

Aus dem Albrecht-Kossel-Institut für Neuroregeneration  
der Universität Rostock  
Direktor: Prof. Dr. med. A. Rolfs

---

**Zystein-aussparende Mutationen bei atypischen CADASIL  
Varianten – ein neues Krankheitsbild ?**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von  
**Ales Dudešek**  
geb. am 17.11.1975 in Zürich (Schweiz),  
aus Rostock

Rostock 01/2011

Dekan: Prof. Dr. med. E. C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Rolfs,  
Albrecht-Kossel-Institut für Neuroregeneration, Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Wree,  
Institut für Anatomie, Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. O. Rieß,  
Institut für Humangenetik (Medizinische Genetik), Universität Tübingen

Datum der Verteidigung: 22.11.2011

# INHALTSVERZEICHNIS:

---

	Seite
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1. CADASIL UND SEINE BEDEUTUNG IN KLINISCHER UND WISSENSCHAFTLICHER HINSICHT</b>	<b>1</b>
<b>1.2. HISTORISCHES ZU CADASIL</b>	<b>2</b>
<b>1.3. EPIDEMIOLOGIE</b>	<b>3</b>
<b>1.4. KLINIK UND KLINISCHE HAUPTMANIFESTATIONEN</b>	<b>4</b>
1.4.1. <i>Migräne (mit Aura)</i>	5
1.4.2. <i>Zerebrale Ischämien, subkortikale ischämische Ereignisse</i>	6
1.4.3. <i>Progressiver kognitiver Abbau und Demenz</i>	8
1.4.4. <i>Psychiatrische Störungen, Apathie</i>	10
1.4.5. <i>Weitere Symptome und Befunde:</i>	10
a) <i>Epileptische Anfälle</i>	10
b) <i>Zerebrale Blutungen</i>	11
c) <i>Akute reversible Enzephalopathie (mit komaähnlichen Episoden)</i>	12
d) <i>Manifestationen im Bereich der Augen und des visuellen Systems</i>	12
e) <i>Hörverlust und olfaktorische Identifikationsdefizite</i>	13
f) <i>Extrazerebrale Manifestationen</i>	13
<b>1.5. ZEREBRALE BILDGEBUNG UND PARAKLINISCHE ZUSATZUNTERSUCHUNGEN</b>	<b>15</b>
1.5.1. <i>Zerebrale MRT-Bildgebung</i>	15
1.5.2. <i>Paraklinische Zusatzuntersuchungen und –Befunde</i>	18
<b>1.6. DIAGNOSTIK UND DIAGNOSESICHERUNG</b>	<b>19</b>
1.6.1. <i>Molekulargenetische Diagnostik</i>	20
1.6.2. <i>Bioptische Diagnosesicherung</i>	20
<b>1.7. THERAPEUTISCHE MÖGLICHKEITEN</b>	<b>22</b>
1.7.1. <i>Symptomatische/symptomorientierte Therapie</i>	22
1.7.2. <i>Risikoreduktion (Schlaganfallprävention)</i>	23
<b>1.8. NOTCH3 – GEN</b>	<b>24</b>
<b>1.9. MUTATIONEN IM NOTCH3 - GEN, MUTATIONSSPEKTRUM CADASIL</b>	<b>24</b>
<b>1.10. PATHOPHYSIOLOGISCHE ASPEKTE VON NOTCH3</b>	<b>26</b>
1.10.1. <i>Notchrezeptoren und Notch-Signaltransduktionssystem</i>	27
1.10.2. <i>Notch3-Rezeptor: Synthese und struktureller Aufbau</i>	27
1.10.3. <i>Notchsignalweg (Notch-Signalling)</i>	29
1.10.4. <i>Notch3-Rezeptor: Expressionsmuster und mögliche physiologische Funktionen</i>	30
1.10.5. <i>CADASIL, ein gestörter Notch3-Signalweg oder ein Protein-Akkumulationsproblem (Notch3-Aggregatopathie) ?</i>	31
1.10.6. <i>Notch3-assoziierte zerebrale Arterio-/Vaskulopathie</i>	33

<b>1.11. SCHLAGANFÄLLE BEI JUNGEN PATIENTEN UND SIFAP</b>	<b>35</b>
1.11.1. Schlaganfall bei jungen Patienten und assoziierte „single-gene“-Erkrankungen	35
1.11.2. SIFAP: Stroke in young Fabry patients	36
<b>1.12. AUSGANGSLAGE ZU BEGINN UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>37</b>
1.12.1. Ausgangslage zu Beginn der Arbeit	37
1.12.2. Zielsetzung der Arbeit	37
<b>2. MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>38</b>
<b>2.1. AUSWAHL DER PATIENTEN</b>	<b>38</b>
<b>2.2. GENETISCHE ANALYSEN/SEQUENZANALYSEN DES NOTCH3 – GENS</b>	<b>38</b>
- Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Vollblut	39
- Fluorophotometrische Konzentrationsbestimmung und Verdünnung der DNA	39
- Automatisierte PCR zur Amplifizierung der gewünschten DNA-Abschnitte	39
-- Grundprinzip der PCR („polymerase chain reaction“)	39
-- Grundprinzip der Touchdown-PCR	40
-- Protokoll für die hier verwendete Touchdown-PCR	41
- Reinigung der PCR-Produkte (ExoSAP Aufreinigung)	42
- Sequenzierungsreaktion (Sequenzierungs-PCR; Cycle Sequencing)	42
-- Grundprinzip der Sequenzierungsreaktion	42
-- Protokoll der Sequenzierungsreaktion (S-PCR)	43
- Reinigung der Sequenzierprodukte	44
- Sequenzierung/Sequenzierungsanalyse	45
- Manuelle Wiederholungen	45
<b>2.3. CHARAKTERISIERUNG VON PHÄNOTYPEN</b>	<b>46</b>
2.3.1. Charakterisierung des Phänotyps der gefundenen Notch3-Mutationen	46
2.3.1. Charakterisierung des Phänotyp-Spektrums von CADASIL-Patienten aus einer eigenen Patientenkohorte	47
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>48</b>
<b>3.1. GENETISCHE ANALYSEN/MUTATIONSANALYSEN</b>	<b>48</b>
3.1.1. Zusammenfassung	48
3.1.2. Vermutliche Mutationen	49
3.2.2. Vermutliche Polymorphismen	49
<b>3.2. FALLBESCHREIBUNGEN und KLINISCH-NEURORADIOLOGISCHER PHÄNOTYP VON PATIENTEN, BEI DENEN EINE HOCHWAHRSCHEINLICHE MUTATION IDENTIFIZIERT WURDE</b>	<b>50</b>
3.2.1. PATIENT 32 P 2629 (SIFAP-ZENTRUM REGENSBURG)	50
3.2.2. PATIENT 17 P 1295 (SIFAP-ZENTRUM LYON)	54
3.2.3. PATIENT 01 P 0052 (SIFAP-ZENTRUM GRAZ)	58
3.2.4. Tabellarische Zusammenfassung: Phänotypen der gefundenen Mutationen	61

<b>3.3. FALLBESCHREIBUNGEN und KLINISCH-NEURORADIOLOGISCHER PHÄNOTYP VON CADASIL-PATIENTEN AUS EINER EIGENEN KOHORTE MIT RELATIV PROTOTYPISCHEM PHÄNOTYP</b>	<b>62</b>
3.3.1. <i>PATIENT S. O.</i>	62
3.3.2. <i>PATIENT M. R.</i>	66
3.3.3. <i>PATIENTIN H. R.</i>	70
3.3.4. <i>PATIENTIN G. C.</i>	73
<b><u>4. DISKUSSION</u></b>	<b>77</b>
<b><u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>86</b>
<b><u>6. ANHANG:</u></b>	<b>88</b>
- ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	88
- TAB. 1: Übersicht „stroke-negative“ Kontrollgruppe	89
- TAB. 2: Übersicht über verwendete Primer	91
- TAB. 3: Umfassende Übersicht über bisher bekannte/publizierte Mutationen im Notch3-Gen	92
- TAB. 4: Übersicht über die in dieser Arbeit gefundenen Mutationen	96
<b><u>7. LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>97</b>
<b><u>8. LEBENSLAUF</u></b>	<b>107</b>
<b><u>9. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</u></b>	<b>109</b>
<b><u>10. DANKSAGUNG</u></b>	<b>110</b>
<b><u>11. THESEN</u></b>	<b>111</b>

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. CADASIL UND SEINE BEDEUTUNG IN KLINISCHER UND WISSENSCHAFTLICHER HINSICHT

CADASIL (das Akronym steht für „Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy“, im Deutschen zu übersetzen mit „zerebrale autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie“) ist eine autosomal-dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung, die auf Mutationen im humanen Gen für Notch3 beruht. Sie manifestiert sich in der Regel mit migräneartigen Kopfschmerzen mit Beginn um das 30. Lebensjahr und rezidivierenden ischämischen Schlaganfällen, die im mittleren Erwachsenenalter einsetzen und zu progredienten neurologischen Ausfällen führen. Weitere bedeutende Kernsymptome sind die Entwicklung von kognitiven Defiziten bis hin zur subkortikalen Demenz sowie psychiatrische Manifestationen. In der zerebralen MRT-Bildgebung lassen sich in der Regel bereits in einem frühen, zum Teil noch präsymptomatischen Krankheitsstadium auffällige Veränderungen der weißen Substanz in Form von multiplen Marklagerläsionen sowie im Verlauf zunehmend lakunäre Infarkte darstellen. Das morphologische Korrelat der Erkrankung ist eine Leukenzephalopathie mit subkortikalen Infarkten infolge einer zerebralen nicht-arteriosklerotischen und nicht-entzündlichen Angiopathie, die vorwiegend kleine bis mittelgroße Hirngefäße betrifft und gekennzeichnet ist durch eine Degeneration von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs: vascular smooth muscle cells) sowie die Ablagerung von sog. granulärem osmiophilen Material (GOM).

Klinische Bedeutung ist der Erkrankung insofern beizumessen, da sie die häufigste Ursache einer hereditär bedingten vaskulären Demenz und eine der häufigsten diagnostizierbaren Ursachen von hereditär bedingten Schlaganfällen bei jungen Erwachsenen darstellt. CADASIL trägt vermutlich zu ca. 1.2 % aller Schlaganfälle im jungen Lebensalter bei und ist ursächlich für bis zu 9 % aller rezidivierenden zerebralen Infarkte verantwortlich. In wissenschaftlicher Hinsicht kann CADASIL – als Vertreter einer klassisch monogenetischen Erkrankung – als Modell für Studien von genetischen und pathophysiologischen Aspekten der Migräne, hereditär bedingten Schlaganfällen, Demenzen sowie zerebralen Mikroangiopathien/ vaskulären Leukenzephalopathien dienen. Im Besonderen ist die Eignung als Modell für die Erforschung der reinen vaskulären subkortikalen Demenz hervorzuheben.

## 1.2. HISTORISCHES ZU CADASIL

1977 stellten Sourander und Walinder eine neue Erkrankung vor, die von ihnen als „hereditäre Multiinfarkt-Demenz“ bezeichnet wurde. Sie berichteten über eine schwedische Familie, in der 5 Mitglieder rezidivierende Schlaganfälle mit Beginn vor dem 40. Lebensjahr erlitten und 4 dieser Patienten eine langsam fortschreitende Demenz in der Abwesenheit einer Bluthochdruckerkrankung entwickelt hatten. Bei der autopsischen Untersuchung fanden sich großflächige Marklagerläsionen und umschriebene subkortikale Infarkte, offensichtlich auf dem Boden einer nicht arteriosklerotischen Angiopathie der kleinen Gefäße ohne Ablagerungen von Amyloid. Unabhängig davon beschrieben Stevens und Kollegen eine familiäre Form einer chronisch vaskulären Enzephalopathie, die überwiegend im jungen Erwachsenenalter beginnt und mit neuropsychiatrischen Symptomen einhergeht (Stevens et al, 1977). Die schwedische Arbeit (Sourander und Walinder, 1977) wurde lange als erster Bericht von CADASIL aufgefasst. Nach einer gründlicheren Analyse der Literatur ist die erste CADASIL-Familie wahrscheinlich bereits 1955 durch van Bogaert (Davous, 1998) beschrieben worden. Zu diesem Zeitpunkt war CADASIL als Krankheitsentität noch nicht bekannt und eine familiäre Form der Binswanger-Krankheit angenommen worden (van Bogaert, 1955). Da sich van Bogaert in seiner Arbeit auf eine Beschreibung einer ähnlichen Erkrankung durch Mutrux (Mutrux, 1951) bezieht, gibt es Hinweise für eine bereits noch frühere erste Darstellung dieser Erkrankung.

Ab Ende der 70er bis in die Mitte der 90er Jahre häuften sich Berichte mit Beschreibungen von jeweils ähnlichen Krankheitsbildern, die vorerst noch verschiedene Bezeichnungen erhielten: „chronic familial vascular encephalopathy“ (Stevens et al., 1977), „hereditary multi-infarct dementia“ (Sonninen und Savontaus, 1987), „autosomal dominant syndrome with strokelike episodes and leukoencephalopathy“ (Tournier-Lasserre et al, 1991), „familial subcortical dementia with arteriopathic leukoencephalopathy“ (Davous and Fallet-Bianco, 1991), „slowly progressive familial dementia with recurrent strokes“ (Salvi et al, 1992) und „a familial disorder with subcortical ischemic strokes, dementia and leukoencephalopathy“ (Mas et al, 1992). Klar herausgearbeitet wurde die Einheitlichkeit des Krankheitsbildes durch die Arbeiten von E. Tournier-Lasserre und M. G. Bousser.

Durch Tournier-Lasserre und Kollegen wurde 1993 der Terminus „Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy“

vorgeschlagen und dankbarerweise dafür auch das Akronym „CADASIL“ geprägt. Mittels genetischen Kopplungsanalysen innerhalb von zwei großen französischen Familien gelang es dieser Arbeitsgruppe 1993 auch, den Krankheitslokus auf das Chromosom 19 (19q12) zu kartieren (Tournier Lasserre et al, 1993). Drei Jahre später konnte dieselbe Gruppe durch Einbezug von 13 zusätzlichen Familien die kritische CADASIL-Region auf ein Intervall von 2 Centimorgan einengen bzw. auf die Chromosomenposition 19p13.1 präzisieren sowie die genetische Homogenität der Erkrankung bekräftigen (Ducros et al, 1996). Mit Hilfe eines Positionsklonierungs-Ansatzes und Nachweis von ersten humanen Mutationen wurde kurze Zeit später Notch3 als das defekthafte Gen hinter der Krankheit identifiziert (Joutel et al, 1996 und 1997). Die Identifizierung des genetischen Defekts erlaubte in der Zukunft nicht nur die Determination des molekularen Hintergrundes, sondern auch die Definition der klinischen Charakteristika von CADASIL.

Die ursprünglich von Sourander und Walinder 1977 beschriebene schwedische Familie wurde in der kürzeren Vergangenheit nochmals detailliert untersucht. Dabei konnten weder Notch3-Mutationen noch CADASIL-spezifisches granuläres osmiophiles Material in den Arterien der Patienten gefunden werden (Low et al, 2007). Retrospektiv muss diese Familie daher an einer anderen vererbten, molekulargenetisch bisher nicht definierten Erkrankung der vaskulären Demenz leiden.

### **1.3. EPIDEMIOLOGIE**

Die genaue Inzidenz und Prävalenz von CADASIL ist unbekannt. Für eine Region im Westen Schottlands wurde die Prävalenz mit 1.98 : 100 000 Einwohner angegeben, unter Berücksichtigung von Familienanamnesen mit Einbezug von Individuen mit vorausgesagter Diagnose auf ca. 4 : 100 000 beziffert (Razvi et al, 2005<sup>a</sup>). Ähnliche Prävalenzdaten finden sich in Finnland (Kalimo et al, 2008). Nach Berechnungen von M. Dichgans (LMU München) liegt die Genträger-Frequenz für Süddeutschland bei ca. 1 : 150 000. Frauen und Männer sind gleich häufig betroffen. Die Erkrankung findet sich weltweit und in allen ethnischen Gruppen, auffallend ist die Vielzahl von Berichten aus Europa (wo auch die ersten CADASIL-Familien beschrieben wurden). Im Rahmen einer molekulargenetischen Untersuchung von Patienten mit lakunären zerebralen Infarkten und gleichzeitig MR-morphologisch imponierender Leukenzephalopathie konnte CADASIL bei ca. 2 % der < 65-jährigen und ca. 11 %



der < 50-jährigen Individuen als zugrunde liegende Erkrankung gefunden werden (Dong et al, 2003).

#### 1.4. KLINIK UND KLINISCHE HAUPTMANIFESTATIONEN

Die klinischen Hauptmanifestationen des CADASIL-Syndroms sind durch folgende 4 Charakteristika zu beschreiben:

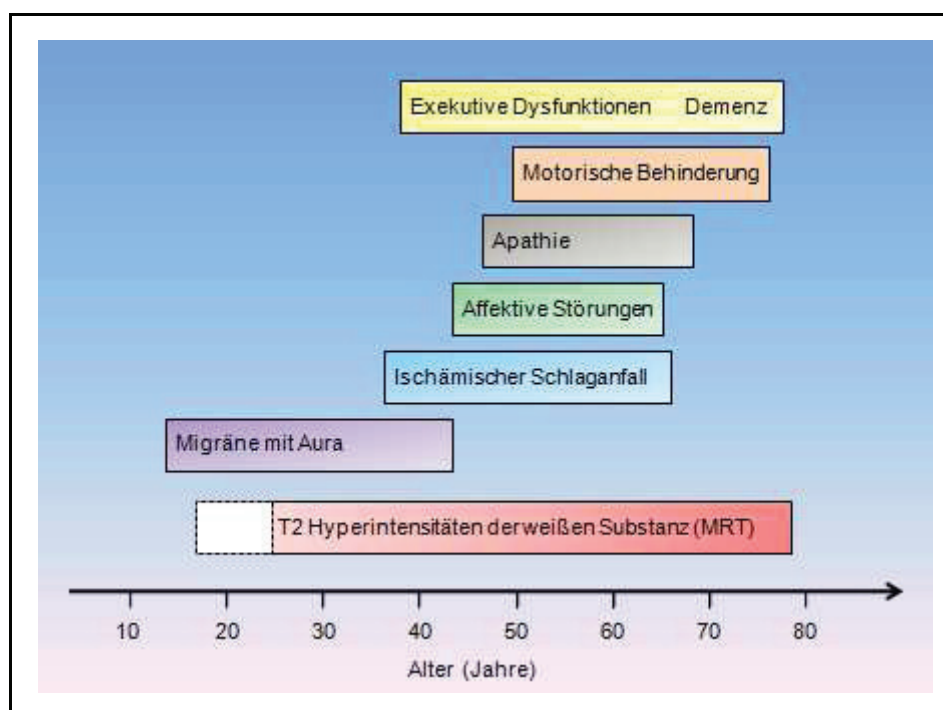
- (1) Migräne-Kopfschmerzen (mit Aura)
  - (2) rezidivierende zerebral-ischämische Ereignisse (TIA`s und/oder Schlaganfälle)
  - (3) psychiatrische Symptome/Störungen und/oder Apathie sowie
  - (4) kognitiver Abbau mit Fortschreiten in eine subkortikale Demenz
- (Chabriat et al, 1995<sup>a</sup>; Dichgans et al, 1998; Opherk et al, 2004; Chabriat et al, 2009).

Erste Symptome von CADASIL entwickeln sich in der Regel in der dritten bis vierten Lebensdekade, können sich aber bereits in der ersten oder erst spät in der siebten Dekade präsentieren. Obwohl jede der o.g. Manifestationen isoliert auftreten kann, entwickeln sie sich in der Regel im sukzessiven temporalen Ablauf mit einer vom Alter und der Erkrankungsdauer abhängigen Variation in Frequenz und Ausprägung. Der prototypische Phänotyp einer CADASIL Erkrankung beginnt mit einer Migräne und zerebralen MRT-Auffälligkeiten in der dritten bis vierten Lebensdekade, gefolgt von ischämischen Schlaganfällen in der fünften Dekade (die Migräne geht den ischämischen Insulten in der Regel um ca. 10 Jahre voraus), einer subkortikalen Demenz in der sechsten Dekade und letztendlich dem Tod während der siebten Dekade (Bousser et al, 1994; Chabriat et al 1995<sup>a</sup>; Dichgans et al, 1998; Vahedi et al 2004; Chabriat et al 2009) (Vgl. **Abb. 1**).

Das phänotypische Spektrum und der Verlauf von CADASIL sind allerdings ausgesprochen pleomorph und variabel, sowohl intrafamiliär wie auch interfamiliär. Sogar im Falle eines monozygoten Zwillingspaares konnten differierende klinische Phänotypen gefunden werden (Mykkänen et al, 2008). Neben Fällen mit frühem Beginn und rasch fortschreitender Behinderung gibt es sehr gutartige Verläufe mit langjähriger Beschwerdefreiheit. Eine frühe Erstmanifestation bedeutet dabei nicht notwendigerweise eine rasche Erkrankungsprogression. Umgekehrt ist ein zunächst asymptomatischer Verlauf kein Ausschluss einer Krankheitsprogression, da asymptomatische Individuen sog. „stille“ MRT-Läsionen akkumulieren können, die später zu einem kognitiven Abbau beitragen können.

Die mittlere Erkrankungszeit von der klinischen Erstmanifestation (in den meisten Studien durch die erste TIA bzw. den ersten definitiven Schlaganfall determiniert) bis zum Tod wird mit ca. 20-25 Jahren beziffert (Streuung zwischen 3 und 43 Jahren), das mittlere Todesalter beträgt 60-65 Jahre (Streuung 30-80 Jahre). (Chabriat et al, 1995<sup>a</sup>; Dichgans et al, 1998). Opherk und Mitarbeiter (2004) berichteten dabei über statistisch signifikante Unterschiede zwischen Männern und Frauen sowohl hinsichtlich Erkrankungsdauer vom ersten Schlaganfall bis zum Tod (6.6 Jahre Differenz; Männer: 19.3 vs. Frauen: 25.9 Jahre) wie auch Todesalter (6.1 Jahre Differenz; Männer: 64.6 vs. Frauen: 70.7 Jahre).

**Abb. 1: Typische Hauptmanifestationen von CADASIL im zeitlichen Verlauf:**



#### 1.4.1. Migräne (mit Aura)

Migräne-Kopfschmerzen sind ein häufiges und anamnestisch wichtiges Frühsymptom der Erkrankung. Insgesamt leiden ca. 40 % der CADASIL Patienten an einer Migräne, der in größeren europäischen Studien angegebene Anteil an betroffenen Individuen bewegt sich zwischen 22 und 64 % (Chabriat et al, 1995<sup>a</sup>; Dichgans et al 1998; Markus et al, 2002; Vahedi et al, 2004). Wenn Migräne auftritt, ist sie üblicherweise das früheste Symptom der Erkrankung. Das mittlere Manifestationsalter liegt bei 30 Jahren, das Auftreten kann jedoch von der frühen

Kindheit bis jenseits des mittleren Erwachsenenalters variieren (6 – 54 Jahre; Chabriat et al, 1995<sup>b</sup>; Dichgans et al, 1998; Desmond et al, 1999; Vahedi et al, 2004).

In der Majorität der Fälle ist die Migräne mit einer Aura assoziiert (bis zu 90%; Dichgans et al, 1998). In ca. 40-50 % erleiden die Patienten dabei klassische bzw. typische Aurasymptome, die sich in Form von visuellen, sensorischen, motorischen oder aphasischen Ausfällen sowie verschiedenen Kombinationen davon äußern können. In einem auffallend hohen Anteil von ca. 50-60 % finden sich atypische oder besondere Formen der Aura, zu nennen sind prolongierte oder außergewöhnlich schwere Auren, Bilder einer basilären oder hemiplegischen Migräne oder isolierte Auren ohne Kopfschmerzen (Vahedi et al, 2004). Auch sind Patienten mit einer Migräne ohne Aura sowie mit nicht-migränösen Kopfschmerzen beschrieben worden. Im Gegensatz zur Migräne mit Aura scheinen diese beiden Kopfschmerzformen allerdings etwa in gleich häufiger Frequenz wie in der Normalbevölkerung vorzukommen.

Generell ist die Migräne-Attackenfrequenz von verschiedenen Patienten hochvariabel und kann sich interessanterweise im Verlaufe der Erkrankung verändern. Viele Patienten berichten über einen Anstieg der Attackenfrequenz vor und eine Abnahme der Frequenz sowie der Intensität der Kopfschmerzen nach dem ersten Schlaganfallereignis (Dichgans et al, 1998). Auch entwickeln Patienten, die als Erstsymptom einen Schlaganfall präsentieren, in der Folge weniger häufig Migräne-Kopfschmerzen.

In einigen Familien scheint die Migräne das prominent vorherrschende Symptom der Erkrankung zu sein (Verin et al, 1995; Chabriat et al, 1995<sup>b</sup>; Mellies et al, 1998).

#### *1.4.2. Zerebrale Ischämien, subkortikale ischämische Ereignisse*

Das häufigste Leitsymptom der CADASIL-Erkrankung sind im mittleren Lebensalter einsetzende und rezidivierende zerebrale Durchblutungsstörungen in Form von transitorisch-ischämischen Attacken (TIA`s) oder Schlaganfällen. In den größten klinischen Studien haben 83 % (172/206) der Patienten in der symptomatischen Phase TIA`s oder Schlaganfälle erlitten (Chabriat et al, 1995<sup>a</sup>; Dichgans et al, 1998; Peters et al, 2004<sup>a</sup>). Das Alter beim klinischen Einsetzen von zerebralen Ischämien variiert mit einer großen Spannweite von 10 bis 70 Jahren (Chabriat et al, 1995<sup>a</sup>, Dichgans et al, 1998; Desmond et al, 1999; Peters et al, 2004<sup>a</sup>; Opherk et al, 2004; Granild-Jensen et al, 2009). Das mittlere Manifestationsalter liegt innerhalb der 5.

Lebensdekade mit 46.1 (nach Dichgans et al, 1998) resp. 49.3 Jahren (nach Chabriat et al, 1995<sup>a</sup>). In beinahe der Hälfte der Patienten ist das ischämische Ereignis das erste Symptom von CADASIL (Dichgans et al, 1998; Desmond et al, 1999).

Im frühen Stadium der Erkrankung bestehen zerebrale Ischämien typischerweise aus mildereren TIA's, deren Symptomatik sich schnell zurückbilden kann und die dadurch klinisch eventuell nur schwer von migränösen Auren oder hemiplegischen Attacken unterschieden werden können. Die Mehrzahl der ischämischen Ereignisse lassen sich klassischen lakunären Syndromen zuordnen (entsprechend der relativ geringen Größe von subkortikalen Infarkten). Letztere können sich als rein motorische („pure motor stroke“), rein sensorische („pure sensory stroke“), kombinierte sensomotorische („sensorimotor stroke“) Ausfälle, als ataktische Hemiparese oder als „dysarthria-clumsy hand syndrome“ äußern (Chabriat et al 2003; Kalimo et al, 2008). Die ischämischen Ereignisse betreffen beinahe ausschließlich subkortikale Strukturen, wobei vereinzelt auch von (möglicherweise koinzidenten) territorialen Schlaganfällen berichtet wurde, die die Versorgungsgebiete der großen Hirnarterien betrafen und den Kortex mitbeteiligten (Rubio et al, 1997; Gong et al, 2010). Kleine asymptotische ischämische Läsionen sind nicht ungewöhnlich und werden gemäß prospektiven Evaluationen in ca. 10 % der Patienten gefunden (Moon et al, 2003; O`Sullivan 2003). Multiple Infarkte können auch simultan auftreten (Gobron et al, 2006).

Die meisten Patienten (um 80 %) offenbaren im Verlauf rekurrende zerebrale Ischämien, die permanente Defizite hinterlassen können. Letztere können akkumulieren und zu einer stufenweisen Progression bis hin zu einer schweren Behinderung führen. Mit Fortschreiten der Erkrankung entwickelt sich konsekutiv oft (31-52 %) ein pseudobulbärer Status (mit pseudobulbärer Paralyse im Sinne einer Dysarthrie, Dysphagie, gesteigertem Masseterreflex, emotionaler Labilität und Affektinkontinenz), häufig in Verbindung mit einer spastischen Tetraparese mit entsprechenden Gangstörungen und eingeschränkter Mobilität sowie einer Urininkontinenz (Chabriat et al, 1995<sup>a</sup>; Ragno et al, 1995; Dichgans et al 1998; Opherk et al, 2004). Insgesamt seltener ist auch die Entwicklung von vaskulären Parkinsonsyndromen und weiteren extrapyramidalen Bewegungsstörungen infolge von Infarkten im Basalganglienbereich beschrieben worden (Van Gerpen et al, 2003; Miranda et al, 2006; Wegner et al, 2007). Im Alter von 60 Jahren erreichen über 50

%, mit 65 Jahren insgesamt 63 % der Patienten einen Behinderungsgrad von 4 auf der Rankin Skala (Graduierung des Outcomes nach Hirninfarkten von 0-5 nach Rankin, 1987), der einer mäßigen bis schweren Behinderung entspricht bzw. einer notwendigen Hilfestellung bei den täglichen Verrichtungen und beim Gehen gleichzusetzen ist (Dichgans et al, 1998).

Die zerebralen Schlaganfälle ereignen sich in der Regel – und insbesondere im jungen Lebensalter - in Abwesenheit von klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren (Tournier-Lasserre et al, 1993; Bousser et al, 1994; Chabriat et al, 1995<sup>a</sup>, Desmond et al 1999). In einer neueren Studie, in der eine große, prospektiv rekrutierte Kohorte von 127 CADASIL-Patienten analysiert wurde, konnte allerdings bei 20 % der Betroffenen eine arterielle Hypertonie sowie in ca. 50 % der Fälle Risikofaktoren wie hohe Cholesterinwerte und Rauchen gefunden werden. Diese Studie legt darüberhinaus signifikante Assoziationen von fortgesetztem Rauchen mit einem früheren Auftreten von Schlaganfällen sowie einer Hyperhomozysteinämie mit einem frühen Manifestationsalter der Migräne nahe (Singhal et al, 2004).

#### *1.4.3. Progressiver kognitiver Abbau und Demenz*

Kognitive Defizite sind nach zerebrovaskulären Ereignissen die zweithäufigste klinische Manifestationsform der CADASIL-Erkrankung. Das Spektrum reicht von diskreten kognitiven Einschränkungen mit vorwiegend exekutiven Funktionsstörungen bis hin zu einer schweren, typischerweise subkortikalen Demenz, die im kognitiven Profil einer sporadischen subkortikalen ischämischen vaskulären Demenz („SIVD“) bemerkenswerterweise sehr ähnlich ist (Charlton et al, 2006; Dichgans, 2009). Das Hauptmanifestationsalter der subkortikalen Demenz liegt in der 5.-7. Lebensdekade, 60-80 % (bzw. mindestens zwei Drittel) der Patienten werden im Alter von 60 Jahren das Stadium einer Demenz entwickelt haben (Dichgans et al, 1998; Opherk et al, 2004). Erste, subtile Zeichen kognitiver Veränderungen finden sich in der Regel in Form von Störungen von exekutiven Funktionen („dysexecutive syndrome“) und einer Verlangsamung der kognitiven Verarbeitungsgeschwindigkeit („processing speed“). Störungen der Aufmerksamkeit, des Arbeitsgedächtnisses und eine reduzierte Wortflüssigkeit („verbal fluency“) ergänzen das bereits in frühen Stadien relativ charakteristische kognitive Profil von CADASIL-Patienten und unterstreichen die prominente Beeinträchtigung von frontalen, insbesondere exekutiven Kontrollfunktionen (Amberla et al, 2004; Peters et

al, 2005; Buffon et al, 2006; Charlton et al 2006). Mittels geeigneten neuropsychologischen Tests lassen sich diese Veränderungen schon bei relativ jungen Patienten (eine exekutive Dysfunktion wurde bei allen Individuen im Alter von 30-50 Jahren in einer Serie von 42 symptomatischen Patienten detektiert; Buffon et al, 2006) und bereits vor dem ersten Schlaganfall aufdecken (Taillia et al, 1998; Amberla et al, 2004; Charlton et al, 2006). Die Entwicklung eines Vollbildes einer Demenz vom subkortikalen Typus kann gekennzeichnet sein durch ein ausgeprägtes dysexekutives Syndrom (mit Störung im Bereich Zielformulierung, Initiation, Planung, Organisation, Abstraktion, Umstellfähigkeit/Flexibilität, Sequenzierung und Exekution), Konzentrations- und Aufmerksamkeitsdefizite, Störungen von visuo-räumlichen Fähigkeiten (in frühen Stadien oft lange erhalten) sowie zumeist moderat ausgeprägte Gedächtnisstörungen. Das semantische Gedächtnis ist oft erhalten, Einschränkungen des episodischen Gedächtnisses werden typischerweise begleitet von einem gestörten freien Abruf von Gedächtnisinhalten („recall“, der sich durch externe Hinweise verbessern lässt), während das Wiedererkennen („recognition“) auch bei älteren und dementen Patienten oft noch intakt ist (Buffon et al, 2006). Hinzutreten können Persönlichkeitsveränderungen, Verhaltensauffälligkeiten, eine Apathie, Affektstörungen sowie mit subkortikalen Ischämien konsistente neurologische Zeichen (wie z.B. Zeichen einer milden Beteiligung des oberen Motoneurons, leichte extrapyramidale Zeichen, Gangschwierigkeiten, Dranginkontinenz, später pseudobulbäre Paralyse). Wie bei anderen subkortikalen Demenzen ist die Sprache meistens gut erhalten, eine schwere Aphasie, Apraxie oder Agnosie ist selten (Chabriat et al, 1995<sup>a</sup>; Dichgans et al 1998; Taillia et al, 1998; Opherk et al, 2004; Peters et al, 2004<sup>a</sup> und 2005<sup>b</sup>; Buffon et al, 2006; Dichgans, 2009).

Einhergehend mit progressiv akkumulierenden ischämischen Hirngewebsschäden schreitet der kognitive Abbau bei CADASIL-Patienten mit dem Alter üblicherweise langsam fort. Zum Teil auf diesen Prozess aufgesetzt kann es zu stufenweisen, relativ plötzlichen und drastischen Verschlechterungen der Kognition kommen, zumeist im Rahmen von akuten ischämischen Episoden mit fokal-neurologischen Symptomen. Amberla und Mitarbeiter (2004) beobachteten bei CADASIL-Patienten zwischen dem „Prä“-Stadium vor dem ersten evidenten Schlaganfall und dem folgenden „Post“-Stadium signifikante Unterschiede in Bezug auf spezifische exekutive Funktionen wie Verarbeitungsgeschwindigkeit und die kognitive



Umstellungsfähigkeit. In ca. 5-15 % der Fälle findet sich aber auch ohne klinisch fassbare Schlaganfälle ein Fortschreiten in eine vaskuläre Demenz. Bei dieser Minorität von Patienten lassen sich MR-morphologisch jedoch stumme zerebrale Infarkte nachweisen, welche zu progredienten Läsionen der weißen Substanz bzw. subkortikalen Strukturen beitragen (Mellies et al, 1998; Desmond et al, 1999; Kalimo et al, 2008).

#### *1.4.4. Psychiatrische Störungen, Apathie*

Die Prävalenz von psychiatrischen Störungen bei CADASIL-Patienten wird in der Literatur mit 20-41 % angegeben (Chabriat et al, 1995<sup>a</sup>; Dichgans et al, 1998; Desmond et al, 1999; Valenti et al, 2008). Üblicherweise treten psychiatrische Symptome erst zum Vorschein, wenn sich bereits andere Symptome etabliert haben. Die deutlich am häufigsten berichteten psychiatrischen Manifestationen sind affektive Störungen („Mood Disorders“, ca. 23-24 %). Innerhalb dieser Krankheitsgruppe dominiert das Bild der „Major Depression“ (ca. 21 %; Desmond et al, 1999; Amberla et al, 2004; Peters et al, 2005<sup>b</sup>; Singhal et al 2005), während eine milde chronische Depression (sog. Dysthymie) und bipolare Störungen viel seltener sind (Valenti et al, 2008). Nur eine geringe Zahl von CADASIL-Patienten leidet an einer anderen Form einer psychiatrischen Störung. Beschrieben sind hier u.a. psychotische Störungen (manische oder schizophreniforme Bilder), Angst-, Anpassungs-, Persönlichkeits- und Verhaltensstörungen sowie Abhängigkeitserkrankungen (Valenti et al, 2008).

Die Apathie, definiert als Mangel an Motivation mit einem verminderten willkürlichen oder zielgerichteten Verhalten, wurde erst kürzlich als wichtiges und häufiges Manifestationsmerkmal von CADASIL erkannt. Sie kann im Erkrankungsverlauf bei bis zu 40 % der Patienten vorhanden sein und auch unabhängig von einer Depression auftreten (Reyes et al, 2009).

#### *1.4.5. Weitere Symptome und Befunde*

Es gibt darüberhinaus einige - in der Regel eher seltenere und spezielle - Symptome und Störungsbilder, die bei CADASIL-Patienten gefunden werden konnten:

##### *a) Epileptische Anfälle:*

Bei ca. 5-10 % der Patienten kommt es zum Auftreten von epileptischen Anfällen, in der Regel erst im späteren Verlauf der Erkrankung (mittleres Manifestationsalter liegt

bei ca. 50 Jahren, Streuung 23-63 Jahre; Dichgans et al, 1998). Ihre Natur und Pathophysiologie ist nur dürftig verstanden. Oft sind den epileptischen Anfällen klinisch fassbare Schlaganfälle vorausgegangen, so dass sie am ehesten sekundär zu ischämischen Schäden bzw. Defekten zu werten sind (Malandrini et al, 1997; Dichgans et al, 1998; Haan et al, 2007; Valko et al, 2007). Anfallsrezidive sind häufig (ca. 50 %).

#### b) *Zerebrale Blutungen*

Größere intrazerebrale parenchymatöse Blutungen („intracerebral hemorrhage“: ICH bzw. „parenchymal brain hemorrhage“: PBH) wurden bei CADASIL-Patienten vereinzelt beobachtet (Sourander und Walinder, 1977; Baudrimont et al, 1993; Maclean et al, 2005; Ragoschke-Schumm et al, 2005), sind aber insgesamt unter Berücksichtigung des fehlenden Nachweises in großangelegten Serien als ungewöhnlich und eher selten einzustufen (Chabriat et al, 1995<sup>a</sup>; Dichgans et al, 1998). Eine relativ hohe Rate von symptomatischen Blutungen wurde in kleineren asiatischen Fallserien beschrieben (bis zu 25 % in einer koreanischen Population von 20 Patienten (Choi et al, 2006), 23.8 % in einer taiwanesischen/chinesischen Kohorte von 21 Patienten (Lee et al, 2009), wobei hier praktisch bei allen Patienten ein arterieller Hypertonus als möglicher konfundierender Faktor vorlag). In wenigen Fällen scheint eine antikoagulatorische Behandlung eine fatale zerebrale Hämorrhagie verursacht oder zumindest begünstigt zu haben (Kalimo et al, 2002; Werbrouck und de Bleecker, 2006; Oh et al, 2008).

Zerebrale Mikroblutungen („cerebral microbleeds“: CM) sind dagegen als relativ häufiger MR-morphologischer Befund zu finden, bleiben aber scheinbar klinisch stumm bzw. weisen kein unmittelbar erkennbares klinisches Korrelat auf. Sie kommen bei ca. 1/3 aller symptomatischen CADASIL-Patienten vor, wobei die Häufigkeitsangabe – sicherlich auch stark abhängig von Studienpopulation und -Setting – von 31 % (Lesnik Oberstein et al, 2001) bis zu 69 % (Dichgans et al, 2002<sup>b</sup>) variiert. Zerebrale Mikrohämmorrhagien können in hämsensitiven MR-Sequenzen als zumeist multifokale, kleine Areale mit Signalverlust visualisiert werden und kommen bevorzugt in kortiko-subkortikalen Regionen, in der subkortikalen weißen Substanz, im Hirnstamm, in den Basalganglien und hier v.a. im Thalamus vor (Lesnik Oberstein et al, 2001; Dichgans et al, 2002<sup>b</sup>). Kontrovers diskutiert wird, ob sie ein erhöhtes Risiko für spätere intrazerebral-parenchymale



Blutungen darstellen und ob die zusätzlich häufig notwendige Verwendung von Thrombozytenaggregationshemmern bei CADASIL-Patienten insbesondere im Falle des Vorliegens von Mikroblutungen dieses Risiko noch erhöht.

*c) Akute reversible Enzephalopathie (mit komaähnlichen Episoden)*

Bei einer relativ kleinen Anzahl von CADASIL-Patienten ist die Entwicklung einer akuten reversiblen Enzephalopathie beschrieben worden, die mit Fieber, Kopfschmerzen, Konfusionen, einem gestörtem Bewusstsein bis hin zu einem Koma-ähnlichen Zustand sowie epileptischen Anfällen einhergehen und in der Regel episodenhaft 7 bis 14 Tage anhalten kann (Chabriat et al, 1995<sup>b</sup>; Feuerhake et al, 2002; Le Ber et al 2002; Schon et al, 2003). In einer britischen Prävalenzstudie ist diese akute reversible Enzephalopathie bei 6 von 70 Individuen beschrieben worden, in diesem Kollektiv typischerweise mit einer Migräneattacke mit Aura beginnend (Schon et al, 2003). Die Enzephalopathie reflektiert möglicherweise eine intermittierende Dysfunktion der Bluthirnschranke auf dem Boden der CADASIL-Vaskulopathie.

*d) Manifestationen im Bereich der Augen und des visuellen Systems:*

CADASIL-Patienten können ein relativ weites Spektrum von objektivierbaren, abnormen ophthalmologischen Befunden aufweisen, die scheinbar aber nur geringe funktionelle Konsequenzen und keine wesentliche klinische Signifikanz besitzen. Im Besonderen sind retinal-vaskuläre Veränderungen zu erwähnen, die Verengungen der Arteriolen, ein vaskuläres „Sheathing“, vermehrte Gefäßwandreflexe, arteriovenöse Kerbungen mit zum Teil assoziierten Okklusionen von retinal-venösen Ästen sowie fluoreszenzangiographisch irreguläre retinale Gefäßfüllungen umfassen können (Robinson et al, 2001; Haritoglou et al, 2004; Roine et al, 2006; Liu et al, 2008). Interessanterweise scheinen in der Regel zumindest im Bereich der retinalen arteriellen Gefäße keine Okklusionen oder resultierende retinale Infarkte vorzukommen. Vaskuläre Veränderungen sind nicht ausschließlich auf die Retina begrenzt und können auch die choroidale (Robinson et al, 2001, Haritoglou et al, 2004) sowie die Sehnervkopf-versorgende Vaskulatur (Rufa et al, 2004 und 2005) betreffen, bleiben in der Regel aber klinisch stumm. Sehstörungen oder Gesichtsfeldeinschränkungen/Hemianopsien werden bei CADASIL-Patienten offensichtlich nur im Rahmen von ischämischen zerebralen Infarkten (Roine et al,

2006; Cumurciuc et al, 2004), von Migräneattacken mit visuellen Auren oder in Einzel-Fällen in Form einer anterioren ischämischen Optikusneuropathie (Rufa et al, 2004<sup>a</sup>) beobachtet.

e) *Hörverlust und olfaktorische Identifikationsdefizite*

Bei einigen Patienten wird ein sensorineuronaler Hörverlust als mögliches zusätzliches klinisches Korrelat von CADASIL beschrieben (Phillips et al, 2005; Scheid et al, 2008). Eine erst kürzlich erschienene Arbeit legt eine reduzierte Fähigkeit zur Erkennung/Diskrimination von olfaktorischen Reizen als mögliches Krankheitssymptom nahe, vermutlich auf dem Boden von vaskulären Läsionen bzw. einer Dysfunktion in den frontotemporalen Arealen (Lee et al, 2010).

f) Extrazerebrale Manifestationen:

Klinisch fassbare extrazerebrale bzw. nicht-zentralneurologische Manifestationen der Erkrankung konnten bisher nicht mit zweifelsfreier Sicherheit beschrieben werden, obwohl CADASIL als systemische Arteriopathie betrachtet und eine Multiorganbeteiligung zumindest strukturell nachgewiesen werden konnte (Myokard, Retina, Haut, Muskel, Nerven (Cumurciuc et al, 2006<sup>a</sup>; Goebel et al, 1997)). Mögliche Ausnahmen bilden:

- *Myokardischämien, Herzrhythmusregulationsstörungen*: Ein erhöhtes Risiko für Myokardischämien/-infarkte wurden in einer kleineren klinisch-elektrokardiographisch basierten Studie als unterdiagnostiziertes Merkmal der Erkrankung postuliert (Lesnik Oberstein et al, 2003), letztendlich konnte diese Beobachtung in weiteren Studien nicht repliziert werden (Cumurciuc et al, 2006<sup>a</sup>). Daten von neueren Arbeiten legen allerdings eine Störung des kardialen autonomen Nervensystems (verminderte Herzratenvariabilität bzw. erhöhte zeitliche Dispersion der kardialen Repolarisation gemessen mit QT-Variabilitätsindex) bei CADASIL-Patienten nahe, woraus die Autoren ein erhöhtes Risiko für lebensbedrohliche Arrhythmien und eine mögliche Erklärung für die erhöhte Inzidenz von plötzlichen unerwarteten Todesfälle ableiten (Rufa et al, 2007; Piccirillo et al, 2008). Die Frage nach einer klinisch signifikanten Beteiligung von Myokard bzw. kardialen Nervensystem im Rahmen von CADASIL kann letztendlich noch nicht hinreichend beantwortet werden.

- *Nierenfunktionsstörung*: Obwohl eine Nephroangiosklerose mit Präsenz von granulärem osmiophilen Material in den Nieren v.a. feingeweblich häufig

nachgewiesen werden kann, ist eine manifeste und mit CADASIL in Verbindung gebrachte chronische Nierenerkrankung in der Literatur erst einmalig beschrieben worden (Guerrot et al, 2008).

*- Neuropathien und neuromuskuläre Funktionsstörungen:*

Periphere Polyneuropathien sind als extrazerebrale, allerdings subklinische Manifestation von CADASIL beschrieben worden. In einer kleinen Studie konnte bei 7 von 11 CADASIL-Patienten elektrophysiologisch eine zumeist sensomotorische, vorwiegend axonale Polyneuropathie mit relativ milder Ausprägung nachgewiesen werden, bei 3 Patienten darüberhinaus durch eine Suralisnervbiopsie eine vorwiegend axonale, weniger demyelinisierende Neuropathie histologisch gesichert werden (Sicurelli et al, 2005). Eine größere, elektroneurographisch-basierte Studie von 47 koreanischen Patienten konnte eine periphere Neuropathie nicht als sicherer Teil des CADASIL-Phänotyps belegen (Kang et al, 2009). Klinisch relevante Polyneuropathien, die in eindeutiger Relation zum CADASIL-Syndrom stehen, sind nach unserem Wissen bisher nicht beschrieben worden.

Als weiterer bemerkenswerter Aspekt ist zu erwähnen, dass es Hinweise für eine Beteiligung der Skelettmuskulatur gibt, die offensichtlich ohne klinisch manifeste Zeichen einer Myopathie vorherrschen kann. Muskuläre Auffälligkeiten wurden mit mitochondrialen Dysfunktionen in Verbindung gebracht, da einige muskelbiopsisch untersuchte CADASIL-Individuen hierfür suggestive strukturelle und histochemische Veränderungen aufwiesen (z. B. mitochondriale Myopathie mit „ragged red fibers“, ultrastrukturell abnorme Mitochondrien, reduzierte Cytochrom-C-Oxidase (COX)-Anfärbung (Finnila et al, 2001; de la Pena 2001; Malandrini et al, 2002; Dotti et al, 2004, Schroder et al, 2005)). Interessanterweise wurde bei einzelnen CADASIL-Patienten eine erhöhte Frequenz an Mutationen in der mitochondrialen DNA im Vergleich zu Kontrollsubjekten gefunden (Annunen-Rasila et al, 2006). Ursache und biologische Relevanz dieser scheinbar vermehrten mitochondrialen Mutationsfrequenz bzw. der auf eine mitochondriale Dysfunktion hinweisenden Befunde bleiben gegenwärtig unklar. Möglicherweise handelt es sich hier um ein Epiphänomen der CADASIL-Erkrankung, zumindest denkbar erscheint eine Induktion von mitochondrialen Mutationen durch einen vermehrten oxidativen Stress, z.B. infolge einer mit der Arteriopathie assoziierten chronischen „low grade“-Hypoxie.

## 1.5. ZEREBRALE BILDGEBUNG UND PARAKLINISCHE ZUSATZUNTERSUCHUNGEN

### 1.5.1. Zerebrale MRT-Bildgebung

Für die Diagnose ist meist der bildgebende Befund der kernspintomographischen Untersuchungen des Neurokraniums wegweisend. Eine Leukenzephalopathie mit multiplen T2-Hyperintensitäten im subkortikalen Marklager sowie umschriebene subkortikale Ischämien sind neuroradiologische Hauptbefunde (Vgl. **Abb. 2**).

- *T2-hyperintense Läsionen („white matter hyperintensities“ = WMH)*: Zu Beginn der Erkrankung zeigen sich in den T2- oder FLAIR-gewichteten Aufnahmen vereinzelte, punktförmig oder nodulär konfigurierte, zunächst meist in periventrikulären Arealen und im Centrum semiovale gelegene Marklagerhyperintensitäten („white matter hyperintensities“), welche in der Folge an Menge und Größe zunehmen. Die T2-hyperintensiven Läsionen der weißen Substanz werden zunehmend diffus und konfluierend, in fortgeschrittenen Fällen kann weitgehend symmetrisch das gesamte Marklager beider Hemisphären betroffen sein (= Leukoaraiosis). Nur ein Teil dieser Veränderungen erscheint in den T1-gewichteten Aufnahmen zu einem variablen Grad hypointens, aber mit einem klar vom Liquor abgrenzbaren Signal (Chabriat et al, 1998).

Die T2- und FLAIR-Hyperintensitäten finden sich am häufigsten im periventrikulären und tiefen Marklager (zusammengenommen über 96 %; Desmond et al, 1998). Darüberhinaus sind Prädilektionen für folgende Lokalisationen hervorzuheben: Signalalterationen im anterioren Temporalpol (sog. „O`Sullivans sign“) sind häufig und gelten als sensitiver Prädiktor bzw. diagnostischer Hinweis für das Vorliegen von CADASIL (O`Sullivan et al, 2003). Die Beteiligung des temporalen Poles bzw. der temporopolen weißen Substanz ist als charakteristisches neuroradiologisches Merkmal vorgeschlagen worden, das am besten von Läsionsmustern diskriminiert, die im Rahmen von sporadischen vaskulären Leukenzephalopathien anderer Genese gesehen werden können (Auer et al, 2001; O`Sullivan, 2001 und 2003, Tomimoto et al, 2006). Die Präsenz von Hyperintensitäten in der Capsula externa ist ein anderer nützlicher, aber weniger spezifischer Marker von CADASIL. Als eine weitere Prädilektionsstelle werden Marklageranteile des superioren Frontallappens angesehen (Dichgans et al, 1999; Auer et al, 2001, Okeda et al, 2002), wo sich die Läsionen wie auch in den temporalen Regionen auf oberflächliche subkortikale

Bereiche einschließlich der U-Fasern ausdehnen können. Weiterhin häufig sind Balkenläsionen bzw. Signalalterationen im Corpus callosum, die zur Fehldiagnose einer demyelinisierenden Erkrankung wie z.B. der Multiplen Sklerose verführen können, wobei sich bei letzterer im Gegensatz zu CADASIL keine Beteiligung von Basalganglien und Thalami finden lässt (Coulthard et al, 2000; Chawda et al, 2000; O'Sullivan et al, 2001). Hirnstammläsionen sind in der Regel etwas seltener, aber wenn vorhanden typisch in der Verteilung: Die Pons ist dann in der Regel praktisch immer und häufiger als das Mesencephalon und die Medulla oblongata involviert (Chabriat et al, 1995<sup>a</sup> und 1998). Äußerst selten betroffen – wenn nicht sogar ausgespart - sind das Kleinhirn (< 3-6 %; Chabriat et al, 1998; Dichgans et al, 1999) und die Hirnrinde (max. 3 %; Rago et al, 1995; Chabriat et al, 1998; Auer et al, 2001). Das cervikale Rückenmark zeigt bis auf gelegentliche Atrophien keine Signalabnormitäten und kann deshalb als Hilfe zur Unterscheidung von demyelinisierenden Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose herangezogen werden (Rocca et al, 2001).

- *Lakunäre subkortikale Infarkte*: Lakunäre Infarkte von variabler Form, Größe und Zahl begleiten typischerweise die oben beschriebenen Veränderungen, in der Regel etwas später im Verlauf auftretend. Wie bei den sporadischen Mikroangiopathien finden sich deshalb bei CADASIL neben den mehr flächigen, diffusen Marklagerveränderungen auch umschriebene, mehr demarkierte, zum Teil auch zystisch umgewandelte Läsionen, die T1-gewichtet mit einem herabgesetztem Signal (liquorisointens in der T1- und T2-Wichtung) erscheinen und lakunären Infarkten entsprechen. Lakunäre Infarkte stellen sich bevorzugt im periventrikulären und tiefen Marklager, den Basalganglien (inkl. Thalamus), der Capsula interna und in der Pons dar. Die Frequenz der lakunären Infarkte steigt mit zunehmendem Alter: Bei Individuen unter dem 30. Lebensjahr werden sie in weniger als 20 % gefunden, bei Patienten über 50 Jahre in mehr als 80 % (van den Boom, 2003).

- *Zerebrale Mikroblutungen (CM: cerebral microbleeds)*: Zerebrale Mikroblutungen können in T2\*-gewichteten bzw. Gradienten-Echo MR-Bildgebungen je nach Studie bei 25-69 % der CADASIL-Patienten gefunden werden (Lesnik Oberstein et al, 2001; Dichgans et al, 2002<sup>b</sup>; Choi et al, 2006; Lee et al, 2009). Sie erscheinen in den hämsensitiven Sequenzen als kleine subcentimetergroße Areale mit hypointensem Signal oder Signalverlust, zumeist als multiple bzw. multifokale Läsionen (im Mittel ca. 9 zerebrale Mikroblutungen pro Patient gemäß einer Studie von van den Boom et

al, 2003). Sie können supra- oder infratentoriell vorkommen, präferentiell liegen sie in kortiko-subkortikalen Regionen, in der subkortikalen weißen Substanz, im Hirnstamm (Pons) und sehr häufig in den Basalganglien/Thalami.

Zerebrale Mikroblutungen treten in der Regel außerhalb von T2-hyperintensen oder ischämischen Läsionen auf und werden letztendlich als Ischämie-unabhängige Manifestation der CADASIL-Arteriopathie angesehen, auch wenn ihr genauer Entstehungsmechanismus nicht vollständig verstanden ist. Sie akkumulieren und korrelieren signifikant mit dem Alter des Patienten (Lesnik Oberstein et al, 2001; Dichgans et al, 2002<sup>b</sup>), daneben legen einzelne Studien – in den Ergebnissen nicht durchgehend konsistent – eine Zunahme ihrer Frequenz mit dem Blutdruck, der HbA1c-Konzentration, dem Ausmaß der Leukenzephalopathie (T2-gewichtete Läsionen) und der Verwendung von Thrombozytenaggregationshemmern nahe (Lesnik Oberstein et al, 2001; Dichgans et al, 2002<sup>b</sup>; van den Boom et al 2003; Viswanathan 2006<sup>a</sup>; Choi et al 2006). Ob die Präsenz solcher Mikroblutungen als Risikomarker für konsekutive intrazerebral-parenchymatöse Blutungen herangezogen werden kann – sowohl was spontane, hypertensive oder sekundär durch Pharmakotherapien wie Thrombozytenaggregationshemmer/Antikoagulanzen begünstigte Hämorrhagien betrifft – wird weiterhin kontrovers diskutiert und bleibt letztendlich nicht eindeutig belegt.

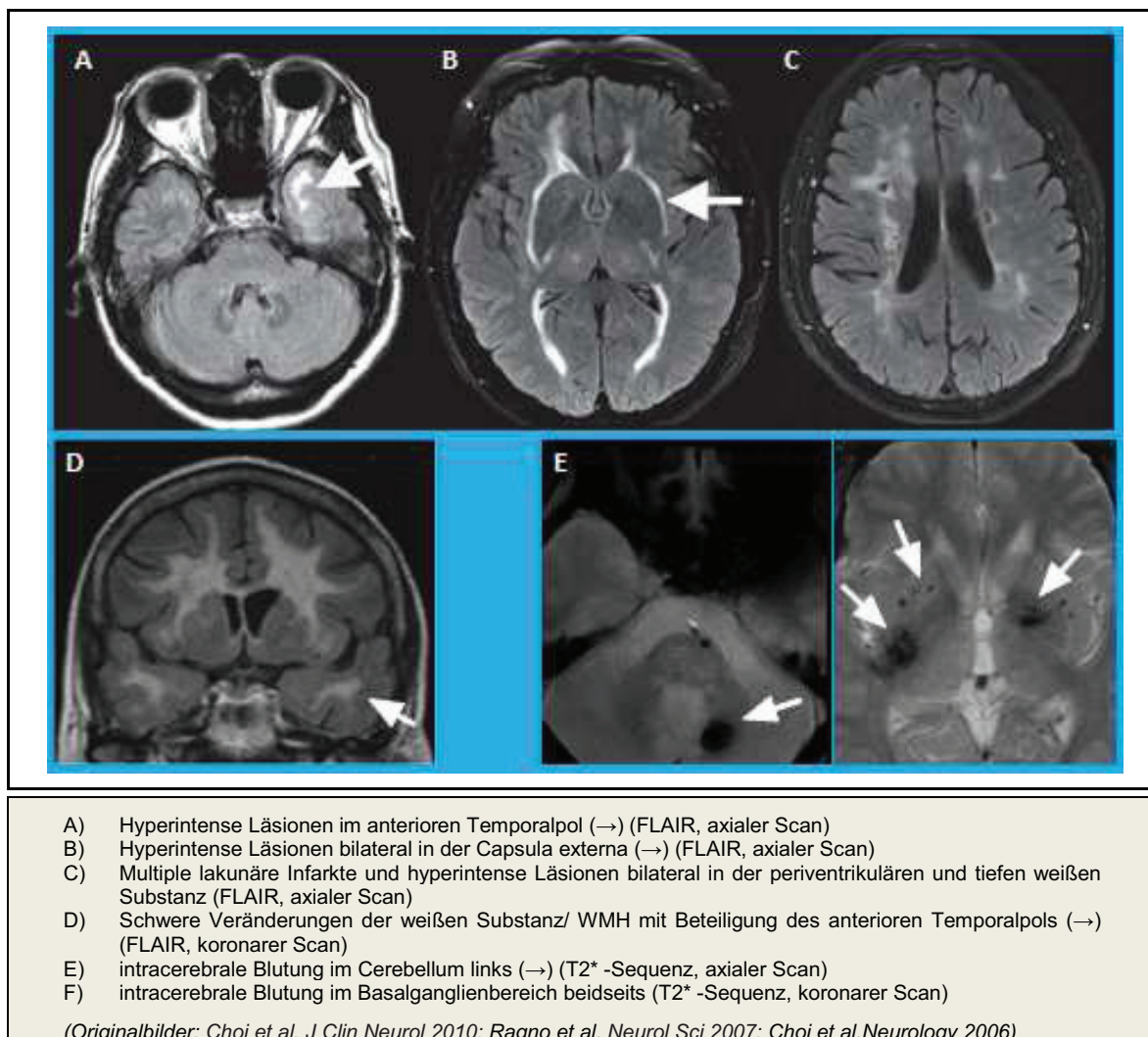
- *Weitere MRT-Befunde:* Weiterhin stellt sich bei CADASIL-Patienten in der MRT eine zunehmende Hirnatrophie dar (Peters et al. 2006; Jouvent et al, 2007), die nach den Beobachtungen von Peters und Mitarbeitern eine im Vergleich zu normal alternden Individuen ca. dreifach erhöhte Atrophie-Rate aufweist. Nicht selten finden sich auch dilatierte perivaskuläre Räume (Virchow-Robin-Räume), die hauptsächlich in den Basalganglien, dem Centrum semiovale und relativ spezifisch in der temporalen weißen Substanz imponieren können (van den Boom 2002; Cumurciuc et al, 2006<sup>b</sup>).

Die bildgebenden Veränderungen gehen den klinischen Symptomen oft um Jahre voraus und finden sich daher nicht selten auch schon bei klinisch noch nicht betroffenen Nachkommen von CADASIL-Patienten (Chabriat et al, 1995<sup>a</sup> und 1998). In der Regel treten die ersten MR-morphologisch fassbaren Veränderungen vor dem 30. Lebensjahr auf. Vollständige Penetranz wird jedoch erst mit etwa 35 Jahren erreicht (Chabriat et al, 1995<sup>a</sup>). Dieser Aspekt muss bei Heranziehung der



Kernspintomographie im Rahmen der präsymptomatischen Diagnostik berücksichtigt werden. Erwartungsgemäß findet sich eine deutliche Läsionsvolumenzunahme mit dem Alter (Chabriat et al, 1998; Dichgans et al, 1999<sup>a</sup>), Geschlecht und Genotyp scheinen dagegen keinen wesentlichen Einfluss auf den Ausprägungsgrad der MRT-Veränderungen zu haben (Dichgans et al, 1998). Die Korrelation von MR-Parameter mit dem klinischen Erkrankungsschweregrad ist weniger eindeutig. Die lakunäre Läsionslast sowie die globale zerebrale Atrophie sind scheinbar die stärksten und voneinander unabhängigen MRT-Marker für das Ausmaß der globalen kognitiven Beeinträchtigung und der physischen Behinderung (Dichgans et al, 1999<sup>a</sup>; Peters et al, 2004<sup>a</sup>; Liem et al, 2007; Viswanathan et al, 2007; Jouvent et al, 2007 und 2008).

Abb 2: Charakteristische MRT-Veränderungen bei CADASIL-Patienten:



### 1.5.2. Paraklinische Zusatzuntersuchungen und –befunde

- Routinelaboruntersuchungen offenbaren bei CADASIL-Patienten in der Regel unauffällige Werte (z. B. Blutbild, Leber- und Nierenwerte, Schilddrüsenwerte).

- Die Analyse des Liquor cerebrospinalis fällt meist ohne weiterführenden Befund aus. Eher beiläufig (in ca. 30 %) finden sich milde Erhöhungen des Liquoreiweißes in Verbindung mit einem erhöhten Albuminquotienten und in Abwesenheit von zellulären Auffälligkeiten, die als Schrankenfunktionsstörung aufzufassen sind (reflektieren am ehesten endotheliale Dysfunktionen kleinster Hirngefäße oder akute ischämische Hirnläsionen). Zellzahlerhöhungen oder oligoklonale Banden fehlen in der Regel (unter 2 %; Dichgans et al, 1999<sup>b</sup>; Chabriat et al, 1995<sup>a</sup>).

## 1.6. DIAGNOSTIK UND DIAGNOSESICHERUNG

Diagnostisch wegweisend ist neben Anamnese, Klinik und einer positiven Familienanamnese der Nachweis einer zerebralen Mikroangiopathie mit einer diffusen Leukenzephalopathie und subkortikalen lakunären Infarkten mittels MRT. Die Diagnose ist nicht immer einfach zu stellen, da einzelne klinische Merkmale (Migräne, rekurrende Schlaganfälle, vaskuläre Demenz) und kompatible MR-Befunde nicht unbedingt spezifisch sind bzw. durchaus bei anderen Erkrankungsentitäten vorkommen können. Darüberhinaus ist familienanamnestisch nicht immer eine offensichtliche Heredität zu fassen (Razvi et al, 2005<sup>b</sup>). Vor allem T2-Hyperintensitäten im temporopolen Marklager besitzen eine hohe diagnostische Spezifität und erlauben eine gute MR-morphologische Diskriminierung gegenüber anderen ischämischen oder hypertensiven Mikroangiopathien (O`Sullivan et al, 2001). Zum Ausschluss imitierender chronisch-entzündlicher ZNS-Erkrankungen (z.B. Multiple Sklerose) bietet sich die Liquorpunktion an. Eine konventionelle digitale Subtraktionsangiographie (DSA) wird nicht empfohlen, da sie mit einem erhöhten Blutungsrisiko behaftet zu sein scheint (Dichgans et al, 1997). Weitere Untersuchungen (wie übliche Blutuntersuchungen, Elektrophysiologie mit Elektroneuromyographie, EKG, Echokardiographie) sind nicht hilfreich zur Diagnosebestätigung, aber nützlich zum Ausschluss von differentialdiagnostisch zu erwägenden Erkrankungen.

Zur Diagnosesicherung wird beim Vorliegen von klinisch-neuroradiologisch suggestiven/verdächtigen Befunden die Identifikation einer pathogenen Mutation im Notch3-Gen mittels molekulargenetischer DNA-Analyse gefordert. Im Falle einer negativen Notch3-Genanalyse (oder der Detektion von Sequenzveränderungen mit ungeklärter pathologischer Signifikanz) kann ergänzend versucht werden, die Diagnose elektronenmikroskopisch über eine (Haut-)Biopsie durch den Nachweis



von granulären, osmiophilen Ablagerungen (sog. GOM) an oder zwischen degenerierenden vaskulären glatten Muskelzellen in den Gefäßwänden von Hautarterien zu stellen. Beide Verfahren sind wertvoll und können sich ggf. ergänzen, methodische Einschränkungen müssen aber durchaus erwähnt werden:

- 1.6.1. *Molekulargenetische Diagnostik:*

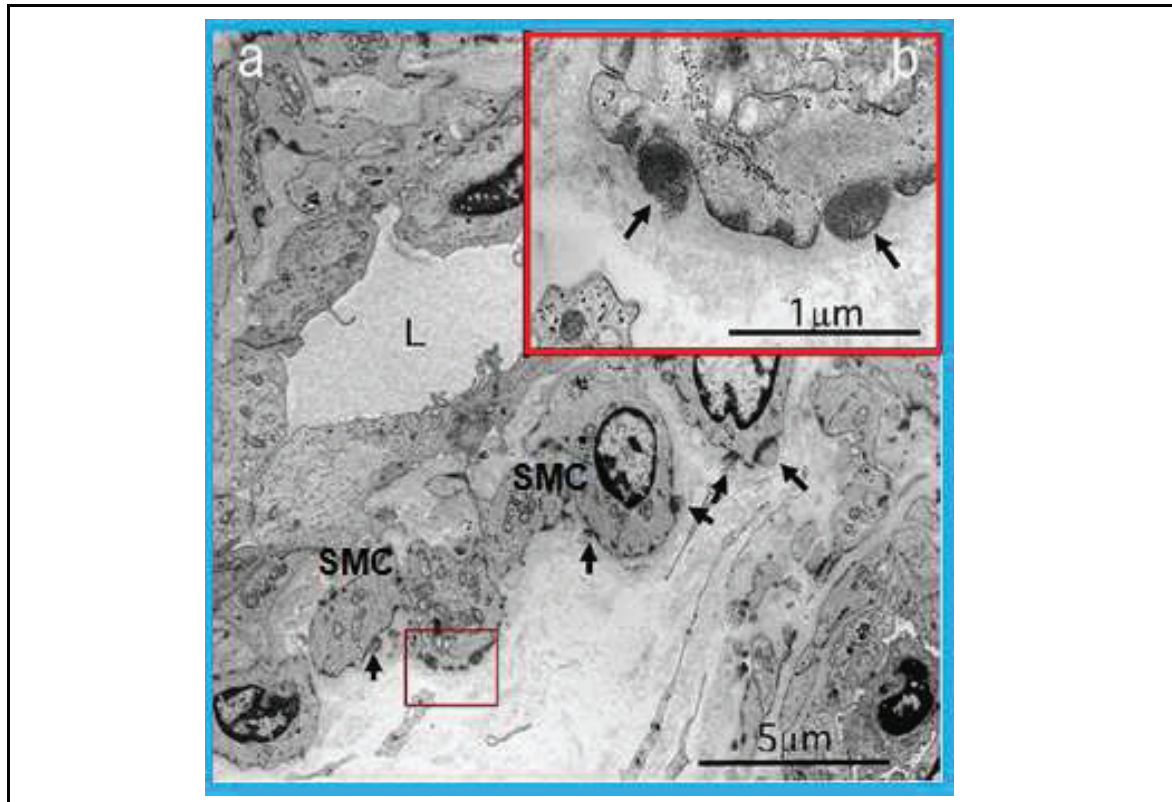
Die molekulargenetische Diagnostik kann mit einem großen Aufwand verbunden und letztendlich auch kostenintensiv sein. Unter Berücksichtigung dieses Aspekts und der Tatsache, dass die bisher bekannten CADASIL-verursachenden Mutationen häufiger in einigen bestimmten von insgesamt 33 Exons des Notch3-Gens liegen (sog. Hotspots), wird bei der Suche nach Mutationen ein stratifiziertes Vorgehen empfohlen. Da prototypische, CADASIL-verursachende Mutationen bisher nur in den Exons 2-24 detektiert wurden und in Europa ca. 40-60 % der Mutationen in den Exons 4 und 3 bzw. beinahe 90 % der Mutationen in den Exons 2-6 liegen (Peters et al, 2005<sup>a</sup>; Chabriat et al, 2009), fokussiert sich die molekulargenetische Untersuchung mittels direkter DNA-Diagnostik in der Regel zuerst auf diese Exonabschnitte, wobei regional und international abweichende Clustering-Muster bzw. Founder-Effekte im diagnostischen Protokoll berücksichtigt werden sollten (z. B. in Italien zusätzliche Berücksichtigung der Exons 8, 10 und 11; in den Niederlanden Exons 11 und 19 (Federico et al, 2005; Bianchi et al, 2010; Lesnik Oberstein, 2003)). Lässt sich in diesen Exons keine Mutation nachweisen, werden die restlichen Exons in Regel zunächst mittels eines Screeningverfahrens untersucht (z.B. einer SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) – Analyse) und auffällige DNA-Abschnitte in einem zweiten Schritt direkt sequenziert. Trotz Analyse aller Exons 2-24 sind allerdings in einem kleinen Prozentsatz (< 4 %) von Patienten mit einem CADASIL-vereinbarten Phänotyp keine klassischen Mutationen gefunden worden (Joutel et al, 1997; Peters et al, 2005<sup>a</sup>), wobei sowohl methodisch-technische Mängel der SSCP- bzw. direkten Sequenz-Analyse als auch die kritisch debattierte Möglichkeit des Vorliegens von polymorphen, möglicherweise pathogenen Sequenzvariationen oder pathogenen Mutationen außerhalb der Exons 2-24 hierfür verantwortlich sein könnten.

- 1.6.2. *Biopsische Diagnosesicherung:*

Sie basiert auf dem ultrastrukturellen Nachweis charakteristischer osmiophiler Ablagerungen (sog. GOM) in Wänden von betroffenen arteriellen Gefäßen. In der

Regel wird hierzu unter Berücksichtigung der einfachen Durchführbarkeit und geringen Komplikationsrate eine Hautbiopsie verwendet (Material aus Hautstanze, Durchmesser ca. 4 x 4 mm, sollte idealerweise Anteile der tiefen Dermis und oberen Subkutis enthalten), auch wenn aufgrund des generalisiert-systemischen Charakters der CADASIL-Arteriopathie der Nachweis von GOM auch in Gewebeproben von diversen anderen Organen (z.B. Nerv, Muskel) erbracht werden könnte. Elektronenmikroskopisch lokalisiert sich GOM in Gefäßwänden von kleinen bis mittelgroßen Arterien (v.a. Arteriolen, deutlich seltener auch in Venen oder vereinzelt in Kapillaren zu finden), typischerweise entweder an Einkerbungen von degenerierenden vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) oder im extrazellulären Raum in unmittelbarer Nähe oder zwischen diesen Zellen, deren Basallamina üblicherweise verdickt ist (*siehe Abb. 3*). Die Spezifität der beschriebenen Ablagerungen ist nach bisherigen Erfahrungen 100 %: Der Nachweis von akkumuliertem GOM wird als pathognomonisch für CADASIL betrachtet, da es bei anderen Erkrankungen bisher nicht detektiert wurde (Ruchoux et al, 1995; Kalimo et al, 2008). Die Sensitivität der Untersuchung hängt wesentlich von der Qualität der entnommenen Biopsie ab. Entscheidend ist, dass eine ausreichende Anzahl von muskelstarken Arteriolen untersucht wurde, bevor eine Biopsie als unauffällig eingestuft wird. In Einzelfällen muss nachbiopsiert werden. Bei 100 % Spezifität wird die Sensitivität der Detektion von GOM in Hautbiopsien je nach Autoren unterschiedlich beurteilt: Eine sehr hohe Sensitivität wird suggeriert durch zwei frühere Studien mit einer relativ kleinen Patientenzahl (100 %: Ebke et al, 1997; Mayer et al, 1999) und eine kürzlich erschienene retrospektive Arbeit (Tikka et al, 2009; gefundene Kongruenz von 100 % zwischen dem Vorhandensein einer Notch3-Mutation und dem retrospektiv erbrachten Nachweis von GOM bei 137 Patienten), während andere Studien eine signifikant niedrigere Sensitivität vermuten (ca. 45 %: Markus et al, 2002; sogar < 45 %: Razvi et al, 2003).

Alternativ zur elektronenmikroskopischen Analyse kann mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers eine immunhistochemische Identifizierung von akkumuliertem extrazellulärem Notch3-Protein in Gewebeproben mit Gefäßanteilen (in der Regel wird auch hier eine Hautbiopsie verwendet) erfolgen. Die Spezifität dieses Verfahrens wird mit 100 %, die Sensitivität mit 96 % angegeben (Joutel et al, 2001). In einigen Ländern wird diese Methode allerdings im diagnostischen Service nicht verwendet.

**Abb 3: Granuläres osmiophiles Material (GOM):**

Elektronenmikroskopische Darstellung von GOM innerhalb einer Arteriole in der tiefen Dermis eines Patienten mit CADASIL:

- a) GOM (mit Pfeilen markiert) findet sich im Umgebungsbereich von mehreren glatten Muskelzellen (SMC: smooth muscle cell) einer Arteriole. L bezeichnet das Lumen des Gefäßes.
- b) Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung a): Typische GOM-Ablagerungen (Pfeile) an der äußeren Zellmembran bzw. in Einkerbungen von degenerierenden glatten Muskelzellen (SMCs)

(Originalbild: Ishiko et al, Acta Neuropathol 2006)

## 1.7. THERAPEUTISCHE MÖGLICHKEITEN

Eine kausale oder spezifische krankheitsprogressionsbeeinflussende Therapie steht bisher nicht zur Verfügung. Die Behandlung erfolgt daher rein symptomorientiert und letztendlich vollständig pragmatisch, da bislang kein Wirksamkeitsnachweis einer symptomatischen oder risikoreduzierenden Therapie erbracht werden konnte. Ergänzend liegt der Fokus auf der Beratung und supportiven Therapie der Patienten und Familienangehörigen.

### 1.7.1. Symptomatische/symptomorientierte Therapie:

Im Mittelpunkt der symptomatischen Therapie stehen folgende Symptome:

#### A) Migräne:

- häufige und lebensqualitätseinschränkende Migräneattacken mögen eine prophylaktische Langzeitpharmakotherapie erfordern. Empfohlen wird die Migräneprophylaxe mit üblichen Medikamenten wie z.B. Betablockern oder

Acetazolamid, das sich in anekdotischen Berichten als wirksam erwiesen hatte (Weller et al, 1998; Forteza et al, 2001).

- Migränöse Attacken werden präferentiell mit konventionellen bzw. nicht-steroidalen Analgetika behandelt, Triptane sowie Ergot-Derivate sollten aufgrund ihrer vasokonstriktiven Effekte vor dem Hintergrund eines schon gestörten zerebralen Blutflusses bei CADASIL-Patienten vermieden werden (Kalimo et al, 2008).

## B) kognitive Störungen

- Bei kognitiven Störungen sind Acetylcholinesterase-Inhibitoren wie Donepezil zu erwägen: Einige klinische Studien mit Cholinesteraseinhibitoren haben einen leichten Benefit bezüglich der kognitiven Performance bei vaskulären Demenzen gezeigt (Kavirajan und Schneider, 2007). Die Effekte einer Donepezil-Behandlung wurden kürzlich in einer großen kontrollierten Studie auch bei CADASIL-Patienten untersucht (Dichgans et al, 2008), in der allerdings nur eine geringfügige Verbesserung hinsichtlich exekutiven Funktionen beobachtet werden konnte. Die Effekte waren statistisch nicht signifikant, so dass der klinische Wert dieser Behandlung letztendlich unbestimmt bleibt.

### 1.7.2. Risikoreduktion (Schlaganfallprävention):

Eine kausale Therapie der Vaskulopathie ist bisher nicht bekannt. Das derzeitige medikamentöse Management in Hinsicht auf zerebrovaskuläre Komplikationen der CADASIL-Erkrankung ist vorwiegend aus Daten von Schlaganfallstudien zu nicht-kardioembolischen ischämischen Infarkten extrapoliert worden.

- Pragmatisch wird den meisten Patienten eine Thrombozytenaggregationshemmung (z.B. mit ASS) verschrieben. Nutzen einer solchen Behandlung sind allerdings nicht gesichert und bleiben umstritten: Ein eindeutig positiver Effekt von Thrombozytenaggregationshemmern oder Antikoagulantien in der Schlaganfallprävention bei CADASIL konnte nicht nachgewiesen werden. Tatsächlich haben diese Medikationen bei einigen Patienten fatale parenchymale Hirnblutungen begünstigt (Werbrouck und De Bleeker, 2006).

- Eine Behandlung von vaskulären Risikofaktoren wird empfohlen. Im Falle eines vorliegenden arteriellen Hypertonus werden Antihypertensiva verwendet, Hinweise für das spekulative Risiko einer hierdurch verstärkten chronischen zerebralen

Hypoperfusion fanden sich bisher nicht. Bei Patienten mit Hypercholesterinämien werden Statine aufgrund ihres gut bekannten präventiven Effektes bei arteriellen Erkrankungen verschrieben.

### 1.8. NOTCH-GEN

Das humane Notch3-Gen wurde im Jahre 1996 als das defektive, für die CADASIL-Pathologie verantwortliche Gen identifiziert und erste pathogene Mutationen beschrieben (Joutel et al, 1996 und 1997). Das Notch3-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 19 (19p13.2-13.1) lokalisiert und besitzt eine Länge von ca. 41,3 Kilobasen. Es besteht aus 33 Exons mit einer ca. 7 kb (6966 Basenpaare) umfassenden kodierenden Polynukleotidsequenz. Das Gen kodiert für ein als membranständiger Rezeptor fungierendes Protein, das als humaner Notch3-Rezeptor bezeichnet wird. Der Notch3-Rezeptor ist Teil eines komplexen, evolutionär hochkonservierten Signaltransduktionssystems (sog. Notch-Signalling). Struktur und mögliche Funktionen des Rezeptors werden weiter unten dargestellt.

### 1.9. MUTATIONEN IM NOTCH3-GEN, MUTATIONSSPEKTRUM CADASIL

Bislang wurden weltweit mehr als 170 verschiedene Mutationen im humanen Notch3-Gen beschrieben (zusammengestellte und umfassende *Übersicht siehe Tab. 3 im Anhang*). Die Analysen einer sehr hohen Zahl von CADASIL-Familien haben einige (drei) charakteristische Hauptmerkmale dieser Mutationen ans Licht gebracht:

#### 1) *Die Mutationen sind überwiegend heterozygot vorliegende Punktmutationen:*

Bei der Mehrzahl der Mutationen handelt es sich um Punktmutationen (ca. 95 %; Federico et al, 2005). In einer Minorität ließen sich auch Deletionsmutationen nachweisen (ca. 3-4 % aller Mutationen ausmachend; bisher 9 Deletionen bekannt, davon die Mehrzahl „in-frame-shift“- (Dichgans et al, 2000; Joutel et al, 2000<sup>b</sup>; Dichgans et al, 2001; Mazzei et al, 2004; Wang et al, 2010) und 1 „frameshift“-Deletion (Dotti et al, 2004)). In den verbleibenden seltenen Fällen wurden darüberhinaus bislang eine kleine Insertion (Mazzei et al, 2008), eine kombinierte Deletions-Insertions-Mutation (Opherck et al, 2004), zwei Duplikationen und zwei splice-site Mutationen (Joutel et al, 2000<sup>b</sup>; Saiki et al, 2006) beschrieben.

Die kausativen Mutationen liegen entsprechend der autosomal-dominanten Natur der Erkrankung heterozygot vor. Eine Ausnahme bilden bislang 2 Patienten, bei denen



eine homozygote Notch3-Mutation diagnostiziert worden ist (Tuominen et al, 2001; Liem et al, 2008). Bemerkenswerterweise bewegte sich der Phänotyp dieser beiden homozygot vorliegenden Mutationen innerhalb des normalen CADASIL-Spektrums und ließ sich somit nicht von demjenigen heterozygoter Mutationen unterscheiden (in beiden Fällen auch nicht vom Phänotyp von Familienmitgliedern mit der gleichen, nur heterozygot vorliegenden Mutation).

*2) Nahezu alle Mutationen liegen innerhalb den 23 Exons, die für die sog. 34 EGF-like Repeats kodieren:*

Nahezu alle mit CADASIL in Verbindung gebrachten Mutationen kommen in den Exons 2-24 vor, die für 34 in der extrazellulären Domäne des Notchrezeptors angeordnete „epidermal growth factor-like“-Repeats (EGFR) kodieren (Joutel et al, 1997). EGFR sind universell vorkommende – zur Domäne des „epidermalen growth factor“ (EGF) homologe – Protein-Motive, die aus jeweils ca. 40 Aminosäuren bestehen und invariabel jeweils 6 Zysteinreste enthalten (Wharton et al, 1985, Lardelli et al, 1994). Innerhalb dieser EGF-Repeats sollen die Zysteinreste miteinander in einer vorgegebenen Organisation 3 Disulfid-Brücken bilden (Cysteinrest 1 mit 3, 2 mit 4 sowie 5 mit 6) und so für die strukturelle Integrität und die Reizempfängerfähigkeit des Notch-Rezeptors hauptverantwortlich sein.

Weiterhin bemerkenswert finden sich die Mutationen bevorzugt in den Exons 2-6 lokalisiert, wobei Exon 4 das mit Abstand am häufigsten betroffene Exon darstellt (sog. „Clustering“ der Mutationen). Nach Peters et al (2005<sup>a</sup>) werden ca. 58 % aller Mutationen im Exon 4 gefunden, während sich ca. 86 % aller Mutationen über die Exons 2-6 verteilen. Die von diesen Exons kodierten EGFR weisen keine anerkannte spezifische Funktion auf. Es bleibt letztendlich unklar, weshalb die Mutationen dieses relativ stark geclusterte Muster aufweisen bzw. in diesen Bereichen Mutationshotspots formieren. Hierüberhinaus ist ein doch beträchtliche geographische bzw. regionale Variabilität des Mutationsverteilungsmusters beschrieben worden: Nach Exon 4 ist Exon 3 vermutlich der zweithäufigste Mutationsort bei deutschen, französischen und britischen Individuen (Joutel et al, 1997; Markus et al, 2002; Peters et al, 2005<sup>a</sup>), bei niederländischen affizierten Personen dagegen Exon 11 (Oberstein et al, 2003), das auch in mediterranen Ländern ein sehr hohe Prävalenz an Mutationen aufweist (Italien: Dotti et al, 2005; Spanien: Ampuero et al, 2009).

3) Die Mutationen sind hoch stereotyp und führen alle zu einer ungeraden Anzahl von Zysteinresten innerhalb eines EGFR:

Die pathogenen Notch3-Mutationen scheinen ein stereotypes und essentielles Merkmal aufzuweisen: Sie führen über einen Aminosäureaustausch in beinahe allen Fällen zu einem Gewinn oder Verluste eines Zysteinrestes innerhalb des betroffenen EGF-Repeats. Da jede EGF-Einheit im gesunden Fall 6 invariable Zysteinreste beinhaltet, resultiert aus den Mutationen eine ungerade Anzahl von Zysteinresten innerhalb des entsprechenden EGFR (Joutel et al, 1997).

Zusätzlich zu diesen üblichen Mutationen, die charakteristischerweise alle einen Verlust oder eine Addition eines Zysteinrestes mit sich bringen, wurden bisher mindestens 9 Mutationen beschrieben, die die Zahl der Zysteinreste nicht alteriert. Eine davon ist eine Deletion, die Aminosäuren zwischen zwei Zysteinen entfernt (Mazzei et al, 2004), die anderen sind Missense-Mutationen, die zu einer Aminosäuresubstitution führen (*Mutationen R213K*: Kotorii et al, 2001 (auch bei Uchino et al, 2000 und Santa et al, 2003); *V237M*: Uchino et al, 2002; *R75P*: Kim et al, 2006; *T577A* und *S978R*: Ferreira et al, 2007; *A1020P*: Scheid et al, 2008; *Q151E*: Ampuero et al, 2009, *T1098S*: Wang et al, 2010). Ob diese Substitutionen sicher pathogene Mutationen oder eher Polymorphismen/polymorphe molekulare Sequenzvarianten mit Krankheitswert darstellen, wird kontrovers debattiert und ist letztendlich auch ein zentraler Inhalt dieser Arbeit.

Weiterhin erwähnenswert ist das - in mindestens zwei Fällen gesicherte - Vorkommen von *de novo*-Mutationen, deren Frequenz letztendlich unbekannt bleibt (Joutel et al, 2000<sup>c</sup>; Coto et al, 2006).

## **1.10. PATHOPHYSIOLOGISCHE ASPEKTE VON NOTCH3**

### **(Von der Notch3-Mutation über den Notch-Rezeptor zur CADASIL-Angiopathie)**

Die hoch-stereotype Natur der CADASIL-Mutationen suggeriert eigentlich einen gemeinsamen krankheitsverursachenden Mechanismus. Die genauen molekularen Mechanismen und funktionellen Konsequenzen dieser Mutationen in Bezug auf den Notch3-Rezeptor sowie letztendlich auf die Entwicklung der CADASIL-spezifischen Arteriopathie und klinischen Phänomenologie verstehen wir gegenwärtig allerdings

erst teilweise und noch unvollständig. Grundlagen und Erkenntnisse zu Grundzügen der Pathophysiologie von CADASIL seien im Folgenden grob skizziert:

#### *1.10.1. NOTCHREZEPTOREN UND NOTCH-SIGNALTRANSDUKTIONSSYSTEM*

Bei Säugern und Menschen sind insgesamt vier Notchrezeptoren identifiziert worden (Notch 1-4). Es handelt sich dabei um eine Familie von single-pass- (Typ-1) Transmembranrezeptoren, die eine gemeinsame Grundorganisation mit charakteristischen konservierten Bereichen sowie einen prinzipiell identischen Signaltransduktionsmechanismus mit überlappenden und redundanten Funktionen teilen, daneben aber – erst in den letzten Jahren zunehmend verstanden – auch subtile Strukturdiversitäten sowie unterschiedliche Funktionen und Expressionsmuster aufweisen. Sie sind Teil eines hochkonservierten, bei Metazoen weitverbreiteten Signaltransduktionssystems (sog. „Notch-Signalling“), das auf einer kurzstreckigen Kommunikation zwischen benachbarten Zellen beruht und über die Regulation von Programmen für Wachstum, Apoptose und Differenzierung entscheidend zur Determinierung von Zellschicksalen während der Entwicklung eines Organismus sowie zur Aufrechterhaltung von adulten selbsterneuernden Geweben beiträgt (Artavanis-Tsakonas et al, 1999; Bray, 2006, Wu und Bresnick, 2007; Bellavia et al, 2008; Kopan und Ilagan, 2009). Die Bezeichnung „Notch“ geht ursprünglich auf Beobachtungen bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zurück, wo Mutationen im Notch-Rezeptor u.a. zu gut sichtbaren Einkerbungen (Kerbe = engl. notch) an den Flügelrändern führen.

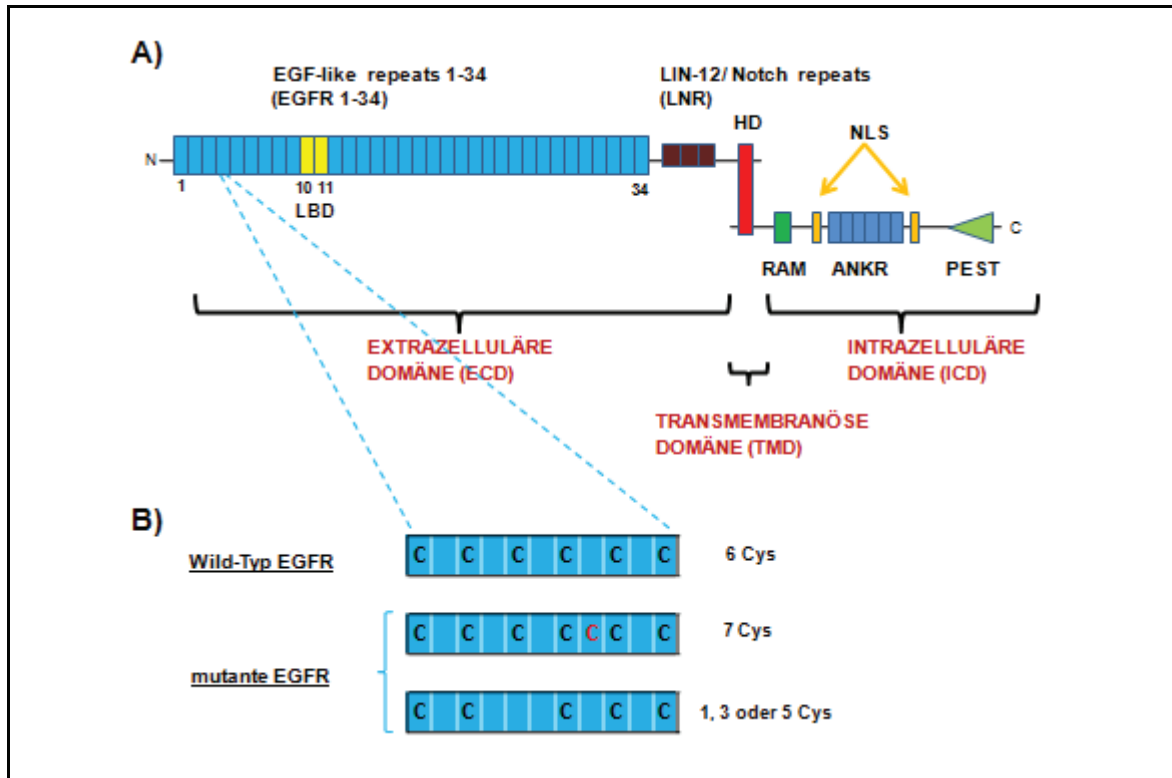
#### *1.10.2. NOTCH3-REZEPTOR: SYNTHESE UND STRUKTURELLER AUFBAU*

Der Notch3-Rezeptor wird wie alle anderen Notchrezeptoren als Vorläuferprotein im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und während des Transports zur Zelloberfläche posttranslational prozessiert. Im trans-Golgi Netzwerk wird das Protein durch eine Furin-artige Convertase (sog. „S1-Cleavage“) enzymatisch in zwei Untereinheiten gespalten (Logeat et al, 1998). In der Zellmembran formieren diese beiden Untereinheiten einen als Heterodimer vorliegenden reifen Rezeptor, bestehend aus einer ca. 210 kD großen extrazellulären Domäne („ECD“ oder „NECD“) und einer ca. 97 kD großen, transmembranös-intrazelluläre Domäne („TMICD“, „NTMICD“), die durch nicht-kovalente (calcium-abhängige) Bindungen im Transmembranbereich zusammengehalten werden (Blaumüller et al, 1997). Der



mature Notch3-Rezeptor wird in 3 Domänen gegliedert und enthält alle typischen Notch-Motive von Notch-Homologen. Sein Aufbau wird in der folgenden **Abb. 4** wiedergegeben:

**Abb 4: Notch3-Rezeptor:**



Legende:

**A) Die schematische Abbildung zeigt die Grundorganisationen mit den verschiedenen Domänen des Notch-Rezeptors und seinen einzelnen Motiven:**

- Die große **extrazelluläre Domäne (ECD)** beinhaltet im N-terminalen Teil 34 sog. EGFR (epidermal growth factor repeats), darüberhinaus eine LBD (Ligandenbindungsdomäne, von EGFR 10 und 11 gebildet) sowie weiter C-terminal 3 LNR (Lin12/Notch repeats) und eine HD (Heterodimerisationsdomäne).
- Die kurze **transmembranöse Domäne (TMD)** besteht aus einem einzelnen transmembranösen Abschnitt mit 21 Aminosäuren.
- Die **intrazelluläre Domäne (ICD)** beherbergt eine RAM-Domäne (=RBP-Jk assoziiertes Modul), 7 ANKR (Ankyrin repeats) flankiert von 2 NLS (nukleären Lokalisationssignalen) sowie C-terminal eine PEST-Sequenz (reich an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T)).

**B) Schema eines normalen EGFR sowie von mutierten EGFR:**

Beachte: Ein EGFR-Motiv besteht aus jeweils ca. 40 Aminosäuren und enthält invariabel 6 Zystein-Reste, die in einer vorgegebenen Organisation 3 Disulfidbrücken bilden (Zysteinrest 1 mit 3, 2 mit 4 sowie 5 mit 6). Diese Disulfidbrücken scheinen für die strukturelle Integrität des Notchproteins essentiell zu sein, so enthält die gefaltete extrazelluläre Domäne u.a. 2 anti-parallele  $\beta$ -Faltblattstrukturen ( $\beta$ -sheets), die durch die 3 Disulfidbrücken stabilisiert werden.

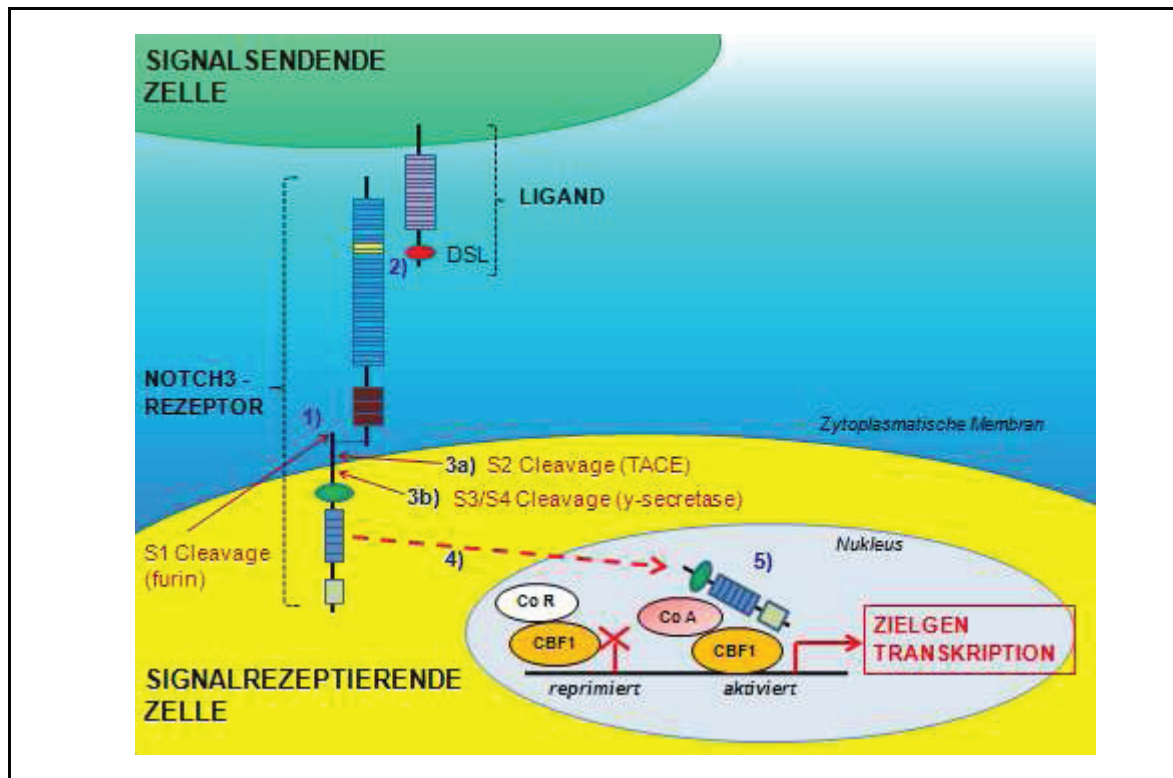
- „**Wild Typ EGFR**“: Schema eines normalen EGFR mit seinen 6 Zystein (=Cys)-Resten.
- „**mutante EGFR**“: Klassische CADASIL-verursachende Mutationen im Notch3-Gen führen zu einer ungeraden Anzahl von Zysteinresten im jeweiligen EGFR. Beispielhaft wurden hier EGFR mit 7 Zystein-Resten (zusätzlicher Zysteinrest rot markiert) bzw. 5 Zystein-Resten (im Falle eines Verlustes eines Zysteins) dargestellt.

### 1.10.3. NOTCHSIGNALWEG (NOTCH-SIGNALLING)

Der Notchsignalweg beginnt mit einer Bindung eines Liganden im Bereich der extrazellulären Domäne des Notchrezeptors und mündet über eine Sequenz von 2 proteolytischen Spaltungsschritten innerhalb des Notchproteins („S2“- und „S3/S4“-Cleavage) in der Zellmembran-Ablösung der intrazellulären Domäne, die in den Zellkern transloziert und dort über die Bildung eines Transkriptionsfaktor-Komplexes die Expression von Notch-Zielgenen aktiviert und reguliert (siehe **Abb. 5**).

Dieser Kern-Signaltransduktionsweg („canonical notch signalling“) ist einem weiten Feld von vielfältigen regulatorischen Einflüssen auf verschiedenen Ebenen unterworfen. Die Notch-Zielgene sowie die effektorische Regulation der weiteren Downstream-Signalmaschinerie sind nur teilweise bekannt bzw. charakterisiert. Beim Säuger konnten bisher 5 klassische, sog. DSL-Liganden aus den zwei Genfamilien „Delta-like“ und „Jagged“ (Delta-like DLL1, DLL3, DLL 4 sowie Jag 1 und Jag 2) charakterisiert werden (Überblick bei D`Souza et al, 2008). Bei den Liganden handelt es sich wie bei Notch-Rezeptoren ebenfalls um Typ1-Transmembranproteine, die auf benachbarten Zellen membranständig exprimiert vorkommen. Ein von den kanonischen Liganden unabhängiges Notch-Signalling und ein komplexer Crosstalk mit anderen essentiellen Signalwegen sind beschrieben worden und verdeutlichen, dass wir die Komplexität des Notchsignallings erst beginnend verstehen (Tamura et al, 1995; Artavanis-Tsakonas et al, 1999; Iso et al, 2003; Bray 2006, Nam et al, 2007; Gordon et al, 2008; Kovall 2008; Kopan und Ilagan 2009).

Abb 5: Kanonischer Notch-Signaltransduktionsweg:



- 1) Als Heterodimer in der Zellmembran der signalempfangenden Zelle vorliegender maturaer Notch-Rezeptor nach vorangehender Synthese, posttranslationellen Modifikationen und S1-Cleavage (durch furinartige Convertase) (1).
- 2) Initiierung der Notchsignaltransduktion über die Bindung (2) eines von einer signalsendenden Zelle exprimierten Liganden (DSL-Ligand) an die Ligandenbindungsstelle im extrazellulären Teil des Notch-Rezeptors.
- 3) Durch die Ligand-Rezeptor-Interaktion induzierte Sequenz von zwei weiteren proteolytischen Spaltungen innerhalb des Rezeptorproteins, die als sog. S2-Cleavage (vermittelt durch Metalloprotease TACE = TNF- $\alpha$ -Converting Enzyme) (3a) und S3/S4-Cleavage (durch  $\gamma$ -Sekretase-Komplex) (3b) bezeichnet werden und in der Ablösung der intrazellulären Domäne des Notchrezeptors von der Zellmembran münden.
- 4) Konsekutive Translokation der intrazellulären Domäne des Notchrezeptors in den Zellkern (4)
- 5) Im Zellkern formiert die intrazelluläre Domäne des Notchrezeptors einen Transkriptionskomplex über die Interaktion mit dem transkriptionsregulierenden und DNA-bindenden Protein CBF1 / RBP-J $\kappa$  (C Promotor Bindungsfaktor 1/ Rekombinationssignal Bindungsprotein J-kappa) sowie die zusätzliche Rekrutierung von Co-Aktivatoren (CoA, z.B. Mastermind) und Verdrängung von Repressoren (CoR). Der so gebildete und aktivierte Transkriptionsfaktor-Komplex (5) reguliert die Expression von spezifischen Notch-Zielgenen.

#### 1.10.4. NOTCH3-REZEPTOR: EXPRESSIONSMUSTER UND MÖGLICHE PHYSIOLOGISCHE FUNKTIONEN

Der Notch3-Rezeptor wird im adulten Organismus des Menschen praktisch ausschließlich in vaskulären glatten Muskelzellen von systemischen Arterien mit kleinerem bis mittlerem Gefäßdurchmesser sowie – erst kürzlich entdeckt – in Perizyten von Hirnkapillaren exprimiert (Joutel et al, 2000<sup>a</sup>; Prakash et al, 2002, Joutel et al, 2010). Die präzise physiologische Funktion des Notch3-Rezeptors beim Menschen ist letztendlich noch nicht abschließend verstanden, vereinfacht zusammengefasst scheint er in Abhängigkeit bzw. Kontext von bestimmten

Gefäßbetten eine bedeutende Rolle bei der arteriellen Differenzierung und Maturation von glatten vaskulären Muskelzellen zu haben, möglicherweise agiert er zusätzlich auch als Blutdrucksensor (Joutel et al, 2010).

#### 1.10.5. CADASIL, EIN GESTÖRTER NOTCH3-SIGNALWEG oder EIN PROTEIN- AKKUMULATIONSPROBLEM (NOTCH3-AGGREGATOPATHIE) ?

Grundsätzlich kann diskutiert werden, welchen Einfluss CADASIL-Mutationen auf die Funktion des Notch3-Rezeptors ausüben könnten. Prinzipiell müssen dabei mindestens 3 verschiedene Mechanismen in Betracht gezogen werden:

I) „*Loss-of-Function*“ des Rezeptors (hypomorphe Mutationen, die die Signal-Aktivität des Rezeptors vermindern; alternativ auch dominant-negative Mutationen, die die Wild-Typ-Genaktivität reduzieren)

II) „*Gain-of-Function*“ des Rezeptors (hypermorphe Mutationen, die die Genaktivität erhöhen) oder

III) „*Gain-of-novel Function*“ des Rezeptors (neomorphe Mutationen, bei denen das mutierte Protein eine neue/zusätzliche, evtl. toxische Aktivität erlangt).

Bisherige Daten aus zahlreichen neueren Studien argumentieren zusammengenommen stark für einen neomorphen Effekt der CADASIL-Mutationen und weniger für eine kompromittierte kanonische Signaltransduktionsfunktion:

##### a) Konsequenz der Mutationen auf das Notch-Signalling:

In vitro-Studien, die die Effekte von mutanten Notchrezeptoren auf das Notch-Signalling in Reporter-Gen-Assays untersuchten, legen nahe, dass die Signalaktivität des mutierten Notch3-Rezeptors abhängig von der Mutationslokalisierung differieren kann, in der Majorität aber nicht eingeschränkt ist:

- Die Mehrheit der Mutationen bzw. mutierten Notch3-Rezeptoren, sind als Antwort auf die Liganden-Bindung zu einer Aktivierung der RBP-Jk-Transkription auf einem normalen Wild-Typ-Level fähig (Karlstrom et al, 2002; Joutel et al, 2004; Peters et al, 2004<sup>b</sup>; Haritunians et al, 2005; Low et al, 2006), auch wenn einige wenige Rezeptormutanten eine gestörte Maturation und eine verminderte Präsenz des Rezeptors auf der Zelloberfläche offenbarten.

- Im Gegensatz zu den oben diskutierten Mutationen können insgesamt seltener auftretende CADASIL-Mutationen, die in kodierenden Abschnitten für die DSL-Liganden-Bindungsdomäne (EGF-like Repeats 10 und 11) liegen, vermutlich zu

einem „Loss of function“ des Notch3-Rezeptors führen. Bei zwei dafür repräsentativen Mutationen konnte gezeigt werden, dass sie zumindest in-vitro das RBP-Jk-Signalling als Antwort auf Liganden aufheben (Joutel et al, 2004; Peters et al, 2004<sup>b</sup>).

In Rescue-Experimenten unter Verwendung von transgenen CADASIL-Mäusen (die eine für CADASIL typische Mutation R90C exprimierten) in Kombination mit Notch3-Null (-/-) - Mäusen konnte überdies auch in-vivo gezeigt werden, dass sowohl Expression wie auch Signal-Funktion des Notch3-Rezeptors in den Hirnarterien erhalten ist (Monet et al, 2007). Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, dass ein „Loss of Signal-Function“ bzw. eine direkte Störung des klassischen Signaltransduktionsweges nicht der fundamentale pathogene Effekt von CADASIL-verursachenden Mutationen ist. Allerdings kann formal die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass eine alterierte Notch-Signalaktivität den Phänotyp bzw. Verlauf der Erkrankung modulieren könnte.

*b) Akkumulation von aggregierten Notch3-ECD-Protein:*

Das prädominante Pattern der Mutationen führt wie bereits ausgeführt zu jeweils einem freien Zysteinrest innerhalb der entsprechenden EGF-Domäne. Aus diesem fundamentalen Merkmal ist abgeleitet werden, dass die ungerade Zahl von Zysteinresten im entsprechenden EGF-Modul über eine Störung der Formation von Disulfidbrücken zu einer Veränderung der tertiären Struktur (Konformationsänderung) bzw. einem Misfolding des Notch3-Rezeptors führt. Die aberranten Disulfidbrückbildungen scheinen desweiteren eine abnorme Homo- oder Heterodimerisation von Notch3 (entweder mit einem weiteren Notch3-Rezeptor oder anderen Proteinen) (Joutel et al, 2000<sup>a</sup>; Opherk et al, 2009) sowie die Akkumulation eines mutierten Rezeptorbestandteils zu begünstigen. Studien belegen tatsächlich eine abnorme Akkumulation von Notch3-Protein innerhalb der Hirngefäße wie auch in den Gefäßen von zahlreichen anderen Organen (z.B. Niere, Skelettmuskel, Haut), wobei es sich um eine selektive und graduelle Akkumulation der Ektodomäne von Notch3 (N3ECD, NECD) an der zytosolischen Membran von vaskulären glatten Muskelzellen handelt, bemerkenswerterweise ohne assoziierte Akkumulation der transmembranös-intrazellulären Domäne (N3TMICD, NTMICD) (Joutel et al, 2000<sup>a</sup>). In den Gefäßwänden des Hirns wurde die akkumulierte Ektodomäne (N3ECD) in Form von mikroskopischen Aggregaten um VSMCs und Perizyten in unmittelbarer

Nähe, aber nicht innerhalb der sog. GOM-Ablagerungen gefunden (Joutel et al, 2000<sup>a</sup>). Basierend auf immunelektronenmikroskopischen Studien an Hautbiopsien wurde von bestimmten Autoren suggeriert, dass der extrazelluläre Anteil des Notch3-Rezeptors (N3ECD) eine Komponente des ebenfalls akkumulierten und pathognomonischen GOM ist (Ishiko et al, 2006), während andere Arbeitsgruppen (u.a. um A. Joutel) diese Hypothese in Frage stellen. Letztendlich ist es denkbar, dass ungepaarte Zysteinreste oder ein Exzess von N3ECD innerhalb der Gefäßstruktur zu Interaktionen mit noch nicht charakterisierten Proteinen führen, die dann selbst in den GOM-Ablagerungen anhäufen sowie möglicherweise für die Funktion oder Überlebensfähigkeit der glatten Muskelzellen essentiell sein oder einen toxischen Effekt auf die vaskuläre Zellen haben könnten. Der mögliche gemeinsame Denominator der CADASIL-Mutationen ist also scheinbar das Merkmal einer freien Zysteinbildung in einem spezifischen EGFR und ein damit begünstigter neomorphogener Effekt.

#### 1.10.6. NOTCH3-ASSOZIIERTE ZEREBRALE ARTERIO-/VASKULOPATHIE

*(Makro- und mikroskopisch-ultrastrukturelle sowie funktionelle Charakteristika)*

Die CADASIL zugrunde liegende Pathologie resultiert in einer systemischen Arteriopathie/Vaskulopathie, die sich histologisch unterscheidet von arteriosklerotischen und amyloid-assoziierten Angiopathien. Arterielle Veränderungen sind auf kleine und mittelgroße Arterien begrenzt und kommen nicht nur im Zerebrum, sondern auch im Bereich anderer Organe vor (z.B. Haut, Niere, Leber, Milz und Skelettmuskel) (Ruchoux et al, 1994; Ebke et al, 1997; Joutel et al, 2001), obwohl die Symptome von CADASIL praktisch exklusiv auf das zentrale Nervensystem beschränkt erscheinen.

Makroskopisch-autoptische Untersuchungen des Gehirns zeigen Veränderungen, die typisch sind für „small-artery-“ bzw. „small-vessel diseases“ des Hirns:

- Diffuser Verlust von Myelin mit Rarefizierung der hemisphärischen weißen Substanz, prädominierend in den periventrikulären Arealen und im Centrum semiovale
- Lakunäre Infarkte in der weißen Substanz sowie in Basalganglien, Thalamus, Pons und Mesencephalon (Ruchoux et al, 1997)
- Dilatierte Virchow-Robin-Räume

- In der groben makroskopischen Untersuchung scheinbar nicht betroffener Kortex, wobei mikroskopisch doch erhebliche kortikale neuronale Apoptosen gefunden werden können, die abhängig vom Ausmaß der subkortikalen ischämischen Läsionen erscheinen (Viswanathan et al, 2006<sup>b</sup>).

Mikroskopische und ultrastrukturelle Untersuchungen offenbaren eine spezifische Arteriopathie, die vorwiegend die kleinen perforierenden zerebralen und leptomeningealen/pialen Gefäße betrifft (mit einem externen Gefäßdurchmesser, der sich v.a. im Bereich um 10-150 µm, weniger im Bereich bis zu 500 µm bewegt; Ruchoux et al, 1997; Okeda et al, 2002; Miao et al, 2004). Diese Angiopathie ist typischerweise charakterisiert durch:

- 1) eine Verdickung und Fibrosierung der arteriellen Wände mit konsekutiven Stenosen (ausgeprägt in Gefäßen der weißen Substanz, während im Bereich der lentikulostriatalen Gefäße und Arteriolen der grauen Substanz trotz Wandverdickungen bisher keine relevanten Stenosen/Okklusionen beobachtet wurden; Miao et al, 2004; Okeda et al, 2002)
- 2) die Präsenz von GOM in den Gefäßwänden (elektronenmikroskopisch an oder zwischen degenerierenden VSMCs und in der umgebenden verdickten Basalmembran der Gefäßwände)
- 3) die bereits oben beschriebene Akkumulation der Notch3ECD in der Zytoplasmamembran von VSMCs und
- 4) prominente morphologische Veränderungen der VSMCs (Degeneration und Untergang bis sogar gänzlicher Verlust der VSMCs in der Gefäßwand). Eine entsprechend der Degeneration der VSMCs verminderte  $\alpha$ -SMA (smooth muscle actin)-Immunopositivität geht dabei einher mit einer Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen (incl. bestimmten Kollagentypen und Laminin), die die Gefäßwandverdickungen verursachen (Baudrimont et al, 1993; Jung et al, 1995; Okeda et al, 2002; Kalimo et al, 2002; Kalaria et al, 2004).

Das Endothel der Gefäße scheint morphologisch weitgehend bewahrt, während sich in mehreren Studien durchaus Hinweise für funktionelle Einschränkungen im Sinne einer endothelialen Dysfunktion fanden (Stenborg et al, 2007, Rufa et al, 2008; Peters et al, 2008). Spezifische zerebrovaskuläre Dysfunktionen und eine moderate zerebrale Hypoperfusion ließen sich beim Menschen mit verschiedenen Studienansätzen mittels SPECT-, PET-, MRI-Bolus-Tracking- sowie funktionellen



Vasoreaktivitäts-Untersuchungen unterlegen (Chabriat et al, 1995<sup>c</sup>; Mellies et al, 1998; Tuominen et al, 2004; Chabriat et al, 2000; Pfefferkorn et al, 2001).

Ein neueres Mausmodell ergab Hinweise für ein mögliches Entstehungsmuster von zerebralen Läsionen in der weißen Substanz: Eine Kombination von zerebrovaskulärer Dysfunktion und Rarefizierung der Mikrozirkulation (gestörte Autoregulation des zerebralen Blutflusses, Kapillarbettreduktion in der weißen Substanz, Erhöhung des distalen vaskulären Widerstandes) scheint eine moderate und weitgestreute Reduktion des zerebralen Blutflusses (um ca. 10-20 %) zu bedingen, die in den Ischämie-suszeptibelsten Regionen (speziell in den tieferen Hirnregionen, die über das distale vaskuläre Bett versorgt werden) zu Läsionen der weißen Substanz führen könnte (Joutel et al, 2010).

Die Entwicklung der oben beschriebenen Arteriopathie assoziiert mit einer sowohl funktionell wie auch sekundär strukturell bedingten subkortikalen zerebralen Hypoperfusion, die in vulnerablen Regionen zu mikrostrukturellen Veränderungen der weißen Substanz und rekurrenden lakunären Infarkten sowie vermutlich sekundär später im Verlauf auch zu neuronalen Apoptosen mit kortikaler Atrophie führt, scheint die Endstrecke der CADASIL-Pathologie zu sein. Die genauen Wege von Genmutation über gestörte Rezeptorfunktion/-akkumulation, VSMC-Degeneration/Endotheldysfunktion bis hin zur spezifischen Vaskulopathie und klinischen Expression bleibt allerdings trotz umfangreichen Forschungsbemühungen nicht abschließend aufgeklärt.

## **1.11. SCHLAGANFÄLLE BEI JUNGEN PATIENTEN UND SIFAP**

### *1.11.1. Schlaganfall bei jungen Patienten und assoziierte „single-gen“-Erkrankungen*

Zerebrale Infarkte (Schlaganfälle, Hirninfarkte) sind die dritthäufigste Todesursache und der häufigste Grund für eine bleibende Behinderung in den Industrienationen. In Deutschland erleiden über 200.000 Menschen jedes Jahr einen Schlaganfall. Auch bei jungen Menschen – nach WHO-Definition Betroffene zwischen 18 und 55 Jahren – ist der Schlaganfall häufiger als allgemein bekannt und eine nicht zu vernachlässigende Gefahr. Schätzungsweise ca. 15 % aller Schlaganfallpatienten sind unter 55 Jahre alt. In dieser Altersgruppe sind die möglichen Ursachen eines Schlaganfalls sehr unterschiedlich und bleiben in bis zu 30-40 % der Fälle ungeklärt (sog. kryptogene Schlaganfälle). Gerade in dieser Altersgruppe sind insbesondere auch hereditäre/genetisch determinierte Erkrankungen als Ursache von zerebralen



Ischämien in die ätiologische Differentialdiagnose einzubeziehen. Als Vertreter von Erkrankungen, die monogen vererbt werden und phänotypisch eindeutig einen Schlaganfall bedingen können, sind hier neben dem CADASIL-Syndrom u.a. der Morbus Fabry ( $\alpha$ -Galaktosidase A-Defizienz), das MELAS-Syndrom (Mitochondriale Myopathie, Encephalopathie, Laktat-azidose und „stroke-like episodes“) oder die Sichelzellanämie zu nennen. CADASIL trägt vermutlich zu ca. 1.2 % aller jugendlichen Schlaganfälle bei und ist für ca. 9 % aller rezidivierenden zerebralen Infarkte im jüngeren Lebensalter ursächlich verantwortlich.

#### *1.11.2. SIFAP: Stroke in young Fabry patients*

SIFAP („Stroke in young Fabry patients“) ist eine prospektive, multizentrische und europaweit durchgeführte Studie, die dem Zusammenhang zwischen juvenilem Schlaganfall und der genetisch bedingten Erkrankung M. Fabry gewidmet ist. Wissenschaftlich aufzuzeigen, dass die Fabry-Erkrankung als eine der häufigsten genetischen Ursachen eines juvenilen Schlaganfalls betrachtet werden muss, war das primäre Ziel dieser Studie ([www.sifap.eu](http://www.sifap.eu)). An der von der Universitätsklinik Rostock (Prof. A. Rolfs) initiierten Studie sind 47 Zentren aus 15 europäischen Ländern beteiligt. Durch die Rekrutierung von ca. 5.000 unselektionierten, 18 bis 55-jährigen Patienten wird sie gleichzeitig die größte Studie über den juvenilen Schlaganfall sein.

Die umfangreichen Patientenbefunde wurden webbasiert digitalisiert erfasst, die genetische Analyse des AGLA ( $\alpha$ -Galaktosidase A)-Gens zentralisiert und komplett automatisiert an der Universität Rostock durchgeführt. Es erfolgte eine umfassende und detaillierte Darstellung des zerebrovaskulären Ereignisses und dessen Kofaktoren mit verschiedenen Methoden: Artklassifikation (TOAST-Klassifikation), Schwereklassifikation (Modified Ranking Scale; Barthel Index), Kategorisierung des zerebrovaskulären Ereignis durch cMRT-Daten, Erfassung von zusätzlichen, z. T. fakultativen Parameter wie paraklinischen Blutuntersuchungen, Proteinurie, Ultraschall der Hirngefäße, EKG und Echokardiographie (Rolfs et al, 2010).

## 1.12. AUSGANGSLAGE ZU BEGINN UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

### 1.12.1. Ausgangslage zu Beginn der Arbeit:

- Zum gegenwärtigen Zeitpunkt finden sich in der Literatur keine präzisen Daten über die Frequenz bzw. Prävalenz von Notch3-/CADASIL-Mutationen bei Schlaganfallkohorten. Unter Berücksichtigung des Aufwandes der Komplettssequenzierung des humanen Notch3-Gens wird derzeit im Einzelfall bei Verdacht auf das Vorliegen einer CADASIL-Erkrankung zunächst gezielt bzw. einem Stufenschema folgend nach Mutationen in bestimmten Exons (in den sog. Mutations-Hotspots) gesucht. Dementsprechend finden sich in der publizierten Literatur wenige systematische Arbeiten, die die kodierenden Abschnitte des humanen Notch3-Gens jeweils vollständig sequenziert haben.

- Wir haben unselektionierte junge Schlaganfallpatienten (in der Altersgruppe von 18-55 Jahren), die in zufälliger Weise aus der Patientenkohorte der SIFAP-Studie entnommen worden sind, auf Notch3-Mutationen untersucht. Diese Analyse beinhaltete eine umfassende Kompletts-Sequenzierung aller bekannten Exons des humanen Notch3-Gens.

### 1.12.2. Zielsetzung der Arbeit:

- 1) Bestimmung der Frequenz von humanen Notch3-Gen-Mutationen in einer nicht-selektierten Kohorte von jungen Schlaganfallpatienten.
- 2) Analyse und Charakterisierung der gefundenen Mutationen, insbesondere der sog. Zystein-aussparenden Mutationen.
- 3) Charakterisierung des klinischen und MR-morphologischen Phänotyps derjenigen Patienten, die Zystein-aussparende Mutationen im humanen Notch3-Gen aufweisen (im Vergleich zu einer kleineren, von SIFAP unabhängigen Kontrollgruppe mit klassisch-paradigmatischen - jeweils zu einer ungeraden Zahl von Zysteinresten in den EGFR führenden - Mutationen, die repräsentativ für den prototypischen CADASIL-Phänotyp dargestellt werden sollten).
- 4) Die zentrale Fragestellung versucht zu klären, inwiefern diese Zystein-aussparenden Sequenzveränderungen im Sinne von Polymorphismen oder als relevante Mutationen mit einem atypischen klinischen Verlauf zu interpretieren sind.

## 2. MATERIAL UND METHODIK

### 2.1. AUSWAHL DER PATIENTEN

In der SIFAP1-Studie wurden 5.000 Schlaganfallpatienten im Alter zwischen 18 und 55 Jahren aus einem paneuropäischen Kollektiv auf das Vorliegen von Mutationen innerhalb des AGLA-Gens und damit einem molekulargenetisch nachgewiesenen M. Fabry untersucht. Die genetische Analyse erfolgte zentralisiert und komplett automatisiert an der Universität Rostock. Aus der großen SIFAP-Kohorte von jungen Patienten mit Schlaganfall, die keinen M. Fabry aufwiesen, wurden für die vorliegende Arbeit die ersten 154 Schlaganfallpatienten aus der rekrutierten Kohorte ausgewählt und deren DNA auf das Vorliegen von Mutationen im humanen Notch3-Gen untersucht.

Als Kontrollgruppe für die Mutationsanalyse (sog. „stroke-negative“-Kontrollgruppe) wurde in einer eigenen Biobank angelegte Blutproben von Individuen mit diversen genetisch bedingten, per se nicht zum Schlaganfall führenden Erkrankungen verwendet (sowohl manifest Erkrankte mit molekulargenetisch bestätigter Diagnose, Mutationsträger sowie auch Verdachtsfälle; *Übersicht siehe Tab. 1 im Anhang*).

Zusätzlich ist eine Kohorte von CADASIL-Patienten (Pat. S. O., M. R., H. R., G. C.), deren Diagnose an unserem Zentrum (Zentrum für Nervenheilkunde/AKos, Universität Rostock, Zeitraum 2006-2010) gestellt und molekulargenetisch unterlegt werden konnte, zur Veranschaulichung eines repräsentativen, relativ prototypischen klinisch-neuroradiologischen Phänotyps bzw. als Vergleichsgruppe zu möglichen Phänotypen der gefundenen Mutationen im SIFAP-Kollektiv in diese Arbeit aufgenommen worden.

### 2.2. GENETISCHE ANALYSEN/SEQUENZANALYSEN DES NOTCH3-GENS

Die DNA-Sequenz- bzw. Mutationsanalyse erfolgte durch Amplifikation aller Exons des Notch3-Gens inkl. ihrer intronisch flankierenden Regionen sowie eine anschließende direkte Sequenzierungen der erzeugten Amplikons, basierend auf der Dideoxy-Nukleotid-Methode nach Sanger (Sanger et al, 1977). In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 154 Patienten und 527 „stroke-negative“-Kontrollpersonen auf das Vorliegen von Sequenzvarianten bzw. Mutationen in den kodierenden Sequenzen der Exons 1-33 sowie derer Intron-Exon-Übergänge mit der in der Folge beschriebenen und einzeln erläuterten Methodik untersucht:

*- Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Vollblut:*

Die Isolierung von genomischer DNA erfolgte aus Blutleukozyten von EDTA-stabilisierten Blutproben (10 ml EDTA-Blut), die unserem Zentrum im Rahmen der SIFAP1-Studie zugesandt wurden. 1.8 ml Vollblut jeder einzelnen Probe wurden für die DNA-Extraktion eingesetzt, die in automatischer Weise mithilfe eines Pipettierroboters der Firma Hamilton (Liquid handling work stations Hamilton STAR™ und Hamilton STARplus™; Hamilton Robotics GmbH, Martinsried/D) unter Verwendung eines DNA-Isolationskits ablief (AGOWA mag Maxi DNA Isolation Kit PLUS™, Firma AGOWA genomics/AGOWA GmbH, Berlin/D). Die DNA-Isolierung basiert hierbei auf der Bindung der DNA an magnetischen Mikropartikeln in einer polydispersen Lösung (sog. „magnetic beads“). Das verwendete DNA-Isolierungsprotokoll im automatisierten System erlaubte eine Ausbeute von ca. 30 µg DNA (Konzentration 50 µg/ml) pro Patientenprobe.

*- Fluorophotometrische Konzentrationsbestimmung und Verdünnung der DNA:*

Nach der Isolation erfolgten innerhalb des Pipettierautomaten photometrische Bestimmungen der DNA-Konzentration in einem Fluorometer (Fluoroskan Ascent™, Firma Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich/D). Anschließend wurden die DNA automatisiert mit TE-Puffer auf eine vorgegebene genormte DNA-Konzentration von 50 µg/ml verdünnt. Ein Aliquot dieser normkonzentrierten DNA-Lösung wurde für den nachfolgenden Schritt der PCR-Amplifizierung verwendet, der Rest der Stock-DNA vom Roboter als Rückstellprobe in einer sog. Biobank eingelagert.

*- Automatisierte PCR zur Amplifizierung der gewünschten DNA-Abschnitte:*

*-- Grundprinzip der PCR („polymerase chain reaction“):*

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine von Kary B. Mullis entwickelte Standardmethode zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Fragmenten (Saiki et al, Science 1988). Der Kopiervorgang einer DNA-Zielsequenz beruht dabei auf sich wiederholenden Zyklen von 3 Reaktionsschritten („Denaturierung“, „Annealing“ und „Elongation“), deren Abfolge temperaturgesteuert wird. In einem ersten Schritt wird das doppelsträngige DNA-Molekül, das die zu kopierende Sequenz enthält, bei einer Temperatur um 94-95°C durch Hitzeeinwirkung in seine beiden komplementären Einzelstränge aufgetrennt (=„Denaturierung“). Durch Herabsetzung der Temperatur auf 37-65°C verbinden sich in einem zweiten Schritt zwei DNA-Oligonukleotide

definierter Sequenz (sog. „Primer“) mit den zu ihnen komplementären Abschnitten am jeweiligen 3`-Ende der DNA-Einzelstränge (=„Annealing“). In einem dritten Schritt erfolgt die Neusynthese eines komplementären Gegenstranges durch eine hitzestabilen DNA-Polymerase (*Taq-Polymerase*; optimale Arbeitstemperatur um 65-75°C), wobei die hybridisierten Primer als Startermoleküle für die Polymerisation von Desoxyribonukleotiden (dNTPs) dienen und entlang der einzelsträngigen DNA-Vorlage (sog. „Matrize“ oder „Template“) in 5`→ 3`-Richtung verlängert werden (=„Extension“ oder „Elongation“). Das so generierte DNA-Doppelstrang-Molekül wird als zusätzlich entstandenes Template in die folgenden Zyklen einbezogen. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Oligonukleotid-Primerpaares wird ab dem zweiten Zyklus gezielt die DNA-Sequenz vervielfältigt, die sich zwischen den beiden Primer befindet. Bei jedem neuen PCR-Zyklus verdoppelt sich idealerweise die Anzahl an kopierten DNA-Molekülen (sog. „exponentielle Amplifikation“), so dass nach 20 Zyklen aus einem einzigen doppelsträngigen DNA-Molekül theoretisch eine Million Kopien entstehen. Die PCR findet üblicherweise in einem sog. Thermocycler statt, der die in ihm befindlichen Gefäße mit den Reaktionsansätzen möglichst schnell und präzise auf diejenige Temperatur erhitzt bzw. kühlt, die für den jeweiligen Reaktionsschritt benötigt wird.

-- Grundprinzip der Touchdown-PCR:

Die sog. Touchdown-PCR stellt eine Modifikation der Standard-PCR dar mit einer Abwandlung des Profils des Thermocyclerprogramms zur Erhöhung der Spezifität der initialen Primer-Template-Bindung und damit des finalen PCR-Produktes. Die Annealing-Temperatur wird im initialen Zyklus 5-10°C über der Schmelztemperatur des Primers (=T<sub>m</sub>) gewählt und in den folgenden Zyklen in Schritten von 1-2°C pro Zyklus reduziert bis eine Temperatur um T<sub>m</sub> oder bis zu 3-5°C unterhalb der T<sub>m</sub> erreicht wird. Das Hochhalten der Annealing-Temperatur in den ersten Zyklen soll initial die hochspezifische Primer- Bindung begünstigen bis eine gewisse Anzahl von gewünschten Amplikons geschaffen ist. Das zyklusweise Absenken der Annealing-Temperatur dient dann der quantitativen Vermehrung der initial erzeugten spezifischen Templates bzw. dem Erhalt einer möglichst hohen Ausbeute.

-- *Protokoll für die hier verwendete Touchdown-PCR:*

Die vom Pipettierroboter aus den jeweiligen Blutproben isolierten und normierten DNA-Lösungen wurden zusammen mit den im folgendem aufgeführten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien in vorgegebener Weise der sog. PCR-Strecke des Hamilton-Pipettierautomaten vorgelegt. Das System verdünnte dabei zunächst erneut ein Aliquot der normierten DNA-Lösung mit H<sub>2</sub>O von der Norm-Konzentration auf eine Arbeitslösung-Konzentration von 10 µg/ml. Jeweils 175 µl (35 x 5 µl) der so erhaltenen DNA-Lösungen von insgesamt 7 (Patienten-) Proben wurden vom System daraufhin in einer definierten Weise auf eine 384-Well-Platte für 35 PCR-Ansätze (35 Ansätze pro Probe entsprechend den 35 für die insgesamt 33 Exons eingesetzten Primerpaaren) verteilt: Die Platte besitzt 384 Wells in 24 „Spalten“ (1-24) und 16 „Zeilen“ (A bis P), jeweils 5 µl DNA wurde in ein Well gefüllt nach folgender Anordnung: Patient 1 = Zeile A (A1-A24) und B (B1-B11); Patient 2 = Zeile C (C1-C24) und D (D1-D11); etc., Pat 7 = Zeile M (M1-M24) und N (N1-N24); 35 Wells in 2 Zeilen wurden darüberhinaus als Kontrolle mit H<sub>2</sub>O befüllt. Insgesamt wurden somit also 280 Wells (7 x 35 mit DNA-Proben + 35 mit H<sub>2</sub>O) der 384-Well-Platte besetzt, die somit in einem gleichzeitigen Arbeitszyklus die Aufarbeitung von 7 (Patienten-) Proben erlaubte. Zu jeder DNA-Lösung in einem Well (5 µl DNA) wurde dann automatisch ein PCR-Gemisch (20 µl) hinzupipettiert und die entsprechenden Wells mit dem jeweiligen spezifischen PCR-Primer (1 µl forward und 1 µl reverse Primer pro Well) ergänzt. Das PCR-Gemisch bestand aus RNAase-freiem Wasser und dem HotStarTaq Mastermix™ (beinhaltet HotStar Taq DNA Polymerase (5 U/ml), PCR Buffer (mit 3 mM MgCl<sub>2</sub>) und 400 µM von jedem dNTP; Firma Qiagen, Hilden/D). Anschließend wurde die so vorbereitete Platte in einen 384-Well-Heizblock eines PCR-Thermal-Cyclers (DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler™, Firma Bio-Rad, München/D) transferiert und eine Touchdown-PCR-Amplifizierungsreaktion unter folgenden Programmbedingungen gestartet:

<b>Initiale Denaturierung</b>	95°C	15 min	
<b>Denaturierung</b>	94°C	30 sec	} 13 Zyklen
<b>Annealing</b>	66°C - 1.5 °C/ Zyklus	30 sec	
<b>Elongation</b>	72°C	20 sec	
<b>Denaturierung</b>	94°C	30 sec	} 8 Zyklen
<b>Annealing</b>	46.5°C + 1.0 °C/ Zyklus	30 sec	
<b>Elongation</b>	72°C	20 sec	
<b>Denaturierung</b>	94°C	30 sec	} 11 Zyklen
<b>Annealing</b>	54.5°C + 1.0 °C/ Zyklus	30 sec	
<b>Elongation</b>	72°C	20 sec	
<b>Finale Extension</b>	72°C	5 min	
<b>Abkühlung</b>	4°C	∞	

*- Reinigung der PCR-Produkte (ExoSAP Aufreinigung):*

Zur enzymatischen Aufreinigung der durch die Amplifikation erhaltenen PCR-Produkte wurde ein sog. „ExoSAP“-Reagenzienansatz (ExoSAP-IT™ PCR Clean-up, Firma Affymetrix Inc./USB Corporation, Cleveland Ohio/USA) verwendet, der der Entfernung von ungewünschten Komponenten wie überschüssigen Primer und Nukleotiden dient, die mit nachfolgenden Reaktionsschritten wie der Sequenzierungsreaktion interferieren könnten. Hierzu wurde noch während der PCR-Inkubationszeit eine weitere 384-Well-Platte vom System vorbereitet und mit dem ExoSAP-Ansatz versehen, der die Enzyme „Exonuklease I“ (Abbau der überschüssigen Primer) und „Shrimp alkaline phosphatase“ (Abbau überschüssiger Nukleotide) sowie einen Anteil Tris-Puffer enthält (hier verwendetes Protokoll: 4 µl Exo-SAP-Master-Ansatz bestehend aus je 1 µl „Shrimp alkaline phosphatase“, 0,5 µl „Exonuklease I“ und 2.5 µl Tris-Puffer pro Well).

Nach Beendigung der Touchdown-PCR-Zyklen wurden die PCR-Produkte (jeweils 5 µl PCR-Produkt pro Well) in die mit ExoSAP vorbereitete Platte umpipettiert und der Reinigungsschritt mittels einer erneuten Inkubationsphase im PCR-Thermal-Cycler (DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler™, Firma Bio-Rad, München/D) katalysiert (15 Minuten 37°C, 15 Minuten 80°C, ∞ 4°C).

*- Sequenzierungsreaktion (Sequenzierungs-PCR; CycleSequencing):*

*-- Grundprinzip der Sequenzierungsreaktion:*

Das Ausgangsmaterial für die „Dideoxy-“ oder auch „Kettenabbruch“-genannte Methode nach Sanger ist Einzelstrang-DNA (Sanger et al, 1977). Bei diesem Verfahren wird analog zur PCR der zu sequenzierende DNA-Einzelstrang nach Bindung eines spezifischen Primers durch eine Polymerase verlängert. Neben



Desoxy-Nukleotiden (*dNTPs*) werden der Reaktion jedoch auch zu einem geringeren Anteil (ca. 10 %) fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleotide (*ddNTPs*) beigefügt, die nach ihrem Einbau in die wachsende Polynukleotidkette durch das Fehlen ihrer 3'-OH-Gruppe zu einem Kettenabbruch führen (sog. *Terminatoren*). Die Mischung von *dNTPs* und *ddNTPs* wird so gewählt, dass es statistisch gesehen an jeder Nukleotidposition einmal zum Einbau eines *ddNTPs* und damit zum Kettenabbruch kommt. Somit erhält man DNA-Ketten unterschiedlicher Länge, deren letzte - zum Kettenabbruch führende - Base fluoreszenzmarkiert ist, wobei jede der vier möglichen *ddNTPs* mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekennzeichnet ist. Die so durch die Sequenzierreaktion entstandenen Populationen an unterschiedlich langen DNA-Fragmenten mit unterschiedlich markierter letzter Base lassen sich im Folgenden in einem hochauflösenden Elektrophoreseverfahren auftrennen (z. B. Kapillarelektrophorese in einem entsprechend ausgestatteten Sequenziergerät). Die Detektion der mit 4 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Fragmente erfolgt durch Anregung der Farbstoffe über fokussierte Argon-Laserstrahlen und Auswertung der Emission nach spektraler Aufspaltung über eine hochauflösende CCD (charge coupled device)-Kamera. Aus der Kombination von Laufstrecke und Fluoreszenzsignalen der Fragmente lässt sich letztendlich die DNA-Sequenz ermitteln. Mithilfe einer gerätespezifischen Auswertesoftware des Sequencers werden die detektierten Emissionspeaks in eine Sequenzabfolge übersetzt.

*-- Protokoll der Sequenzierungsreaktion:*

Parallel zur ExoSAP-Reinigung der erhaltenen PCR-Produkte wurden vom Pipettierroboter vorbereitend einer dritten 384-Well-Platte die Sequenzierungsreaktions-Ansätze vorgelegt. Dieser sog. Cycle Sequencing Mastermix (Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Darmstadt/D), bestehend aus einem Sequenzierpuffer und der BigDye™-Lösung (enthält als gebrauchsfertiger Mix alle benötigten Komponenten wie Puffer, *dNTPs*, fluoreszenzmarkierte *ddNTPs* und die Taq Polymerase), wurde mit einem jeweils spezifischen Sequenzier-Primer versetzt (*Übersicht über die verwendeten Primer: Tab. 2 im Anhang*). Im Gegensatz zur PCR, bei der für jeden Reaktionsansatz forward- und reverse-Primer zur Amplifizierung eines DNA-Segmentes eingesetzt werden, wird bei der Sequenzierungsreaktion pro Reaktionsansatz entweder ein forward- oder reverse-Primer benutzt. Die Reaktionskomponenten wurden in einem

Gesamtvolumen von 9  $\mu$ l pro Well angesetzt, darin enthalten waren 1  $\mu$ l Primer (10  $\mu$ M), 0.5  $\mu$ l BigDye-Lösung, 2  $\mu$ l Sequenzierpuffer sowie 5,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Nach automatisierter Zugabe von 1  $\mu$ l des gereinigten PCR-Produktes pro Well in die 384-Well-Platte wurden die Ansätze in den Thermal-PCR-Cycler (DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler™, Firma Bio-Rad, München/D) transferiert und die Sequenzierungs-PCR nach folgenden Programmbedingungen durchgeführt:

<b>Denaturierung</b>	96°C	20 sec	} 30 Zyklen
<b>Annealing</b>	50°C	20 sec	
<b>Elongation</b>	60°C	4 min	
<b>Abkühlung</b>	4°C	$\infty$	

*- Reinigung der Sequenzierprodukte:*

In einem nächsten Schritt erfolgte die Reinigung der erhaltenen Cycle-Sequencing-Amplifikate von nicht-inkorporierten Terminatoren, Nukleotiden, Salzen und anderen Kontaminationen, basierend auf der Bindung der Sequenzierprodukte an magnetischen Partikeln in einem sog. „solid phase reversible immobilization“ Purifikationssystem (Agencourt CleanSEQ™, Agencourt Bioscience Corporation der Firma Beckman Coulter Genomics, Danvers Massachusetts/USA). Hierzu wurde zu jedem Amplifikat in den Wells der 384-Platte Agencourt Clean SEQ™ (mit magnetischen Partikeln = „magnetic beads“) hinzugegeben sowie mit 85 % Ethanol gemischt und inkubiert (zur alkoholischen Präzipitierung der DNA, in den restlichen 15 Vol% ddH<sub>2</sub>O lösen sich Verunreinigungen). Die Platte wurde dann auf einen Magnetblock platziert und ein Magnetfeld eingeschaltet, wodurch sich die „magnetic beads“ mit den gebundenen Cycle-Sequencing-Produkten an den Böden der Kavitäten/Wells sammeln. Der Überstand (mit den Terminatoren/Kontaminationen) wurde abgesaugt und verworfen. Dieser Waschschrift mit 85 % Ethanol wurde mehrfach wiederholt, die „magnetic beads“-Pellets dann unter Ausschaltung des Magnetblockes trocken abpipettiert und in bidestilliertem Wasser gelöst, damit sich die Sequenzierprodukte von den Magnetpartikeln lösen und im Wasser eluieren konnten. Die Platte wurde daraufhin erneut auf dem Magnetblock platziert, so dass die im klaren Überstand eluierten PCR-Sequenzierprodukte über dem „magnetic bead“-Pellet abpipettiert und letztendlich auf eine Sequenzierplatte übertragen werden konnten, wo sie mit Mineralöl überschichtet wurden, um eine Degradierung der Cycle-Sequencing-Produkte zu vermeiden.

*- Sequenzierung/Sequenzierungsanalyse:*

Mit Hilfe des „ABI 3130xl Genetic Analyzer™ (Firma Applied Biosystems, Foster City, CA/USA) wurden die in der Sequenzierreaktion entstandenen 3'-fluoreszenzmarkierten DNA-Extensionsprodukte kapillar-elektrophoretisch der Länge nach aufgetrennt. Das vollautomatische Sequenziergerät ist mit einem Multi-Kapillar-Array (insgesamt 16 mit einem gelartigen Fertigpolymer gefüllte Quarzglaskapillaren) ausgestattet, der die gleichzeitige Auftrennung von mehreren Proben erlaubt. Am anodennahen Ende der jeweiligen Kapillare durchliefen die aufgetrennten Sequenzprodukte einer Probe ein Detektionsfenster, durch das die fluoreszenzmarkierten Fragmente von einem Laser angeregt wurden. Die an einem Detektor registrierte Abfolge der einzelnen Fluoreszenzsignale gibt dabei direkt die Nukleotidfolge des sequenzierten DNA-Stranges wieder. Mittels einer gerätespezifischen Software kann diese Abfolge anhand von farbigen Peakdiagrammen in einem sog. Chromatogramm visualisiert und die gesuchte DNA-Sequenz letztendlich ermittelt bzw. abgelesen werden. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte unter Verwendung der Software SeqPilot™ (JSI medical System GmbH), die die Sequenzen mit der hinterlegten Wildtyp-Sequenz des jeweiligen Genabschnitts verglich und letztlich die gefundenen Veränderungen/ Mismatches anzeigte. Zur Beschreibung bzw. Nukleotid-Positionsangabe der Mutationen auf kodierender DNA-Ebene verwendeten wir in unserer Arbeit die auf die NCBI-Referenz-Sequenz NG\_009819.1 bezogene Nukleotidfolge der CDS (coding sequences) (Referenzsequenz des National Center for Biotechnology Information (NCBI): "Homo sapiens Notch homolog 3 (Drosophila) (NOTCH3), RefSeqGene on chromosome 19"). Die erste Base (A) des für das Methionin-/Start-Kodon kodierenden Triplets (ATG) entspricht hierbei der Nukleotidnummer 1.

*- Manuelle Wiederholungen:*

Im Falle der Identifikation einer Abweichung in der Notch3-Sequenz wurde das Ergebnis beim entsprechenden Patienten durch eine selektiv auf das betroffene Exon beschränkte PCR-Amplifikation und anschließende Sequenzierung nochmals überprüft sowie zusätzlich durch eine manuelle Wiederholung der Analyse bestätigt. Hierzu erfolgte zunächst eine erneute DNA-Isolierung aus 200 µl Vollblut mittels eines High Pure PCR Template Kit™ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/D), das auf der Bindung der DNA an Filter-Tube-Einsätzen basiert. Mittels eines manuell

erstellten PCR-Ansatzes (ausgehend von 2,5 µl der gewonnenen DNA für die Amplifikation des jeweiligen Exons, versetzt mit 6,25 µl HotStarTaq Polymerase Mastermix™, 2,75 µl RNase freiem Wasser sowie 1 µl Primer (0,5 µl forward und 0,5 µl reverse Primer)) und einer anschließenden direkten Sequenzierung in einem vollautomatischen Sequenziergerät nach oben beschriebenen Standardbedingungen wurde die vorangehend gefundene Sequenzveränderung/-variation verifiziert.

Jede nachgewiesene Sequenzveränderung der genomischen DNA wurde jeweils mit über 250, im Falle von wahrscheinlichen Mutationen mit über 500 Kontroll-DNA-Proben („stroke-negative“ Kontrollgruppe; Vgl. **Tab. 1 im Anhang**) verglichen.

CADASIL-Patienten (Pat. S. O., M. R., H. R., G. C.), die aus einem eigenen, von SIFAP unabhängigen Patientenkollektiv stammen und als Vergleichsgruppe mit einem repräsentativen, relativ klassischen klinisch-neuroradiologischen Phänotyp aufgeführt werden sollten, sind ursprünglich mit derselben - oben dargelegten – Methodik (Ausnahme: manuelles statt automatisiertes Pipettieren) molekulargenetisch untersucht worden. Auf dieser Basis konnte bei ihnen jeweils eine krankheitsverursachende Mutation nachgewiesen werden.

## 2.3. CHARAKTERISIERUNG VON PHÄNOTYPEN

### 2.3.1. Charakterisierung des Phänotyps der gefundenen Notch3-Mutationen

Die phänotypische Charakterisierung der Indexpatienten, bei denen mit o.g. Methoden eine mit einer Mutation vereinbare Variation in der Notch3-Sequenz identifiziert wurde, basiert auf anamnestischen und klinischen Daten sowie einer multimodalen MR-Bildgebung des Neurocraniums. Die Daten wurden aus dem webbasierten CRF („case report form“) der SIFAP-Studie und vor Ort im entsprechenden Zentrum über die zuständigen Ärzte erhalten und gesammelt.

Sie beinhalteten bei jedem betroffenen Patient Informationen zu:

#### - ANAMNESE:

- Anamnese zum erlittenen Schlaganfall
- frühere Schlaganfälle oder zerebrovaskuläre Ereignisse
- Kopfschmerz-/Migräneanamnese
- Anamnese zu neuropsychiatrische Auffälligkeiten
- Vorerkrankungen, kardiovaskuläre Risikofaktoren, Medikation

## - FAMILIENANAMNESE

- insbesondere Vorkommen von Kopfschmerzen/Migräne, zerebrovaskulären Ereignissen, dementiellen Entwicklungen oder neuropsychiatrischen Auffälligkeiten innerhalb der Familie

## - KLINIK

- Dokumentation des neurologischen Status kurz nach dem Schlaganfallereignis

## - KRANIELLE MR-BILDGEBUNG:

- Multimodale MR-Bildgebung, die im Rahmen der SIFAP1-Studie kurz (innerhalb 30 Tagen) nach dem Schlaganfallereignis gefordert wurde, wobei sowohl eine neuroradiologische Analyse durch erfahrene, gegenüber den klinisch-epidemiologischen Daten verblindete Untersucher der Neurologischen Universitätsklinik Graz (Direktor Prof. F. Fazekas) wie auch eine eigenständige Analyse der Bilder erfolgten. Im MRT-Analyse-Zentrum in Graz erfolgte eine multiparametrische Beurteilung der MR-Bilder aller in die SIFAP-Studie eingeschlossenen Patienten, die u.a. folgende routinemäßig angewendete Skalen umfasste: Fazekas Rating Scale (Fazekas et al, 1987) zur Beurteilung der „white matter hyperintensities“ (WMH in der tiefen weißen Substanz: 0 = abwesend, 1 = punktuell, 2 = früh konfluierend, 3 = konfluierend; WMH in der periventrikulären Substanz: 0 = abwesend, 1 = Bleistift-dünne Linien, 2 = Halo mit  $\geq 5$  mm Dicke, 3 = irreguläre WMH mit Ausweitung in die tiefe weiße Substanz; WMH im Ponsbereich: 0 = abwesend, 1 = punktuell, 2 = früh konfluierend, 3 = konfluierend). Die globale Atrophie wurde mittels einer Vorlagen-basierten Skala eingeschätzt, die zwischen Werten von 1 (keine Atrophie) bis 8 (schwere Atrophie) abstuft und separat eine innere („ventrikuläre“) und äußere („sulkale“) Hirnatrophie beurteilt (Rating Scale nach Ryberg et al, 2008).

## - ZUSATZUNTERSUCHUNGEN:

- Laboruntersuchungen (Differentialblutbild, Blutchemie, HbA1c, Lipidstatus; Proteinurie), die im Rahmen der SIFAP-Studie gefordert wurden
- Doppler- und duplexsonographische Untersuchungen der hirnversorgenden extra- und intrakraniellen Gefäße
- EKG; fakultativ: Echokardiographie

### *2.3.1. Charakterisierung des Phänotyp-Spektrums von CADASIL-Patienten aus einer eigenen Patientenkohorte*

Das Spektrum der Phänotypen einer kleinen Kohorte von CADASIL-Patienten, deren Diagnose molekulargenetisch an unserem Zentrum im Zeitraum zwischen 2006-2010 gestellt wurde, soll mit klinischen Fallbeschreibungen umrissen werden. Die verfügbaren Daten zu den entsprechenden Patienten (Anamnese, Klinik, Verlauf, zerebrale MR-Bildgebungen, Familienanamnese) wurden ermittelt und die Betroffenen ergänzend im Rahmen einer Vorstellung an unserem Zentrum anamnestisch und klinisch-neurologisch evaluiert.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. GENETISCHE ANALYSEN/MUTATIONSANALYSEN

Bei der Untersuchung der kodierenden DNA-Bereiche des gesamten Notch3-Gens von insgesamt 154 SIFAP-Patienten ließen sich bei 3 Patienten Veränderungen identifizieren, die als hochwahrscheinliche Punktmutationen zu klassifizieren sind, da sie bei keiner von jeweils mindestens 498 Kontrollen nachgewiesen werden konnten (die einwandfrei verwertbare Anzahl von Kontrollen lag je nach überprüfter Mutationsposition zwischen 498 und 514). Darüberhinaus sind in derselben Kohorte insgesamt 3 Sequenzvariationen gefunden worden, die als sog. Polymorphismen („SNP“, single nucleotide polymorphismus) einzustufen sind. Folgende tabellarische Zusammenfassungen (**A**: gefundene und zu prüfende Sequenzvariationen, **B**: vermutliche Mutationen; **C**: vermutliche Polymorphismen) geben zu den molekulargenetisch gefundenen Ergebnissen einen Überblick:

##### A) Zusammenfassung von gefundenen und zu prüfenden Sequenzvariationen:

Zu prüfende Veränderung:	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5	Nr. 6	Nr. 7	Nr. 8	Nr. 9	Nr. 10
Exon	Exon 9	Exon 11	Exon 21	Exon 25	Exon 25	Exon 32	Exon 32	Exon 33	Exon 33	Exon 33
Nukleotid-Position	c.1490	c.1678	c.3399	c.4552	c.4639	c.5854	c.5868	c.6097	c.6221	c.6532
Nukleotid-Austausch	C>T	G>T	C>A	C>A	C>G	G>A	G>C	C>T	C>T	C>T
Position und Art des AS-Austausches	S497L	V560L	H1133Q	L1518M	L1547V	V1952M	L1956F	P2033S	P2074L	P2178S
<b>SIFAP1-Kollektiv</b>										
Anzahl der geprüften Patienten	154	154	154	154	154	154	154	154	154	154
Auftreten der Veränderung	3	0	6	0	1	3	0	0	1	1
<b>„stroke-negative“-Kontrollen</b>										
Anzahl der Patienten gesamt	288	239	288	527	527	288	527	527	527	527
Davon nicht verwertbar	3	7	10	13	13	9	29	29	29	23
Verbleibende Kontrollzahl	285	232	278	514	514	279	498	498	498	504
Auftreten der Veränderung	2	1	17	1	0	5	2	2	0	0

**B) Vermutliche Mutationen:**

Folgende hochwahrscheinliche Mutationen des Notch3-Gens wurden bei der direkten Sequenzierung aller Exons von 154 untersuchten Patienten gefunden:

Als MUTATION zu klassifizierende Veränderung:	Nr. 5	Nr. 9	Nr. 10
Exon	<b>Exon 25</b>	<b>Exon 33</b>	<b>Exon 33</b>
Nukleotid-Position	<b>c.4639</b>	<b>c.6221</b>	<b>c.6532</b>
Nukleotid-Austausch	<b>C&gt;G</b>	<b>C&gt;T</b>	<b>C&gt;T</b>
Position und Art des AS-Austausches	<b>L1547V</b>	<b>P2074L</b>	<b>P2178S</b>
Hetero-/Homozygotie	<b>het.</b>	<b>het.</b>	<b>het.</b>
<b>Zuordnung zu Patient/ SIFAP-Zentrum:</b>			
Patient	01 P 0052	17 P 1295	32 P 2629
Zentrum	Zentrum Graz	Zentrum Lyon	Zentrum Regensburg

Alle 3 Mutationen sind zum Zeitpunkt der Untersuchung in der publizierten Literatur bzw. bekannten Genmutationsdatenbanken nicht beschrieben worden. Sie führen alle zu einem Aminosäureaustausch, der die Aminosäure Zystein nicht tangiert.

**C) Vermutliche Polymorphismen:**

Folgende Polymorphismen in der Notch3-Sequenz wurden bei 154 untersuchten SIFAP-Patienten mit Schlaganfall (Vgl. „C1“) sowie in der Schlaganfall-negativen Kontrollgruppe (Vgl. „C2“) gefunden:

Als POLYMORPHISMUS zu klassifizierende Veränderung:	C1) SIFAP 1-Patienten			C2) Schlaganfall-negative-Kontrollgruppe („stroke-negative“-Kontrollen)			
	Nr. 1	Nr. 3	Nr. 6	Nr. 2	Nr. 4	Nr. 7	Nr. 8
Exon	<b>Exon 9</b>	<b>Exon 21</b>	<b>Exon 32</b>	<b>Exon 11</b>	<b>Exon 25</b>	<b>Exon 32</b>	<b>Exon 33</b>
Nukleotid-Position	<b>c.1490</b>	<b>c.3399</b>	<b>c.5854</b>	<b>c.1678</b>	<b>c.4552</b>	<b>c.5868</b>	<b>c.6097</b>
Nukleotid-Austausch	<b>C&gt;T</b>	<b>C&gt;A</b>	<b>G&gt;A</b>	<b>G&gt;T</b>	<b>C&gt;A</b>	<b>G&gt;C</b>	<b>C&gt;T</b>
Position und Art des AS-Austausches	<b>S497L</b>	<b>H1133Q</b>	<b>V1952M</b>	<b>V560L</b>	<b>L1518M</b>	<b>L1956F</b>	<b>P2033S</b>
Hetero-/Homozygotie	<b>het.</b>	<b>het.</b>	<b>het.</b>	<b>het.</b>	<b>het.</b>	<b>het.</b>	<b>het.</b>
<b>Gefunden bei SIFAP1-Patienten bzw. „stroke-negative“-Kontrollen:</b>							
SIFAP1-Patienten	3/154	6/154	3/154	0/154	0/154	0/154	0/154
„stroke –negative“ Kontrollen	2/285	17/278	5/279	1/232	1/514	2/498	2/498



### **3.2. FALLBESCHREIBUNGEN und KLINISCH-NEURORADIOLOGISCHER PHÄNOTYP VON PATIENTEN, BEI DENEN EINE HOCHWAHRSCHEINLICHE MUTATION IDENTIFIZIERT WURDE**

#### **3.2.1. PATIENT 32 P 2629 (SIFAP-ZENTRUM REGENSBURG)**

Mutation:

Exon 33, heterozygot, c.6532 C>T, [P2178S]: Heterozygote Mutation im Exon 33, die zu einem Nukleotid-Austausch an der Position 6532 von C>T und einem Aminosäure-Austausch an der Position 2178 von Prolin zu Serin führt.

Fall-/Patientenbeschreibung:

Bei diesem Patienten handelt es sich um einen 53-jährigen Mann europäischer Herkunft. Er erlitt am 24.09.2008 einen ischämischen, dem Carotis-Versorgungsgebiet links zuzuordnenden Schlaganfall, der zunächst durch eine in der Häuslichkeit aufgetretene global-aphasische Störung symptomatisch wurde, darüberhinaus kam es einige Stunden verzögert zu einer passageren einseitigen Visusstörung (Amaurosis fugax) im Sinne eines Zentralarterienverschlusses links.

Anamnestisch ließen sich Hinweise für ein mögliches Trauma in der näheren Vorgeschichte erheben, wobei der Patient vor ca. 2-3 Wochen im Rahmen einer Baumpflege von einer Leiter abgerutscht und mit seiner linksseitigen Halspartie auf eine Astgabel gestürzt sein sollte und seither über prädominant linksseitige Hals- und Schulterschmerzen klagte, die in den Kopfbereich ausstrahlten.

Zum Zeitpunkt der Aufnahme in der neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Regensburg war die Aphasie bereits komplett rückläufig und nicht mehr nachweisbar, persistierend fand sich eine Visusstörung links bei ansonsten unauffälligem neurologischem Status. In der zerebralen Bildgebung ließen sich MR-morphologisch frische, embolisch anmutende ischämische Areale im Bereich des hinteren Stromgebietes der A. cerebri media links (parieto-occipitale Areale im sog. hinteren Grenzstromgebiet) nachweisen. Im Rahmen der Abklärung des Schlaganfallgeschehens fanden sich sowohl in der MR-Angiographie der Halsgefäße wie auch neurosonographisch mit einer Dissektion vereinbare Veränderungen der Arteria carotis interna links. Für eine Dissektion sprachen ein relativ typisch konfigurierter, zipflig-konisch bis unter die

Schädelbasis zulaufender, distaler Verschluss der A. carotis interna, fehlende ausgeprägte arteriosklerotische Veränderungen der Halsgefäße und das mögliche Trauma in der Anamnese.

Die weiteren Routine-Abklärungen des zerebral-ischämischen Ereignis ergaben nicht-wegweisende Befunde: Laborchemisch fiel ein leicht erhöhtes HbA1c von 6.4 % auf, EKG und transthorakale Echokardiographie zeigten einen Normalbefund.

Konsekutiv wurde der Patient entsprechend dem Dissektionsnachweis überlappend mit einer subkutanen Heparinisierung auf eine orale Antikoagulation mit Marcumar für zumindest 6 Monate eingestellt.

#### Eigenanamnese/Vorgeschichte:

- Anamnestisch ließen sich keine früheren zerebrovaskulären Ereignisse, keine Migräne/gehäufte Kopfschmerzen und keine dementielle Entwicklung bzw. neuropsychiatrische Auffälligkeiten eruieren.
- An kardiovaskulären Risikofaktoren bestanden ein leichter, nicht-medikamentös geführter arterieller Hypertonus (ED im 27. LJ) sowie ein Nikotinabusus (Beginn 17. LJ; 20 Zigaretten/Tag).
- Z. n. Cholezystektomie, Z. n. Nasennebenhöhlenoperation.

#### Familienanamnese:

Die Familienanamnese ergab keine Hinweise für Migräne/Kopfschmerzen, zerebrovaskuläre Ereignisse, dementielle Entwicklungen oder neuropsychiatrische Auffälligkeiten.

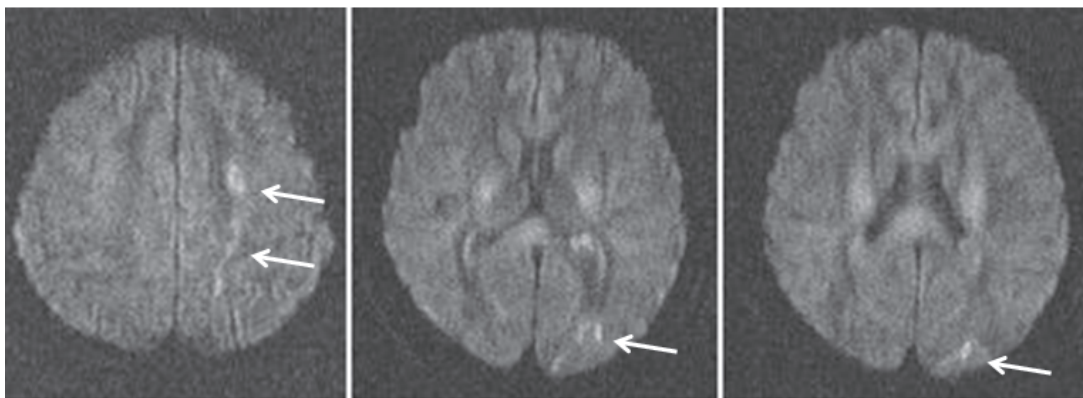
Familienanamnestisch bemerkenswert ist das Vorkommen eines systemischen Lupus erythematosus bei der mit 70 Jahren verstorbenen Mutter (wohl keine neuropsychiatrische Auffälligkeiten, allerdings mit kardialen Problemen) und eines Diabetes mellitus Typ 2 bei einem 26-jährigen Sohn des Patienten.

MRT-Bildgebung:

<b>cMRT vom 15.09.2008 (Patient 32 P 2629)</b>																	
Vorliegende MR-Sequenzen:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diffusionswichtung axial (DWI/EPI axial)</li> <li>- T1 axial und koronar</li> <li>- T2 axial</li> <li>- FLAIR axial</li> <li>- T2* axial</li> <li>- TOF-MR-Angiographie der großen intrakraniellen arteriellen Gefäße, CE-MR-Angiographie der supraaortalen Halsgefäße</li> </ul>																
Gefundene Pathologie:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Frische Ischämien parietooccipital (und fraglich frontobasal) links im Grenzstromgebiet der A. cerebri media links.</b></li> <li>- CE-MRA der Halsgefäße: <b>Distaler Verschluss der A. carotis interna links, aufgrund der Konfiguration des Gefäßabbruches (zipflig-zulaufend zur Schädelbasis) ist trotz fehlendem Nachweis eines eindeutigen Wandhämatoms von einer Dissektion der ACI links auszugehen</b></li> </ul>																
Weitere Analysen bezüglich:																	
- <b>WMH</b> (white mater hyperintensities)	Nicht/kaum vorhanden																
	<table border="1"> <tr> <td rowspan="3">Nach modifizierter Fazekas Rating Skala (min. 0 bis max. 3)</td> <td>deep WMH</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>periventricular WMH</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>pons WMH</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td rowspan="4">WMH im Bereich</td> <td>Anteriorer Temporalpol</td> <td>Nein</td> </tr> <tr> <td>Capsula externa</td> <td>Nein</td> </tr> <tr> <td>Inselregion</td> <td>Nein</td> </tr> <tr> <td>Frontallappen, gyrus frontalis sup.</td> <td>Nein</td> </tr> </table>	Nach modifizierter Fazekas Rating Skala (min. 0 bis max. 3)	deep WMH	0	periventricular WMH	0	pons WMH	0	WMH im Bereich	Anteriorer Temporalpol	Nein	Capsula externa	Nein	Inselregion	Nein	Frontallappen, gyrus frontalis sup.	Nein
Nach modifizierter Fazekas Rating Skala (min. 0 bis max. 3)	deep WMH		0														
	periventricular WMH		0														
	pons WMH	0															
WMH im Bereich	Anteriorer Temporalpol	Nein															
	Capsula externa	Nein															
	Inselregion	Nein															
	Frontallappen, gyrus frontalis sup.	Nein															
- <b>Microbleeds</b> (Mikrohämorrhagien in T2*)	Nicht vorhanden																
- <b>Zerebrale Atrophie</b>	Sehr gering																
	<table border="1"> <tr> <td rowspan="2">Nach Atrophie-Score (min. 0 bis max. 8)</td> <td>ventricular atrophy</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>sulcal atrophy</td> <td>5</td> </tr> </table>	Nach Atrophie-Score (min. 0 bis max. 8)	ventricular atrophy	2	sulcal atrophy	5											
Nach Atrophie-Score (min. 0 bis max. 8)	ventricular atrophy		2														
	sulcal atrophy	5															
- <b>Gefäße</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- distaler Verschluss der ACI links (mit vermutlicher kompensatorischer Auffüllung der MCA links über die retrograd perfundierte ACA)</li> <li>- keine Ektasien/Elongationen der Gefäße, keine vaskulären Malformationen</li> </ul>																

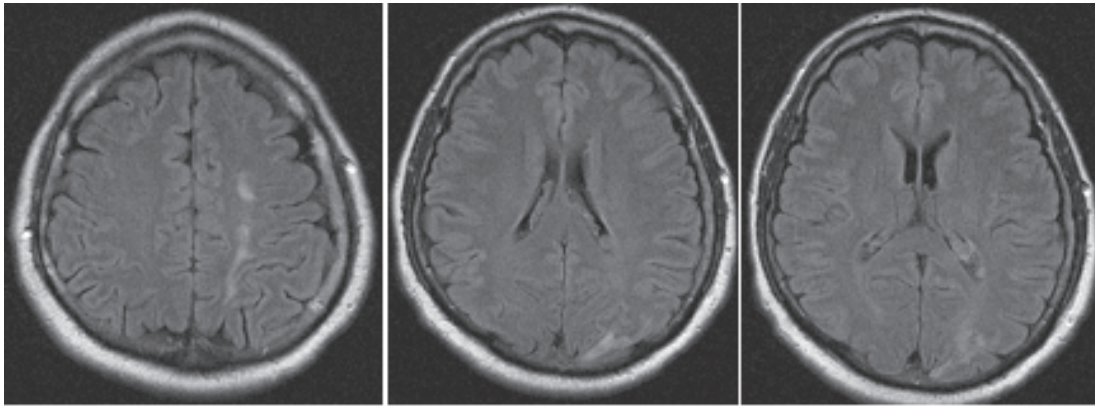
Illustrierende Abbildungen der MRT-Sequenzen Patient 32 P 2629:

- Diffusionswichtung (Epi/Diff), axial:

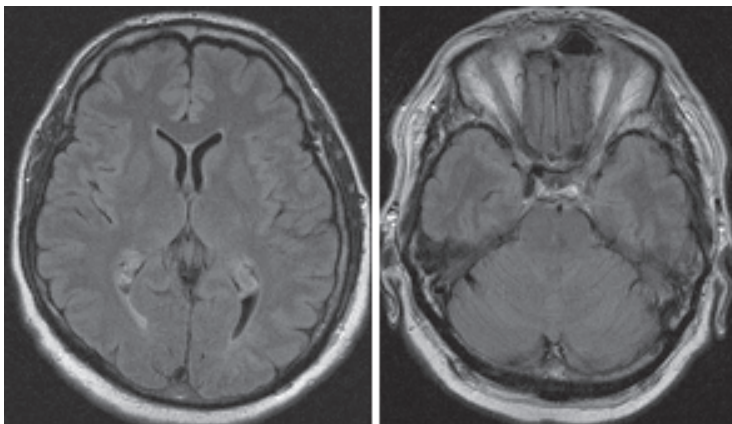


Axiale diffusionsgewichtete Sequenzen mit Nachweis von multiplen Diffusionseinschränkungen parieto-occipital links (→)

- FLAIR, axial:



Axiale FLAIR-Sequenzen mit multiplen Hyperintensitäten parieto-occipital links



Axiale FLAIR-Sequenzen ohne wesentliche WMH/Hyperintensitäten supratentoriell. Keine WMH im anterioren Temporalpol.

- CE-MR-Angiosequenz der Halsgefäße:



CE-MRA der supraaortalen Gefäße mit Darstellung einer Dissektion der A. carotis interna links (zipflig zur Schädelbasis zulaufender Verschluss; markiert mit →)

### 3.2.2. PATIENT 17 P 1295 (SIFAP-ZENTRUM LYON)

#### Mutation:

Exon 33, heterozygot, c.6221 C>T, [P2074L]: Heterozygote Mutation im Exon 33, die zu einem Nukleotid-Austausch an der Position 6221 von C>T und einem Aminosäure-Austausch an der Position 2074 von Prolin zu Leucin führt.

#### Fall-/Patientenbeschreibung:

Bei diesem Patienten handelt es sich um einen rechtshändigen 45-jährigen Mann tunesischer Herkunft, der am 24.04.2008 aufgrund einer plötzlich aufgetretenen motorisch- und beinbetonten Halbseitensymptomatik rechts der Schlaganfall-Einrichtung der Neurologischen Klinik von Lyon zugewiesen wurde. Bei Aufnahme wurde eine rechtsseitige, beinbetonte und ataktische Hemiparese mit Pyramidenbahnzeichen festgestellt. Am 4. Tag war eine klinische Verschlechterung mit einer neu aufgetretenen leichten Parese der linken unteren Extremität sowie einer Dysarthrie ersichtlich. Darüberhinaus wurden nach der Akutphase im weiteren Verlauf eine leichte anomische/aphasische Störung, anosognostische Elemente sowie mittelgradige mnestisch-kognitive Defizite mit führenden exekutiven sowie Aufmerksamkeits-, Auffassungs- und verbalen Gedächtnisstörungen manifest.

Ursächlich konnten MR-morphologisch am Aufnahmetag und in einer Kontrollbildgebung vom 29.04.2008 (am 4.Tag) frischere zerebrale Ischämien in mehreren vaskulären Stromgebieten nachgewiesen werden, bestehend aus Läsionen sowohl im Stromgebiet der A. cerebri media links (territorialer MCA-Infarkt mit Läsion striatokapsulär sowie Zeichen eines embolisch gestreuten territorialen Partialinfarktes im eher hinteren Stromgebiet links) wie auch im Bereich des rechten Hirnstammes (ischämische Läsion pontin dorsal paramedian rechts in der DWI-Sequenz, zusätzlich mögliche Mikroblutungen hier aufgrund von Bewegungsartefakten nicht sicher auszuschließen). Welche der Läsionen oder ob beide Läsionen verantwortlich zeichneten für oben erwähnte Klinik konnte mit letztendlicher Sicherheit nicht bestimmt werden, sowohl die supratentoriellen links- als auch die infratentoriellen rechtsseitigen Veränderungen erschienen in der MRT ungefähr gleich alt. Die MR-angiographischen Sequenzen der intrakraniellen Gefäße zeigten keine Stenosen

oder Verschlüsse, die Basilararterie (wie auch die beiden internen Carotiden) imponierten in einer dolichoektatischen Konfiguration.

Die Zusatzuntersuchungen im Rahmen der Abklärung des Multiinfarktgeschehens ergaben folgende Befunde: Die transösophageale Echokardiographie brachte eine hypertrophe Kardiomyopathie mit einem linksaurikulären Thrombus zum Vorschein. Am Aufnahmezeitpunkt ist elektrokardiographisch noch ein Sinusrhythmus mit einer lateralen T-Wellen-Invertierung festgestellt worden, im Verlauf konnte am 21. Tag ein mit einer kardiopulmonalen Dekompensation einhergehendes Vorhofflimmern detektiert werden (das in einer späteren EKG-Holter-Untersuchung permanent persistierte). Neurosonographisch fanden sich keine relevanten Stenosen oder Verschlüsse der extrakraniellen Carotiden oder Vertebralien (bei vermutlicher Hypoplasie der A.vertebralis rechts bzw. prädominantem rechtsseitigem Vertebralisversorgungstyp). Paraklinisch-laborchemisch imponierten eine Niereninsuffizienz (Kreatininclearance nach Cockcroft 60 ml/min) und ein leicht erhöhtes HbA1c von 6,2 % bei fehlender Dyslipidämie. Auf dem Boden einer am ehesten kardioembolisch vermuteten Genese des zerebrovaskulären Geschehens wurde die vorbestehende Sekundärprophylaxe von Clopidogrel auf eine orale Antikoagulation mit Fluindione (Ziel-INR 2,5) gewechselt.

Im Rahmen einer klinisch-neurologischen Verlaufskontrolle 10 Monate später wies der Patient noch eine moderate Parese der rechten unteren Extremität auf (konnte aber ohne Hilfe gehen), darüberhinaus fielen eine persistierende anomische Sprachstörung und Aufmerksamkeitsdefizite auf.

#### Eigenanamnese/Vorgeschichte:

- Frühere klinisch relevante zerebrovaskuläre Ereignisse, eine Migräne/gehäufte Kopfschmerzen und eine vorangehende dementielle Entwicklung bzw. neuropsychiatrische Auffälligkeiten ließen sich anamnestisch nicht erheben.
- An kardiovaskulären Risikofaktoren bestand eine Adipositas (BMI = 37 kg/m<sup>2</sup>) bzw. in diesem Kontext ein metabolisches Syndrom mit einem Diabetes mellitus Typ 2 (ED 2004, komplizierende diabetische Retinopathie; Incompliance bezüglich Behandlung mit Metformin und Gliclazid) sowie einem dürrtig kontrollierten arteriellen Hypertonus (unter Behandlung mit Verapamil, Losartan



und Hydrochlorothiazid). Kein Nikotinabusus. Keine Koronare Herzkrankheit, keine Myokardinfarkte, keine Herzrhythmusstörungen vorbekannt.

- Vorgeschichtlich wies der Patienten darüberhinaus eine chronische Hepatitis C (unter Behandlung mit Peginterferon alpha-2a und Ribavirin), eine Hypothyreose (Substitutionsbehandlung mit L-Thyroxin) sowie ein obstruktives Schlafapnoesyndrom auf.

Familienanamnese:

Die Familienanamnese ergab keine Hinweise für Migräne/Kopfschmerzen, zerebrovaskuläre Ereignisse, dementielle Entwicklungen oder neuropsychiatrische Auffälligkeiten.

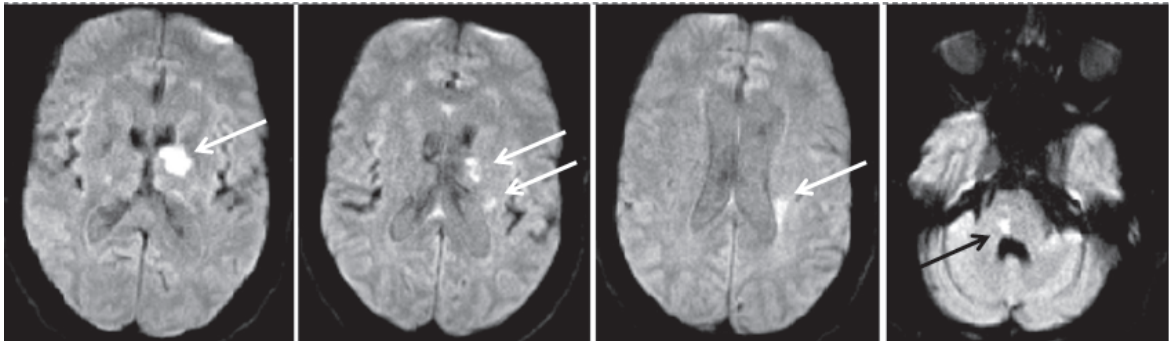
MRT-Bildgebung:

<b>cMRT vom 15.09.2008 (Patient 17 P 1295)</b>			
Vorliegende MR-Sequenzen:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DWI axial</li> <li>- 3D T1 mit KM (Gadolinium)</li> <li>- FLAIR axial</li> <li>- TOF-MR-Angiographie der großen intrakraniellen arteriellen Gefäße, MR-Angiographie der Halsgefäße</li> </ul>		
Gefundene Pathologie:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Frischere Ischämien im MCA-Stromgebiet links: Größere kapsuläre/ striatokapsuläre Läsion links (mit Einbezug des anterioren Thalamus) und als Teilinfarkt imponierende Läsion im hinteren Mediastromgebiet links; Frischere Ischämie im Hirnstammbereich paramedian dorsal pontin rechts.</b></li> <li>- <b>Älterer MCA-Partialinfarkt links temporal.</b></li> <li>- <b>leichte bis mäßige Hyperintensitäten der weißen Substanz</b> (ohne erkennbares prototypisches Verteilungsmuster für CADASIL)</li> <li>- vermutliche Arachnoidalzyste und Tortuosität der vertebrobasilären Gefäße angrenzend an den linken Hirnstamm mit Impression und Verdrängung desselben nach links</li> </ul>		
Weitere Analysen bezüglich:			
- <b>WMH</b> (white mater hyperintensities)	Leicht bis mäßig ausgeprägt vorhanden		
	Nach modifizierter Fazekas Rating Skala (min.0 bis max. 3)	deep WMH	1
		periventricular WMH	1
		pons WMH	3
	WMH im Bereich	Anteriorer Temporalpol	Nein
Capsula externa		Nein	
Inselregion		Nein	
	Frontallappen, gyrus frontalis sup.	Nein	
- <b>Microbleeds</b> (Mikrohämorrhagien in T2*)	Nicht adäquat beurteilbar bei fehlender T2*-Sequenz		
- <b>Zerebrale Atrophie</b>	Gering		
	Nach Atrophie-Score (min. 0 bis max. 8)	ventricular atrophy	6
		sulcal atrophy	4
- <b>Gefäße</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ektatische und elongierte Verläufe der vertebrobasiläre Gefäße und A. carotides internae beidseits</li> <li>- keine vaskulären Malformationen</li> </ul>		



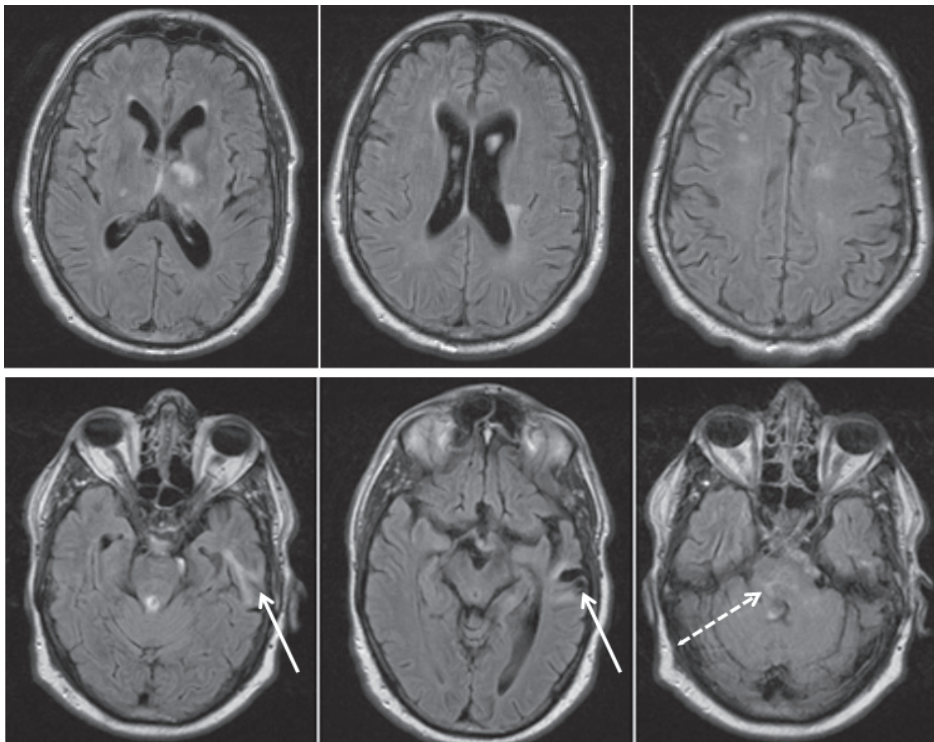
Illustrierende Abbildungen der MRT-Sequenzen Patient 17 P 1295:

- Diffusionswichtung, axial:



Diffusionsgewichtete Sequenzen mit Darstellung von mehreren Diffusionseinschränkungen im Sinne von frischeren Ischämien im MCA-Stromgebiet links (kapsuläre/striatokapsuläre Läsion mit Einbezug des Thalamus; Ischämiegebiet paraventrikulär des Hinterhornes des Seitenventrikels im hinteren Mediastromgebiet links; weiße →) sowie im Hirnstammbereich pontin rechts (dunkler →, Abb. rechts).

- FLAIR, axial



Axiale FLAIR-Sequenzen mit Darstellung mehrerer Ischämiebereiche im MCA-Stromgebiet links (Vgl. diffusionsgewichtete Sequenzen) sowie pontin rechts (gestrichelter →, Abb. rechts unten). Älterer MCA-Partialinfarkt links temporal (→ in Abbildungen links unten). Weiterhin finden sich vorwiegend supratentoriell vereinzelte WMH. Keine WMH in den anterioren Temporalpolen.

- TOF-MR-Angiographie (TOF-MRA):



TOF-Angiographiesequenz mit Darstellung der großen intrakraniellen arteriellen Gefäße (intrakranielle Aa. carotides internae, MCA, ACA, intrakranielle Vertebraliaen und A. Basilaris).

### 3.2.3. PATIENT 01 P 0052 (SIFAP-ZENTRUM GRAZ)

#### Mutation:

Exon 25, heterozygot, c.4639 C>G, [L1547V]: Heterozygote Mutation im Exon 33, die zu einem Nukleotid-Austausch an der Position 4639 von C>G und einem Aminosäure-Austausch an der Position 1547 von Leucin zu Valin führt.

#### Fall-/Patientenbeschreibung:

Dieser Patient ist ein 52-jähriger Mann europäischer Abstammung. Er erlitt am 27.04.2008 ein akutes zerebrovaskuläres Ereignis im Sinne einer rechtsseitigen Kleinhirnblutung. Die Blutung ging mit relativ plötzlich aufgetretenen Kopfschmerzen, Nausea und Erbrechen, Schwindel, einer schweren Dysarthrie sowie einer rechtsseitigen Hemiparese und Ataxie einher.

An Vorerkrankungen bestanden ein arterieller Hypertonus (ED 50. LJ) sowie eine koronare Herzkrankheit mit Z. n. Myokardinfarkt 2005 (während des 50. LJ). Bereits 2005 ist es zu einem zerebrovaskulären Ereignis im Sinne einer symptomatischen TIA gekommen.

Im Rahmen der Abklärung der oben erwähnten, zur Aufnahme in die Klinik für Neurologie der Universität Graz führenden Symptomatik ließ sich sowohl in der initialen kraniellen Computertomographie wie auch nachfolgend ergänzt in der zerebralen MR-Bildgebung eine rechtscerebelläre Blutung nachweisen. Ursächlich ist unter Berücksichtigung der Anamnese und ausschließenden Zusatzdiagnostik am ehesten von einer hypertensiven Parenchymblutung ausgegangen worden. Therapeutisch wurde die antihypertensive medikamentöse Behandlung ausgebaut und optimiert.

#### Eigenanamnese/Vorgeschichte:

- Anamnestisch ließen sich bis auf oben erwähnte TIA im Jahre 2005 keine weiteren zerebrovaskulären Ereignisse eruieren. Darüberhinaus ergaben sich keine Hinweise für eine Migräne/gehäufte Kopfschmerzen oder eine dementielle Entwicklung bzw. neuropsychiatrische Auffälligkeiten.
- An kardiovaskulären Risikofaktoren bestand eine arterielle Hypertonie, daneben eine koronare Herzkrankheit mit 2005 stattgehabtem Myokardinfarkt. Kein Diabetes mellitus, keine Hyperlipidämie/Hyperlipoproteinämie, keine Herzrhythmusstörungen. Kein Nikotinabusus, seltener Alkoholkonsum.

Familienanamnese:

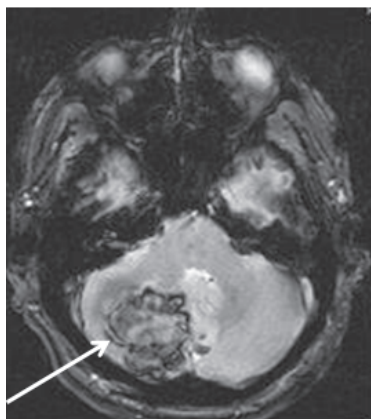
Die Familienanamnese ergab keine Anhaltspunkte für das Vorliegen von Migränekopfschmerzen, zerebrovaskulären Ereignissen, dementiellen Entwicklungen oder neuropsychiatrischen Auffälligkeiten.

MRT-Bildgebung:

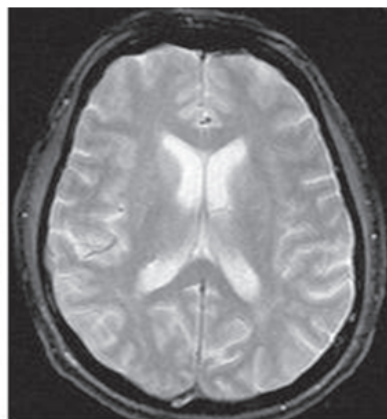
<b>cMRT vom 28.04.2008 (Patient 01 P 0052)</b>			
Vorliegende MR-Sequenzen:	- Diffusionswichtung (DWI) axial - T1 axial und sagittal - T2 TSE axial - TIRM axial - T2* axial - TOF-MR-Angiographie der großen intrakraniellen arteriellen Gefäße		
<b>Gefundene Pathologie:</b>	- <b>Größere Blutung cerebellär rechts</b>		
Weitere Analysen bezüglich:			
- <b>WMH</b> (white mater hyperintensities)	Leicht ausgeprägt vorhanden		
	Nach modifizierter Fazekas Rating Skala (min.0 bis max. 3)	deep WMH	2
		periventricular WMH	1
		pons WMH	0
	WMH im Bereich	Anteriorer Temporalpol	Nein
		Capsula externa	Nein
		Inselregion	Nein
		Frontallappen, gyrus frontalis sup.	Nein
- <b>Microbleeds</b> (Mikrohämorrhagien in T2*)	Nicht vorhanden		
- <b>Zerebrale Atrophie</b>	Gering		
	Nach Atrophie-Score (min. 0 bis max. 8)	ventricular atrophy	5
		sulcal atrophy	3
- <b>Gefäße</b>	- Gering ektatische/elongierte vertebrobasiläre Gefäße - Keine vaskuläre Malformationen		

Illustrierende Abbildungen der MRT-Sequenzen Patient 01 P 0052:

- T2\* axial:

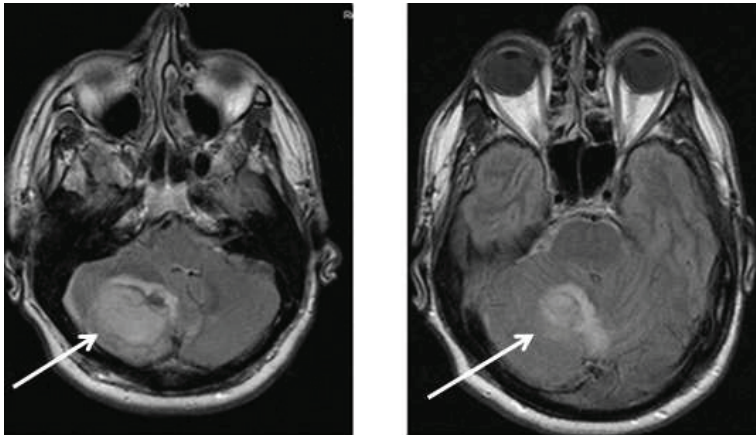


Axiale T2\*-Sequenz infratentoriell: Blutung cerebellär rechts (→)

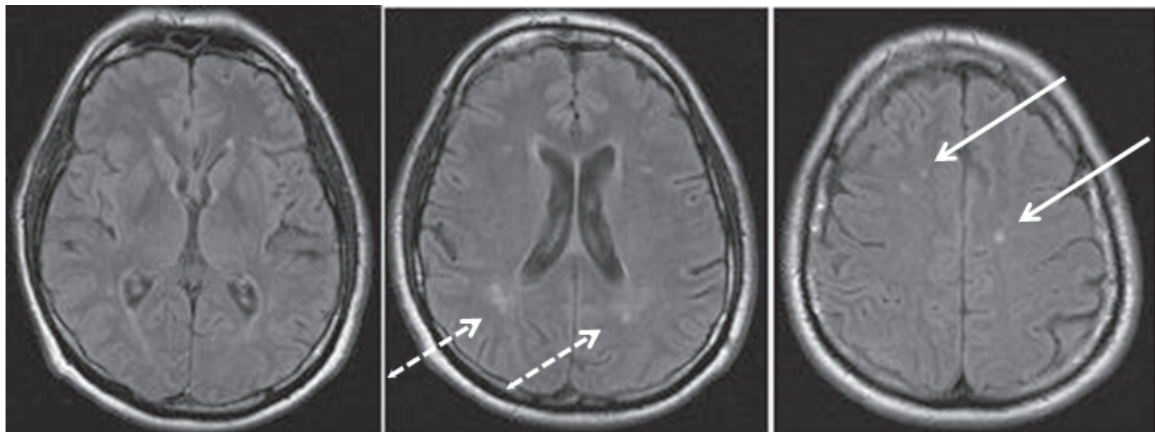


Axiale T2\*-Sequenz supratentoriell: keine sichtbaren Mikroblutungen

- TIRM axial:

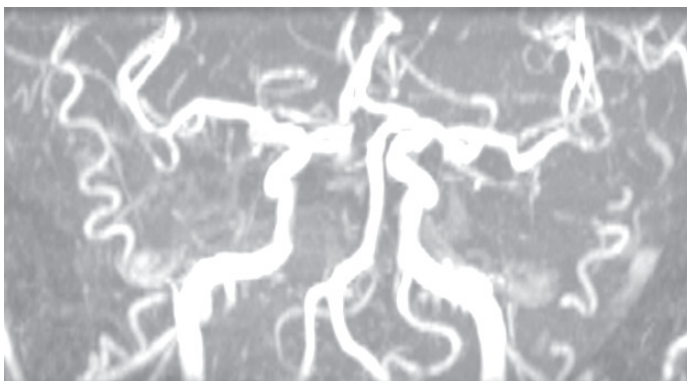


Axiale TIRM-Sequenzen infratentoriell: Darstellung eines Anteils der rechts cerebellären Blutung (→). Beachte: Keine Auffälligkeiten im anterioren Temporalpol



Axiale TIRM-Sequenzen supratentoriell mit Nachweis einzelner WMH posterior periventrikulär (gestrichelte →) und im tiefen Marklager (→, Abb. rechts)

- TOF-MR-Angiographie (TOF-MRA):



TOF-Angiographiesequenz mit Darstellung der großen intrakraniellen arteriellen Gefäße (intrakranielle Aa. carotides internae, MCA, ACA, intrakranielle Vertebralia und A. Basilaris)



3.2.4. Tabellarische Zusammenfassung: Phänotypen der gefundenen Mutationen

PATIENT		01 P 0052	17 P 1295	32 P 2629
Geschlecht, Alter (SIFAP-Zentrum)		Männlich, 52 Jahre (Zentrum Graz)	Männlich, 45 Jahre (Zentrum Lyon)	Männlich, 45 Jahre (Zentrum Regensburg)
MUTATION		Nr. 5	Nr. 9	Nr. 10
Exon Nukleotid-Austausch Aminosäure-Austausch		<b>Exon 25</b> <b>c.4639 C&gt;G</b> <b>[L1547V]</b>	<b>Exon 33</b> <b>c.6221 C&gt;T</b> <b>[P2074L]</b>	<b>Exon 33</b> <b>c.6532 C&gt;T</b> <b>[P2178S]</b>
ZEREBROVASKULÄRES EREIGNIS				
		Rechts cerebelläre Blutung	Multiple zerebrale Infarkte im Bereich des MCA-Stromgebietes links und paramedian pontin rechts, am ehesten als (kardiogen-) embolisch zu werten	Dissektion der extrakraniellen ACI links (wohl traumatisch) mit MCA-Grenzzoneninfarkt links und Zentralarterien-Verschluss
cMRT- AUFFÄLLIGKEITEN				
<b>WMH</b>		Leicht ausgeprägt	Leicht-mäßig ausgeprägt	KEINE
- Score nach modifizierter Fazekas Rating Scale (0-3)				
deep WMH		2	1	0
periventricular WMH		1	1	0
Pons WMH		0	3	0
- WMH im Bereich				
Temporalpol		KEINE	KEINE (alter Infarkt temporal links)	KEINE
Capula externa		KEINE	KEINE	KEINE
Frontallappen		KEINE	KEINE	KEINE
Periventrikulär, posterior betont		Gering ja	Diskret (aber auch am Vorderhorn)	KEINE
<b>Microbleeds</b>		KEINE	Nicht ausreichend beurteilbar	KEINE
<b>Atrophie zerebral</b>		Gering	Gering	Sehr gering
- Atrophie-Score (0-8)				
sulkale Atrophie		5	6	2
Ventrikuläre Atrophie		3	4	5
<b>Gefäße</b>				
- intrakraniell		Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig (leichte Minderperfusion MCA links anzunehmen, Kollateralisation über retrograde ACA links)
- extrakraniell		Moderate Ektasie/ Elongation der vertebro-basilären Gefäße	Dolichoektasie Basilaris/ Carotis internae	ACI-Dissektion links mit distalem Verschluss
ANAMNESTISCHE AUFFÄLLIGKEITEN				
Kopfschmerzen/Migräne		KEINE	KEINE	KEINE
Vorangehende zerebrovaskuläre Ereignisse		Z. n. TIA 2005	KEINE	KEINE
Demenz/neuropsychiatr. Auffälligkeiten		KEINE	mögliche leichte exekutive und mnestiche Störungen	KEINE
Sonstige inkl. kardiovaskuläre Risikofaktoren		- kontrollierter arterieller Hypertonus - Koronare Herzkrankheit mit Z. n. Myokardinfarkt 2005	- Arterieller Hypertonus - Diabetes mellitus Typ 2 - Adipositas, metabolisches Syndrom - Schlafapnoe-Syndrom - chronische Hep. C - Hypothyreose	- kontrollierter arterieller Hypertonus - Nikotinabusus
FAMILIENANAMNESTISCHE AUFFÄLLIGKEITEN				
Kopfschmerzen/Migräne		KEINE	KEINE	KEINE
Zerebrovaskuläre Ereignisse		KEINE	KEINE	KEINE
Demenz/neuropsychiatr. Auffälligkeiten		KEINE	KEINE	KEINE
Sonstige		-	-	SLE bei der Mutter, Diabetes mellitus des Sohnes

### 3.3. FALLBESCHREIBUNGEN und KLINISCH-NEURORADIOLOGISCHER PHÄNOTYP VON CADASIL-PATIENTEN AUS EINER EIGENEN KOHORTE MIT RELATIV PROTOTYPISCHEM PHÄNOTYP

#### 3.3.1. PATIENT S. O., geb. 22.12.1963

Mutation:

Exon 4, heterozygot, c.505 C>T, [R169C]: Heterozygote Mutation im Exon 4, die zu einem Nukleotid-Austausch an der Position 505 von C>T und einem Aminosäure-Austausch an der Position 169 von Arginin zu Zystein führt. Diese Mutation ist häufig und als krankheitsverursachend in der Literatur vorbeschrieben worden (u.a. Joutel et al, Nature 1996).

Fall-/Patientenbeschreibung:

Dieser männliche Patient deutscher Herkunft erlitt im Alter von 42 Jahren eine transitorische ischämische Attacke, die mit einer apoplektiform aufgetretenen und ca. 90 Minuten anhaltenden Symptomatik bestehend aus einer leichten Dysarthrie sowie einer brachiofazial betonten leichten Hemisymptomatik links (zentrale Fazialisparese und latente Armparese links, Hypästhesien brachiofazial betont im Bereich der linken Körperhälfte) einherging.

Im Rahmen der diagnostischen Abklärung dieser Symptomatik in der neurologischen Abteilung des Klinikums Schwerin ließ sich in der zerebralen Bildgebung zwar keine frische Ischämie/Diffusionsstörung nachweisen, allerdings imponierten in der T2- und FLAIR-Wichtung ausgeprägte Marklagerveränderungen mit Einbezug der anterioren Temporalpole sowie zahlreiche lakunäre Defektbildungen, bildmorphologisch ein CADASIL-Syndrom nahelegend. Die weiteren ergänzenden Untersuchungen erbrachten keine wegweisende Befunde (unauffällige Doppler- und Duplexsonographie der hirnversorgenden Gefäße, transthorakale und transösophageale Echokardiographie, 24h-EKG- und -Blutdruckuntersuchung, unauffällige Liquoruntersuchung abgesehen vom Nachweis einer leichten Eiweißerhöhung (597 mg/l) im Sinne einer reinen Schrankenstörung, umfassende paraklinische Blutuntersuchungen ohne Hinweise für eine systemische Vaskulitis).

In der Zusammenschau wurde das oben beschriebene klinische Ereignis im Sinne einer TIA im Stromgebiet der A. cerebri media rechts gewertet. In

Zusammenarbeit mit uns (Klinik für Neurologie und Neurobiologisches Labor der Universität Rostock) ist unter Berücksichtigung des bildmorphologischen zerebralen Befundes sowie der Eigenanamnese – die eine vermutlich bereits stattgehabte TIA im Alter von 39 Jahren und Kopfschmerzen seit dem 30. LJ offenlegte – die Verdachtsdiagnose einer CADASIL-Erkrankung gestellt worden. Letztere konnte dann auch molekulargenetisch mit dem Nachweis o.g. Mutation im Notch3-Gen bestätigt werden. Der Patient wurde zur Sekundärprophylaxe pragmatisch auf eine Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS 1 x 100 mg täglich eingestellt. Weitere zerebral-ischämische Ereignisse ereigneten sich im Verlauf nicht (Stand 06/2010).

#### Eigenanamnese/Vorgeschichte:

- Vorgeschichtlich sei es bereits im Alter von 39 Jahren zu einer passageren Fazialisparese links mit kompletter Remission gekommen. Eine weiterführende Abklärung erfolgte damals nicht.
- Weiterhin berichtete der Patient über bereits seit ca. dem 30. LJ bestehende und rezidivierende linksseitige Kopfschmerzen. Diese werden in der Qualität als stechend beschrieben, seien nicht von Aurasymptomen bzw. Übelkeit/Erbrechen oder Licht-/Lärmempfindlichkeit begleitet, würden für die mittlere Dauer von ca. 1 Stunde anhalten und eine gute Response auf die Einnahme von Aspirin (Acetylsalicylsäure 0.5 g) aufweisen.
- Subjektive Konzentrationsstörungen, mnestisch-kognitive Einschränkungen bzw. psychiatrische Auffälligkeiten waren nicht zu erfragen.
- An kardiovaskulären Risikofaktoren bestand eine im Rahmen der Abklärungen im Klinikum Schwerin festgestellte Hypercholesterinämie (konsekutiv mit einem Statin behandelt) sowie ein Nikotinabusus (ca. 15 Zigaretten/Tag).
- Keine weiteren relevanten Vorerkrankungen.

#### Familienanamnese:

Abgesehen von den Auffälligkeiten des Indexpatienten ergab die Familienanamnese – soweit sie zu erheben war (Vater geb. 1937, Mutter geb. 1937, eine Schwester geb. 1963, drei gesunde Kinder geb. 1994, 1998 und 2002; Großeltern weder in mütterlicher noch väterlicher Linie bekannt) – keine Hinweise für das Vorliegen von Migränekopfschmerzen, zerebrovaskulären



Ereignissen, dementiellen Entwicklungen oder neuropsychiatrischen Erkrankungen.

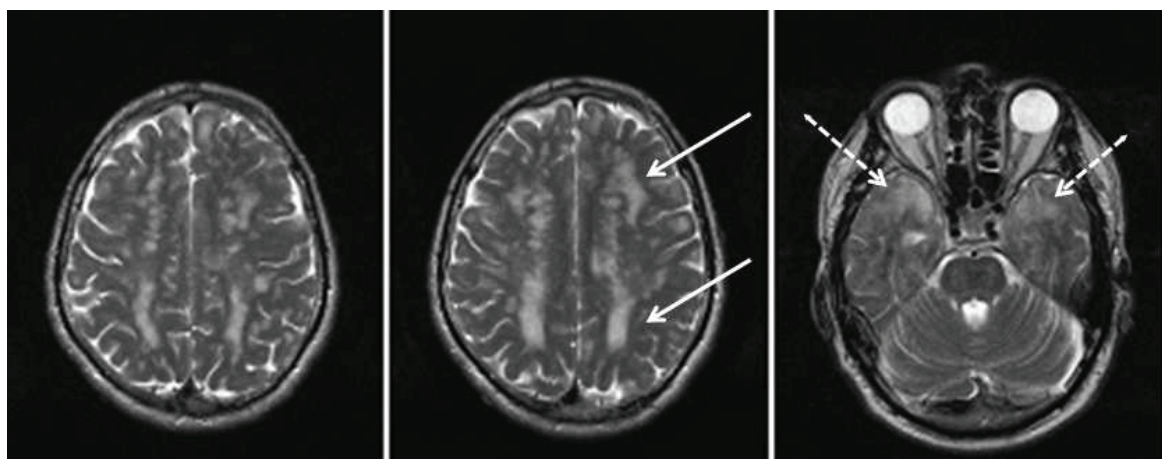
Bei der asymptomatischen Schwester des Patienten ließ sich auf molekulargenetischer Ebene keine Mutation im Notch3-Gen nachweisen, insbesondere nicht die o.g. R169C-Mutation.

MRT-Bildgebung:

<b>cMRT vom 23.05.2006 (Patient S.O.)</b>	
Vorliegende MR-Sequenzen:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diffusionswichtung (DWI) axial</li> <li>- T1 axial, T1 axial mit Kontrastmittel</li> <li>- T2 axial</li> <li>- FLAIR axial</li> <li>- TOF-MR-Angiographie der großen intrakraniellen arteriellen Gefäße</li> </ul>
<b>Gefundene Pathologie:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Keine frische Ischämie</li> <li>- <b>Schwere Marklagerveränderungen mit Einbezug der anterioren Temporalpole und der Stammganglien mit zahlreichen lakunären Defektbildungen</b> (ausgedehnte Signalhyperintensitäten in der T2- und FLAIR-Wichtung im supratentoriellen Marklager, die teilweise kleinfleckig erscheinen, aber auch flächig konfluieren, darüberhinaus rundliche, glatt begrenzte liquorintense Defektzonen - teilweise mit randständiger Gliose - im Linsenkern links, beidseits im Thalamus und im Bereich des Nucleus caudatus sowie rechts frontal. Die Marklagerveränderungen liegen im Bereich der Balkenstrahlung beidseits teilweise radiär angeordnet. Die kortikalen Strukturen sind ausgeschlossen)</li> <li>- Unauffälliger Befund der Hirnbasisarterien in der TOF-MR-Angiographie</li> </ul>

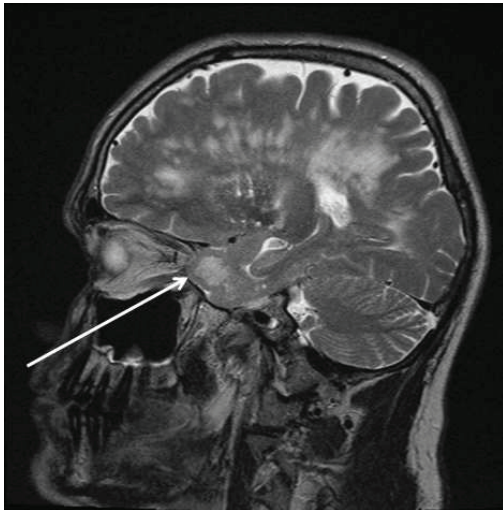
Illustrierende Abbildungen der MRT-Sequenzen Patient S. O.:

- T2, axial:



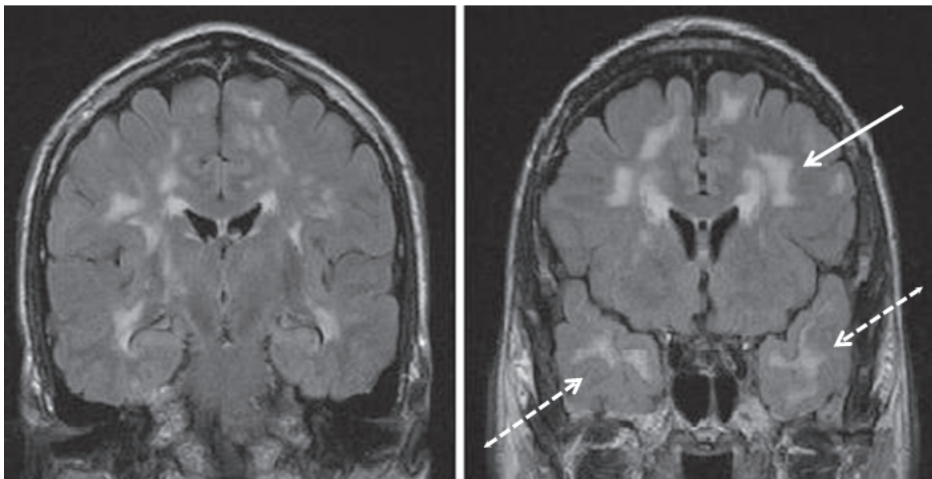
Schwere Marklagerveränderungen (→) mit Einbezug der anterioren Temporalpole (gestrichelte →, Abb. ganz rechts)

- T2, sagittal:



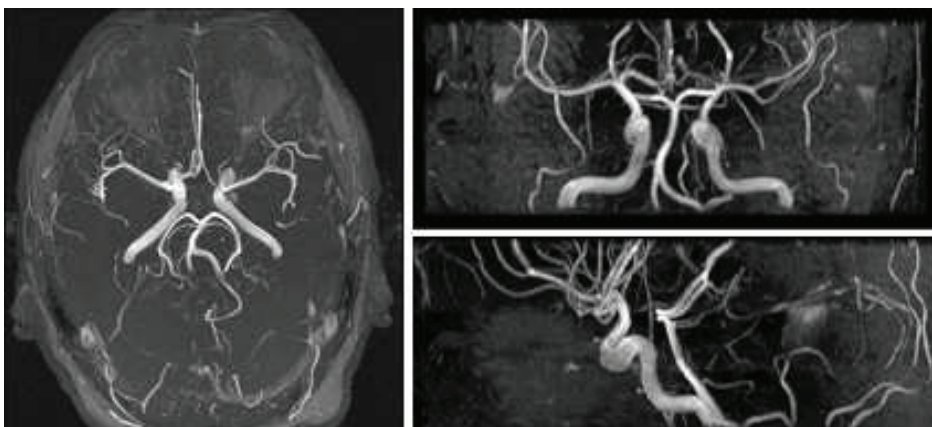
Schwere Marklagerveränderungen. Beachte die WMH im anterioren Temporalpol (→). Läsionen im Bereich der Balkenstrahlung beidseits teilweise radiär angeordnet.

- FLAIR, koronar:



Darstellung der Marklagerveränderungen in koronaren FLAIR-Sequenzen (→). Beachte die WMH im (anterioren) Temporalpol (gestrichelte → in Abb. rechts)

- TOF-MR-Angiographie (TOF-MRA):



TOF-MR-Angiographiesequenzen in axialer (links), koronarer (rechts oben) und sagittaler (rechts unten) Ansicht mit Darstellung der großen intrakraniellen arteriellen Gefäße (intrakranielle Aa. carotides internae, MCA, ACA, PCA, intrakranielle Vertebralia und A. Basilaris).

### 3.3.2. PATIENT M. R., geb. 18.07.1967

#### Mutation:

Exon 4, heterozygot, c.421 C>T, [R141C]: Heterozygote Mutation im Exon 4, die zu einem Nukleotid-Austausch an der Position 421 von C>T und einem Aminosäure-Austausch an der Position 141 von Arginin zu Zystein führt. Diese Mutation ist häufig und als krankheitsverursachend in der Literatur vorbeschrieben worden (u.a. Joutel et al, Lancet 1997).

#### Fall-/Patientenbeschreibung:

Dieser männliche Patient deutscher Herkunft erlitt mehrere zerebral-ischämische Ereignisse: Im Alter von 38 Jahren wurde anlässlich einer apoplektiform aufgetretenen arm- und distal betonten Hemiparese rechts (im Kraftgrad 3/5) erstmals ein zerebraler Infarkt im Stromgebiet der A. cerebri media links diagnostiziert. Die initialen Abklärungen erfolgten in der neurologischen Abteilung des Klinikums in Neubrandenburg. Neben einer frischen zerebralen Ischämie im Medialstromgebiet links ließen sich in der zerebralen Bildgebung ältere lakunäre Läsionen thalamisch und im Nucleus lentiformis rechts sowie ausgedehnte T2- und FLAIR-hyperintense Signalveränderungen mit temporopolarer Betonung nachweisen. Aufgrund des Läsionsmusters wurde hier bereits an ein mögliches CADASIL-Syndrom gedacht. Die Zusatzdiagnostik ergab keine erwähnenswerten bzw. relevanten pathologischen Befunde (unauffällige Doppler- und Duplexsonographie der hirnersorgenden Gefäße, unauffällige transthorakale und -ösophageale Echokardiographie, Langzeit-EKG mit Normalbefund, unauffällige Liquoranalyse inkl. nicht nachweisbarer intrathekaler Immunglobulin-Synthese bzw. negativen oligoklonalen Banden, laborchemisch und serologisch keine Hinweise für eine Vaskulitis, Koagulopathie oder parainfektiose/infektiose/immunologische Enzephalitis/Enzephalopathie).

Die klinisch-neuroradiologische Verdachtsdiagnose ließ sich im Verlauf in unserer Einrichtung durch den Nachweis einer gut bekannten Mutation im Exon 4 des Notch3-Gen [R141C] molekulargenetisch bestätigen. Sekundärprophylaktisch wurde eine Medikation mit ASS 1 x 100 mg täglich etabliert. Trotz einer Anschlussrehabilitationsbehandlung blieb eine motorische Armparese rechts im KG 4/5 bestehen.

Ca. 3 Monate nach dem ersten klinisch manifesten Ereignis entwickelte der Patient nun im Alter von 39 Jahren ein dem Stromgebiet der A. cerebri media links zugeordnetes, prolongiertes reversibles ischämisches neurologisches Defizit (PRIND), einhergehend mit einer Feinmotorikstörung der rechten Hand sowie Kribbelparästhesien des rechten Fußrückens inkl. aller Zehen (bei zusätzlich vorbekannter residueller Armparese im KG 4/5 rechts). Die neu aufgetretene neurologische Symptomatik bildete sich innerhalb weniger als 72 Stunden auf das Ausgangsniveau zurück, MR-morphologisch ließ sich keine frische Diffusionsstörung nachweisen. Die Behandlung mit ASS 100 mg wurde pragmatisch eskalierend auf eine Thrombozytenaggregationshemmung mit Aggrenox (ASS 25 mg + Dipyridamol 200 mg) 2 x 1 umgestellt.

Wiederum ca. 6 ½ Monate später erlitt der Patient erneut einen zerebralen Infarkt im Medialstromgebiet links, einhergehend mit passageren Wortfindungsstörungen im Sinne einer ca. 90 Minuten anhaltenden, motorisch betonten Aphasie. Die Sekundärprophylaxe mit Aggrenox wurde unverändert belassen.

Im weiteren Verlauf kam es etwas mehr als 2 Jahre später erneut zu einer Ischämie im Medialstromgebiet links, die aufgrund einer apoplektiform akzentuierten Hemiparese rechts (inkl. Beinparese) und einer erneuten motorischen Aphasie postuliert werden musste. In der zerebralen Computertomographie fand sich 3 Tage nach dem Ereignis keine sichere Demarkierung eines frischen Infarktareals (bei vorbekannter ausgedehnter Leukenzephalopathie). Hinweise für ein epileptisches Anfallsgeschehen ergaben sich anamnestisch nicht. Zu diesem Zeitpunkt bemerkte der Patient selbst auch erstmals Defizite hinsichtlich Gedächtnisfunktionen. Eine neuropsychologische Leistungsdiagnostik ergab Hinweise für eine leichte, hirnorganisch bedingte Verminderung der kognitiven Leistungsfähigkeit.

Herr M.R. wurde erneut mit der etablierten Medikation (Aggrenox) in eine stationäre Anschlussheilbehandlungsmaßnahme entlassen. In der dort wiederholten Leistungsdiagnostik fanden sich Hinweise auf deutliche Defizite in der geteilten und selektiven Aufmerksamkeit, Störungen in den komplexen Aufgabenfeldern, die die exekutiven Fähigkeiten erfordern, sowie Einschränkungen im verbal-mnestischen Leistungsvermögen.

Eigenanamnese/Vorgeschichte:

- Eigenanamnestisch fanden sich keine relevanten Vorerkrankungen, insbesondere keine Migränekopfschmerzen oder andere Cephalgien.
- An kardiovaskulären Risikofaktoren ist eine Hypercholesterinämie (erst während dem ersten stationären Aufenthalt im Klinikum Neubrandenburg festgestellt und im Folgenden mit einem Statin (Locol 40 mg 1 x 1) behandelt) sowie ein Nikotinabusus zu nennen.

Familienanamnese:

Familienanamnestisch ist ein Schlaganfall des Vaters im 70. LJ zu erwähnen, die Mutter des Patienten befand sich aufgrund einer nicht näher eingrenzbaeren Demenz (vorangehende zerebrale ischämische Ereignisse sind dem Patienten selbst nicht bekannt) seit dem 69. LJ in einem Pflegeheim. Eine ältere Schwester (geb. 1966) sei offensichtlich gesund und lehne eine molekulargenetische Abklärung ab. Der Patient hat aufgrund seiner sexuellen Orientierung keine Kinder.

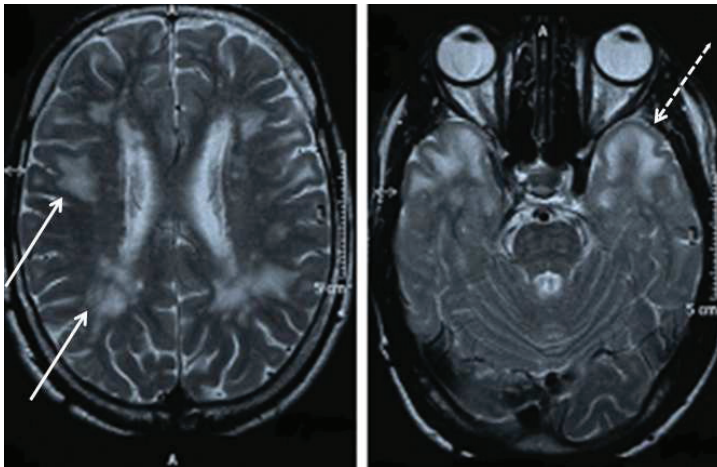
MRT-Bildgebung:

<b>cMRT vom 03.07.2006 (Patient M.R.)</b>	
Vorliegende MR-Sequenzen:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diffusionswichtung (DWI) koronar</li> <li>- T1 axial, T1 axial mit Kontrastmittel</li> <li>- T2 axial und sagittal</li> <li>- FLAIR koronar</li> </ul>
<b>Gefundene Pathologie:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Subakute ischämische Läsionen</b> mit Diffusionsstörungen <b>subkortikal und kortikal fronto-parietal links</b> (nicht gezeigt)</li> <li>- <b>ältere lakunäre Läsionen thalamisch und im Ncl. lentiformis rechts</b> sowie</li> <li>- <b>Marklagerläsionen in Form von hyperintensiven Signalveränderungen in den T2- und FLAIR-gewichteten Sequenzen</b>, ausgedehnt und diffus verteilt, fronto-temporo-parietal beidseits mit temporopolarer Betonung.</li> </ul>



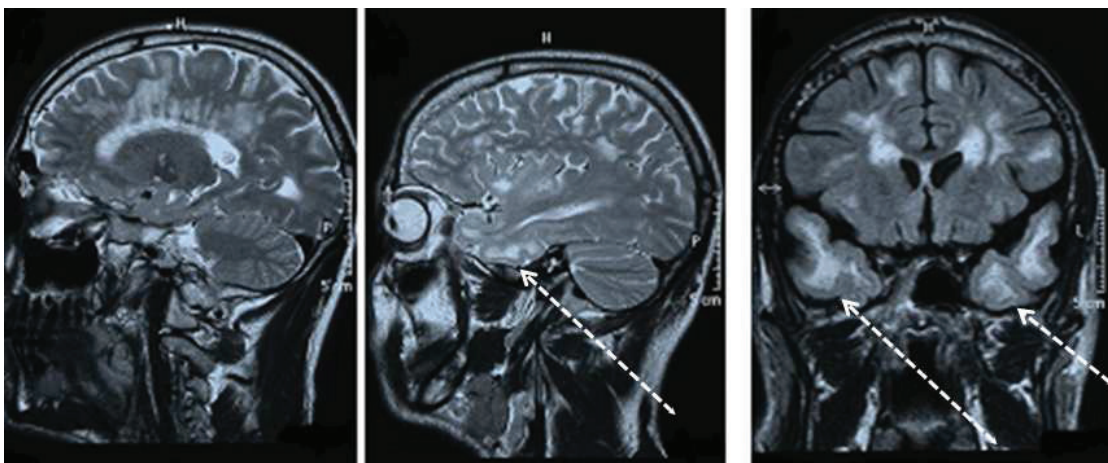
Illustrierende Abbildungen MRT-Sequenzen Patient M. R.:

- T2, axial und sagittal:



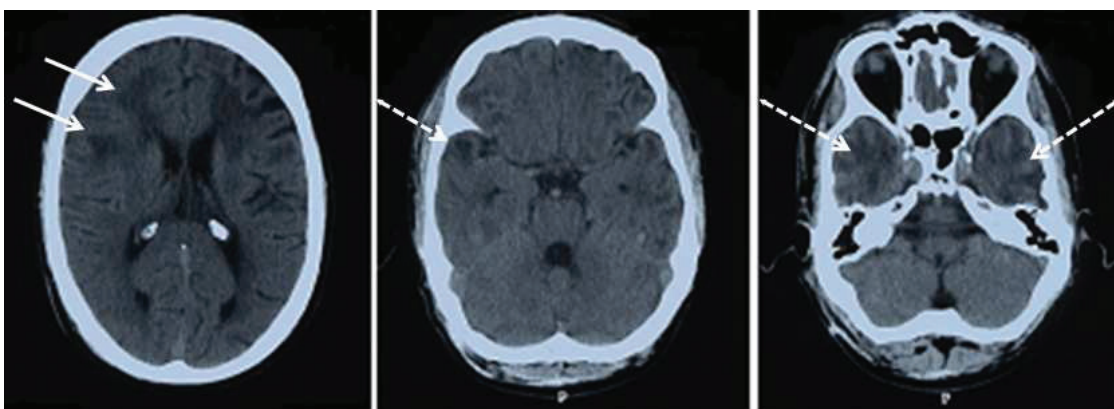
Schwere Marklagerveränderungen (→). Beachte die deutlichen WMH im Bereich der anterioren Temporalpole (gestrichelter → in Abb. rechts).

- FLAIR, sagittale Scans und koronarer Scan:



Sagittale (Abb. links und Mitte) und koronare (Abb. ganz rechts) Darstellung der schweren Marklagerveränderungen mit Einbezug der Temporalappen bzw. Polstrukturen (gestrichelte →).

Illustrierende Abbildung der cranialen Computertomographie (CCT) des gleichen Patienten ( M. R.) vom 30.06.2006:



Darstellung der ausgeprägten Leukenzephalopathie mit älteren ischämischen Defektläsionen im CCT (→). Beachte auch hier die ausgeprägten Hypodensitäten beidseits im Bereich der anterioren Temporalpole (gestrichelte →)

### 3.3.3. PATIENTIN H. R., geb. 03.06.1960

#### Mutation:

Exon 4, heterozygot, c.397 C>T, [R133C]: Heterozygote Mutation im Exon 4, die zu einem Nukleotid-Austausch an der Position 397 von C>T und einem Aminosäure-Austausch an der Position 133 von Arginin zu Zystein führt. Diese Mutation ist häufig und als krankheitsverursachend in der Literatur vorbeschrieben worden (u.a. Joutel et al, Lancet 1997).

#### Fall-/Patientenbeschreibung:

Diese Patientin entwickelte ab Mitte der 5. Lebensdekade langsam-progredient zunehmende Konzentrations- und Merkfähigkeitsstörungen sowie kognitive Einschränkungen, klagte begleitend über eine chronische Müdigkeit, rezidivierende Schwindelzustände, Schluckschwierigkeiten sowie eine Dranginkontinenz. Sicher abgrenzbare TIAs bzw. Schlaganfallereignisse im weiteren Vorfeld ließen sich nicht eruieren. In der im Alter von 47 Jahren erstmals durchgeführten zerebralen MR-Bildgebung imponierte eine Leukenzephalopathie zunächst unklarer Genese (Klinik für Neurologie und neurologische Intensivmedizin, Fachkrankenhaus Hubertusburg in Wermisdorf). Im Verlauf klagte die Patientin ca. im Alter von 49 Jahren über wiederholt auftretende Taubheitsgefühle und Missempfindungen im Bereich der gesamten linken Körperhälfte. Klinisch-neurologisch führend fand sich zu diesem Zeitpunkt ein diffuses hirnorganisches Psychosyndrom im Sinne einer subkortikalen Demenz sowie eine leichte sensible Hemisymptomatik links (Angabe einer beinbetonten Hemihypästhesie linkskorporal mit assoziierter Hypalgesie, Thermhypästhesie und Pallhypästhesie). In einer testneuropsychologischen Untersuchung offenbarten sich durchschnittliche bis unterdurchschnittliche Intelligenzleistungen mit schweren Störungen der Aufmerksamkeits- und Informationsverarbeitung, verlangsamtem Denken, reduzierter Wortflüßigkeit, deutlichen Einschränkungen der Gedächtnisleistungen (v.a. Störungen der verbalen Gedächtnisleistung und des Arbeitsgedächtnisses) sowie eine Störung der Exekutivfunktionen. In der zu diesem Zeitpunkt aktualisierten zerebralen MR-Bildgebung fanden sich leukenzephalopathischen Veränderungen im Sinne von relativ ausgedehnten, v.a. periventrikulär betonten, T2-/FLAIR-hyperintensiven



Marklagerläsionen mit relativ typischen bandförmigen Signalanhebungen im Bereich der gesamten Capsula externa und einer Mitbeteiligung der anterioren Temporalpole beidseits. Darüberhinaus konnte in den entsprechenden Sequenzen dezente diffusionsgestörte Areale im Centrum semiovale parieto-occipital mit Betonung der rechten Seite nachgewiesen werden, so dass hier ursächlich auch eine subakute Ischämie als Grundlage der Sensibilitätsstörungen der linken Körperhälfte angenommen werden musste. Differentialdiagnostisch ist bei wiederholtem Auftreten bzw. Akzentuierung der relativen monomorphen sensiblen Symptomatik (ohne Cephalgien oder Migränehinweise) auch an einfach-fokale, sensible epileptische Anfälle auf dem Boden der vaskulären Schädigung gedacht worden. Als möglicher Hinweis für einen epileptogenen Fokus konnten im EEG bei einem parietooccipital leicht dysrhythmisch imponierenden Grundrhythmus um 10 Hz und intermittierend höher-gespannter und verlangsamer Aktivität temporal links auch einmalig steilere Wellenabläufe linkstemporal registriert werden. Neben der bereits im Vorfeld etablierten Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS 100 mg 1 x 1 und einer Optimierung der Behandlung der sekundären kardiovaskulären Risikofaktoren (arterielle Hypertonie, Hyperlipoproteinämie) wurde zusätzlich eine antikonvulsive Behandlung mit Lamotrigin initiiert, die zu einem deutlichen Rückgang der intermittierenden sensiblen Reizerscheinungen führte. Darüberhinaus ist in Hinsicht auf die dementielle Entwicklung eine Therapie mit dem Acetylcholinesterasehemmer Donezepil begonnen worden. Die Gesamtkonstellation mit besonderer Berücksichtigung der MR-Bildgebung legte zu diesem Zeitpunkt eine CADASIL-Erkrankung nahe, die mit dem Nachweis von o.g. Mutation in unserer Institution molekulargenetisch bestätigt werden konnte.

#### Eigenanamnese/Vorgeschichte:

- Eigenanamnestisch fanden sich keine Migränekopfschmerzen oder andere gehäufte Cephalgien.
- An kardiovaskulären Risikofaktoren ist ein medikamentös behandelter arterieller Hypertonus (Behandlung mit einem  $\beta$ -Blocker und einem Kombinationspräparat aus ACE-Hemmer/Diuretikum) sowie eine Hyperlipoproteinämie (Behandlung mit einem Statin) zu erwähnen.

Familienanamnese:

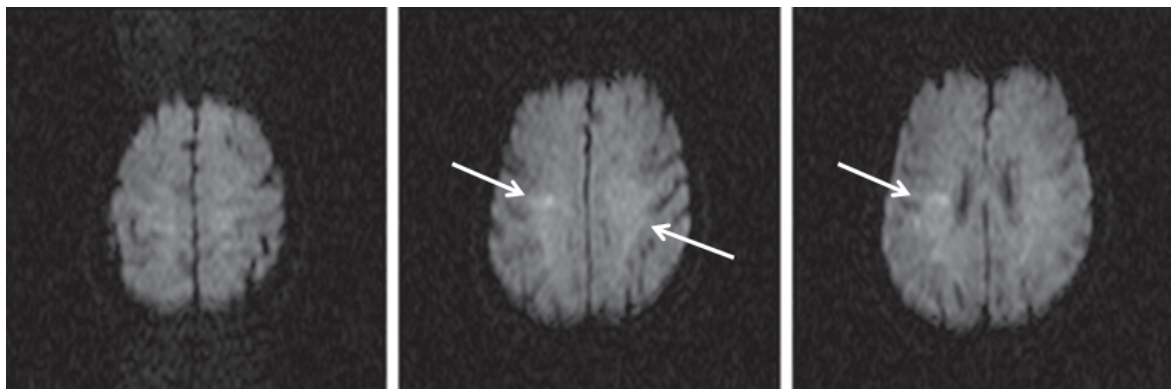
Die Mutter der Indexpatientin habe unter häufigen Kopfschmerzen gelitten. Im Übrigen ergaben sich keine familienanamnestischen Auffälligkeiten. Die Patientin hat insgesamt 4 Kinder (geb. 1987, 1989, 1990), die bislang asymptomatisch seien.

MRT-Bildgebung:

<b>cMRT vom 06.04.2009 (Patient H.R.)</b>	
Vorliegende MR-Sequenzen:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diffusionswichtung (DWI) axial</li> <li>- T1 axial, T1 axial mit Kontrastmittel</li> <li>- T2 axial</li> <li>- T2* axial</li> <li>- FLAIR axial und sagittal</li> </ul>
Gefundene Pathologie:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Dezente diffusionsgestörte Areale im Bereich des Centrum semiovale beidseits (parieto-occipital mit Rechtsbetonung) im Sinne einer möglichen subakuten Ischämie (Differentialdiagnostisch „Durchschein-Effekt“).</b></li> <li>- <b>Ausgedehnte, zum Teil fleckig-konfluierende, zum Teil zystisch degenerierte Marklagerläsionen</b>, überwiegend periventrikulär, aber auch sub- und juxtakortikal, balkenassoziiert sowie im Hirnstamm lokalisiert. Auffällig sind <b>bandförmige Signalanhebungen in der gesamten Capsula externa, Marklagerveränderungen im Bereich der Temporalpole und lakunäre Läsionen im Bereich der Basalganglien</b></li> </ul>

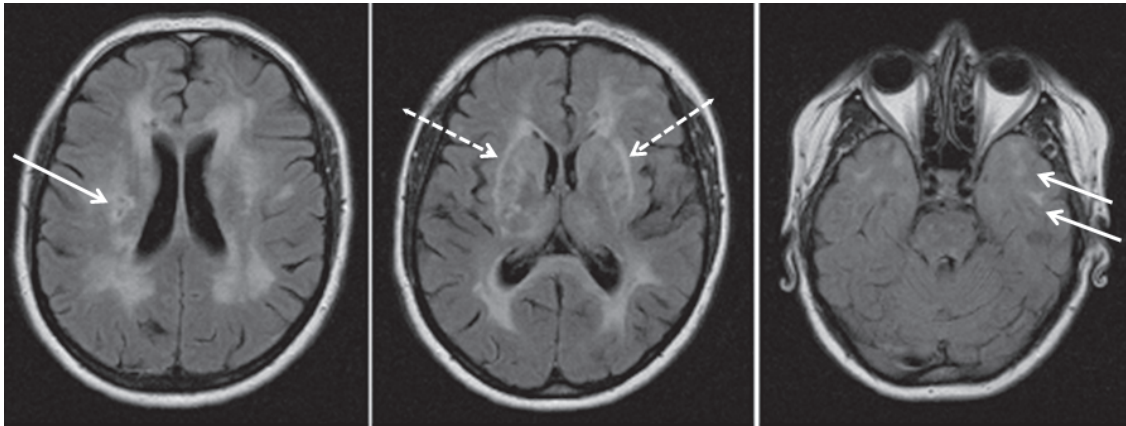
Illustrierende Abbildungen der MRT-Sequenzen Patient H. R.:

- Diffusionsgewichtete Sequenzen (DWI), axial:



Dezente diffusionsgestörte Areale im Centrum semiovale parieto-occipital beidseits mit Rechtsbetonung (→) im Sinne möglicher subakuten Ischämien (DD „Durchschein-Effekt“)

- FLAIR, axial:



Axiale FLAIR-Sequenzen mit Darstellung von

- supratentoriellen konfluierenden Marklagerveränderungen, z.T. zystisch degeneriert (→ in Abb. links)
- bandförmigen Signalhyperintensitäten im Bereich der gesamten Capsula externa beidseits (gestrichelte → in der mittigen Abb.)
- FLAIR-Hyperintensitäten im Bereich der anterioren Temporalpole (→ in Abb. rechts)

### 3.3.4. PATIENTIN G. C., geb. 26.05.1954

Mutation:

Exon 5, heterozygot, c.785 G>A, [C262Y]: Heterozygote Mutation im Exon 5, die zu einem Nukleotid-Austausch an der Position 785 von G>A und einem Aminosäure-Austausch an der Position 262 von Zystein zu Prolin führt. Diese bislang in der Literatur nicht vorbeschriebene Mutation repräsentiert eine Mutation mit einem Austausch von Zystein zu Tyrosin an einer hochkonservativen Aminosäure-Position, wobei die ausgetauschten Aminosäuren einen großen biophysikalischen Unterschied aufweisen. Durch die Mutation wird eine Disulfidbrücke zerstört, so dass es – unter Berücksichtigung der Klinik und des bildmorphologischen MR-Befundes - hochwahrscheinlich ist, dass die Mutation biologisch relevant ist.

### Fall-/Patientenbeschreibung

Diese Patientin erlitt im Alter 54 Jahren ein letztendlich unklares synkopales Ereignis nach dem Toilettengang („Miktionssynkope“). Die in diesem Zusammenhang extern in der nicht fachneurologisch-spezialisierten Warnowklinik Bützow veranlasste zerebrale MR-Bildgebung offenbarte Auffälligkeiten im Sinne einer ausgeprägten Leukenzephalopathie unklarer Ätiologie. Nach umfassenden, nicht zur Diagnose führenden Abklärungen in der neurologischen Klinik in Güstrow ist uns die Patientin zur weiteren neurologischen Beurteilung und Differentialdiagnostik zugewiesen worden.

Anamnestisch berichtete Frau G. C. über nahezu täglich bestehende Kopfschmerzen seit ca. ihrem 45. LJ, die helmartig bzw. haubenförmig, in der Qualität als dumpf sowie als stressabhängig beschrieben wurden (an einen Spannungskopfschmerz erinnernd, ohne eruierbare Charakteristika für einen Migränekopfschmerz). Weiterhin schilderte sie eine reduzierte körperliche Leistungsfähigkeit und subjektive Kurzzeitgedächtnisstörungen, die sich schleichend über die letzten Jahre entwickelt hätten. Darüberhinaus beständen seit ca. dem 53. LJ - initial relativ apoplektiform aufgetretene - schmerzende Dysästhesien im Bereich des linken Unterschenkels und des Fußspannes, im weiteren Verlauf seien zusätzlich Parästhesien und Missempfindungen im Bereich der linken Hand begleitet von einer leichtgradigen arm- und distalbetonten Hemiparese links (Arm distal KG 4-5) hinzugekommen. Unter der Annahme von schubhaften Ereignissen im Rahmen eines chronisch-entzündlichen ZNS-Prozesses (DD Encephalomyelitis disseminata; Nachweis von wenigen oligoklonalen Banden im Liquor) sind im Klinikum Güstrow aufgrund der sensiblen und im Verlauf auch motorischen Ausfallerscheinungen Behandlungsversuche mit jeweils hochdosierten Steroidpulstherapien (1g Methylprednisolon über 5 Tage i.v.) durchgeführt worden, ohne dass sich eine relevante Besserung der Beschwerden/Ausfälle einstellte.

Zum Zeitpunkt der Vorstellung in unserer Einrichtung imponierte klinisch-neurologisch eine blande linksbetonte Tetraparese mit residuellen Sensibilitätsstörungen in Form von Parästhesien und Dysästhesien im Bereich der Hand und des Unterschenkels links. Neuropsychologisch fielen Leistungseinschränkungen in exekutiven Funktionsbereichen (reduzierte sprachliche Flexibilität und Flüssigkeit) sowie im Arbeits- und Kurzzeitgedächtnis (v.a. visuo-räumliches Kurzzeitgedächtnis, unbeeinträchtigtes auditiv-verbales Kurzzeitgedächtnis) auf, während das formal-logische Denken und das Langzeitgedächtnis ungestört erschienen.

In der in unserer Einrichtung aktualisierten zerebralen MR-Bildgebung zeigten sich ausgeprägte supratentorielle Marklagerveränderungen mit Einbezug des Marklagers temporal beidseits und bilateral bandförmigen Signalveränderungen zwischen Putamen und Capsula externa, so dass wir vorrangig die Verdachtsdiagnose einer CADASIL-Erkrankung stellten. Liquoranalytisch fand sich reproduzierbar ein positives oligoklonales IgG mit einer schwachen Bande

bei ansonsten unauffälligem zytologischem Befund ohne Pleozytose oder Hinweisen für eine intrathekale Immunglobulin-Synthese im Reiber-Schema. Bei MR-morphologisch fehlender Balkenbeteiligung und für eine Multiple Sklerose atypischer Konfiguration der zerebralen Läsionen verwarfen wir die Diagnose eines chronisch-entzündlichen ZNS-Prozesses im Sinne einer Encephalomyelitis disseminata, für eine Vaskulitis bzw. Kollagenose mit zerebraler Beteiligung ergaben sich bei unauffälliger digitaler Subtraktionsangiographie der Hirngefäße und paraklinisch nicht wegweisenden Befunden keine Hinweise. Die vermutete CADASIL-Erkrankung konnte letztendlich mit dem molekulargenetischen Nachweis von oben erwähnter, bisher in der Literatur nicht beschriebener Notch3-Genmutation molekulargenetisch untermauert werden.

Die Patientin wurde pragmatisch im weiteren Verlauf auf eine Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS 100 mg 1 x 1 eingestellt. Weitere zerebral-ischämische Ereignisse ereigneten sich im Verlauf nicht, während sich exekutive und kognitive Einschränkungen trotz einer inzwischen etablierten Acetylcholinesterasehemmer-Behandlung leicht progredient verhalten (Stand 06/2010).

#### Eigenanamnese/Vorgeschichte:

- An kardiovaskulären Risikofaktoren bestand ein arterieller Hypertonus, der medikamentös (ACE-Hemmer und Calcium-Antagonist) gut kontrolliert war.
- In der Systemanamnese fanden sich neben den bereits oben erwähnten Cephalgien, die als chronische Kopfschmerzen vom Spannungstyp eingeordnet wurden, den subjektiven mnestischen Schwierigkeiten, einer vermehrten körperlichen Erschöpfbarkeit und leichten Durchschlafstörungen keine relevanten Auffälligkeiten. Apoplektiform aufgetretene Beschwerden vereinbar mit einer TIA oder einem Schlaganfall seien vor dem 45. LJ nicht bemerkt worden.

#### Familienanamnese:

Die Familienanamnese ist leer bezüglich vergleichbarer Erkrankungen.

Die Eltern seien im Alter von 75 bzw. 77 Jahren an „Altersschwäche“ verstorben; vermehrte Cephalgien, Schlaganfälle oder psychiatrische Auffälligkeiten seien der Patientin weder bei ihren Eltern noch bei insgesamt 6 Geschwistern bekannt. Einer der beiden Söhne der Patientin leide an einem Knochentumor.

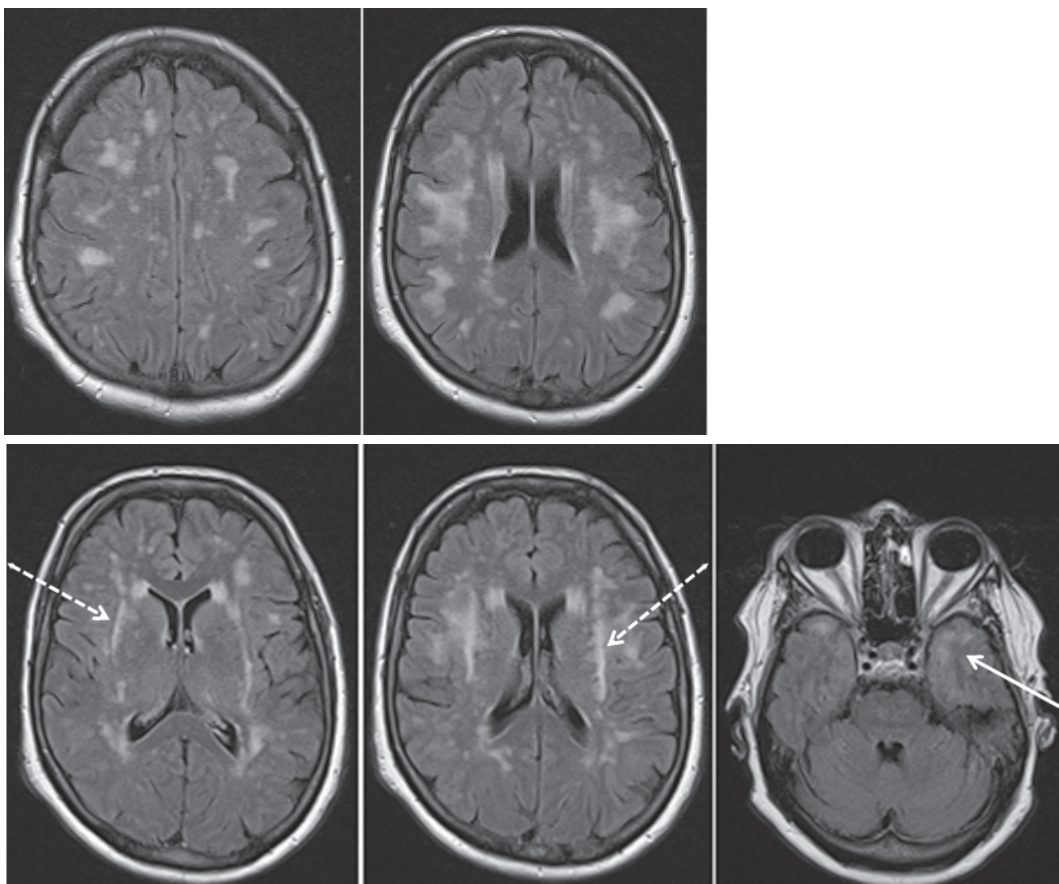


MRT-Bildgebung:

<b>cMRT vom 07.11.2008 (Patient G.C.)</b>	
Vorliegende MR-Sequenzen:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diffusionswichtung (DWI) axial</li> <li>- T1 axial, T1 axial mit Kontrastmittel</li> <li>- T2 axial</li> <li>- T2* axial</li> <li>- FLAIR axial</li> </ul>
<b>Gefundene Pathologie:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- in T2 und FLAIR-Wichtung <b>zahlreiche, teils flächig konfluierende signalreiche Marklagerläsionen beidseits symmetrisch und supratentoriell</b> (v.a. subkortikal, weniger periventrikulär, laterale Balkenstrahlung)</li> <li>- Weiterhin Abbildung von <b>zahlreichen lakunären Läsionen</b> (z. B. im Thalamus links), die in der T1-Wichtung als signalarme Zone erscheinen</li> <li>- Im Besonderen stellen sich darüber hinaus <b>bilateral signalreiche, bandförmige Veränderungen zwischen Putamen und der Capsula externa</b> sowie <b>Marklagerveränderungen im Bereich der anterioren Temporalpole</b> dar</li> </ul>

Illustrierende Abbildungen der MRT-Sequenzen Patient G.C:

- FLAIR, axial:



Ausgeprägte supratentorielle fleckig-konfluierende Marklagerveränderungen. Beachte die bilaterale, bandförmige, signalreiche Veränderung im Bereich der Capsula externa (gestrichelte → in den Abb. unten links und unten Mitte) sowie die hyperintensiven Veränderungen in den anterioren Temporalpolen (→ in Abb. unten rechts)

#### 4. DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine comprehensive Mutationsanalyse des Notch3-Gens bei einer größeren Kohorte von jungen Schlaganfallpatienten durchgeführt. Sie kann als komprehensiv bezeichnet werden, da bei jedem einzelnen Patienten die kodierenden Bereiche sämtlicher Exons 1-33 sowie die jeweils umgebenden Intron-Exon-Übergänge komplett sequenziert wurden. Ziel der Arbeit war eine Ermittlung der Frequenz von Notch3-Mutationen in einer nicht weiter selektionierten Gruppe von jungen, d.h. unter 55 Jahre alten Patienten mit einem Schlaganfall sowie – im Falle von entdeckten Sequenzvariationen – die Bestimmung des assoziierten Phänotyps bzw. deren biologisch-klinischen Relevanz. In der Analyse entdeckten wir insgesamt 3 Punktmutationen bei 3 verschiedenen Patienten aus dem europäischen Raum, die in den Exons 25 (c.4639 C>G, p.L1547V) und 33 (c.6221 C>T, p.P2074L sowie c.6532 C>T, p.P2178S) liegen. Diese Sequenzaberrationen wurden von uns als Mutationen gewertet, da sie bei jeweils ca. 500 Kontrollindividuen bzw. 1000 Kontrollallelen nicht nachgewiesen werden konnten und damit mit großer Wahrscheinlichkeit keine Polymorphismen darstellen. Interessanterweise führen alle 3 Mutationen zu einem Aminosäure-Austausch, der die Anzahl von Zysteinresten innerhalb der sog. „epidermal growth factor (EGF)-like repeats“ (EGFR) des Notch3-Proteins nicht verändert (sog. Zystein-aussparende Mutationen).

Dagegen konnte in den Sequenzanalysen keine in der Literatur vorbeschriebene oder neue Mutation gefunden werden, die zu einer Alteration der Zysteinrestzahl führt und somit das bisher postulierte Paradigma der klassischen Notch3-Mutationen erfüllt. Die Frequenz bzw. Prävalenz von klassischen CADASIL-Mutationen in der von uns untersuchten SIFAP-Kohorte (154 Patienten jünger als 55 Jahre mit einem Schlaganfallereignis jeder möglichen Ätiologie) ist damit mit 0 % anzugeben. Diese ermittelte Frequenz mag die insgesamt sicherlich nicht häufig vorkommende Erkrankung widerspiegeln, deren Inzidenz und Prävalenz nicht genau bekannt ist. Die Prävalenz von CADASIL ist für eine Population einer Region im Westen Schottlands auf 1.98 / 100 000 Erwachsene, die Mutationsprävalenz (Exon 3, 4, 5 und 6) sogar auf 4.14 / 100 000 Einwohner geschätzt worden (Razvi et al, 2005<sup>a</sup>). Vereinbar mit dem o.g. Resultat unserer Arbeit sind die Ergebnisse einer britischen Studie, die eine gut definierte Gruppe von 218 konsekutiv in einer



Schlaganfalleinrichtung evaluierten Patienten mit einem lakunären Schlaganfall (mit oder ohne Leukenzephalopathie) auf CADASIL-Mutationen untersuchte (molekulargenetische Analyse limitiert auf die Exons 3, 4, 5 und 6 des Notch3-Gens, die vermutlich ca. 85 % der klassischen Mutationen erfassen dürfte): Nur ein Patient mit einer klassischen Zysteinanzahl-alterierenden Mutation (R207C-Mutation im Exon 4) konnte detektiert werden, einer Frequenz von 0.05 % innerhalb der gesamten Kohorte entsprechend. Im Falle einer spezifizierenden Einschränkung der Analyse auf Patienten mit einer zusätzlichen Leukenzephalopathie und ein Schlaganfallmanifestationsalter von < 65 bzw. < 50 Jahren stieg die ermittelte Frequenz von CADASIL-positiven Fällen auf 2 % bzw. 11 % (Dong et al, 2003). Mit der vorliegenden Arbeit kann festgehalten werden, dass die Frequenz von klassischen CADASIL-Mutationen in einem Kollektiv von jungen Schlaganfallpatienten entsprechend der geringen Prävalenz der Erkrankung in der Allgemeinbevölkerung sehr niedrig sein dürfte und dass die Detektionsrate von prototypischen Mutationen durch die auf Schlaganfallpatienten fokussierte Suche sowie die Komplettssequenzierung der kodierenden Exons zumindest gemäß unserer Untersuchung nicht erhöht werden konnte. Ein routinemäßiges diagnostisches Mutationsscreening von jungen Schlaganfallpatienten ohne zusätzliche klinisch-anamnestische und/oder neuroradiologische Evidenz für eine CADASIL-Erkrankung kann somit in der alltäglichen Praxis derzeit nicht empfohlen werden.

Die von uns gefundenen Zystein-aussparenden Mutationen scheinen – soweit durch die kleine Fallzahl überhaupt beurteilbar bzw. irgendwie zu vereinheitlichen – mit einem im Vergleich zur klassischen CADASIL-Erkrankung variablen und atypischen, insgesamt milderem Phänotyp einherzugehen:

Der Patient mit der Mutation L1547V (c.4639 C>G in Exon 25) erlitt im Alter von 52 Jahren eine rechtsseitige cerebelläre Blutung und 3 Jahre vorausgehend ein zerebrovaskuläres ischämisches Ereignis im Sinne einer ischämischen TIA. Neuroradiologisch imponierten allenfalls leicht ausgeprägte „white matter lesions“, die die für eine CADASIL-Erkrankung typischen Prädilektionsstellen nicht erfassten. Weitere mit dem klassischen CADASIL-Phänotyp vereinbare Charakteristika konnten nicht ermittelt werden (keine Kopfschmerzen/Migräne, keine neuropsychiatrische Auffälligkeiten bzw. Demenzentwicklung, keine verdächtige Familienanamnese). Konkurrierend bestand bei diesem Patienten ein arterieller Hypertonus, der als

mögliche verantwortliche Ursache für die intrazerebrale Blutung und die Veränderungen der weißen Substanz in Erwägung gezogen werden könnte, allerdings war der Hypertonus medikamentös gut kontrolliert und in der zerebralen MR-Bildgebung ließen sich in den hämsensitiven T2-Gradientenechosequenzen keine Mikroblutungen als Hinweis für eine langjährig bestehende arterielle Hypertonie finden.

Multiple zerebrale Infarkte im Bereich des Medialstromgebietes links und paramedian pontin rechts fanden sich bei einem 45-jährigen Patienten, bei dem sich die Mutation P2074L (c.6221 C>T in Exon 33) nachweisen ließ. Hier wurde aufgrund des Verteilungsmusters letztendlich eine kardioembolische Genese der zerebralen Infarkte postuliert, konnte aber nicht bewiesen werden und blieb somit unklar. Auch bei ihm fanden sich keine für eine klassische CADASIL-Erkrankung wegweisende Befunde bzw. Anamnese: In der zerebralen MR-Bildgebung offenbarten sich leicht bis mäßig ausgeprägte „white matter lesions“, die konkurrierend auch auf ein ausgeprägtes kardiovaskuläres Risikoprofil (arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas mit metabolischem Syndrom) zurückgeführt werden könnten und die nicht die typischen Prädilektionsstellen erfassten (keine Läsionen im anterioren Temporalpol bzw. in der Capsula externa). Der Patient wies darüberhinaus keine Kopfschmerzen/Migräne, zerebrovaskuläre Ereignisse, neuropsychiatrische Auffälligkeiten oder kognitiv-mnestische Schwierigkeiten vor dem Ereignis sowie keine familienanamnestische Auffälligkeiten auf. Erwähnenswert sind offensichtliche mnestic-kognitive Einschränkungen des Betroffenen zumindest nach dem Schlaganfallereignis, die im Profil mit führenden Aufmerksamkeits- und exekutiven Störungen den bei CADASIL beschriebenen Veränderungen gleichen.

Der dritte Patient mit einer Zystein-aussparenden Mutation (P2178S (c.6532 C>T in Exon 33)) erlitt einen zerebralen Mediagrenzzoneninfarkt links mit einem begleitenden okulären Zentralarterienverschluss, der auf eine Dissektion der extrakraniellen Arteria carotis interna links mit konsekutivem distalem Verschluss des Gefäßes zurückgeführt wurde. Bei diesem Patienten fanden sich weder in der neurokraniellen MR-Bildgebung noch anamnestisch bzw. familienanamnestisch Auffälligkeiten, die in Richtung eines klassischen CADASIL-Syndroms weisen würden.

Summierend finden wir bei diesen Patienten als gemeinsames Charakteristikum einen Schlaganfall (sowohl ischämischer wie hämorrhagischer Natur) und MR-morphologisch zum Teil milde WML's ohne Beteiligung des Temporallappens, wobei letztere auch durch die Präsenz eines arteriellen Hypertonus als konfundierenden Faktor bedingt sein könnten und eine hypertensive Genese dieser MR-Auffälligkeiten deshalb nicht ausgeschlossen werden kann. Allerdings wird ein arterieller Hypertonus auch bei CADASIL-Patienten zumindest im Krankheitsverlauf etwas häufiger gefunden als ursprünglich vermutet (bei ca. 20-25 % aller Patienten; Singhal et al, 2004; Peters et al, 2004<sup>a</sup>, Adib-Samii 2010). Zusätzlich bleiben phänotypisch die kognitiven Einschränkungen mit führenden Aufmerksamkeits- und Exekutivstörungen des Patienten mit der P2074L-Mutation erwähnenswert, wobei auch hier eine postischämische Ursache bzw. Genese im Rahmen einer sporadischen vaskulären subkortikalen Demenzentwicklung nicht auszuschließen ist. Weitere Charakteristika (Anamnese, Klinik, Familienanamnese), die auf einen prototypischen bzw. „klassischen“ CADASIL-Phänotyp hinweisen würden, ließen sich nicht eruieren. Wir wollen diese Fälle deshalb unter einem als „atypisch“ bezeichneten CADASIL-Phänotyp bzw. „atypischen CADASIL-Varianten“ einordnen. Formal korrekt müssen wir die von uns gefundenen Zystein-aussparenden Sequenzvariationen letztendlich aber als „Mutationen nicht sicher determinierter bzw. unbekannter klinischer Relevanz“ bezeichnen, da wir eine Segregation der oben beschriebenen Phänotypen mit diesen Mutationen nicht beweisen können.

Im Kontrast zu diesen „atypischen Varianten“ kann der „klassische“ CADASIL-Phänotyp in dieser Arbeit sehr schön mit den Beschreibungen der Patienten aus unserer eigenen Kohorte veranschaulicht werden, bei denen ausschließlich Mutationen im Notch3-Gen gefunden wurden, die das Paradigma einer Änderung der Zysteinanzahl in einem der 34 EGF-Repeats erfüllen. Auch wenn das Spektrum des klassischen Phänotyps bekanntermaßen sehr breit und variabel ist, werden gemeinsame bzw. überlappende Charakteristika bereits innerhalb der kleinen Kohorte der hier dargestellten Patienten ersichtlich: Neben Kopfschmerzen, (wiederholten) zerebral-ischämischen Ereignissen und relativ typischen kognitiv-mnestischen Einschränkungen (v.a. die exekutiven Funktionen betreffend) finden sich in der zerebralen MR-Bildgebung eine relativ ausgeprägte subkortikale Leukenzephalopathie und multiple lakunäre Infarkte. Die Leukenzephalopathie geht bei allen 4 Patienten mit Marklagerläsionen im Bereich des anterioren Temporalpols

und in der Hälfte der Fälle mit bandförmigen Läsionen im Bereich der Capsula externa einher.

In der Literatur mehren sich in beachtenswerter Weise die Beschreibungen der Fälle von Zystein-aussparenden Sequenzveränderungen. Hierunter verbergen sich sowohl Mutationen mit relativ eindeutiger klinisch-biologischer Relevanz wie auch Mutationen unklarer klinischer Signifikanz. Innerhalb der ersten Gruppe finden sich Fälle mit relativ typischer CADASIL-Klinik, MRT-Auffälligkeiten im Sinne von milderen bis schweren Leukenzephalopathien und lakunären Infarkten sowie zum Teil nachgewiesenen GOM-Ablagerungen (z. B. Kotorii et al, 2001, Santa et al, 2003; Uchino et al, 2002; Mazzei et al, 2004; Kim et al, 2006, Choi et al, 2006, Mizuno et al, 2008; Ferreira et al, 2007; Scheid et al, 2008, Wang et al, 2010). Unter Mutationen unklarer Signifikanz werden durch einen Vergleich mit einer geforderten Anzahl von gesunden Kontrollindividuen nicht als Polymorphismus/SNP zu wertende Sequenzveränderungen subsummiert, die entweder keinen erkennbaren oder keinen untersuchten bzw. beschriebenen Phänotyp aufweisen (z. B. Ferreira et al, 2007: T577A-Mutation in Exon 11, Ampuero et al, 2009: Q151-Mutation in Exon 4). Die bisher eher spärliche Charakterisierung und die Verletzung des paradigmatischen Grundprinzips erklärt die Kontroverse um die Bedeutung dieser Mutationen/Sequenzvarianten.

Folgende Zystein-aussparende Mutationen sind in der Literatur mit phänotypischen Hinweisen beschrieben worden:

-*Kotorii et al, 2001*: R213K-Mutation in Exon 4 bei einem japanischen Patienten mit typischer CADASIL-Klinik (Migräne seit dem 10. LJ, multiple zerebrale Infarkte, affektive Störung, Demenz mit Fortschreiten in eine pseudobulbäre Paralyse, Tod mit 75 Jahren; positive Familienanamnese), in der MR-Bildgebung multiple T2-Hyperintensitäten in der weißen Substanz sowie Nachweis von GOM in Hirn- und viszeralen Gefäßen (bereits klinisch vorbeschriebener und autoptisch untersuchter Patient durch Nishio et al, 1997; neuropathologische Reexaminationen durch Okeda et al, 2002 und Santa et al, 2003). Die R213K-Mutation wurde in der Folge bei einem weiteren japanischen Patienten mit milder Migräne, rekurrierenden Schlaganfallereignissen, einer moderaten Demenz und pseudobulbären Paralyse (keine GOM- und keine MRT-Analyse) gefunden (Uchino et al, 2002).

-*Uchino et al, 2002*: V237M-Mutation im Exon 5 bei einer japanischen Patientin mit später Erstmanifestation im 71. LJ mit einer milden Migräne, milden Demenz und ataktischen Gangstörung (keine Analyse von GOM).

-*Mazzei et al, 2004*: Kleine Deletion von 12 bp im Exon 3 (p.A88-G81del, c.C341-G352del), in einer „in-frame“ Deletion von 4 Aminosäuren resultierend, die nicht direkt einen Zysteinrest involviert; gefunden bei einer italienischen 73-jährigen Indexpatientin und ihrer 51-jährigen Tochter mit relativ CADASIL-typischer Klinik (milde Depression, dementielle Entwicklung, Gangschwierigkeiten; Tochter nur mit Migräne mit Aura seit dem 45. LJ) und MR-Veränderungen (auch hier keine Beteiligung des anterioren Temporalpols oder der Capsula externa).

-*Kim et al, 2006; Mizuno et al, 2008*: R75P-Mutation im Exon 3, zuerst entdeckt bei 15 Individuen von 4 unverwandten koreanischen Familien (und bei 200 gesunden Kontrollpersonen nicht vorkommend), 6 symptomatische Patienten mit mit CADASIL vereinbaren klinischen und Bildgebungs-Befunden (aber bemerkenswerterweise ohne Beteiligung des anterioren Temporalpols), ein Indexpatient mit Nachweis von GOM in der Hautbiopsie (Kim et al, 2006). Dieselbe R75P-Mutation wurde bei 2 weiteren koreanischen Patienten (Betroffene mit ischämischen Infarkten und kognitiven Defiziten; Choi et al, 2006) und bei 4 japanischen Individuen (Mizuno et al, 2008) gefunden. Letztere wiesen relativ typische klinische Bilder (Kopfschmerzen/Schwindelattacken, wiederholte zerebrale Ischämien, Depression, Demenz mit pseudobulbärer Paralyse/akinetischem Mutismus, zum Teil epileptische Anfälle; bei einer Patientin darüberhinaus thalamische Blutung und Nachweis von GOM) und MR-Bildgebungsbefunde auf, aber wie bei den koreanischen Patienten keine Ausdehnung der WML in die Temporalpole.

-*Ferreira et al, 2007*: S978R-Mutation in Exon 18 bei einer Patientin mit einem ersten Schlaganfall in der 5. Dekade, psychiatrischen Problemen, Demenz und einer Epilepsie sowie „white matter“-Auffälligkeiten im kraniellen MRT.

-*Scheid et al, 2008*: A1020P-Mutation im Exon 19 (auch als Polymorphismus beschriebene Sequenzveränderung, siehe u.a. Escary et al, 2000), gefunden bei insgesamt 4 deutschen Patienten: 3 Angehörige einer deutschen Familie, die einen relativ milden Phänotyp aufweisen (49-jährige Indexpatientin mit unilateralem Kopfschmerz, episodischen sensomotorischen Symptomen der linken Extremität, kognitiver Verlangsamung und beeinträchtigtem Gedächtnis, sensorineuronalem Hörverlust im adoleszentem Alter, cMRT mit ausgedehnten WMLs in der T2-

Wichtung ohne Temporalpolbeteiligung, Nachweis von GOM in der Hautbiopsie; 71-jährige Mutter der Patientin nur mit einem bilateralen Hörverlust und einem horizontalen Blickrichtungsnystagmus nach links (aber ausgeprägten WML in der cMRT), 63-jähriger Onkel der Patientin mütterlicherseits mit mildem bilateralen Hörverlust (geringfügige Abblassung der weißen Substanz und dilatierte Robin-Virchow Räume in der cMRT). Eine unverwandte deutsche, 77-jährige Patientin mit derselben Mutation wies vorgeschichtlich depressive Episoden und progressive Veränderungen der Persönlichkeit sowie eine verdächtige Familienanamnese auf, assoziiert mit schweren WML in der cMRT ohne Involvierung des Temporalpols (hier unauffällige Hautbiopsie).

-Wang et al, 2010: T1098S-Mutation in Exon 20 bei einem 39-jährigen chinesischen Patient mit Schlaganfall und kognitiven Einschränkungen, leukenzephalopathischen Veränderungen (ohne Temporalpolbeteiligung) und lakunären Infarkten im MRT sowie Nachweis von GOM in der Hautbiopsie.

Diese in der Literatur bislang aufgeführten Fälle unterlegen die Schwierigkeit, einen einheitlichen Phänotyp von Zystein-aussparenden Mutationen abzugrenzen. Assoziierte „atypische“ CADASIL-Phänotypen bzw. atypische Merkmale (z. B. mildere und spätmanifeste Verläufe; MR-Bildgebung ohne bisher beschriebene Beteiligung des anterioren Temporalpols und nicht gelungener GOM-Nachweis) scheinen allerdings häufig vorzukommen. Die Prävalenz von solchen atypischen und im Vergleich zu CADASIL eher milderer Varianten mag zudem durchaus höher sein als bisher gedacht, da entsprechende Bilder nicht unbedingt zu einer geeigneten resp. ursachenklärenden Diagnostik veranlassen.

Die Zystein-aussparenden Mutationen könnten darüberhinaus nicht nur vom phänotypischen Aspekt, sondern auch vom pathophysiologischen Gesichtspunkt her eine heterogene Gruppe bilden. Über mögliche pathomechanistische Konsequenzen der Zystein-aussparenden Mutationen existieren bisher keine systematischen Untersuchungen. Diesbezüglich können derzeit nur Spekulationen getätigt werden, die sich letztendlich auf die molekulare Ebene beschränken: Im EGFR-kodierenden Bereich gelegene Mutationen könnten über ihren resultierenden Aminosäure-Austausch ähnlich den klassischen Mutationen die Proteinfaltung und Domänenstruktur des Notchrezeptors stören: Beispielhaft seien die Mutationen R75P (Kim et al, 2006) und A1020P (Scheid et al, 2008) erwähnt, die beide in einer Aminosäuresubstitution zu Prolin resultieren, welche ähnlich dem Zystein für die



Bildung von „ $\beta$ -Sheet-Turns“ in der extrazellulären Domäne des Notch3-Rezeptors wichtig ist. Die Deletion p.A88-G91del (Mazzei et al, 2004) fällt zwischen das 2. und 3. Zystein im EGFR 2, deletiert 4 nichtkonservierte Aminosäuren und rückt hierdurch die zwei normalerweise durch 5 Aminosäuren getrennte zwei Zystein-Aminosäuren näher zusammen, was eine inkorrekte Disulfidbrückenpaarung verursachen könnte. Bei der Mutation S978R (Ferreira et al, 2007) wird die Ladung der Seitenkette verändert. Keine primär ersichtlichen substantiellen Konsequenzen hinsichtlich der Domänenfaltung scheint die Punktmutation R213K (Kotori et al, 2001 und Uchino et al, 2002) zu haben, die ein Arginin (mit einer basischen Seitenkette) mit einem Lysin (mit ebenfalls basischer Seitenkette) ersetzt, das zusätzlich eine ähnliche Größe wie Arginin aufweist. Allerdings scheint Arginin sowohl in den EGFR des Notchproteins (unterlegt durch die bekannten klassischen Punktmutationen, die in ca. 45 % zu einem Ersatz oder Verlust von Arginin in der extrazellulären Domäne führen) sowie auch in anderen verwandten Proteinen (z.B. Arg184 als häufigste mutierte Stelle von JAG1, einem Notchligandprotein mit 16 EGFR) eine wichtige Rolle zu spielen, möglicherweise für ein korrektes intrazelluläres Prozessing oder Interaktionen mit anderen regulatorischen Proteinen. Eine weitere Punktmutation (V237M; Uchino et al, 2002) ersetzt ein konserviertes Valin innerhalb einer Calcium-bindenden Stelle des 6. EGF-Repeats und könnte dadurch z.B. die Calciumbindung stören. Beachtenswert liegen die von uns gefundenen Zystein-aussparenden Mutationen in nicht-EGFR-kodierenden Exons (L1547V in Exon 25; P2074L und P2178S jeweils in Exon 33). Die exakten Strukturelemente bzw. deren Funktionen, die durch diese betroffenen Genabschnitte kodiert werden, sind bisher nicht genauer bekannt.

Einen weiteren Beleg dafür, dass Notch3-Genmutationen nicht nur die klassische CADASIL-Erkrankung verursachen, sondern möglicherweise auch mit anderen Erkrankungsentitäten einhergehen, findet sich in einer Studie von Fouillade (Fouillade et al, 2008): Es konnte gezeigt werden, dass eine bisher nicht benannte familiäre Form einer ischämischen zerebralen Mikroangiopathie durch eine ebenfalls außerhalb der EGFR-kodierenden Exons 2-24 liegende und Zystein-aussparende Notch3-Mutation hervorgerufen wird. Diese Punktmutation (c. 4544T>C, p.L1515P, Exon 25) führt zu einem Aminosäureaustausch in der juxtamembranen, die sog. Heterodimerisationsdomäne bildende Region des Notch3-Rezeptors. Zumindest in vitro bedingt sie vermutlich über eine Destabilisierung des Heterodimers eine

konstitutionell erhöhte, von der Ligandenbindung unabhängige Signalaktivität des Notch3-Rezeptors. Dies unterscheidet sie fundamental von der Majorität der klassischen CADASIL-Mutationen, die in in-vitro-Experimenten einen normalen Level des kanonischen Notch3-Signallings zu bewahren scheinen, und könnte somit auf einen alternativen Pathomechanismus bzw. eine neue mechanistische Klasse von Notch3-Mutationen hinweisen. Bemerkenswerterweise geht die mit o.g. Mutation assoziierte, von Fouillade als neue Form einer familiären „cerebral small vessel disease“ postulierte Erkrankung mit Merkmalen einher, die sich von CADASIL unterscheiden: Bei der Indexpatientin, die im Alter von 35 Jahren einen Schlaganfall erlitt und ab dem 53. LJ rezidivierend transiente Symptome in Form von Skotomen und Parästhesien mit zum Teil nachfolgenden frontalen Kopfschmerzen entwickelte, konnten MR-morphologisch neben einem kleinen lakunären Infarktdefekt weitgestreute und symmetrische T2-Hyperintensitäten in der weißen Substanz (ohne Beteiligung des Temporalpols) gefunden werden. In der Hautbiopsie gelang der Nachweis von GOM-Ablagerungen oder einer Akkumulation der extrazellulären Domäne des Notch3-Rezeptors dagegen nicht.

Zusammenfassend können wir mit der vorliegenden Arbeit eine mögliche Segregation von „atypischen“ CADASIL-Phänotypen bzw. „atypischen CADASIL-Varianten“ mit den gefundenen Zystein-aussparenden Mutationen auf keinen Fall beweisen und damit die zentrale Fragestellung bzw. Hypothese letztendlich nicht schlüssig beantworten. Limitierend sind dabei die sehr geringe Zahl der gefundenen Patienten mit solchen Mutationen, der kurze klinisch-neuroradiologische Beobachtungsausschnitt, das Fehlen von phänotypisch klar diskriminierenden bzw. pathognomonischen Krankheitsmerkmalen und die Bias durch die Selektion der Patienten aus der SIFAP-Kohorte mit theoretisch denkbaren konkurrierenden Schlaganfallursachen. Um die Hypothese eines „atypischen“ Phänotyps durch die Gruppe von Zystein-aussparenden Mutationen adäquater unterlegen bzw. ggf. auch ausschließen zu können, sind letztendlich weitere Arbeiten notwendig, die molekulargenetische Analysen von noch größeren Kollektiven, sorgfältige Genotyp-Phänotyp-Korrelationen über einen längeren Zeitraum und ggf. in-vitro-Expressionsstudien der Mutationen umfassen sollten.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit ließen sich bei einer großen Kohorte von jungen Schlaganfallpatienten mittels molekulargenetischen Analysen der gesamten kodierenden DNA-Sequenz des Notch3-Gens insgesamt drei, bisher nicht bekannte Mutationen nachweisen, die auf Proteinebene nicht dem Paradigma von klassischen CADASIL-Mutationen – einer Veränderung der Zysteinanzahl in einem bestimmten EGFR des extrazellulären Notch3-Rezeptors – folgen (1. Mutation in Exon 25: c.4639 C>G, p.L1547V; 2. Mutation in Exon 33: c.6221 C>T, p.P2074L; 3. Mutation in Exon 33: c.6532 C>T, p.P2178S). Diese Sequenzveränderungen konnten in einer Kontrollgruppe, die jeweils ca. 500 Kontrollindividuen ohne Schlaganfall bzw. 1000 entsprechende Kontrollallele umfasste, sowie in internationalen Polymorphismus-Datenbanken nicht gefunden werden und wurden von uns deshalb zunächst formal als „Mutationen unklarer bzw. möglicher klinischer Relevanz“ klassifiziert. Eine bei den 3 betroffenen Patienten durchgeführte Genotyp-Phänotyp-Analyse könnte darauf hinweisen, dass diese Mutationen mit einem von uns als „atypisch“ bezeichneten Phänotyp einhergehen, der sich vom klassischen CADASIL-Phänotyp unterscheidet. Ein eher milderer Verlauf, eine inkomplette Ausbildung der CADASIL-Hauptmanifestationen mit Ausnahme von Schlaganfällen sowie MR-morphologisch nur geringe „white matter lesions“ bzw. eine geringe Leukenzephalopathie ohne Erfassung des anterioren Temporalpols könnten Elemente dieses Phänotyps sein. Eine Segregation von diesem vermuteten „atypischen“ Phänotyp mit den gefundenen Zystein-aussparenden Mutationen und damit auch ein neues Krankheitsbild im Sinne von „atypischen CADASIL-Varianten“ lassen sich in dieser Arbeit allerdings nicht beweisen. Dies scheitert an der sicherlich zu geringen Fallzahl von Patienten mit solchen Mutationen, dem Fehlen von klar herausragenden gemeinsamen Krankheitszeichen sowie auch der möglichen Bias durch die Selektion der Patienten aus der SIFAP-Studiengruppe. Eine Recherche bezüglich der in der Literatur vorbeschriebenen Zystein-aussparenden Mutationen unterstützt zwar nicht die Vereinheitlichung eines durch diese Mutationen bedingten Phänotyps, deutet aber auf eine Häufung von assoziierten „atypischen“ CADASIL-Verläufen bzw. „atypischen CADASIL-Varianten“. „Atypische CADASIL-Varianten“ könnten sich klinisch äußern in einer Spektrum von einzelnen oder wenig kombinierten Elementen der bekannten Hauptmanifestationen von CADASIL, einer sowohl sehr mild bis hin zu einer stark ausgeprägten subkortikalen Leukenzephalopathie, einem tendenziell eher milderem

Verlauf und häufigeren Spätmanifestationen, aber z. B. keiner typischen Beteiligung des anterioren Temporalpols in der MRT-Bildgebung sowie einem nicht unbedingt notwendigen Vorhandensein von GOM-Ablagerungen. Dieser insgesamt heterogen erscheinende, vereinfacht unter der Bezeichnung „atypisch“ zusammengefasste Phänotyp mag möglicherweise auch die Heterogenität der Zystein-aussparenden Mutationen in Bezug auf ihre pathophysiologischen Konsequenzen widerspiegeln, die bislang nicht gezielt untersucht worden sind. In diesem Zusammenhang erscheint auch erwähnenswert, dass die von uns gefundenen Mutationen entgegen der Mehrheit der bisher beschriebenen Zystein-aussparenden sowie den klassischen Zystein-involvierenden CADASIL-Mutationen in Exon-Sequenzen des Notch3-Gens liegen, die nicht für die im extrazellulären Teil befindlichen 34 EGFR des Notchrezeptors kodieren. Die exakten Strukturelemente des Notch3-Rezeptors bzw. deren Funktionen, die durch diese betroffenen Genabschnitte kodiert werden, sind uns bisher nicht genauer bekannt. Eine spannende Aufgabe von weiteren notwendigen Studien wird es sein, diese möglicherweise heterogene Gruppe von Zystein-aussparenden Mutationen sowohl hinsichtlich pathophysiologischen Grundlagen wie auch phänotypischen Aspekten umfassender zu beleuchten und im Einzelnen auch näher zu charakterisieren.

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass in einer unselektionierten Population von 154 jungen Patienten mit Schlaganfall die Frequenz von klassischen Zysteinanzahl-alterierenden CADASIL-Mutationen sehr gering sein dürfte. Im klinischen Alltag kann dementsprechend und unter Berücksichtigung von Aufwand und Kosten derzeit kein routinemäßiges Mutationsscreening des gesamten Notch3-Gens bei jedem jüngeren Schlaganfallpatienten empfohlen werden. Ein solches sollte von zusätzlichen (auch schon minimalen) anamnestisch-klinischen und/oder neuroradiologischen Verdachtsmomenten für eine CADASIL-Erkrankung geleitet werden.

Als Nebenbefund konnte in einer von uns zusammengestellten Vergleichsgruppe von CADASIL-Patienten mit einem klassischen Phänotyp eine neue, bislang nicht publizierte Mutation im Exon 5 (c.785 G>A, p. C262Y) nachgewiesen werden.

**6. ANHANG:****ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS****ALLGEMEINE ABKÜRZUNGEN:**

AGLA (-Gen)	$\alpha$ -Galaktosidase A (-Gen)
ANKR	ankyrin repeats = Ankyrin Wiederholungen
AS (aa)	Aminosäure (aa = amino acid)
BMI	body mass index
bp	base pairs = Basenpaare
CADASIL	Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy
CBF 1	C Promotor Bindungsfaktor 1
cDNA	coding DNA = kodierende DNA
cM	Centimorgan
CM	cerebral microbleeds = zerebrale Mikroblutungen (auch als MB = microbleeds bezeichnet)
DNA	Deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
DSL	Notchligandenfamilie, bezeichnet nach den Liganden Delta und Serrate (bei <i>Drosophila melanogaster</i> ) und Lag2 (bei <i>C. elegans</i> )
ED	Erstdiagnose
EGFR	EGF-like repeats = "Epidermal Growth Factor"-like repeats
GOM	Granular osmiophilic material = Granuläres osmiophiles Material
H <sub>2</sub> O	Wasser (ddH <sub>2</sub> O = bidestilliertes Wasser)
het.	heterozygot
HD	Herodimerisationsdomäne des Notchrezeptors
ICH	Hirnparenchymlutung (ICH: intracerebral hemorrhage; PBH: parenchymal brain hemorrhage)
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
LJ	Lebensjahr
LNR	Lin-12/Notch repeats = Lin-12/Notch Wiederholungen
LRS	ligand recognition site (Ligandenbindungsstelle)
MRT	Magnetresonanztomographie
N3	Notch3-Rezeptorprotein
NECD	= N3ECD: Notch3 extracellular domain = ECD: extrazelluläre Domäne des Notch3-Rezeptors
NICD	= N3ICD: Notch3 intracellular domain = ICD: intrazelluläre Domäne des Notch3-Rezeptors
NLS	nukleäre Lokalisierungssignale im Bereich der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors
NRR	negative regulatorische Region des Notchrezeptors
NTMD	=TM: transmembranous domain = TMD: transmembranöse Domäne des Notch3-Rezeptors
NTMICD	= Notch3-transmembranous-intracellular domain, auch als NEXT: notch extracellular truncation (trunkierter Notchrezeptor mit transmembranös-intrazelluläre Domäne) bezeichnet
PCR	polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PEST	PEST (proline, glutamic acid, serine, threonine (-rich)) domain
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
RAM	RBP-Jk-associated molecule domain
RBP-Jk	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
SIFAP	stroke in young fabry patients
SIVD	sukortikale ischämische vaskuläre Demenz
SNP	single nucleotide polymorphism (auch: SNV = single nucleotide variation) = Einzelnukleotid-Polymorphismus
SVD	small vessel disease
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SSCP (SSCA)	Single Strand DNA Conformation Polymorphism (-Analyse)
TIA	transient ischemic attack = transitorisch ischämische Attacke
VSMC (s)	vascular smooth muscle cell (s) = vaskuläre glatte Muskelzelle (n)
WMH	White matter hyperintensities = Hyperintensitäten der weißen Substanz

**GEFÄSSBEZEICHNUNGEN:**

ACA (A. cerebri anterior); ACM (A. cerebri media), ACP (A. cerebri posterior), ACI (A. carotis interna)

**MRT-BEGRIFFE/-GLOSSAR:**

DWI	Diffusion Weighted Imaging-Sequenzen (diffusionsgewichtete Sequenzen)
EPI	Echo Planar Imaging-Sequenzen (echoplanare Bildgebung)
FLAIR	Fluid Attenuated Inversion Recovery-Sequenzen
MRA	Magnetresonanz-Angiographie
MIP	Maximum Intensity Projection (Nachverarbeitungsmethode)
T1, T2	T1- bzw. T2-gewichtete Sequenzen
T2*	hämsensitive Sequenzen (T2*-gewichtete Gradientenecho-Sequenzen)
TIRM	Turbo Inversion Recovery Magnitude-Sequenzen

**Tab. 1. Übersicht „stroke-negative“-Kontrollen:**

Aus einer eigenen Biobank stammende Kontrollen, die Blutproben von Individuen mit diversen genetisch bedingten Erkrankungen (sowohl manifest Erkrankte mit molekulargenetisch bestätigter Diagnose, Anlageträger/Carrier wie auch Verdachtsfälle) beinhalten, die per se nicht zum Schlaganfall führen.

(Abk: M = Männer, F = Frauen, ND = nicht determiniertes Geschlecht, PN = Pränatale Untersuchung)

ERKRANKUNG (Genprodukt, Gen)	STATUS						ANZAHL	
	Patienten mit pathologischen molekulargenetischen Veränderungen		Carrier/Anlageträger		Verdachtsfälle		Anzahl M Anzahl F, Anzahl ND (mit PN)	Alle
	M	F	M	F	M	F		
FRDA: Friedreich-Ataxie (Frataxin)		2					2 F	2
SCA 1: Spinocerebelläre Ataxie 1 (Ataxin-1)	1 1x ND						1 M, 1 ND	2
SCA 2: Spinocerebelläre Ataxie 2 (Ataxin-2)	1	1					1 M, 1 F	2
SCA 3: Spinocerebelläre Ataxie 3 (Ataxin-3/MJD 1)	2 1x ND	1			1		3 M, 1 F, 1 ND	5
SCA 7: Spinocerebelläre Ataxie 7 (Ataxin-7)	1				1		2 M	2
SCA 12: Spinocerebelläre Ataxie 12 (PPP2R2B)					1		1 M	1
SCA 17: Spinocerebelläre Ataxie 17 (TBP: TATA-Box-Binding-Protein)	3 2x ND	4			1		4 M, 4 F, 2 ND	10
AOA2: Ataxie mit okulo-motorischer Apraxie 2 (Senataxin)		1				2	3 F	3
SPG 3: Spastische Spinalparalyse Typ 3 (Atlastin)	3				1x ND		3 M, 1 ND	4
SPG 4: Spastische Spinalparalyse Typ 4 (Spastin)	2 2x ND	4			1x ND		2 M, 4 F, 3 ND	9
SPG 7: Spastische Spinalparalyse Typ 7 (Paraplegin)		1			2	1	2 M, 2 F	4
SPG17: Spastische Spinalparalyse Typ 17 (BSCL2)		1					1 F	1
SBMA: Spinobulbäre Muskelatrophie (Androgenrezeptor)	4						4 M	4
SMA 2: spinale Muskelatrophie, intermediäre (SMN1)	1x ND						1 ND	1
SMA 3: spinale Muskelatrophie, Kugelberg-Welander (SMN1)	1						1 M	1
Spinale Muskelatrophie, skapulo-humeral	1						1 M	1
FSHD: Fazioskapulohumerale Muskeldystrophie (FSHMD1A)	1	1					1 M, 1 F	2
OPMD: Okulopharyngeale Muskeldystrophie (PABP-2)	2 1x ND						2 M, 1 F	3
Myotonia congenita Becker (Chloridkanal CLCN1)					1x ND		1 ND	1
Myotone Dystrophie 1 (DMPK)	4	1			2 2x ND		6 M, 1 F, 2 ND	9
Myotone Dystrophie 2 (Zinkfingerprotein 9)	1x ND	2			2		2 M, 2 F, 1 ND	5
CMT 1A: Charcot-Marie-Tooth 1A (PMP22 dupl)	5 10x ND	8			2	1	7 M, 9 F, 10 ND	26
CMT 1B: Charcot-Marie-Tooth 1B (MPZ, PO)	1 1x ND				3	2	4 M, 2 F, 1 ND	7
CMT 1C: Charcot-Marie-Tooth 1C (LITAF)					1	1	1 M, 1 F	2
CMT 2A1: Charcot-Marie-Tooth 2A1 (MFN2)		1					1 F	1



CMT 2L: Charcot-Marie-Tooth 2L (MPZ)	1x ND	1						1 F, 1 ND	2
CMT X1: Charcot-Marie-Tooth X1 (GJB1/Connexin 32)	1x ND	1						1 F, 1 ND	2
HNPP: Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy (PMP22 del)	12 20x ND	8				1 2x ND		13 M, 8 F, 22 ND	43
PMP22-3' UTR	5	2						5 M, 2 F	7
DYT1: Torsionsdystonie, generalisierte (TOR1A)						2	1	2 M, 1 F	3
PARK2: Parkinsonsyndrom, autosomal rezessives juveniles (PARK2)	1					1	1	2 M, 1 F	3
Chorea Huntington (Huntingtin)	15 17x ND	25						15 M, 25 F, 17 ND	57
Glykogenose II: M. Pompe (Alpha-Glukosidase)		2						2 F	2
M. Gaucher (Glucocerebrosidase)	5 13x ND 2x PN	7	2 16x ND 1x PN	2	4 2x ND		3	11 M, 12 F, 34 ND (inkl. 3 PN)	57
M. Gaucher (CCL 18 und PARC-Bestimmung)	2							2 M	2
M. Gaucher (Chitotriosidase-Bestimmung)	3 6x ND	2				1x ND		3 M, 2 F, 7 ND	12
NP-AB: Niemann-Pick Erkrankung Typ A od. B (Sphingomyelin/PDE1)	12 6x ND	4	14 4x ND 1x PN	4	4 2x ND		3	30 M, 11 F, 13 ND (inkl. 1PN)	54
NP-C1: Niemann-Pick Erkrankung Typ C (NPC1)	4 2x ND	1	7 6x ND 4x PN	13	5 1x ND		1	16 M, 15 F, 13 ND (inkl. 4 PN)	44
NP-C2: Niemann-Pick Erkrankung Typ C (NP-C2/HE1)			1	1				1 M, 1 F	2
GM2-Gangliosidose/M. Tay-Sachs (Hexosaminidase A)	1x ND	2	1 3x ND	4	2 1x PN		2	3 M, 8 F, 5 ND (inkl. 1PN)	16
Globoidzell-Leukodystrophie/ M. Krabbe (β-Galaktocerebrosidase)	6 13x ND 4x PN	2	19 23x ND 12x PN	6	9 2x ND 1x PN		7	34 M, 15 F, 55 ND (inkl. 17 PN)	104
Metachromatische Leukodystrophie (Arylsulfatase A)					1			1 M	1
CYP27A-1: Cerebrotendinöse Xanthomatose (Sterol-27-Hydroxylase)	1		2	3				3 M, 3 F	6
ALD: Adrenoleukodystrophie (ABCD1)	1							1 M	1
VMMD: Vanishing white matter disease (EIF2B 1-5)	1							1 M	1
<b>TOTAL</b>								<b>191 M, 143 F, 193ND</b>	<b>527</b>

**Tab. 2. Übersicht über PRIMER, die für die PCR-Amplifikation und Sequenzierung des Notch3-Gens verwendet wurden:**

Exon	PCR Primer forward	Primer Oligonukleotidsequenz	PCR Primer reverse	Primer Oligonukleotidsequenz	Länge Amplifikat	Exon	Sequenz.-Primer forward
Prom.	5327_Cada Promfw	5'-gcccggtccgacttttaggt-3'	5328_Cada Promrev	5'-cgcgacctcccctcctc-3'			
1	6098_Cada e1fw	5'-ctgggtttctgagggtc-3'	6099_Cada e1rev	5'-tctgaatctctgggtcctcc-3'	526 bp	1	6098_Cada e1fw
2	5331_Cada 2fw	5'-ggaggaggggggttgcac-3'		5'-agagggtgccaagccacac-3'	298 bp	2	5331_Cada 2fw
3	5333_Cada 3fw	5'-tgtctgtgtgtatcttgtctgg-3'	5334_Cada 3rev	5'-cagggctggaggacca-3'	299 bp	3	5333_Cada 3fw
4	5335_Cada 4fw	5'-gtggctccgaggtagagg-3'	5336_Cada 4rev	5'-cctggagactgtccacttc-3'	567 bp	4	5335_Cada 4fw
5+6	5715_Cada 5+6fw	5'-agagtcagagggtgggc-3'	5716_Cada 5+6rev	5'-cccagcctagcataatcttc-3'	614 bp	5+6	5715_Cada 5+6fw
7	5341_Cada 7fw	5'-ctcaaggggtgggctt-3'	5342_Cada 7rev	5'-gatggagtcgactggtg-3'	317 bp	7	5341_Cada 7fw
8	5343_Cada 8fw	5'-ggggagctccatctgtgt-3'	5344_Cada 8rev	5'-ggtccactccaaccactt-3'	390 bp	8	5343_Cada 8fw
9	5345_Cada 9fw	5'-gaaggctcggggattgtc-3'	5346_Cada 9rev	5'-caggttcccacctggagt-3'	296 bp	9	5345_Cada 9fw
10	5347_Cada 10fw	5'-tgggtttccaccaaca-3'	5348_Cada 10rev	5'-ccccagctctcccaagtc-3'	294 bp	10	5347_Cada 10fw
11	5349_Cada 11fw	5'-gatagactgaaccaggatggtc-3'	5350_Cada 11rev	5'-tgcccactagatgaccatt-3'	400 bp	11	5349_Cada 11fw
12	5351_Cada 12fw	5'-acacctggaggggcacagag-3'	5352_Cada 12rev	5'-gcaaacaggcccacagaga-3'	273 bp	12	5351_Cada 12fw
13	5353_Cada 13fw	5'-gggggtgtgggtgtctaag-3'	5354_Cada 13rev	5'-cacacacacagcggaaactg-3'	382 bp	13	5353_Cada 13fw
14	5355_Cada 14fw	5'-ctgcagtcacggcatctgt-3'	5356_Cada 14rev	5'-cccaagctcctggaggaaa-3'	397 bp	14	5355_Cada 14fw
15	5357_Cada 15fw	5'-ggagggtggatcaaggtg-3'	5358_Cada 15rev	5'-ggatccccagcatcc-3'	300 bp	15	5357_Cada 15fw
16	5359_Cada 16fw	5'-tgacagcacggctattttg-3'	5360_Cada 16rev	5'-gccaggcacacagttcaag-3'	350 bp	16	5359_Cada 16fw
17	5361_Cada 17fw	5'-ccaaggcatatcccagtcag-3'	5362_Cada 17rev	5'-ctgaggactcccccaagtc-3'	400 bp	17	5361_Cada 17fw
18	5363_Cada 18fw	5'-ctaacagcgggactcaggaa-3'	5364_Cada 18rev	5'-gggggtagtctgggagaac-3'	377 bp	18	5363_Cada 18fw
19	5365_Cada 19fw	5'-ccaagtcggggcacagt-3'	5366_Cada 19rev	5'-ggctcacactagcaggagt-3'	296 bp	19	5365_Cada 19fw
20	5367_Cada 20fw	5'-ccaccaaggatgtgaatga-3'	5368_Cada 20rev	5'-taccataccaagccacaca-3'	364 bp	20	5367_Cada 20fw
21	5369_Cada 21fw	5'-tttgcgtctcatgggtatg-3'	5370_Cada 21rev	5'-aacgaggggtggtcaagag-3'	280 bp	21	5369_Cada 21fw
22	5371_Cada 22fw	5'-gttcatgactgacctctg-3'	5372_Cada 22rev	5'-agcgggagcatgtatcag-3'	472 bp	22	5371_Cada 22fw
23	5373_Cada 23fw	5'-gcttctcaggaagcgtgg-3'	5374_Cada 23rev	5'-tagagccacgcccacta-3'	283 bp	23	5373_Cada 23fw
24-1	5375_Cada 24_1fw	5'-gtgggacatgggaggtga-3'	5376_Cada 24_1rev	5'-aggagccccgtggagac-3'	379 bp	24-1	5375_Cada 24_1fw
24-2	5377_Cada 24_2fw	5'-ggttcgggacctcctg-3'	5378_Cada 24_2rev	5'-tgggcagatagatgcacag-3'	581 bp	24-2	5377_Cada 24_2fw
25	5379_Cada 25fw	5'-tctacgggtgaatgatgg-3'	5380_Cada 25rev	5'-caagacctggaatcaagca-3'	482 bp	25	5379_Cada 25fw
26	5381_Cada 26fw	5'-gagacctgtgggtggatg-3'	5382_Cada 26rev	5'-ccctaagagcaggaagcaga-3'	396 bp	26	5381_Cada 26fw
27	5383_Cada 27fw	5'-actacctgggagcgtgtca-3'	5384_Cada 27rev	5'-tcagaggtctgagtcaggtaa-3'	490 bp	27	5383_Cada 27fw
28	5385_Cada 28fw	5'-cgctggcatgaagtgagaa-3'	5386_Cada 28rev	5'-tctctggagctaggaggtg-3'	388 bp	28	5385_Cada 28fw
29	5387_Cada 29fw	5'-cccaggctctgtgtatc-3'	5388_Cada 29rev	5'-ccccaaaacacagagtcagaa-3'	367 bp	29	5387_Cada 29fw
30	5389_Cada 30fw	5'-ttcattgttcccattagctc-3'	5390_Cada 30rev	5'-ccccaacctgaaattggt-3'	583 bp	30	5389_Cada 30fw
31	5391_Cada 31fw	5'-ggggactcatggacttag-3'	5392_Cada 31rev	5'-aagcctggtatgtgtcgtga-3'	358 bp	31	5391_Cada 31fw
32	5393_Cada 32fw	5'-acaattctgcctccctgac-3'	5394_Cada 32rev	5'-aatcaatgttgggtttt-3'	296 bp	32	5393_Cada 32fw
33-1	5395_Cada 33_1fw	5'-ccaggctctcaagctccag-3'	5396_Cada 33_1rev	5'-agtggcagctcataggg-3'	598 bp	33-1	5395_Cada 33_1fw
33-2	5397_Cada 33_2fw	5'-cgtggactcgtggactc-3'	5398_Cada 33_2rev	5'-ctgggaacagacaaggaag-3'	591 bp	33-2	5397_Cada 33_2fw
33-3	5399_Cada 33_3fw	5'-tctcagactgtccgaatcc-3'	5400_Cada 33_3rev	5'-aatgggcccacagactca-3'	666 bp	33-3	5399_Cada 33_3fw
	5401_Cada 33_4fw	5'-ctccctccccctgtgaac-3'	5402_Cada 33_4rev	5'-ccaagatgggagctcaagtt-3'			5401_Cada 33_4fw

Tab. 3. Übersicht über bisher bekannte/publizierte Mutationen im NOTCH3-Gen:

Exon	Aminosäure-Austausch		Nukleotid-Veränderung auf DNA-Ebene in der kodierenden Sequenz von Notch3 (c.DNA)			Referenzen, Anmerkungen (=Anm.)
			A:	Verändertes Nukleotid-Triplet	B:	
			A:			
			Nukleotid-Positions-Angabe gemäß der NCBI Reference Sequence: NG_009819.1 ("NOTCH3 RefSeqGene on chromosome 19")→Erste Base des translations-initiiierenden Methionin-Codons (A von ATG) wird als Nummer 1 gezählt			
			B:			
			Häufig in der Literatur auch benutzte Nukleotid-Positions-Angabe für Sequenzvariationen/Mutationen, abgeleitet von NCBI Reference Sequence NM_00435.2 („NOTCH3 mRNA“)→Erste Base des Methionin Codons wird hier als Nummer 77 gezählt			
2	C43G	Cys43Gly	c.127 T>G	tgc > ggc	205 T>G	Opherk et al, Brain 2004
2	C43F	Cys43Phe	c.128 G>T	tgc > ttc	206 G>T	Lesnik Oberstein et al, Neurology 2003
2	C49R	Cys49Arg	c.145 T>C	tgt > cgt	223 T>C	Wang et al, JNNP 2010
2	C49G	Cys49Gly	c.145 T>G	tgt > ggt	223 T>G	Oki et al, Eur J Neurol 2007
2	C49Y	Cys49Tyr	c.146 G>A	tgt > tat	224 G>A	Joutel et al, Lancet 1997
2	C49F	Cys49Phe	c.146 G>T	tgt > ttt	224 G>T	Opherk et al, Brain 2004
2	G53C	Gly53Cys	c.157 G>T	ggt > tgt	235 G>T	Wang et al, JNNP 2010
2	R54C	Arg54Cys	c.160 C>T	cgt > tgt	238 C>T	Escary et al, Hum Mutat 2000
2	S60C	Ser60Cys	c.179 C>G	tcc > tgc	257 C>G	Opherk et al, Brain 2004
2	C65Y	Cys65Tyr	c.194 G>A	tgc > tac	272 G>A	Bianchi et al, Hum Genet 2007 (p558-559)
2	C65S	Cys65Ser	c.194 G>C	tgc > tcc	272 G>C	Opherk et al, Brain 2004
3	C67S	Cys67Ser	c.199 T>A	tgc > agc	277 T>A	publiziert bei Tikka et al, Brain 2009
3	C67Y	Cys67Tyr	c.200 G>A	tgc > tac	278 G>A	Moon et al, J Korean Med Sci 2003
3	W71C	Trp71Cys	c.213 G->T	tgg > tgt	291 G>T	Joutel et al, Nature 1996
3	R75P	Arg75Pro	c.224 G>C	cgg > ccg	302 G>C	Kim et al, Neurology 2006 (auch beschrieben bei Choi et al, Neurology 2006; Mizuno et al, Inter Med 2008) <b>Anm:</b> Zystein-aussparend
3	C76_L78del	Cys76_Leu78del	c.226_234del		304_312del	Wang et al, JNNP 2010 <b>Anm:</b> Deletion 9 bp, 3 AS (inkl. Cys76): CQL
3	C76R	Cys76Arg	c.226 T>C	tgt > cgt	304 T>C	Kalimo et al, Brain Pathol 2002 und Markus et al, Neurology 2002
3	C76W	Cys76Trp	c.228 T>G	tgt > tgg	306 T>G	Opherk et al, Brain 2004
3	Q77_C82del	Gln77_Cys82del	c.231_248del (deduzierte mögl. Variante: c.229_246del)		309_326del (deduzierte mögl. Variante: c.307_324del)	Opherk et al, Brain 2004 <b>Anm:</b> Deletion 18 bp, 6 AS (incl. Cys82): QLEDPC
3	D80_S84del	Asp80_Ser84del	c.239_253del (deduzierte mögl. Variante: c.237_251del)		317_331del (deduzierte mögl. Variante: c.316_330del)	Dichgans et al, Eur J Hum Genet 2000 <b>Anm:</b> Deletion 15 bp, 5 AS (incl. Cys82): DPCHS
3	C87R	Cys87Arg	c.259 T>C	tgt > cgt	337 T>C	Opherk et al, Brain 2004
3	C87Y	Cys87Tyr	c.260 G>A	tgt > tat	338 G>A	Opherk et al, Brain 2004
3	A88_G91del	Ala88_Gly91del	c.263_274 (deduzierte mögl. Variante: c.262_273del)		341_352 (deduzierte mögl. Variante: c.340_351del)	Mazzei et al, Neurology 2004 <b>Anm:</b> Deletion 12 bp, 4 AS (Zystein-aussparend): AGRG
3	R90C	Arg90Cys	c.268 C>T	cgt > tgt	346 C>T	Joutel et al, Lancet 1997
3	C93Y	Cys93Tyr	c.278 G>A	tgc > tac	356 G>A	Kalimo et al, Brain Pathol 2002
3	C93F	Cys93Phe	c.278 G>T	tgc > ttc	356 G>T	Dichgans et al, Eur J Hum Genet 2000
3	C93dup	Cys93dup	c.279insTGC = c.277_279dup		357insTGC = 355_357dup	Mazzei et al, JNNP 2008 <b>Anm:</b> Erste beschriebene Insertion (Insertion von TGC an der Position c.279, führt auf AS-Ebene zu einer Insertion eines Zysteins (Cys94) unmittelbar benachbart zum Zysteinrest an der Position p.93)
3	C106W	Cys106Trp	c.318 C>G	tgc > tgg	396 C>G	Opherk et al, Brain 2004
3	C108R	Cys108Arg	c.322 T>C	tgc > cgc	400 T>C	Wang et al, Zhonghua Yi Xue Za Zhi 2004
3	C108S	Cys108Ser	c.322 T>A (deduzierte mögl. Variante: c.323 G>C )	tgc > agc  (tgc > tcc)	400 T>A (deduzierte mögl. Variante: 401 G>C)	Rufa et al, Stroke 2007
3	C108Y	Cys108Tyr	c.323 G>A	tgc > tac	401 G>A	Opherk et al, Brain 2004
3	C108W	Cys108Trp	c.324 C>G	tgc > tgg	402 C>G	Rojas-Marcos, Hum Genet 2004
3	R110C	Arg110Cys	c.328 C>T	cgt > tgt	406 C>T	Joutel et al, Lancet 1997
Intron 3	G114-P120del	Gly114 Pro120del	c.341-2A>G			Joutel et al, Neurology 2000 <b>Anm:</b> Splice-site-Mutation (A>G Transition an der 3'-Spliceakzeptorstelle von Exon 4, resultiert in einer "in frame"- Deletion von 7 AA (incl. Cys117): GPDCSLP

4	C117R	Cys117Arg	c.349 T>C	tgc > cgc	427 T>C	Wang et al, JNNP 2010
4	C117F	Cys117Phe	c.350 G > T	tgc > ttc	428 G>T	Dichgans et al, Neurology 1999
4	C117Y	Cys117Tyr	c.350 G>A	tgc > tac	428 G>A	Ampuero et al, Journal Alzheimer's Disease 2009
4	S118C	Ser118Cys	c.353 C>G	tcc > tgc	431 C>G	Soong et al, Hum Genet 2005
4	C123Y	Cys123Tyr	c.368 G>A	tgc > tac	446 G>A	Escary et al, Hum Mutat 2000
4	C123F	Cys123Phe	c.368 G>T	tgc > ttc	446 G>T	Dichgans et al, Eur J Hum Genet 2000
4	C128P fs X32	Cys128Pro fs X32	c.381_385del		381_385del	Dotti et al, Arch Neurol 2004 <b>Anm:</b> <b>Frame-shift Deletion:</b> Deletion von 5 bp (c.381_385 del TTGTG), führt zu einem frame-shift von AS 128-158 und einem Stop-Codon (tga = X) an der AS-Position 159 (neue deduzierte AS-Sequenz: PRCPLLSGARWTLPLLL PTWLPGPQLPKRRG X)
4	C128G	Cys128Gly	c.382 T>G	tgt > ggt	460 T>G	Coto et al, Eur J Neurol 2006 <b>Anm: de novo-Mutation</b>
4	C128Y	Cys128Tyr	c.383 G>A	tgt > tat	461 G>A	Kalimo et al, Brain Pathol 2002
4	C128F	Cys128Phe	c.383 G>T	tgt > ttt	461 G>T	Lab Leiden (Niederlande) / LOVD (Leiden Open Variation Database)
4	G131C	Gly131Cys	c.391 G>T	ggg > tgt	469 G>T	Ungaro et al, Hum Genet 2008
4	R133C	Arg133Cys	c.397 C>T	cgc > tgc	475 C>T	Joutel et al, Lancet 1997 <b>Anm:</b> Auch als <b>homozygot vorkommende Mutation</b> beschrieben (Tuominen et al, Stroke 2001)
4	C134W	Cys134Trp	c.402 C>G	tgc > tgg	480 C>G	Joutel et al, Lancet 1997
4	R141C	Arg141Cys	c.421 C>T	cgc > tgc	499 C>T	Joutel et al, Lancet 1997
4	F142C	Phe142Cys	c.425 T>G	ttc > tgc	503 T>G	Kalimo et al, Brain Pathol 2002
4	C144Y	Cys144Tyr	c.431 G>A	tgc > tac	509 G>A	Dichgans et al, Eur J Hum Genet 2000
4	C144S	Cys144Ser	c.431 G>C	tgc > tcc	509 G>C	Dichgans et al, Eur J Hum Genet 2000
4	C144F	Cys144Phe	c.431 G>T	tgc > ttc	509 G>T	Grigg et al, Hum Mutat 2000
4	S145C	Ser145Cys	c.434 C>G	tcc > tgc	512 C>G	Opherk et al, Brain 2004
4	C146R	Cys146Arg	c.436 T>C	tgc > cgc	514 T>C	Joutel et al, Lancet 1997
4	C146Y	Cys146Tyr	c.437 G>A	tgc > tac	515 G>A	Malandrini et al, Neurology 2002
4	C146F	Cys146Phe	c.437 G>T	tgc > ttc	515 G>T	Joutel et al, Lancet 1997
4	G149C	Gly149Cys	c.445 G>T	ggc > tgc	523 G>T	Opherk et al, Brain 2004
4	Y150C	Tyr150Cys	c.449 A>G	tac > tgc	527 A>G	Dichgans et al, Eur J Hum Genet 2000
4	Q151E	Gln151Glu	c.451 C>G	cag > gag	529 C>G	Ampuero et al, Journal of Alzheimer's Disease 2009 <b>Anm: Zystein-aussparend</b>
4	R153C	Arg153Cys	c.457 C>T	cgc > tgc	535 C>T	Joutel et al, Lancet 1997
4	R153_C155del	Arg153_Cys155del	c.459_467del (deduzierte 4 zusätzlich mögl. Varianten: c.455_463del c.456_464del c.457_465del c.458_466del)		537_545del (deduzierte 4 zusätzlich mögl. Varianten: 533_541del 534_542del 535_543del 536_544del)	Dichgans et al, Eur J Hum Genet 2000 <b>Anm:</b> <b>Deletion</b> 9 bp, 3 AS (incl. Cys155): RSC
4	C155S	Cys155Ser	c.463 T>A	tgc > agc	541 T>A	Opherk et al, Brain 2004
	C155S	Cys155Ser	c.464 G>C	tgc > tcc	542 G>C	Ampuero et al, Journal of Alzheimer's Disease 2009
4	C155Y	Cys155Tyr	c.464 G>A	tgc > tac	542 G>A	LOVD (Leiden Open Variation Database)
4	C162S	Cys162Ser	c.484 T>A	tgc > agc	562 T>A	Escary et al, Hum Mutat 2000
4	C162W	Cys162Trp	c.486 C>G	tgc > tgg	564 C>G	Lesnik Oberstein et al, Neurology 2001
4	C162R	Cys162Arg	c.484 T>C	tgc > cgc	562 T>C	Andreadou et al, Swiss Med Wkly 2008 <b>Anm:</b> Detektion von Prof. A. Rolfs (Universität Rostock)
4	R169C	Arg169Cys	c.505 C>T	cgc > tgc	583 C>T	Joutel et al, Nature 1996
4	G171C	Gly171Cys	c.511 G>T	ggg > tgt	589 G>T	Joutel et al, Lancet 1997
4	C174S	Cys174Ser	c.520 T>A	tgc > agc	598 T>A	publiziert bei Tikka et al, Brain 2009
4	C174R	Cys174Arg	c.520 T>C	tgc > cgc	598 T>C	Santa et al, J Neurol Sci 2003
4	C174Y	Cys174Tyr	c.521 G>A	tgc > tac	599 G>A	Dichgans et al, Neurology 1999
4	C174F	Cys17 Phe	c.521 G>T	tgc > ttc	599 G>T	Kotorii et al, Dement Geriatr Cogn Disord 2001
4	S180C	Ser180Cys	c.539 C>G	tcc > tgc	617 C>G	Escary et al, Hum Mutat 2000
4	F181C	Phe181Cys	c.542 T>G	ttc > tgc	620 T>G	Graniild-Jensen et al, Developmental Medicine & Child Neurology, 2009 <b>Anm:</b> 11-jähriger Patient!
4	R182C	Arg182Cys	c.544 C>T	cgc > tgc	622 C>T	Joutel et al, Nature 1996 <b>Anm:</b> auch als <b>de novo-Mutation</b> beschrieben (Joutel et al, Ann Neurol 2000)
4	C183R	Cys183Arg	c.547 T>C	tgc > cgc	625 T>C	Dichgans et al, Neurology 1999
4	C183S	Cys183Ser	c.547 T>A	tgc > agc	625 T>A	Dichgans et al, Eur J Hum Genet 2000
4	C183F	Cys183Phe	c.548 G>T	tgc > ttc	626 G>T	Opherk et al, Brain 2004
4	C185R	Cys185Arg	c.553 T>C	tgt > cgt	631 T>C	Joutel et al, Lancet 1997
4	C185G	Cys185Gly	c.553 T>G	tgt > ggt	631 T>G	Joutel et al, Lancet 1997
4	Y189C	Tyr189Cys	c.566 A>G	tac > tgc	644 A>G	Lesnik Oberstein et al, Neurology 2003
4	C194S	Cys194Ser	c.580 T>A	tgt > agt	658 T>A	Markus et al, Neurology 2002
4	C194R	Cys194Arg	c.580 T>C	tgt > cgt	658 T>C	Kalimo et al, Brain Pathol 2002
4	C194Y	Cys194Tyr	c.581 G>A	tgt > tat	659 G>A	Escary et al, Hum Mutat 2000

4	C194F	Cys194Phe	c.581 G>T	tgt > ttt	659 G>T	Dichgans et al, Eur J Hum Genet 2000
4	C201R	Cys201Arg	c.601 T>C	tgt > cgt	679 T>C	Uyguner et al, J Neurol Sci 2006
4	C201Y	Cys201Tyr	c.602 G>A	tgt > tat	680 G>A	Opherk et al, Brain 2004
4	C206R	Cys206Arg	c.616 T>C	tgc > cgc	694 T>C	Matsumoto et al, Rinsho Shinkeigaku 2005
4	C206Y	Cys206Tyr	c.616 T>C	tgc > cgc	694 T>C	Cocho et al, Neurologia 2011
	C206Y	Cys206Tyr	c.617 G>A	tgc > tac	695 G>A	Escary et al, Hum Mutat 2000
4	R207C	Arg207Cys	c.619 C>T	cgt > tgt	697 C>T	Oberstein et al, Neurology 1999
4	C212S	Cys212Ser	c.634 T>A	tgc > agc	712 T>A	Joutel et al, Lancet 1997
4	R213K	Arg213Lys	c.638 G>A	agg > aag	716 G>A	Kotorii et al, Dement Geriatr Cogn Disord 2000 <i>Anm: Zystein-aussparend</i>
4	Y220C	Tyr220Cys	c.659 A>G	tac > tgc	737 A>G	Rojas-Marcos et al, Hum Genet 2007
4	C222G	Cys222Gly	c.664 T>G	tgt > ggt	742 T>G	Joutel et al, Lancet 1997
4	C222Y	Cys222Tyr	c.665 G>A	tgt > tat	743 G>A	Meeks et al, Stroke 1999
4	C222S	Cys222Ser	c.665 G>C	tgt > tct	743 G>C	Wang et al, JNNP 2010
4	C224Y	Cys224Tyr	c.671 G>A	tgt > tat	749 G>A	Joutel et al, Lancet 1997
5	C233S	Cys233Ser	c.697 T>A	tgt > agt	775 T>A	Joutel et al, Lancet 1997
5	C233R	Cys233Arg	c.697 T>C	tgt > cgt	775 T>C	Adib-Samii et al, Stroke 2010
5	C233Y	Cys233Tyr	c.698 G>A	tgt > tat	776 G>A	Opherk et al, Brain 2004
5	C233W	Cys233Trp	c.699 T>G	tgt > tgg	777 T>G	Lesnik Oberstein, Neurology 2003
5	V237M	Val237Met	c.709 G>A	gtg > atg	787 G>A	Uchino et al, Ann NY Acad Sci 2002 <i>Anm: Zystein-aussparend</i>
5	D239_D253del	Asp239_Asp253del	c.714_758del (deduzierte 2 zusätzlich mögl. Varianten: c.715_759del c.716_760del)		792_836del (deduzierte 2 zusätzlich mögl. Varianten: 793_837del 794_838del)	Dichgans et al, Neurology 2001 <i>Anm: Deletion 45 bp, 15 AS (incl. 3 Cys: C240, C245, C251); DCPGHRCLNG GTCVD</i>
5	C240S	Cys240Ser	c.719 G>C	tgt > tct	797 G>C	Opherk et al, Brain 2004
5	C245S	Cys245Ser	c.733 T>A	tgt > agt	811 T>A	Razvi et al, JNNP 2005
5	C245R	Cys245Arg	c.733 T>C	tgt > cgt	811 T>C	Opherk et al, Brain 2004
5	C251S	Cys251Ser	c.751 T>A	tgc > agc	829 T>A	Lesnik Oberstein et al, Neurology 2003
5	C251R	Cys251Arg	c.751 T>C	tgc > cgc	829 T>C	Kalimo et al, Brain Pathol 2002 und Markus et al, Neurology 2002
5	C251G	Cys251Gly	c.751 T>G	tgc > ggc	829 T>G	Vikelis et al, Swiss Med Wkly 2007
5	C251Y	Cys251Tyr	c.752 G>A	tgc > tac	830 G>A	Mykkänen et al, Stroke 2009 <i>Anm: Mutation gefunden bei monozygoten Zwillingen mit CADASIL</i>
5	Y258C	Tyr258Cys	c.773 A>G	tat > tgt	851 A>G	Joutel et al, Lancet 1997
5	C260Y	Cys260Tyr	c.779 G>A	tgc > tac	857 G>A	Opherk et al, Brain 2004
6	C271F	Cys271Phe	c.812 G>T	tgc > ttc	890 G>T	Au et al, Clinica Chimica Acta 2007
6	G296C	Gly296Cys	c.886 G>T	ggg > tgt	964 G>T	Garcia-Estevaz et al, Rev Neurol 2010
6	S299C	Ser299Cys	c.895 A>T	agc > tgc	973 A>T	Golomb et al, Neurology 2004 <i>Anm: 14-jähriges Mädchen mit fehlender Familienanamnese für CADASIL</i>
6	A319C	Ala 319Cys	c.955_956 delinsTG (= c.955_956 GC > TG = c.955 G>T plus c.966 C>G)	ccc > tgc	1033_1034 delins TG (= 1033_1034 GC>TG = 1033 G>T plus 1034 C>G)	Opherk et al, Brain 2004 <i>Anm: delins/ Deletionsinsertion (benötigt 2 Nukleotid-Substitutionen)</i>
6	R332C	Arg332Cys	c.994 C>T	cgc > tgc	1072 C>T	Oliveri et al, Arch Neurol 2001
6	S335C	Ser335Cys	c.1004 C>G	tct > tgt	1082 C>G	Opherk et al, Brain 2004
6	Y337C	Tyr337Cys	c.1010 A>G	tac > tgc	1088 A>G	Lesnik Oberstein, Neurology 2003
6	C338R	Cys338Arg	c.1012 T>C	tgt > cgt	1090 T>C	Dotti et al, JNNP 2005
7	C366W	Cys366Trp	c.1098 T>G	tgt > tgg	1186 T>G	Pradotto et al, J Neurol Sci 2008
7	C379S	Cys379Ser	c.1136 G>C	tgt > tct	1214 G>C	Opherk et al, Brain 2004
7	G382C	Gly382Cys	c.1144 G>T	ggc > tgc	1222 G>T	Lesnik Oberstein et al, Neurology 2003
7	C388Y	Cys388Tyr	c.1163 G>A	tgt > tat	1241 G>A	Ishida et al, Intern Med 2006
7	C395R	Cys395Arg	c.1183 T>C	tgc > cgc	1261 T>C	Opherk et al, Brain 2004
7	S396C	Ser396Cys	c.1187 C>G	tct > tgt	1265 C>G	Mazzucco et al, Eur Neurol 2009
8	G420C	Gly420Cys	c.1258 G>T	ggg > tgt	1336 G>T	Joutel et al, Lancet 2001
8	R421C	Arg421Cys	c.1261 C>T	cgt > tgt	1339 C>T	Opherk et al, Brain 2004
8	R427C	Arg427Cys	c.1279 C>T	cgc > tgc	1357 C>T	Adib-Samii et al, Stroke 2010
8	C428R	Cys428Arg	c.1282 T>C	tgt > cgt	1360 T>C	Dotti et al, JNNP 2005
8	C428Y	Cys428Tyr	c.1283 G>A	tgt > tat	1361 G>A	Opherk et al, Brain 2004
8	C428S	Cys428Ser	c.1283 G>C	tgt > tct	1361 G>C	Joutel et al, Lancet 2001
8	E434_L436dup	Glu434_Leu 436dup	c.1300_1308 dup		1378-1386 dup	publiziert bei Tikka et al, Brain 2009 <i>Anm: Erste beschriebene Duplikation (Duplikation von 3 AS incl. Cys435: ECL)</i>
8	C435R	Cys435Arg	c.1303 T>C	tgt > cgt	1381 T>C	Lesnik Oberstein et al, Neurology 2003 <i>Anm: Auch beschrieben bei einem 8-jährigen Kind vietnamesischer Abstammung in Kanada (Hartley et al, J Chil Neurol 2010)</i>
8	C440S	Cys440Ser	c.1318 T>A	tgc > agc	1396 T>A	Federico et al, Neurol Sci 2005
8	C440G	Cys440Gly	c.1318 T>G	tgc > ggc	1396 T>G	Kalimo et al, Brain Pathol 2002 und Markus et al, Neurology 2002
8	C440R	Cys440Arg	c.1318 T>C	tgc > cgc	1396 T>C	Opherk et al, Brain 2004



8	C446S	Cys446Ser	c.1337 G>C	tgc > tcc	1415 G>C	Opherk et al, Brain 2004
8	C446F	Cys446Phe	c.1337 G>T	tgc > ttc	1415 G>T	Lesnik Oberstein et al, Neurology 2001
8	R449C	Arg449Cys	c.1345 C>T	cgc > tgc	1423 C>T	Thomas et al, Ann NY Acad Sci 2000
8	C455R	Cys455Arg	c.1363 T>C	tgt > cgt	1441 T>C	Arboleda-Velasquez et al, Neurology 2002
8	C457S	Cys457Ser	c.1370 G>C	tgt > tct	1448 G>C	Adib-Samii et al, Stroke 2010
9	Y465C	Tyr465Cys	c.1394 A>G	tat > tgt	1472 A>G	Lesnik Oberstein, Neurology 2003
9	C484G	Cys484Gly	c.1450 T>G	tgc > ggc	1528 T>G	Lab Leiden (Niederlande) / LOVD (Leiden Open Variation Database)
9	C484Y	Cys484Tyr	c.1451 G>A	tgc > tac	1529 G>A	Opherk et al, Brain 2004
9	C484F	Cys484Phe	c.1451 G>T	tgc > ttc	1529 G>T	Peters et al, Arch Neurol 2005
9	C495Y	Cys495Tyr	c.1484 G>A	tgc > tac	1562 G>A	Opherk et al, Brain 2004
10	C511R	Cys511Arg	c.1531 T>C	tgc > cgc	1609 T>C	Opherk et al, Brain 2004
10	C511Y	Cys511Tyr	c.1532 G>A	tgc > tac	1610 G>A	Bianchi et al, Hum Genet 2005
10	G528C	Gly528Cys	c.1582 G>T	ggc > tgc	1660 G>T	Dotti et al, JNNP 2005
10	C531S	Cys531Ser	c.1592 G>C	tgc > tcc	1670 G>C	Mazzei et al, Hum Genet 2007 (p.295)
10	R532C	Arg532Cys	c.1594 C>T	cgc > tgc	1672 C>T	Bianchi et al, Hum Genet 2007 (p.558)
11	C542Y	Cys542Tyr	c.1625 G>A	tgt > tat	1703 G>A	Joutel et al, Nature 1996
11	R544C	Arg544Cys	c.1630 C>T	cgc > tgc	1708 C>T	Oberstein et al, Neurology 1999
11	C549R	Cys549Arg	c.1645 T>C	tgc > cgc	1723 T>C	Lesnik Oberstein et al, Neurology 2003
11	C549Y	Cys549Tyr	c.1646 G>A	tgc > tac	1724 G>A	Opherk et al, Brain 2004
11	R558C	Arg558Cys	c.1672 C>T	cgc > tgc	1750 C>T	Joutel et al, Nature 1996
11	C568Y	Cys568Tyr	c.1703 G>A	tgt > tat	1781 G>A	Ferreira et al, Hum Genet 2007 (p649)
11	Y574C	Tyr574Cys	c.1721 A>G	tac > tgc	1799 A>G	Mazzei et al, Hum Genet 2007 (p296)
11	T577A	Thr577Ala	c.1729 A>G	aca > gca	1807 A>G	Ferreira et al, Hum Genet 2007 (p651-652) <i>Anm: Zystein-aussparend</i>
11	R578C	Arg578Cys	c.1732 C>T	cgc > tgc	1810 C>T	Joutel et al, Nature 1996 <i>Anm: Auch als homozygote Mutation beschrieben (Liem et al, J Neurol 2008)</i>
11	R587C	Arg587Cys	c.1759 C>T	cgc > tgc	1837 C>T	Kim et al, Mutat Res 2006
11	C591R	Cys591Arg	c.1771 T>C	tgc > cgc	1847 T>C	LOVD (Leiden Open Variation Database), eingereicht von Perez-Tur J. (Valencia/Spanien)
11	R592C	Arg592Cys	c.1774 C>T	cgc > tgc	1852 C>T	Adib-Samii et al, Stroke 2010
11	R607C	Arg607Cys	c.1819 C>T	cgc > tgc	1897 C>T	Escary et al, Hum Mutat 2000
12	R640C	Arg640Cys	c.1918 C>T	cgc > tgc	1996 C>T	Lab Leiden, NL / LOVD (Leiden Open Variation Database)
13	G667C	Gly667Cys	c. 1999 G>T	ggc > tgc	2077 G>T	Lab Leiden, NL / LOVD (Leiden Open Variation Database)
14	R728C	Arg728Cys	c.2182 C>T	cgc > tgc	2260 C>T	Joutel et al, Lancet 1997
15	C775S	Cys775Ser	c.2324 G>C	tgc > tcc	2402 G>C	Peters et al, Arch Neurol 2005
Intron 15	P805_N856del	Pro805_Asn856del	c.2411-1G>T			Saiki et al, Neurology 2006 <i>Anm: Splice site-Mutation (G&gt;T Transition an der 3'-Spleißakzeptorstelle von Intron 15, führt gemäß mRNA-Analysen zu einem Skipping von Exon 16 incl. 8 Zysteinresten in entsprechenden EGFR: Die deletierte AS-Sequenz umfasst 1 Cys von EGFR 20, alle 6 Cys von EGFR 21 und 1 Cys von EGFR 22).</i>
18	G953C	Gly953Cys	c.2857 G>T	ggc > tgc	2935 G>T	Kalimo et al, Brain Pathol 2002 und Markus et al, Neurology 2002
18	C977S	Cys977Ser	c.2929 T>A	tgc > agc	3007 T>A	Lee et al, J Neurol Sci 2006
18	S978R	Ser978Arg	c.2932 A>C	agc > cgc	3010 A>C	Ferreira et al, Hum Genet 2007 (p649-650) <i>Anm: Zystein-aussparend</i>
18	F984C	Phe984Cys	c.2951 T>G	ttc > tgc	3029 T>G	Escary et al, Hum Mutat 2000
18	R985C	Arg985Cys	c.2953 C>T	cgc > tgc	3031 C>T	Joutel et al, Lancet 1997
18	C988Y	Cys988Tyr	c.2963 G>A	tgc > tac	3041 G>A	Kim et al, Mutat Res 2006
18	C997G	Cys997Gly	c.2989 T>G	tgc > ggc	3067 T>G	Ungaro et al, Hum Genet 2008
19	C1004Y	Cys1004Tyr	c.3011 G>A	tgc > tac	3089 G>A	Guerrot et al, Am J Kidney Dis 2008
19	R1006C	Arg1006Cys	c.3016 C>T	cgc > tgc	3094 C>T	Joutel et al, Lancet 1997
19	G1013C	Gly1013Cys	c.3037 G>T	ggc > tgc	3115 G>T	Mazzucco et al, Eur Neurol 2009
19	C1015R	Cys1015Arg	c.3043 T>C	tgc > cgc	3121 T>C	Oberstein et al, Neurology 1999
19	A1020P	Ala1020Pro	c.3058 G>C	gcc > ccc	3136 G>C	Scheid et al, Neurology 2008 <i>Anm: Zystein-aussparend</i>
19	Y1021C	Tyr1021Cys	c.3062 A>G	tat > tgt	3140 A>G	Meeks et al, Stroke 1999
19	W1028C	Trp1028Cys	c.3084 G>T	tgg > tgc	3162 G>T	Viana-Babista et al, Cerebrovasc Dis 2007
19	R1031C	Arg1031Cys	c.3091 C>T	cgc > tgc	3169 C>T	Joutel et al, Lancet 1997
20	G1058C	Gly1058Cys	c.3172 G>T	ggc > tgc	3250 G>T	Kalimo et al, Brain Pathol 2002
20	D1063C	Asp1063Cys	c.3187_3188 delinsTG (=c.3187_3188 GA > TG =c. 3187 G>T plus c.3188 A>G)	gat > tgc	3265_3266 delinsTG (=3265_3266 GA > TG =3265 G>T plus 3266 A>G)	Joutel et al, Lancet 2001 <i>Anm: delins/ Deletionsinsertion (benötigt 2 Nukleotid-Substitutionen)</i>



20	Y1069C	Tyr1069Cys	c.3206 A>G	tac > tgc	3284 A>G	Mykkänen K (unpublizierte Daten von 2007); publiziert bei Tikka et al, Brain 2009
20	R1076C	Arg1076Cys	c.3226 C>T	cgt > tgt	3304 C>T	Lesnik Oberstein et al, Neurology 2001
20	T1098S	Thr1098Ser	c.3292 A>T	acc > tcc	3370 A>T	Wang et al, JNNP 2010 <i>Ann: Zystein-aussparend</i>
20	C1099Y	Cys1099Tyr	c.3296 G>A	tgc > tac	3374 G>A	Ferreira et al, Hum Genet 2007 (p649)
21	C1131W	Cys1131Trp	c.3393 C>G	tgc > tgg	3471 C>G	Pescini et al, J Neurol Sci 2008
22	R1231C	Arg1231Cys	c.3691 C>T	cgt > tgt	3769 C>T	Joutel et al, Lancet 1997
23	C1261R	Cys1261Arg	c.3781 T>C	tgc > cgc	3859 T>C	Joutel et al, Nature 1996
23	C1261Y	Cys1261Tyr	c.3782 G>A	tgc > tac	3860 G>A	Opherk et al, Brain 2004
24	C1315Y	Cys1315Tyr	c.3944 G>A	tgc > tac	4022 G>A	Valenti et al, J Neurol 2011
25	L1515P  NICHT-CADASIL !	Leu1515Pro	c.4544 T>C	ctc > ccc	4622 T>C	Fouillade et al, Hum Mutat 2008 <i>Ann: NICHT-CADASIL-assoziierte Mutation (resultiert in einer anderen, zerebralen „small-vessel disease“); lokalisiert in der Heterodimerisations-Domäne, führt auf molekularer Ebene zu einem Liganden-unabhängig erhöhten Notch-Signalling.</i>
26	A1608T	Ala1608Thr	c.4822 G>A	gct > act	4900 G>A	Joutel et al, Nature 1996 <i>Ann: Formal Zystein-aussparend!</i> Die Mutation lokalisiert sich in der hochkonservierten cdc10-repeat-Domäne (entspricht Ankyrin-Repeats innerhalb der intrazellulären Domäne, außerhalb der EGFR !), interessanterweise scheint der Träger dieser Mutation einen normalen CADASIL-Phänotyp aufzuweisen, da Joutel et al keine Differenz zum Phänotyp von klassischen, EGFR-affizierenden Mutationen fanden.

**Beachte farbliche Markierungen:**

Hellblau unterlegt sind  
Grün markiert sind  
Blau markiert sind  
Rot markiert sind

**Mutationshotspots** (mind. > 10-20 Patienten mit der Mutation beschrieben)  
**Deletionen**  
**Spezielle Mutationen** (splice-site-, de novo-Mutationen etc.)  
**Zystein-aussparende Mutationen**

**Abk:** Aminosäuren  
Nukleotide:

**AS** = Aminosäure (im internationalen **Drei- bzw. Ein-Buchstaben-Aminosäuren-Code** wiedergegeben), z.B. Cys bzw. C = Zystein.  
**A oder a** = Adenin, **C oder c** = Cytosin, **G oder g** = Guanin, **T oder t** = Thymin

**Tab. 4. In dieser Arbeit gefundene Zystein-aussparende sowie prototypische, Zystein-Anzahl alterierende Mutationen:**

Exon	Aminosäure-Austausch		Nukleotid-Veränderung (c.DNA)			Patienten und Referenzen (Ref: Erstbeschreibung/-publikation der Mutation)
			Nukleotidpositions-Angabe			
			- nach A (s.o./Tab. 3)		- nach B (s.o./Tab. 3)	
<b>Gefundene ZYSTEIN-AUSSPARENDE MUTATIONEN im SIFAP-Kollektiv:</b>						
25	L1547V	Leu1547Val	c.4639 C>G	ctg > gtg	4715 C>G	<b>Patient 01 P 0052,</b> Zentrum Graz
33	P2074L	Pro2074Leu	c.6221 C>T	cgg > ctg	6297 C>T	<b>Patient 17 P 1295,</b> Zentrum Lyon
33	P2178S	Pro2178Ser	c.6532 C>T	cct > tct	6608 C>T	<b>Patient 32 P 2629,</b> Zentrum Regensburg
<b>Gefundene ZYSTEIN-INVOLVIERENDE MUTATIONEN in eigener Kohorte mit prototypischem CADASIL-Phänotyp:</b>						
4	R133C	Arg133Cys	c.397 C>T	cgc > tgc	473 C>T	<b>Patient H.R., geb. 03.06.1960</b> Ref: Joutel et al, Lancet 1997
4	R141C	Arg141Cys	c.421 C>T	cgc > tgc	497 C>T	<b>Patient M.R., geb. 18.07.1967</b> Ref: Joutel et al, Lancet 1997
4	R169C	Arg169Cys	c.505 C>T	cgc > tgc	581 C>T	<b>Patient S.O., geb. 22.03.1963</b> Ref: Joutel et al, Nature 1996
5	C262Y	Cys262Tyr	c.785 G>A	tgc > tac	861 G>A	<b>Patient G.C., geb. 26.05.1954</b> Ref: <b>NEUE, bisher nicht bekannte/ publizierte Mutation</b>

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

**BEACHTEN: Publikationen, die Erstbeschreibungen von NOTCH3-MUTATIONEN beinhalten, sind GRAU UNTERLEGT (Referenzangaben zur Tab. 3 mit der umfassenden Übersicht über Notch3-Mutationen)**

1. Adib-Samii P, Brice G, Martin RJ, Markus HS. Clinical spectrum of CADASIL and the effect of cardiovascular risk factors on phenotype: study in 200 consecutively recruited individuals. *Stroke* 2010; 41: 630-634
2. Amberla K, Walja M, Tuominen S, Almkvist O, Poyhonen M, Tuisku S, Kalimo H, Viitanen M. Insidious Cognitive Decline in CADASIL. *Stroke* 2004; 35: 1598-1602
3. Ampuero I, Alegre-Abarrategui J, Rodal I, Espana A, Ros R, Lopez Sendon JL, Garcia Galloway E, Cervello A, Belen Caminero A, Zabala A, Erro E, Jarauta F, Morlan L, Lopez-Valdes E, Aladro Y, Seijo M, Garcia Rivas G, Munoz DG, Garcia de Yebene J. On the diagnosis of CADASIL. *Journal of Alzheimer's Disease* 2009; 17: 787-794
4. Andreadou E, Papadimas G, Sfagos C. Novel heterozygous mutation in the NOTCH3 gene causing CADASIL. *Swiss Med Wkly* 2008; 138: 614-617
5. Annunen-Rasila J, Finnila S, Mykkanen K, Moilanen JS, Veijola J, Poyhonen M, Viitanen M, Kalimo H, Majamaa K. Mitochondrial DNA sequence variation and mutation rate in patients with CADASIL. *Neurogenetics* 2006; 7: 185-194
6. Arboleda-Velasquez JF, Lopera F, Lopez E, Frosch MP, Sepulveda-Falla D, Gutierrez JE, Vargas S, Medina M, Martinez De Arrieta C, Lebo RV, Slauchaupt SA, Betensky RA, Villegas A, Arcos-Burgos M, Rivera D, Restrepo JC, Kosik KS. C455R notch3 mutation in a Colombian CADASIL kindred with early onset of stroke. *Neurology* 2002; 59: 277-279
7. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284: 770-776
8. Au KM, Li HL, Sheng B, Chow TC, Chen ML, Lee KC, Chan YW. A novel mutation (C271F) in the Notch3 gene in a Chinese man with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Clinica Chimica Acta* 2007; 376: 229-232
9. Auer DP, Putz B, Gossl C, Elbel G, Gasser T, Dichgans M. Differential lesion patterns in CADASIL and sporadic subcortical arteriosclerotic encephalopathy: MR imaging study with statistical parametric group comparison. *Radiology* 2001; 218: 443-451
10. Baudrimont M, Dubas F, Joutel A, Tournier-Lasserre E, Bousser MG. Autosomal dominant leukoencephalopathy and subcortical ischemic stroke. A clinicopathological study. *Stroke* 1993; 24:122-125
11. Bellavia D, Checquolo S, Campese AF, Felli MP, Gulino A, Screpanti I. Notch3: from subtle structural differences to functional diversity. *Oncogene* 2008; 27: 5092-5098
12. Bianchi S, Dotti MT, De Stefano N, Stromillo ML, Federico A bzw. Bianchi, Dotti MT, Perretti A, De Rosa A, Manganelli F, Federico A. Novel human pathological mutations. Gene symbol: NOTCH3. Disease: CADASIL. *Hum Genet* 2007; 122: 558-559 bzw. 558
13. Bianchi S, Scali O, Dotti MT, Pantoni L, Pametti L, Inzitari D, Federico A. Gene symbol: NOTCH3. Disease: CADASIL. *Hum Genet* 2005; 118: 535
14. Bianchi S, Rufa A, Ragno M, D'Eramo C, Pescini F, Pantoni L, Cappelli A, Perretti A, Zicari E, Zolo P, Inzitari D, Dotti MT, Federico A. High frequency of exon 10 mutations in the NOTCH3 gene in Italian CADASIL families: phenotypic peculiarities. *J Neurol* 2010; 257: 1039-1042
15. Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 1997; 90: 281-291
16. Bousser MG, Tournier-Lasserre E. Summary of the proceedings of the First International Workshop on CADASIL. Paris, May 19-21, 1993. *Stroke* 1994; 25: 704-707
17. Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 678-689
18. Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israel A. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 2000; 5: 207-216
19. Buffon F, Porcher R, Hernandez K, Kurtz A, Pointeau S, Vahedi K, Bousser MG, Chabriat H. Cognitive profile in CADASIL. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 175-180
20. Ceroni M, Poloni TE, Tonietti S, Fabozzi D, Uggetti C, Frediani F, Simonetti F, Malaspina A, Alimonti D, Celano M, Ferrari M, Carrera P. Migraine with aura and white matter abnormalities: Notch3 mutation. *Neurology* 2000; 54: 1869-1871
21. Chabriat H, Bousser MG, Pappata S. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: a positron emission tomography study in two affected family members. *Stroke* 1995; 26: 1729-1730 ([Chabriat et al. 1995<sup>c</sup>](#))
22. Chabriat H, Joutel A, Dichgans M, Tournier-Lasserre E, Bousser MG. CADASIL. *Lancet Neurol* 2009; 8: 643-653

23. Chabriat H, Levy C, Taillia H, Iba-Zizen MT, Vahedi K, Joutel A, Tournier-Lasserre E, Bousser MG. Patterns of MRI lesions in CADASIL. *Neurology* 1998; 51: 452-457
24. Chabriat H, Pappata S, Ostergaard L, Clark CA, Pachot-Clouard M, Vahedi K, Jobert A, Le Bihan D, Bousser MG. Cerebral hemodynamics in CADASIL before and after acetazolamide challenge assessed with MRI bolus tracking. *Stroke* 2000; 31: 1904-1912
25. Chabriat H, Tournier-Lasserre E, Vahedi K, Leys D, Joutel A, Nibbio A, Escaillas JP, Iba Zizen MT, Bracard S, Tehindrazanarivelo A, Gastaut JL, Bousser MG. Autosomal dominant migraine with MRI white-matter abnormalities mapping to the CADASIL locus. *Neurology* 1995; 45: 1086-1091 ([Chabriat et al, 1995<sup>b</sup>](#))
26. Chabriat H, Vahedi K, Iba-Zizen MT, Joutel A, Nibbio A, Nagy TG, Krebs MO, Julien J, Dubois B, Ducrocq X, Levasseur M, Homeyer P, Mas JL, Lyon-Caen O, Tournier-Lasserre E, Bousser MG. Clinical spectrum of CADASIL: a study of 7 families. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Lancet* 1995; 346: 934-939 ([Chabriat et al, 1995<sup>a</sup>](#))
27. Charlton RA, Morris RG, Nitkunan A, Markus HS. The cognitive profiles of CADASIL and sporadic small vessel disease. *Neurology* 2006; 66: 1523-1526
28. Chawda SJ, De Lange RP, Hourihan MD, Halpin SF, St Clair D. Diagnosing CADASIL using MRI: evidence from families with known mutations of Notch 3 gene. *Neuroradiology* 2000; 42: 249-255
29. Choi EJ, Choi CG, Kim JS. Large cerebral artery involvement in CADASIL. *Neurology* 2005; 65: 1322-1324
30. Choi JC, Kang SY, Kang JH, Park JK. Intracerebral hemorrhages in CADASIL. *Neurology* 2006; 67: 2042-2044
31. Coto E, Menendez M, Navarro R, Garcia-Castro M, Alvarez V. A new de novo Notch3 mutation causing CADASIL. *Eur J Neurol* 2006; 13: 628-631
32. Coulthard A, Blank SC, Bushby K, Kalaria RN, Burn DJ. Distribution of cranial MRI abnormalities in patients with symptomatic and subclinical CADASIL. *Br J Radiol* 2000; 73: 256-65
33. Cumurciuc R, Henry P, Gobron C, Vicaut E, Bousser MG, Chabriat H, Vahedi K. Electrocardiogram in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy patients without any clinical evidence of coronary artery disease: a case-control study. *Stroke* 2006; 37: 1100-1102 ([Cumurciuc et al, 2006<sup>a</sup>](#))
34. Cumurciuc R, Massin P, Paques M, Krisovic V, Gaudric A, Bousser MG, Chabriat H. Retinal abnormalities in CADASIL: a retrospective study of 18 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 1058-1060
35. Cumurciuc R, Guichard JP, Reizine D, Gray F, Bousser MG, Chabriat D. Dilatation of Virchow-Robin spaces in CADASIL. *Eur J Neurol* 2006; 13: 187-190 ([Cumurciuc et al, 2006<sup>b</sup>](#))
36. Davous P. CADASIL: a review with proposed diagnostic criteria. *Eur J Neurol* 1998; 5: 219-233
37. Davous P, Fallet-Bianco C. [Familial subcortical dementia with arteriopathic leukoencephalopathy. A clinico-pathological case]. *Rev Neurol (Paris)* 1991; 147: 376-384
38. de la Pena P, Bornstein B, del Hoyo P, Fernandez-Moreno MA, Martin MA, Campos Y, Gomez-Escalonilla C, Molina JA, Cabello A, Arenas J, Garesse R. Mitochondrial dysfunction associated with a mutation in the Notch3 gene in a CADASIL family. *Neurology* 2001; 57: 1235-1238
39. Desmond DW, Moroney JT, Lynch T, Chan S, Chin SS, Mohr JP. The natural history of CADASIL: a pooled analysis of previously published cases. *Stroke* 1999; 30: 1230-1233
40. Desmond DW, Moroney JT, Lynch T, Chan S, Chin SS, Shungu DC, Naini AB, Mohr JP. CADASIL in a North American family: clinical, pathologic, and radiologic findings. *Neurology* 1998; 51: 844-849
41. Dichgans M. CADASIL: a monogenic condition causing stroke and subcortical vascular dementia. *Cerebrovasc Dis* 2002; 13 (suppl 2): 37-41 ([Dichgans et al, 2002<sup>a</sup>](#))
42. Dichgans M. Cognition in CADASIL. *Stroke* 2009; 40: 45-47
43. Dichgans M, Filippi M, Bruning R, Iannucci G, Berchtenbreiter C, Minicucci L, Uttner I, Crispin A, Ludwig H, Gasser T, Yousry TA. Quantitative MRI in CADASIL: correlation with disability and cognitive performance. *Neurology* 1999; 52: 1361-1367 ([Dichgans et al, 1999<sup>a</sup>](#))
44. Dichgans M, Herzog J, Gasser T. Notch3 in-frame deletion involving three cysteine residues causes typical CADASIL. *Neurology* 2001; 57: 1714-1717
45. Dichgans M, Holtmannspotter M, Herzog J, Peters N, Bergmann M, Yousry TA. Cerebral microbleeds in CADASIL: a gradient-echo magnetic resonance imaging and autopsy study. *Stroke* 2002; 33: 67-71 ([Dichgans et al, 2002<sup>b</sup>](#))
46. Dichgans M, Ludwig H, Müller-Höcker J, Messerschmidt A, Gasser T. Small in-frame deletions and missense mutations in CADASIL: 3D models predict misfolding of Notch3 EGF-like repeat domains. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 280-285

47. Dichgans M, Markus HS, Salloway S, Verkkoniemi A, Moline M, Wang Q, Posner H, Chabriat HS. Donepezil in patients with subcortical vascular cognitive impairment: a randomized double-blind trial in CADASIL. *Lancet Neurol* 2008; 7: 310-318
48. Dichgans M, Mayer M, Uttner I, Brüning R, Müller-Höcker J, Rungger G, Ebke M, Klockgether T, Gasser T. The phenotypic spectrum of CADASIL: clinical findings in 102 cases. *Ann Neurol* 1998; 44: 731-739
49. Dichgans M, Petersen D. Angiographic complications in CADASIL. *Lancet* 1997; 349: 776-777
50. Dichgans M, Wick M, Gasser T. Cerebrospinal fluid findings in CADASIL. *Neurology* 1999; 53: 233 ([Dichgans et al. 1999<sup>b</sup>](#))
51. Dong Y, Hassan A, Zhang Z, Huber D, Dalageorgou C, Markus HS. Yield of screening for CADASIL mutations in lacunar stroke and leukoaraiosis. *Stroke* 2003; 34: 203-205
52. Dotti MT, De Stefano N, Bianchi S, Malandrini A, Battisti C, Cardaioli E, Federico A. A novel NOTCH3 frameshift deletion and mitochondrial abnormalities in a patient with CADASIL. *Arch Neurol* 2004; 61: 942-945
53. Dotti MT, Federico A, Mazzei R, Bianchi S, Scali O, Conforti FL, Sprovieri T, Guidetti D, Aguglia U, Consoli D, Pantoni L, Sarti C, Inzitari D, Quattrone A. The spectrum of Notch3 mutations in 28 Italian CADASIL families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 736-738
54. D'Souza B, Miyamoto A, Weinmaster G. The many facets of Notch ligands. *Oncogene* 2008; 27: 5148-5167
55. Ebke M, Dichgans M, Bergmann M, Voelter HU, Rieger P, Gasser T, Schwendemann G. CADASIL: skin biopsy allows diagnosis in early stages. *Acta Neurol Scand* 1997; 95: 351-357
56. Escary JL, Cecillon M, Maciazek J, Lathrop M, Tournier-Lasserre E, Joutel A. Evaluation of DHPLC analysis in mutational scanning of Notch3, a gene with a high G-C content. *Hum Mutat* 2000; 16: 518-526
57. Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig HI, Zimmerman RA. MR signal abnormalities at 1.5T in Alzheimer's dementia and normal aging. *AJNR Am J Neuroradiol* 1987; 8: 421-426
58. Federico A, Bianchi S, Dotti MT. The spectrum of mutations for CADASIL diagnosis. *Neurol Sci* 2005; 26: 117-124
59. Ferreira S, Costa C, Oliveira JP bzw. Ferreira S, Fontoura P, Guerreiro R, Oliveira JP bzw. Ferreira S, Malheiro F, Oliveira JP bzw. Ferreira S, Silva RS, Oliveira JP. Novel human pathological mutations. Gene symbol: NOTCH3. Disease: cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *Hum Genet* 2007; 121: 649 bzw. 649-650 bzw. 651-652 bzw. 649
60. Feuerhake F, Volk B, Ostertag CB, Junglin FD, Kassubek J, Orszagh M, Dichgans M. Reversible coma with raised intracranial pressure: an unusual clinical manifestation of CADASIL. *Acta Neuropathol* 2002; 103: 188-192
61. Finnila S, Tuisku S, Herva R, Majamaa K. A novel mitochondrial DNA mutation and a mutation in the NOTCH3 gene in a patient with myopathy and CADASIL. *J Mol Med* 2001; 79: 641-647
62. Forteza AM, Brozman B, Rabinstein AA, Romano JG, Bradley WG. Acetazolamide for the treatment of migraine with aura in CADASIL. *Neurology* 2001; 57: 2144-2145
63. Fouillade C, Chabriat H, Riant F, Mine M, Arnoud M, Magy L, Bousser MG, Tournier-Lasserre E, Joutel A. Activating NOTCH3 mutation in patient with small-vessel-disease of the brain. *Hum Mutat* 2008; 29: 452-461
64. Garcia-Estevéz DA, Barros-Angueira F, Navarro C. [CADASIL: brief report on a family with a new p.G296C mutation in exon 6 of the Notch-3 gene]. *Rev Neurol*; 51: 729-732
65. Gobron C, Viswanathan A, Bousser MG, Chabriat H. Multiple simultaneous cerebral infarctions in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Cerebrovasc Dis* 2006; 22: 445-446
66. Goebel HH, Meyermann R, Rosin R, Schlote W. Characteristic morphologic manifestation of CADASIL, cerebral autosomal-dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, in skeletal muscle and skin. *Muscle Nerve* 1997; 20: 625-627
67. Golomb MR, Sokol DK, Walsh LE, Christensen CK, Garg BP. Recurrent hemiplegia, normal MRI, and NOTCH3 mutation in a 14-year old girl: is this early CADASIL? *Neurology* 2004; 62: 2331-2332
68. Gong M, Rueschendorf F, Marx P, Schulz H, Kraft HG, Huebner N, Koennecke HC. Clinical and genetic features in a family with CADASIL and high lipoprotein (a) values. *J Neurol* 2010; 257: 1240-1245
69. Gordon WR, Arnett KL, Blacklow SC. The molecular logic of Notch signaling - a structural and biochemical perspective. *J Cell Sci* 2008; 121: 3109-3119
70. Granild-Jensen J, Jensen UB, Schwartz M, Hansen US. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy resulting in stroke in an 11-year-old male. *Developmental Medicine & Child Neurology* 2009; 51: 754-757

71. Grigg R, Lea R, Sullivan AA, Curtain R, Mac Milian J, Griffiths L. Identification of a novel mutation C144F in the NOTCH3 gene in an Australian CADASIL pedigree. *Hum Mutat* 2000; 16: 449-450
72. Guerrot D, Francois A, Boffa JJ, Boulos N, Hanoy M, Lagallier B, Triquenot-Bagan A, Guyant-Marechal L, Laquerriere A, Frequin-Bouilland C, Ronco P, Godin M. Nephroangiosclerosis in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: Is *NOTCH3* mutation the common culprit? *Medical Images Analysis* 2008; 52: 340-345
73. Haan J, Lesnik-Oberstein SA, Ferrari MD. Epilepsy in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Cerebrovasc Dis* 2007; 24: 316-317
74. Haritoglou C, Rudolph G, Hoops JP, Opherk C, Kampik A, Dichgans M. Retinal vascular abnormalities in CADASIL. *Neurology* 2004; 62: 1202-1205
75. Haritunians T, Chow T, De Lange RP, Nichols JT, Ghavimi D, Dorrani N, St Clair DM, Weinmaster G, Schanen C. Functional analysis of a recurrent missense mutation in Notch3 in CADASIL. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 1242-1248
76. Ishida C, Sakajiri K, Mitsuhiro Y, Joutel A, Cave-Riant F, Yamada M. CADASIL with a novel mutation in exon 7 of NOTCH3 (C388Y). *Intern Med* 2006; 45: 981-985
77. Ishiko A, Shimizu A, Nagata E, Takahashi K, Tabira T, Suzuki N. Notch3 ectodomain is a major component of granular osmiophilic material (GOM) in CADASIL. *Acta Neuropathol* 2006; 112: 333-339
78. Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families. Multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* 2003; 194: 237-255
79. Joutel A, Andreux F, Gaulis S, Domenga V, Cecillon M, Battail N, Piga N, Chapon F, Godfrain C, Tournier-Lasserre E. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J Clin Invest* 2000; 105: 597-605 ([Joutel et al. 2000<sup>a</sup>](#))
80. Joutel A, Chabriat H, Vahedi K, Domenga V, Vayssiere C, Ruchoux MM, Lucas C, Leys D, Bousser MG, Tournier-Lasserre E. Splice site mutation causing a 7 amino-acids Notch3 in-frame deletion in CADASIL. *Neurology* 2000; 54: 1874-1875 ([Joutel et al. 2000<sup>b</sup>](#))
81. Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cecillon M, Marechal E, MacLazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserre E. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 1996; 383: 707-710
82. Joutel A, Dodick DD, Parisi JE, Cecillon M, Tournier-Lasserre E, Bousser MG. De novo mutation in the Notch3 gene causing CADASIL. *Ann Neurol* 2000; 47: 388-391 ([Joutel et al. 2000<sup>c</sup>](#))
83. Joutel A, Favrole P, Labauge P, Chabriat H, Lescoat C, Andreux F, Domenga V, Cecillon M, Vahedi K, Ducros A, Cave-Riant F, Bousser MG, Tournier-Lasserre E. Skin biopsy immunostaining with a Notch3 monoclonal antibody for CADASIL diagnosis. *Lancet* 2001; 358: 2049-2051
84. Joutel A, Monet-Lepetre M, Gosele C, Baron-Menguy C, Hammes A, Schmidt S, Lemaire-Carrette B, Domenga V, Schedl A, Lacombe P, Hubner N. Cerebrovascular dysfunction and microcirculation rarefaction precede white matter lesions in a mouse genetic model of cerebral ischemic small vessel disease. *J Clin Invest* 2010; 120: 433-445
85. Joutel A, Monet M, Domenga V, Riant F, Tournier-Lasserre E. Pathogenic mutations associated with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy differently affect Jagged1 binding and Notch3 activity via the RBP/JK signaling pathway. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 338-347
86. Joutel A, Vahedi K, Corpechot C, Troesch A, Chabriat H, Vayssiere C, Cruaud C, Maciazek J, Weissenbach J, Bousser MG, Bach JF, Tournier-Lasserre E. Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *Lancet* 1997; 350: 1511-1515
87. Jouvent E, Viswanathan A, Mangin JF, O'Sullivan M, Guichard JP, Gschwendtner A, Cumurciuc R, Buffon F, Peters N, Pachaï C, Bousser MG, Dichgans M, Chabriat H. Brain atrophy is related to lacunar lesions and tissue microstructural changes in CADASIL. *Stroke* 2007; 38: 1786-1790
88. Jouvent E, Mangin JF, Porcher R, Viswanathan A, O'Sullivan M, Guichard JP, Dichgans M, Bousser MG, Chabriat H. Cortical changes in cerebral small vessel diseases: a 3D MRI study of cortical morphology in CADASIL. *Brain* 2008; 131: 2201-2208
89. Jung HH, Bassetti C, Tournier-Lasserre E, Vahedi K, Arnaboldi M, Blatter Arifi V, Burgunder JM. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: a clinicopathological and genetic study of a Swiss family. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; 59: 138-143
90. Kalaria RN, Viitanen M, Kalimo H, Dichgans M, Tabira T. The pathogenesis of CADASIL: an update. *J Neurol Sci* 2004; 226: 35-39
91. Kalimo H, Miao Q, Tikka S, Mykkänen K, Junna M, Roine S, Viitanen M, Pöyhönen M, Baumann M. CADASIL: the most common hereditary subcortical vascular dementia. *Future Neurol* 2008; 3: 683-704



92. Kalimo H, Ruchoux MM, Viitanen M, Kalaria RN. CADASIL: a common form of hereditary arteriopathy causing brain infarcts and dementia. *Brain Pathol* 2002; 12: 371-384
93. Kang SY, Oh JH, Kang JH, Choi JC, Lee JS. Nerve conduction studies in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *J Neurol* 2009; 256: 1724-1727
94. Karlstrom H, Beatus P, Dannaeus K, Chapman G, Lendahl U, Lundkvist J. A CADASIL-mutated Notch 3 receptor exhibits impaired intracellular trafficking and maturation but normal ligand-induced signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 17119-17124
95. Kavirajan H, Schneider LS. Efficacy and adverse effects of cholinesterase inhibitors and memantine in vascular dementia: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet Neurol* 2007; 6: 782-792
96. Kim Y, Choi EJ, Choi CG, Kim G, Choi JH, Yoo HW, Kim JS. Characteristics of CADASIL in Korea. A novel cysteine-sparing Notch3 mutation. *Neurology* 2006; 66: 1511-1516
97. Kim Y, Kim JS, Kim G, No YJ, Yoo HW. Two novel mutations of the NOTCH3 gene in Korean patients with CADASIL. *Mutat Res* 2006; 593: 116-120
98. Kopan R, Ilgan MX. The canonical notch signaling pathway: Unfolding the activation mechanism. *Cell* 2009; 137: 216-233
99. Kotorii S, Takahashi K, Kamimura K, Nishio T, Arima K, Yamada H, Uyama E, Uchino M, Suenaga A, Matsumoto M, Kuchel G, Roluleau GA, Tabira T. Mutations of the NOTCH3 gene in non-caucasian patients with suspected CADASIL syndrome. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2001; 12: 185-193
100. Kovall RA. More complicated than it looks: assembly of Notch pathway transcription complexes. *Oncogene* 2008; 27: 5099-5109
101. Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 2004; 131: 965-973
102. Lardelli M, Dahlstrand J, Lendahl U. The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech Dev* 1994; 46: 123-136
103. Le Ber I, Carlier L, Derache N, Lalevee C, Ledoze F, Defer GL. Unusual presentation of CADASIL with reversible coma and confusion. *Neurology* 2002; 59: 1115-1116
104. Lee JS, Choi JC, Kang SY, Kang JH, Lee SH, Kim JH, Kim SY. Olfactory identification deficits in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Eur Neurol* 2010; 64: 280-285
105. Lee YC, Yang AH, Liu HC, Wong WJ, Lu YC, Chang MH, Song BH. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: two novel mutations in the NOTCH3 gene in Chinese. *J Neurol Sci* 2006; 246: 111-115
106. Lee YC, Liu CS, Chang MH, Lin KP, Fuh JL, Lu YC, Liu YF, Soong BW. Population-specific spectrum of NOTCH3 mutations, MRI features and founder effect of CADASIL in Chinese. *J Neurol* 2009; 25: 249-255
107. (Lesnik) Oberstein SA. Diagnostic strategies in CADASIL. *Neurology* 2003; 60: 2019-2010 (p.2020: author reply)
108. Lesnik Oberstein SA, Jukema JW, Van Duinen SG, Macfarlane PW, van Houwelingen HC, Breuning MH, Ferrari MD, Haan J. Myocardial infarction in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *Medicine (Baltimore)* 2003; 82: 251-256
109. Lesnik Oberstein SA, van den Boom R, van Buchem MA, van Houwelingen HC, Bakker E, Vollebregt E, Ferrari MD, Breuning MH, Haan J. Cerebral microbleeds in CADASIL. *Neurology* 2001; 57: 1066-1070
110. Liem MK, Lesnik Oberstein SA, Vollebregt MJ, Middelkoop HA, van der Grond J, Helderma-van den Enden AT. Homozygosity for a NOTCH3 mutation in a 65-year-old CADASIL patient with mild symptoms: a family report. *J Neurol* 2008; 255: 1978-1980
111. Liem MK, van der GJ, Haan J, van den BR, Ferrari MD, Knaap YM, Breuning MH, Van Buchem MA, Middelkoop HA, Lesnik Oberstein SA. Lacunar infarcts are the main correlate with cognitive dysfunction in CADASIL. *Stroke* 2007; 38: 923-928
112. Liu Y, Wu Y, Xie S, Luan XH, Yuan Y. Retinal arterial abnormalities correlate with brain white matter lesions in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2008; 36: 532-536
113. Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, Israel A. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8108-8112
114. Low WC, Junna M, Borjesson-Hanson A, Morris CM, Moss TH, Stevens DL, St Clair D, Mizuno T, Zang WW, Mykkanen K, Wahlstrom J, Andersen O, Kalimo H, Viitanen M, Kalaria RN. Hereditary multi-infarct dementia of the Swedish type is a novel disorder different from NOTCH3 causing CADASIL. *Brain* 2007; 130: 357-367



115. Low WC, Santa Y, Takahashi K, Tabira T, Kalaria RN. CADASIL-causing mutations do not alter Notch3 receptor processing and activation. *Neuroreport* 2006; 17: 945-949
116. Maclean AV, Woods R, Alderson LM, Salloway SP, Correia S, Cortez S, Stopa EG. Spontaneous lobar haemorrhage in CADASIL. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 456-457
117. Mayer M, Straube A, Bruening R, Uttner I, Pongratz D, Gasser T, Dichgans M, Müller-Höcker J. Muscle and skin biopsies are a sensitive diagnostic tool in the diagnosis of CADASIL. *J Neurol* 1999; 246: 526-532
118. Malandrini A, Albani F, Palmeri S, Fattaposta F, Gambelli S, Berti G, Bracco A, Tammara A, Calzavara S, Villanova M, Ferrari M, Rossi A, Carrera P. Asymptomatic cores and paracrystalline mitochondrial inclusions in CADASIL. *Neurology* 2002; 59: 617-620
119. Malandrini A, Carrera P, Ciacci G, Gonnelli S, Villanova M, Palmeri S, Vismara L, Brancolini V, Signorini E, Ferrari M, Guazzi GC. Unusual clinical features and early brain MRI lesions in a family with cerebral autosomal dominant arteriopathy. *Neurology* 1997; 48: 1200-1203
120. Markus HS, Martin RJ, Simpson MA, Dong YB, Ali N, Crosby AH, Powell JF. Diagnostic strategies in CADASIL. *Neurology* 2002; 59: 1134-1138
121. Mas JL, Dilouya A, de Recondo J. A familial disorder with subcortical ischemic strokes, dementia, and leukoencephalopathy. *Neurology* 1992; 42: 1015-1019
122. Matsumoto H, Tsumoto M, Yamamoto T, Takahashi K, Tahira T, Ugawa Y, Tsuji S. [A case of early stage CADASIL showing only dizziness and vertigo with a novel mutation of Notch 3 gene]. *Rinsho Shinkeigaku* 2005; 45: 27-31
123. Mazzei R, Conforti FL, Lanza PL, Sprovieri T, Lupo MR, Gallo O, Patitucci A, Magariello A, Caracciolo M, Gabriele AL, Fera F, Valentino P, Bono F, Cenacchi G, Santoro G, Muglia M, Quattrone A. A novel Notch3 gene mutation not involving a cysteine residue in an Italian family with CADASIL. *Neurology* 2004; 63: 561-564
124. Mazzei R, Conforti FL, Ungaro C, Liguori M, Sprovieri T, Patitucci A, Magariello A, Gabriele AL, Muglia M, Quattrone A bzw. Mazzei R, Conforti FL, Ungaro C, Magariello A, Gabriele AL, Patitucci A, Sprovieri T, Muglia M, Quattrone A. Gene symbol: NOTCH3. *Hum Genet* 2007; 121: 295 bzw. 296
125. Mazzei R, Guidetti D, Ungaro C, Conforti FL, Muglia M, Cenacchi G, Lanza PL, Patitucci A, Sprovieri T, Riguzzi P, Magariello A, Gabriele AL, Citrigno L, Preda P, Quattrone A. First evidence of a pathogenic insertion in the NOTCH3 gene causing CADASIL. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 108-110
126. Mazzucco S, Anzola GP, Ferrarini M, Taioli F, Olivato S, Burlina AP, Fabrizi GM, Rizzuto N. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy and right-to-left shunt: Lack of evidence for an association in a prevalence study. *Eur Neurol* 2009; 61: 46-49
127. Meeks JJ, Deng HX, Biller J, Cohen B, Siddique T. Two novel mutations in Notch3 in North American CADASIL patients. *Stroke* 1999; 30: 250
128. Mellies JK, Baumer T, Muller JA, Tournier-Lasserre E, Chabriat H, Knobloch O, Hackeloer HJ, Goebel HH, Wetzig L, Haller P. SPECT study of a German CADASIL family: a phenotype with migraine and progressive dementia only. *Neurology* 1998; 50: 1715-1721
129. Miao Q, Paloneva T, Tuominen S, Pöyhönen M, Tuiski S, Viitanen M, Kalimo H. Fibrosis and stenosis of the long penetrating cerebral arteries: the cause of the white matter pathology in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Brain Pathol* 2004; 14: 358-364
130. Miranda M, Dichgans M, Slachevsky A, Urbina F, Mena I, Venegas P, Galvez M. CADASIL presenting with a movement disorder: a clinical study of Chilean kindred. *Mov Disord* 2006; 21: 1008-1012
131. Mizuno T, Muranishi M, Torugun T, Tango H, Nagakane Y, Kudeken T, Kawase Y, Kawabe K, Oshima F, Yaoi T, Itoh K, Fushiki S, Nakagawa M. Two Japanese CADASIL families exhibiting Notch3 Mutation R75P not involving cysteine residue. *Inter Med* 2008; 47: 2067-2072
132. Monet M, Domenga V, Lemaire B, Souilhols C, Langa F, Babinet C, Gridley T, Tournier-Lasserre E, Cohen-Tannoudji M, Joutel A. The archetypal R90C CADASIL-NOTCH3 mutation retains NOTCH3 function in vivo. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 982-992
133. Moon SY, Ki CS, Kim JW, Suh YL, Kwon JC, Na DL. Silent infarcts demonstrated by diffusion-weighted MRI in CADASIL. *Eur Neurol* 2003; 49: 178-180
134. Moon SY, Kim HY, Seok JI, Kwon JC, Ki CS, Kim JW, Suh YL, Na DL. A novel mutation (C67Y) in the NOTCH3 gene in a Korean CADASIL patient. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 141-144
135. Mutrux S. [Study of a familial case of pseudobulbar paralysis of the pontocerebellar type]. *Monatsschr Psychiatr Neurol* 1951; 122: 349-384
136. Mykkänen K, Junna M, Amberla K, Bronge L, Kääräinen H, Pöyhönen M, Kalimo H, Viitanen M. Different clinical phenotypes in monozygotic CADASIL twins with a novel NOTCH3 mutation. *Stroke* 2009; 40: 2215-2218

137. Nam Y, Sliz P, Pear WS, Aster JC, Blacklow SC. Cooperative assembly of higher-order Notch complexes functions as a switch to induce transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 2103-2108
138. Nishio T, Arima K, Eto K, Ogawa M, Sunohara N. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: report of an autopsied Japanese case. *Clin Neurol* 1997; 37: 910-916
139. Oberstein SA, Ferrari MD, Bakker E, van Gestel J, Kneppers AL, Frants RR, Breuning MH, Haan J. Diagnostic Notch3 sequence analysis in CADASIL: three new mutations in Dutch patients. Dutch CADASIL Research Group. *Neurology* 1999; 52: 1913-1915
140. Oh JH, Lee JS, Kang SY, Kang JH, Choi JC. Aspirin-associated intracerebral hemorrhage in a patient with CADASIL. *Clin Neurol Neurosurg* 2008; 110: 384-386
141. Okeda R, Arima K, Kawai M. Arterial changes in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) in relation to pathogenesis of diffuse myelin loss of cerebral white matter: examination of cerebral medullary arteries by reconstruction of serial sections of an autopsy case. *Stroke* 2002; 33: 2565-2569
142. Oki K, Nagata E, Ishiko A, Shimizu A, Tanaka K, Takahashi K, Tabira T, Katayama T, Suzuki N. Novel mutation of the Notch3 gene in a Japanese patient with CADASIL. *Eur J Neurol* 2007; 14: 464-466
143. Oliveri RL, Muglia M, De Stefano N, Mazzei R, Labate A, Conforti FL, Patitucci A, Gabriele AL, Tagarelli G, Magariello A, Zappia M, Gambardella A, Federico A, Quattrone A. A novel mutation in the Notch3 gene in an Italian family with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: genetic and magnetic resonance spectroscopic findings. *Arch Neurol* 2001; 58: 1418-1422
144. Opherck C, Duering M, Peters N, Karpinska A, Rosner S, Schneider E, Bader B, Giese A, Dichgans M. CADASIL mutations enhance spontaneous multimerization of NOTCH3. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 2761-2767
145. Opherck C, Peters N, Herzog J, Luedtke R, Dichgans M. Long-term prognosis and causes of death in CADASIL: a retrospective study in 411 patients. *Brain* 2004; 127: 2533-2539
146. O'Sullivan M, Jarosz JM, Martin RJ, Deasy N, Powell JF, Markus HS. MRI hyperintensities of the temporal lobe and external capsule in patients with CADASIL. *Neurology* 2001; 56: 628-634
147. O'Sullivan M, Rich PM, Barrick TR, Clark CA, Markus HS. Frequency of subclinical lacunar infarcts in ischemic leukoariosis and cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003; 24: 1348-1354
148. Pescini F, Bianchi S, Salvadori E, Poggese A, Dotti MT, Federico A, Inzitari D, Pantoni L. A pathogenic mutation on exon 21 of the NOTCH3 gene causing CADASIL in an octogenarian paucisymptomatic patient. *J Neurol Sci* 2008; 267: 170-173
149. Peters N, Freilinger T, Opherck C, Pfeifferkorn T, Dichgans M. Enhanced L-arginine-induced vasoreactivity suggests endothelial dysfunction in CADASIL. *J Neurol* 2008; 255: 1203-1208
150. Peters N, Herzog J, Opherck C, Dichgans M. A two-year clinical follow-up study in 80 CADASIL subjects: progression patterns and implications for clinical trials. *Stroke* 2004; 35: 1603-1608 ([Peters et al. 2004<sup>a</sup>](#))
151. Peters N, Holtmannspotter M, Opherck C, Gschwendtner A, Herzog J, Samann P, Dichgans M. Brain volume changes in CADASIL: a serial MRI study in pure subcortical ischemic vascular disease. *Neurology* 2006; 66: 1517-1522
152. Peters N, Opherck C, Bergmann T, Castro M, Herzog J, Dichgans M. Spectrum of mutations in biopsy-proven CADASIL: implications for diagnostic strategies. *Arch Neurol* 2005; 62: 1091-1094 ([Peters et al. 2005<sup>a</sup>](#))
153. Peters N, Opherck C, Danek A, Ballard C, Herzog J, Dichgans M. The pattern of cognitive performance in CADASIL: a monogenic condition leading to subcortical ischemic vascular dementia. *Am J Psychiatry* 2005; 162: 2078-2085 ([Peters et al. 2005<sup>b</sup>](#))
154. Peters N, Opherck C, Zacherle S, Capell A, Gempel P, Dichgans M. CADASIL-associated Notch3 mutations have differential effects both on ligand binding and ligand-induced Notch3 receptor signaling through RBP-Jk. *Exp Cell Res* 2004; 299: 454-464 ([Peters et al. 2004<sup>b</sup>](#))
155. Pfeifferkorn T, von Stuckrad-Barre S, Herzog J, Gasser T, Hamann GF, Dichgans M. Reduced cerebrovascular CO2 reactivity in CADASIL: A transcranial Doppler sonography study. *Stroke* 2001; 32: 17-21
156. Phillips JS, King JA, Chandran S, Prinsley PR, Dick D. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) presenting with sudden sensorineural hearing loss. *J Laryngol Otol* 2005; 119: 148-151
157. Piccirillo G, Magri D, Mitra M, Rufa A, Zicari E, Stromillo ML, De Stefano N, Dotti MT. Increased QT variability in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Eur J Neurol* 2008; 15: 1216-1221
158. Pradotto L, Azan G, Doriguzzi C, Valentini C, Mauro A. Sporadic vascular dementia as clinical presentation of a new missense mutation within exon 7 of NOTCH3 gene. *J Neurol Sci* 2008; 271: 207-210

159. Prakash N, Hansson E, Betsholtz C, Mitsiadis T, Lendahl U. Mouse Notch 3 expression in the pre- and postnatal brain: relationship to the stroke and dementia syndrome CADASIL. *Exp Cell Res* 2002; 278: 31-44
160. Ragoschke-Schumm A, Axer H, Witte OW, Isenmann S, Fitzek C, Dichgans M, Peters N, Mueller-Hoecker J. Intracerebral haemorrhage in CADASIL. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 1606-1607
161. Ragno M, Tournier-Lasserre E, Fiori MG, Manca A, Patrosso MC, Ferlini A, Sirocchi G, Trojano L, Chabriat H, Salvi F. An Italian kindred with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *Ann Neurol* 1995; 38: 231-236
162. Rankin J. Cerebral vascular accidents in patients over the age of 60. II. Prognosis. *Scott Med J* 1957; 2: 200-215
163. Razvi SS, Davidson R, Bone I, Muir KW. Diagnostic strategies in CADASIL. *Neurology* 2003; 60: 2019-2020
164. Razvi SS, Davidson R, Bone I, Muir KW. The prevalence of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) in the west of Scotland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 739-741 ([Razvi et al. 2005<sup>a</sup>](#))
165. Razvi SS, Davidson R, Bone I, Muir KW. Is inadequate family history a barrier to diagnosis in CADASIL? *Acta Neurol Scand* 2005; 112: 323-326 ([Razvi et al. 2005<sup>b</sup>](#))
166. Reyes S, Viswanathan A, Godin O, Dufouil C, Benisty S, Hernandez K, Kurtz A, Jouvent E, O'Sullivan M, Czernecki V, Bousser MG, Dichgans M, Chabriat H. Apathy: a major symptom in CADASIL. *Neurology* 2009; 72: 905-910
167. Robinson W, Galetta SL, McCluskey L, Forman MS, Balcer LJ. Retinal findings in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *Surv Ophthalmol* 2001; 45: 445-448
168. Rocca MA, Filippi M, Herzog J, Sormani MP, Dichgans M, Yousry TA. A magnetic resonance imaging study of the cervical cord of patients with CADASIL. *Neurology* 2001; 56: 1392-1394
169. Roine S, Harju M, Kivela TT, Poyhonen M, Nikoskelainen E, Tuisku S, Kalimo H, Viitanen M, Summanen PA. Ophthalmologic findings in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: a cross-sectional study. *Ophthalmology* 2006; 113: 1411-1417
170. Rojas-Marcos I, Encarnacion M, Martinez-Yelamos S, Ferrer I, Arbizu T, Gil-Peralta A, Garcia-Lozano JR. Gene symbol: NOTCH3. Disease: CADASIL. *Hum Genet* 2004; 115: 175
171. Rojas-Marcos I, Garcia-Lozano R, Lozano P, Gil NE, Gil-Peralta A, Bautista J. Gene symbol: NOTCH3. Disease: CADASIL. *Hum Genet* 2007; 120: 917
172. Rolfs A, Martus P, Heuschmann PU, Grittner U, Holzhausen M, Tatlisumak T, Böttcher T, Fazekas F, Enzinger C, Ropele S, Schmidt R, Riess O, Norrving B. Protocol and Methodology of the Stroke in Young Fabry Patients (sifap1) Study: A Prospective Multicenter European Study of 5,024 Young Stroke Patients Aged 18-55 Years. *Cerebrovasc Dis* 2010; 31: 253-262 (Epub ahead of print)
173. Rubio A, Rifkin D, Powers JM, Patel U, Stewart J, Faust P, Goldman JE, Mohr JP, Numaguchi Y, Jensen K. Phenotypic variability of CADASIL and novel morphologic findings. *Acta Neuropathol* 1997; 94: 247-254
174. Ruchoux MM, Chabriat H, Bousser MG, Baudrimont M, Tournier-Lasserre E. Presence of ultrastructural arterial lesions in muscle and skin vessels of patients with CADASIL. *Stroke* 1994; 25: 2291-2292
175. Ruchoux MM, Maurage CA. CADASIL: Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 947-964
176. Ruchoux MM, Maurage CA. Endothelial changes in muscle and skin biopsies in patients with CADASIL. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998; 24: 60-65
177. Rufa A, Blardi P, De Lalla A, Cevenini G, De Stefano N, Zicari E, Auteri A, Federico A, Dotti MT. Plasma levels of asymmetric dimethylarginine in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarct and leukoencephalopathy. *Cerebrovasc Dis* 2008; 26: 636-640
178. Rufa A, De Stefano N, Dotti MT, Bianchi S, Sicurelli F, Stromillo ML, D'Aniello B, Federico A. Acute unilateral visual loss as the first symptom of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Arch Neurol* 2004; 61: 577-580
179. Rufa A, Guideri F, Acampa M, Cevenini G, Bianchi S, De Stefano N, Stromillo ML, Federico A, Dotti MT. Cardiac autonomic nervous system and risk of arrhythmias in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *Stroke* 2007; 38: 276-280
180. Rufa A, Malandrini A, Dotti MT, Berti G, Salvadori C, Federico A. Typical pathological changes of CADASIL in the optic nerve. *Neurol Sci* 2005; 26: 271-274
181. Ryberg C, Rostrup E, Sjöstrand K, Paulson OB, Barkhof F, Scheltens P, van Straaten ECW, Fazekas F, Schmidt R, Erkinjuntti T, Wahlund LO, Basile AM, Pantoni L, Inzitari D, Waldemar G. White matter changes contribute to corpus callosum atrophy in the elderly: the LADIS study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008; 29: 1498-504.

182. Saiki S, Sakai K, Saiki M, Kitagawa Y, Umemori T, Murata K, Matsui M, Hirose G. Varicose veins associated with CADASIL result from a novel mutation in the Notch3 gene. *Neurology* 2006; 67: 337-339
183. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HB. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491
184. Salvi F, Michelucci R, Plasmati R, Parmeggiani L, Zonari P, Mascalchi M, Tassinari CA. Slowly progressive familial dementia with recurrent strokes and white matter hypodensities on CT scan. *Ital J Neurol Sci* 1992; 13: 135-140
185. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5436-5467
186. Santa Y, Uyama E, Chui DH, Arima M, Kotorii S, Takahashi K, Tabira T. Genetic, clinical and pathological studies of CADASIL in Japan: a partial contribution of Notch3 mutations and implications of smooth muscle cell degeneration for the pathogenesis. *J Neurol Sci* 2003; 212: 79-84
187. Scheid R, Heinritz W, Leyhe T, Thal DR, Schober R, Strenge S, von Cramon DY, Froster UG. Cysteine-sparing NOTCH3 mutations: CADASIL or CADASIL variants? *Neurology* 2008; 71: 774-776
188. Schon F, Martin RJ, Prevett M, Clough C, Enevoldson TP, Markus HS. "CADASIL coma": an underdiagnosed acute encephalopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 249-252
189. Schroder JM, Zuchner S, Dichgans M, Nagy Z, Molnar MJ. Peripheral nerve and skeletal muscle involvement in CADASIL. *Acta Neuropathol (Berl)* 2005; 110: 587-599
190. Singhal S, Bevan S, Barrick T, Rich P, Markus HS. The influence of genetic and cardiovascular risk factors on the CADASIL phenotype. *Brain* 2004; 127: 2031-2038
191. Singhal S, Rich P, Markus HS. The spatial distribution of MR imaging abnormalities in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy and their relationship to age and clinical features. *AJNR Am J Neuroradiol* 2005; 26: 2481-2487
192. Soong BW, Lee YC, Lu YC. Gene symbol: NOTCH3. Disease: cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Hum Genet* 2005; 116: 242
193. Sourander P, Walinder J. Hereditary multi-infarct dementia. Morphological and clinical studies of a new disease. *Acta Neuropathol* 1977; 39: 247-254
194. Stenborg A, Kalimo H, Viitanen M, Terent A, Lind L. Impaired endothelial function of forearm resistance arteries in CADASIL patients. *Stroke* 2007; 38: 2692-2697
195. Stevens DL, Hewlett RH, Brownell B. Chronic familial vascular encephalopathy. *Lancet* 1977; 1: 1364-1365
196. Taillia H, Chabriat H, Kurtz A, Verin M, Levy C, Vahedy K, Tournier-Lasserre E, Bousser MG. Cognitive alterations in non-demented CADASIL patients. *Cerebrovasc Dis* 1998; 8: 97-101
197. Tamura K, Taniguchi Y, Minoguchi S, Sakai T, Tun T, Furukawa T, Honjo T. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol* 1995; 5: 1416-1423
198. Thomas NJ, Morris CM, Scaravilli F, Johansson J, Rossor M, De Lange R, St Clair D, Nicoll J, Blank C, Coulthard A, Bushby K, Ince PG, Burn D, Kalaria RN. Hereditary vascular dementia linked to notch 3 mutations. CADASIL in British families. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 903: 293-298
199. Tikka S, Mykkänen K, Ruchoux MM, Bergholm R, Junna M, Pöyhönen M, Yki-Järvinen H, Joutel A, Viitanen M, Baumann M, Kalimo H. Congruence between NOTCH3 mutations and GOM in 131 CADASIL patients. *Brain* 2009; 132: 933-939
200. Tomimoto H, Ohtani R, Wakita H, Lin JX, Ihara M, Miki Y, Oshima F, Murata T, Ishibashi K, Suenaga T, Mizuno T. Small artery dementia in Japan: radiological differences between CADASIL, leukoaraiosis and Binswanger's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006; 21: 162-169
201. Tournier-Lasserre E, Iba-Zizen MT, Romero N and Bousser MG. Autosomal dominant syndrome with strokelike episodes and leukoencephalopathy. *Stroke* 1991; 22: 1297-1302
202. Tournier-Lasserre E, Joutel A, Melki J, Weissenbach J, Lathrop GM, Chabriat H, Mas JL, Cabanis EA, Baudrimont M, Maciazek J, Bach MA, Bousser MG. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12. *Nat Genet* 1993; 3: 256-259
203. Tuominen S, Juvonen V, Amberla K, Jolma T, Rinne JO, Tuisku S, Kurki T, Marttila R, Poyhonen M, Savontaus ML, Viitanen M, Kalimo H. Phenotype of a homozygous CADASIL patient in comparison to 9 age-matched heterozygous patients with the same R133C Notch3 mutation. *Stroke* 2001; 32: 1767-1774
204. Tuominen S, Miao Q, Kurki T, Tuisku S, Poyhonen M, Kalimo H, Viitanen M, Sipila HT, Bergman J, Rinne JO. Positron emission tomography examination of cerebral blood flow and glucose metabolism in young CADASIL patients. *Stroke* 2004; 35: 1063-1067

205. Uchino M, Hirano T, Uyama E, Hashimoto Y. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) and CADASIL-like disorders in Japan. *Ann NY Acad Sci* 2002; 977: 273-278
206. Ungaro C, Conforti FL, Sprovieri T, de Robertis F, Citrigno L, Quattrone A, Mazzei R. Gene symbol: NOTCH3. Disease: CADASIL. *Hum Genet* 2008; 123: 555
207. Uyguner ZO, Siva A, Kayserili H, Saip S, Altintas A, Apak MY, Albayram S, Isik N, Akman-Demir G, Tasyurekli M, Oz B, Wollnik B. The R110C mutation in Notch3 causes variable clinical features in two Turkish families with CADASIL syndrome. *J Neurol Sci* 2006; 246: 123-130
208. Vahedi K, Chabriat H, Levy C, Joutel A, Tournier-Lasserre E, Bousser MG. Migraine with aura and brain magnetic resonance imaging abnormalities in patients with CADASIL. *Arch Neurol* 2004; 61: 1237-1240
209. Valenti R, Poggesi A, Pescini F, Inzitari D, Pantoni L. Psychiatric disturbances in CADASIL: a brief review. *Acta Neurol Scand* 2008; 118: 291-295
210. Valenti R, Bianchi S, Pescini F, D'Eramo C, Inzitari D, Dotti MT, Pantoni L. First report of a pathogenic mutation on exon 24 of the NOTCH3 gene in a CADASIL family, *J Neurol* 2011: 1632-1636
211. Valko PO, Siccoli MM, Schiller A, Wieser HG, Jung HH. Non-convulsive status epilepticus causing focal neurological deficits in CADASIL. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 1287-1289
212. van Bogaert I. Encephalopathie sous-corticale progressive (Binswanger) à évolution rapide chez deux soeurs. *Med Hellen* 1955; 24: 961-972
213. van den Boom R, Lesnik Oberstein SA, Ferrari MD, Haan J, van Buchem MA. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: MR imaging findings at different ages - 3rd-6th decades. *Radiology* 2003; 229: 683-690
214. van den Boom R, Lesnik Oberstein SA, van Duinen SG, Bornebroek M, Ferrari MD, Haan J, van Buchem MA. Subcortical lacunar lesions: an MR imaging finding in patients with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Radiology* 2002; 224: 791-796
215. Van Gerpen JA, Ahlskog JE, Petty GW. Progressive supranuclear palsy phenotype secondary to CADASIL. *Parkinsonism Relat Disord* 2003; 9: 367-369
216. Verin M, Rolland Y, Landgraf F, Chabriat H, Bompais B, Michel A, Vahedi K, Martinet JP, Tournier-Lasserre E, Lemaitre MH, Edan G. New phenotype of the cerebral autosomal dominant arteriopathy mapped to chromosome 19: migraine as the prominent clinical feature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; 59: 579-585
217. Viana-Baptista M, Ferreira S, Costa P, Venancio M, Fernandes S, Carvalho F, Oliveira JP, Ferro JM. The spectrum of NOTCH3 mutations in portuguese patients with CADASIL: implications for diagnostic strategies. *Cerebrovasc Dis* 2007; 23 (Suppl. 2): 75
218. Vikelis M, Papatriantafyllou J, Krageorgiou CE. A novel CADASIL-causing mutation in a stroke patient. *Swiss Med Wkly* 2007; 137: 323-325
219. Viswanathan A, Gray F, Bousser MG, Baudrimont M, Chabriat H. Cortical neuronal apoptosis in CADASIL. *Stroke* 2006; 37: 2690-2695 ([Viswanathan et al. 2006<sup>b</sup>](#))
220. Viswanathan A, Gschwendtner A, Guichard JP, Buffon F, Cumurciuc R, O'Sullivan M, Holtmannspotter M, Pachai C, Bousser MG, Dichgans M, Chabriat H. Lacunar lesions are independently associated with disability and cognitive impairment in CADASIL. *Neurology* 2007; 69: 172-179
221. Viswanathan A, Guichard JP, Gschwendtner, Buffon F, Cumurciuc R, Boutron C, Vicaud E, Holtmannspotter M, Pachai C, Bousser MG, Dichgans M, Chabriat H. Blood pressure and haemoglobin A1c are associated with microhaemorrhage in CADASIL: a two-centre cohort study. *Brain* 2006; 129: 2375-2383 ([Viswanathan et al. 2006<sup>a</sup>](#))
222. Wang ZX, Lu H, Zhang Y, Bu DF, Niu XY, Zhang Z, Huang YN, Yuan Y. [NOTCH3 gene mutations in four Chinese families with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004; 84: 1175-1180
223. Wang Z, Yuan Y, Zhang W, Lv H, Hong D, Chen B, Liu Y, Luan X, Xie S, Wu S. NOTCH3 mutations and clinical features in 33 mainland Chinese families with CADASIL. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 82: 534-539
224. Wegner F, Strecke K, Schwarz J, Wagner A, Heinritz W, Sommerer F, Thal DR, Schneider JP, Kendziorra K, Sabri O. Vascular parkinsonism in a CADASIL case with intact nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurol* 2007; 254: 1743-1745
225. Weller M, Dichgans J, Klockgether T. Acetazolamide-responsive migraine in CADASIL. *Neurology* 1998; 50: 1505
226. Werbrouck BF, De Bleecker JL. Intracerebral haemorrhage in CADASIL. A case report. *Acta Neurol Belg* 2006; 106: 219-221
227. Wharton KA, Johansen KM, Xu T, Artavanis-Tsakonas S. Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 1985; 43: 567-581
228. Wu J, Bresnick EH. Bare rudiments of notch signaling: how receptor are regulated. *Trends Biochem Sci* 2007; 32: 477-485

## **8. LEBENS LAUF**

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen aus der digitalen Version entfernt.



## WISSENSCHAFTLICHER LEBENS LAUF, VERÖFFENTLICHUNGEN:

### Publizierte wissenschaftliche Arbeiten/ Buchbeiträge:

- **Dudesek A**, Röschinger W, Muntau AC, Seidel J, Leupold D, Thöny B, Blau N. Molecular analysis and long term follow-up of patients with different forms of 6-pyruvoyl-tetrahydrobiopterin synthase deficiency. Eur J Pediatr 2001; 160: 267-276
- **Dudesek A**, Zettl UK. Intravenous immunoglobulins as therapeutic option in the treatment of multiple sclerosis. J Neurol 2006; 253 (Suppl 5): 50-58
- **Dudesek A**, Wittstock M, Grossmann A, Meyer W, Rolfs A. Pathophysiological aspects of neurovascular involvement in Anderson-Fabry Disease. Lysosomal Storage Diseases (Current Medical Literature) 2008; 8: 47-59
- Rolfs A, **Dudesek A**, Lukas J, Böttcher T. Neurological manifestations in Fabry disease. Fabry Disease 2010; Part 2: 245-257 (DOI: 10.1007/978-90-481-9033-1\_13).

### Betreuung von wissenschaftlichen Studien (als Investigator):

- 04/2007-01/2010: **Stroke in Young Fabry Patients (sifap) Study:**  
**Sifap 1:** "A prospective multicenter European study of 5,024 young stroke patients aged 18-55 years";  
**Sifap 2:** "Characterization of the stroke rehabilitation in young patients with Fabry disease: An epidemiological, international, multicenter prognosis study".
- 2005-2006: **Rotigotine Trial (SP 825):** "A phase 3, randomized, open-label, two-arm, Parallel group, multicenter, multinational trial to compare the efficacy of rotigotine patch to that of ropinirole on early morning motor impairment and sleep disorders in subjects with early-stage, idiopathic Parkinson`s disease".
- 2010/2011: **SPACE-Studie:** „A non interventional study to evaluate treatment with Botulinum neurotoxin type A in treatment-naïve subjects with spasticity treated according to common clinical practice“. 2011: **PURE-Studie:** "prospective, double blind, placebo-controlled, randomized, multicenter study with an open-label extension period to investigate the efficacy and safety of NT201 (botulinum neurotoxin type A free from complexing proteins) in the treatment of post-stroke spasticity of the upper limb".

### Spezielle Tätigkeiten in der Poliklinik für Neurologie, Universität Rostock:

- 2006-2007 und ab 07/2009 bis aktuell: **Ständige Mitbetreuung der neurogenetischen Sprechstunde** (unter der Leitung von Prof. Dr. med. A. Rolfs und aktuell von OA Dr. med. Ch. Kamm)
- 2006-2007 und ab 07/2009 bis aktuell: **Ständige Mitbetreuung der Botulinumtoxin-Chefambulanz** (unter der Leitung von Prof. Dr. med. R. Benecke);  
 2009-2010: Fortbildung zum "Junior Expert" für Botulinumtoxin-Anwendungen (PEP – „Program for Expert Partnership“).

## 9. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG:

### Eidesstattliche Erklärung nach § 4 Abs. 2.5

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Rostock, Januar 2011

Aleš Dudešek

## 10. DANKSAGUNG

Ich möchte allen meinen herzlichen Dank aussprechen, die die Entstehung dieser Arbeit ermöglicht haben. Ganz besonderer Dank gilt hierbei...

- Prof. Dr. Arndt Rolfs für die Vergabe des Promotionsthemas, die Betreuung und seinen begeisternden, nie versiegenden Enthusiasmus für aufregende Themen und Projekte
- dem wissenschaftlichen und technisch-assistierenden Personal des AKos-Institutes (insbesondere Mandy Loebert und Daniel Bergmann) für die Unterstützung im neurobiologischen Labor
- den Ärzten, die die SIFAP-Patienten vor Ort betreuten und zum Sammeln von deren Daten unterstützend beigetragen haben (Zentrum Lyon: Dr. med. Laurent Derex; Zentrum Regensburg: PD Dr. med. Felix Schlachetzki und Dr. med. Jennifer Mädler; Zentrum Graz: Univ.-Prof. Dr. med. Franz Fazekas und Univ.-Doz. Dr. med. Stefan Ropele)
- meiner Familie

## 11. THESEN

1. Mutationen im humanen Notch3-Gen sind für die autosomal dominante vererbte Erkrankung CADASIL („Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with subcortical Infarcts and Leucoencephalopathy“) verantwortlich.
2. Die bislang bekannten kausativen Mutationen führen auf Proteinebene beinahe ausnahmslos zu einer ungeraden Anzahl der Aminosäure Zystein in einem der 34 EGFR (EGF-like repeat)-Motive des Notchrezeptors und lokalisieren sich in den EGFR-kodierenden Exons 2-24 des Notch3-Gens.
3. Gegenstand dieser Arbeit war eine molekulargenetische Notch3-Mutationssuche in einem größeren Kollektiv von jungen Patienten unter 55 Jahren mit einem Schlaganfall jeder möglichen Ätiologie. Hierzu erfolgte eine Komplettssequenzierung aller kodierenden Exonbereiche des Notch3-Gens von 154 Patienten, die aus der sog. SIFAP (stroke in young fabry patients)-Studie rekrutiert wurden.
4. Klassische CADASIL-Mutationen, die die Zystein-Anzahl in einem EGFR alterieren, konnten in o.g. Kohorte nicht nachgewiesen werden. Dies legt nahe, dass in einer unselektionierten Population von jungen Patienten mit Schlaganfall die Prävalenz von klassischen Mutationen sehr gering sein dürfte.
5. Im klinischen Alltag kann dementsprechend und unter Berücksichtigung von Aufwand und Kosten zumindest derzeit kein routinemäßiges Mutationsscreening des gesamten Notch3-Gens bei jedem jüngeren Schlaganfallpatienten empfohlen werden. Ein solches sollte von zusätzlichen anamnestisch-klinischen und/oder neuroradiologischen Verdachtsmomenten für eine CADASIL-Erkrankung geleitet werden.
6. In der vorliegenden Arbeit ließen sich in o.g. Kohorte von jungen Schlaganfallpatienten insgesamt 3 sog. Zystein-aussparende Mutationen nachweisen (1. Mutation in Exon 25: c.4639 C>G, p.L1547V; 2. Mutation in Exon 33: c.6221 C>T, p.P2074L; 3. Mutation in Exon 33: c.6532 C>T, p.P2178S). Sie folgen auf Proteinebene nicht dem Paradigma von klassischen CADASIL-Mutationen, die zu einer Veränderung der Zysteinanzahl in einem bestimmten EGFR des extrazellulären Notch3-Rezeptors führen und liegen darüberhinaus außerhalb der EGFR-kodierenden Exons 2-24.
7. Die Mutationen konnten in einer Kontrollgruppe, die jeweils ca. 500 Kontrollindividuen ohne Schlaganfall bzw. 1000 Kontrollallele umfasste, sowie in internationalen Mutations-/ Polymorphismus-Datenbanken nicht gefunden werden. Die Sequenzveränderungen wurden von uns deshalb zunächst als „Mutationen unklarer bzw. möglicher klinischer Signifikanz“ klassifiziert.

8. Ein bei den 3 betroffenen Patienten durchgeführter Versuch einer Genotyp-Phänotyp-Analyse könnte darauf hinweisen, dass diese Mutationen mit einem von uns als „atypisch“ bezeichneten Phänotyp einhergehen, der sich vom klassischen CADASIL-Phänotyp unterscheidet.
9. Elemente dieses Phänotyps könnten sein: 1) mit Ausnahme von zerebrovaskulären Ereignissen inkomplette Ausbildung der CADASIL-Hauptmanifestationen 2) eher milderer Verlauf 3) nur geringe zerebrale Marklagerveränderungen/„white matter lesions“ bzw. geringer ausgeprägte Leukenzephalopathie ohne Beteiligung der anterioren Temporalpole (Zeichen, das in der zerebralen MR-Bildgebung für die klassische CADASIL-Erkrankung sehr charakteristisch ist).
10. Eine Segregation dieses „atypischen“ Phänotyps mit den gefundenen Zystein-aussparenden Mutationen und damit auch ein neues Krankheitsbild im Sinne von „atypischen CADASIL-Varianten“ lassen sich in dieser Arbeit allerdings nicht beweisen. Eine Recherche hinsichtlich der in der Literatur vorbeschriebenen Zystein-aussparenden Mutationen unterstützt zwar nicht die Vereinheitlichung eines durch diese Mutationen bedingten Phänotyps, deutet aber auf eine Häufung von assoziierten „atypischen“ CADASIL-Verläufen bzw. „atypischen CADASIL-Varianten“.
11. „Atypische CADASIL-Varianten“ könnten sich äußern in einem Spektrum von einzelnen oder wenig kombinierten Elementen der bekannten Hauptmanifestationen von CADASIL, einem tendenziell eher milderen Verlauf und häufigeren Spätmanifestationen. Die assoziierte Leukenzephalopathie mag sowohl sehr mild wie auch sehr stark ausgeprägt sein, wobei in der MR-Bildgebung der anteriore Temporalpol offensichtlich nicht beteiligt erscheint. Granuläres osmiophiles Material (GOM), dessen elektronenmikroskopischer Nachweis in (Haut-) Gefäßen als pathognomonisch für die klassische CADASIL-Erkrankung angesehen wird, liegt bei diesen Varianten offensichtlich nicht immer vor.
12. Die insgesamt heterogen erscheinende und vereinfacht unter „atypisch“ zusammengefasste Phänotyp-Gruppe mag möglicherweise auch die Heterogenität der Zystein-aussparenden Mutationen in Bezug auf ihre pathophysiologischen Konsequenzen widerspiegeln, die bislang nicht gezielt untersucht worden sind.
13. In einer von uns zusammengestellten, von der SIFAP-Studie unabhängigen Vergleichsgruppe von CADASIL-Patienten mit einem klassischen Phänotyp konnte eine neue, bislang nicht publizierte Notch3-Mutation im Exon 5 (c.785 G>A, p. C262Y) nachgewiesen werden.