Untersuchungen zum Mutationsspektrum bei CADASIL

Harald Ludwig

Aus der
Neurologischen Klinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Th. Brandt

Untersuchungen zum Mutationsspektrum bei CADASIL

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Harald Ludwig

aus Hamburg

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	PD .Dr.med. Martin Dichgans
Mitberichterstatter:	Dr.med. Jürgen Herzog
Mitbetreuung durch promovierten Mitarbeiter:	Dr.med. Nils Peters
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Klaus Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	17. März 2005

Meinen Eltern und meiner Schwester Angela

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 1

1.1. EINFÜHRUNG UND VORGESCHICHTE 1

1.2. KRANKHEITSBILD 2

1.3. KLINISCHE DIAGNOSTIK 4

1.3.1. Bildgebung 4

1.3.2. Pathologie 5

1.3.3. Diagnostik mit Hautbiopsie 6

1.3.4. Phänotypische-Ausprägung 6

1.3.5. Therapie 6

1.3.6. Vererbungsmodus von CADASIL 6

1.4. BIOLOGIE VON NOTCH3 7

1.4.1. Molekulare Pathogenese 9

1.5. AUSGANGSLAGE ZU BEGINN DER ARBEIT 9

1.6. ZIELSETZUNG DER ARBEIT 11

2. PATIENTEN 12

3. METHODEN 14

3.1. GEWINNUNG DER DNA 14

3.2. POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR) 15

3.2.1. Theorie der PCR 15

3.2.2. Primerdesign als Voraussetzung für die PCR 16

3.2.3. Verwendete Primer 17

3.2.4. Protokoll zur Etablierung einer optimierten PCR 18

3.2.5. Elektrophorese für die PCR-Produkt Kontrolle 19

3.2.6. Reinigung der PCR-Produkte 19

3.3. DNA-SEQUENZIERUNG 20

3.3.1. DNA-Sequenzierreaktion 21

3.3.2. Reinigung der Sequenzier-Produkte 21

3.3.3. Gel-Aufbau, Zusammensetzung und Anwendungsbedingungen 22

3.3.4. Sequenzanalysenauswertung 22

3.4. RESTRIKTIONSANALYSEN 23

3.5. PROTEINMODELLING 23

4. ERGEBNISSE 24

4.1. MOLEKULARGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN 24

4.1.1. ZUORDNUNG DER MUTATIONEN UND POLYMORPHISMEN ZU DEN INDEX-PATIENTEN .. 24

4.1.1.Mutationen 26

4.1.2. Polymorphismen 28

4.1.3. Übersicht über die Mutationen und Polymorphismen in Exon 3 und 4 29

4.2. DIE GEFUNDENEN MUTATIONSTYPEN 32

4.2.1. Punktmutationen 32

4.2.2. Exonische Dinukleotid Mutation (Exon 6) 34

4.2.3. Deletionen 36

4.2.3.1 15 Basenpaar Deletion in Exon 3 36

4.2.3.2 9 Basenpaar Deletion in Exon 4 37

4.3. SEGREGATIONSANALYSEN 38

4.4. AUSWERTUNG DER MUTATIONSDATEN 39

4.4.1 Austauschhäufigkeit der Aminosäuren 39

4.4.2. Analyse der Austausche an bestimmten R-Positionen 41

4.5. ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR VEREINFACHUNG DER DIAGNOSTIK 43

4.5.1. Sequenzierung 43

4.5.2. Restriktionsanalysen 44

4.6. PROTEINSTRUKTURVORHERSAGEN 48

4.7. PROTEINMODELL UND PATHOGENITÄTSMECHANISMUS 50

5. DISKUSSION 51

5.1. MUTATIONSTYPEN 51

5.2. GENOTYP-PHÄNOTYP-KORRELATION 55

5.3. MÖGLICHKEITEN DER CADASIL-DIAGNOSTIK 55

5.4 ALTERNATIVE MÖGLICHKEITEN DER CADASIL DIAGNOSTIK 57

5.5. ERKRANKUNGEN MIT MUTATIONEN IM NOTCHSIGNALWEG 58

5.6. PROTEINMODELL UND PATHOGENITÄTSMECHANISMEN 60

5.7. AUSBLICK 61

6. ZUSAMMENFASSUNG 62

7.ANHANG 64

7.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 1

7.2.MATERIAL 66

7.2.1. Substanzen 66

7.2.2. Geräte 67

7.3. ERGÄNZENDE TABELLEN UND ABBILDUNGEN 68

8. LITERATURVERZEICHNIS 78

9. DANKSAGUNG 88

10. VERÖFFENTLICHUNGEN 89

11. LEBENSLAUF 90

1. Einleitung

1.1. Einführung und Vorgeschichte

Der Schlaganfall (Hirninfarkt) ist neben dem Herzinfarkt eine der weitverbreitesten Volkskrankheiten. Außer den bekannten Risikofaktoren Arteriosklerose, Hypertonie und Diabetes mellitus rücken auch immer mehr die genetischen Aspekte in den Vordergrund.

Sourander und Walinder berichteten 1977 von einer Familie, bei der es gehäuft zu Schlaganfällen vor dem 40. Lebensjahr kam. Bei normotonen Blutdruckwerten fanden sich obstruktive Veränderungen an den kleinen Blutgefäßen, die nicht durch Amyloidablagerungen bedingt waren. Da die als hereditäre Multiinfarktdemenz bezeichnete Erkrankung über mehrere Generationen in der Familie auftrat, wurde von einem autosomal dominanten Erbgang ausgegangen. Nach der Genkartierung auf den kurzen Arm von Chromosom 19 wurde diese Erkrankung als CADASIL bezeichnet (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy, OMIM # 125310) (Joutel et al., 1993).

Zunächst wurde das Gen auf ein Intervall von 14 Centimorgan (cM), später auf 2cM eingegrenzt (Tournier-Lasserve et al., 1993; Dichgans et al., 1996; Ducros et al., 1996). Im Jahre 1996 wurde Notch3 als das für diese Krankheit verantwortliche Gen identifiziert (Joutel et al., 1996). Weitere Kopplungsuntersuchungen an einer großen Zahl vorwiegend europäischer CADASIL-Familien brachten den Hinweis für Lokus-Homogenität (Dichgans et al., 1996; Ducros et al., 1996).

CADASIL ist ein in den letzten Jahren immer mehr beachtetes Krankheitsbild, welches u.a. eine demenzielle Entwicklung, Migräne und die dritthäufigste Todesursache Schlaganfall umfaßt. Ursache sind Veränderungen an den kleinen Blutgefäßen. Die Expression von Notch3 ist streng auf die glatten Muskelzellen der Gefäße beschränkt (Dichgans, 2002). Zusätzlich kommen pathologische Veränderungen in den glatten Muskelzellen der Gefäße vor (Joutel et al., 2000). Bis 1996 stellte die Hautbiopsie neben Kopplungsanalysen die einzige Möglichkeit dar, die Erkrankung zu diagnostizieren (Dichgans und Gasser, 1998).

Die Bezeichnung Notch geht auf Beobachtungen an der Fruchtfliege Drosophila Melanogaster zurück. Hier konnte gezeigt werden, daß der Notch Rezeptor in embryonale Differenzierungsvorgänge involviert ist. Drosophila Mutanten mit genetischen Veränderungen am Notch Lokus zeigen im heterozygoten Zustand eine Reihe von Entwicklungsstörungen. Hierzu gehört u.a. eine gut sichtbare Kerbe im Flügel (Notch=Kerbe) (Artavanis et al., 1995).

1.2. Krankheitsbild

Leitsymptome der Erkrankung sind im mittleren Lebensalter einsetzende rezidivierende, zerebrale Durchblutungsstörungen (transiente ischämische Attacken [TIAs] und Schlaganfälle). Bei 45 CADASIL-Patienten im Alter zwischen 28 und 67 Jahren fanden Chabriat et al. in 84 % der Fälle eine Anamnese für transiente ischämische Attacken oder ischämische Infarkte (Chabriat et al., 1995).

Diese ischämischen Episoden lassen sich klassischen lakunären Infarkten oder Hirnstammsyndromen zuordnen: rein motorischer, rein sensibler, kombinierter sensomotorischer Schlaganfall oder ataktische Hemiparese. Hirnstammsymptome sind häufig mit Dysarthrie assoziiert. Hinzu kommen auch andere Ausfallserscheinungen, die mit kleineren subkortikalen, im Hirnstamm gelegenen Infarkten erklärt werden können. Eine arterielle Hypertonie, wie sie beim sporadisch auftretenden Morbus Binswanger vorkommt, ist nicht mit CADASIL assoziiert.

In dem französischen Patientengut war das mittlere Erkrankungsalter für transiente ischämische Attacken und Schlaganfälle 49,3 Jahre (Chabriat et al., 1995). Bei einer Untersuchung an 29 deutschen Familien mit 102 Individuen fand sich ein mittleres Erkrankungsalter von 46,1 (30-66) Jahren für ischämische Defizite (Dichgans et al., 1998). Die rezidivierenden Ischämien führten in den meisten Fällen zu spastischen Tetraparesen mit Pseudobulbärparalyse.

Ein Großteil der Patienten entwickelt kognitive Störungen. (Chabriat et al., 1995; Ebke et al., 1997; Hutchinson et al., 1995; Mayer et al., 1995; Ragno et al., 1995; Sabbadini et al., 1995; Verin et al., 1995). Neben einem allmählichen Fortschreiten, lassen sich auch stufenweise Verschlechterungen im Rahmen von fokalneurologischen Defiziten feststellen. Das Spektrum reicht von umschriebenen kognitiven Defiziten, wie einer Konzentrations- und Merkfähigkeitsstörung, bis hin zu einer schwerwiegenden, typischerweise subkortikalen Demenz.

Migräneartige Kopfschmerzen sind mit etwa 40 % ein häufiges und wichtiges Frühsymptom der Erkrankung (1994; Chabriat et al., 1995; Verin et al., 1995). In Verbindung mit der Migräne finden sich oft klassische Aurasymptome (Chabriat et al., 1995). Die Erkrankung kann auch unter dem Bild einer hemiplegischen Migräne ablaufen (Hutchinson et al., 1995; Chabriat et al., 1995; Dichgans et al 1998). Ebenfalls können Verläufe einer Basilarismigräne vorkommen, einer Migräne mit verlängerter Aura oder einer Aura ohne Kopfschmerzen.

Bei ca. 30 % der Patienten finden sich psychiatrische Störungen, die episodenhaft auftreten und in Einzelfällen auch lange Zeit die einzige Manifestation der Erkrankung bleiben können (Chabriat et al., 1995; Dichgans et al., 1998). Bei vielen dementen Patienten entwickeln sich Blasenentleerungsstörungen. Bei etwa 10 % der Patienten mit meist fortgeschrittener Erkrankung treten epileptische Anfälle auf (Dichgans et al., 1998). Extrazerebrale, klinisch faßbare Manifestationen durch Gefäßveränderungen sind bei CADASIL bislang nicht beschrieben.

1.3. Klinische Diagnostik

1.3.1. Bildgebung

Die bildgebenden Veränderungen gehen den klinischen Symptomen oft um Jahre voraus. In den T2-gewichteten Aufnahmen finden sich zunächst umschriebene Signalanhebungen im Marklager der Hemisphären. Im Verlauf entwickelt sich eine diffuse Leukoenzephalopathie, die gelegentlich asymptomatisch bleiben kann (Trojana et al, 1998). In Spätstadien finden sich konfluierende, das gesamte Marklager betreffende, weitgehend symmetrische Signal-Hyperintensitäten in den T2-Bildern. Daneben zeigen sich umschriebene lakunäre Infarkte mit einer Prädilektion für die Basalganglien, die Capsula interna, den Thalamus und den Hirnstamm. Die unauffällige Hirnrinde steht in fortgeschrittenen Fällen in scharfem Kontrast zu den ausgeprägten Marklagerveränderungen (s. Abbildung 1). Läsionen im Kleinhirn sind selten.

Abbildung 1: MRT-Aufnahmen eines CADASIL Patienten mit typischen Marklagerveränderungen (siehe Pfeile) (Dichgans und Gasser 1998).

1.3.2. Pathologie

Im Gehirn fällt eine diffuse Leukenzephalopathie mit Rarifizierung der weißen Substanz auf. Auch makroskopisch finden sich wie bei den MRT- Aufnahmen multiple lakunäre Infarkte mit einer Prädilektion für die Basalganglien, den Thalamus, die innere und äußere Kapsel und den Hirnstamm (Baudrimont et al., 1993; Bergmann et al., 1996; Ruchoux et al., 1997). Ausgespart von den Veränderungen sind die Hirnrinde und die subkortikal gelegenen U-Fasern. Ursache der Infarkte ist eine generalisierte Mikroangiopathie mit Schwerpunkt in den leptomeningealen Gefäßen und langen penetrierenden Markarterien. Es handelt sich aber weder um eine arteriosklerotische noch amyloidotische Form (Bergmann et al., 1996; Ruchoux et al., 1997). Vorwiegend betroffen sind die kleinen Arterien und Kapillaren (Baudrimont et al., 1993; Bergmann et al., 1996; Ruchoux et al., 1994). Die verdickten Gefäße fallen lichtmikroskopisch durch die Einlagerung von granulärem, eosinophilem und PAS positivem Material und Veränderungen der glatten Gefäßmuskulatur auf. In der verdickten Basalmembran der betroffenen Gefäße lassen sich elektronenoptisch osmiophile Ablagerungen nachweisen (Baudrimont et al., 1993; Bergmann et al., 1996; Ruchoux et al., 1994).
Die beschriebenen Gefäßbefunde sind pathognomonisch für CADASIL.

1.3.3. Diagnostik mit Hautbiopsie

Bisher wurde die Diagnose überwiegend durch eine Hautstanze mit ultrastruktureller Untersuchung kleiner Arterien gesichert. Bei der generalisierten Arteropathie können osmiophile Ablagerungen in den kleinen Gefäßen der Haut nachgewiesen werden. Eine Angiographie ist diagnostisch nicht weiterführend und hat bei CADASIL-Patienten wiederholt zu schwerwiegenden Angiographiezwischenfällen geführt (Dichgans und Petersen,1997).

1.3.4. Phänotypische-Ausprägung

Es besteht eine erhebliche Variabilität des Phänotyps. Als erstes klinisches Zeichen von CADASIL treten bei ca.47 % der Betroffenen Migräne und bei ca. 45,8 % ischämische Defizite auf. Typische Untersuchungsbefunde sind: Zentrale-Faszialis Parese, Dysarthrie/Dysphagie, Pseudobulbär-Paralyse, Hemiparese, Spastik, positives Babinski Zeichen, Basalganglien Symptome, sensorische Defizite, Ataxie und Inkontinenz. Systematische Untersuchungen an größeren Familien haben gezeigt, daß der Phänotyp intrafamiliär stark variiert (Dichgans et al., 1998). Jedoch wird in einzelnen Familien eine ungewöhnlich hohe Prävalenz von migräneartigen Kopfschmerzen beobachtet (Chabriat et al., 1995; Verin et al., 1995). Die Frage nach Genotyp-Phänotyp Korrelation ist noch nicht endgültig geklärt.

1.3.5. Therapie

Für die Erkrankung steht bisher keine kausale Therapie zur Verfügung. Die Patienten werden symptomatisch behandelt.

1.3.6. Vererbungsmodus von CADASIL

Die Erkrankung wird autosomal dominant vererbt. Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen, wobei die Penetranz vollständig ist. Phänotypisch besteht auch intrafamiliär eine große Variabilität bezüglich der Ausprägung einzelner Symptome (Dichgans et al., 1998).

1.4. Biologie von Notch3

Die *Notch3* Polynukleotidsequenz ist 8091 Bp lang, hat 33 Exons und Introns und kodiert für ein Protein von 2321 Aminosäuren. Notch3 gehört zur sogenannten Notch Rezeptor Familie, die als große Transmembran-Rezeptoren wirkt (siehe Abbildung 2). Dieses Protein kann aufgrund von Sequenzhomologien mit anderen Rezeptorfamilien in verschiedene Domänen eingeteilt werden.

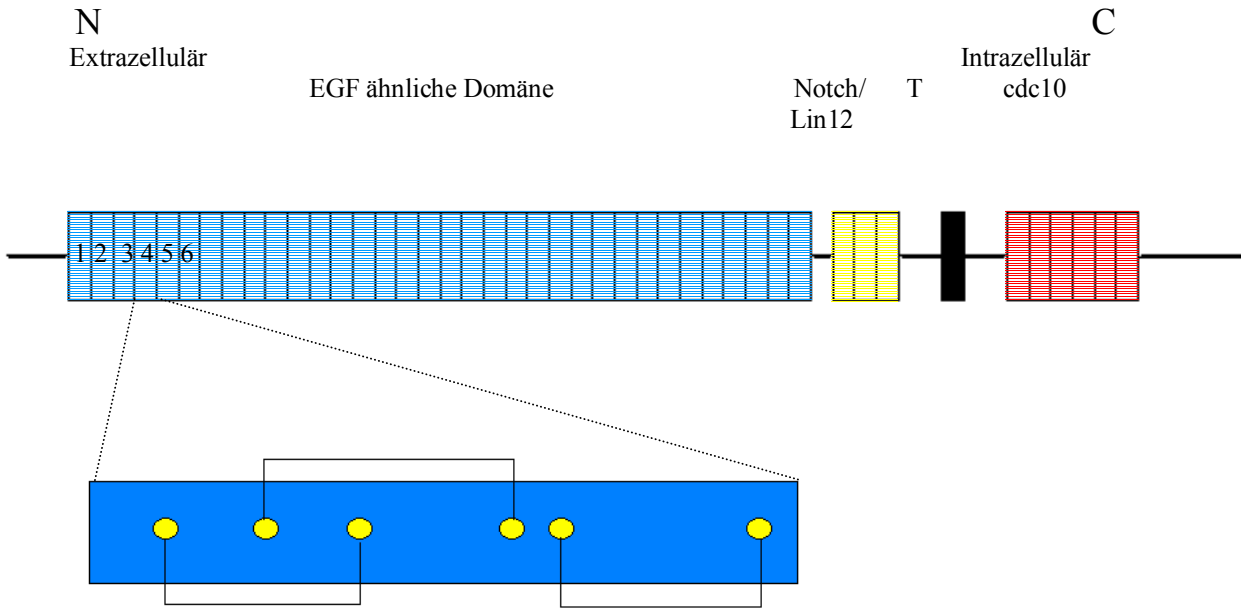


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Proteinstruktur des Notch3 Rezeptors: mit 34 EGF ähnlichen Domänen, drei Notch/Lin12, einer Transmembran Domäne (T) und sechs cdc10 Domänen. N= N-Terminus des Proteins, C= C-Terminus des Proteins. Der untere Teil der Abbildung gibt die Bindungsmuster der Cysteinreste (Bildung der Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinrest 1 mit 3, 2 mit 4 und 5 mit 6) innerhalb einer EGF Domäne wieder.

Die Extrazellularregion enthält 34 Kopien eines ca. 40 Aminosäuren langen Motivs, das sechs Cysteinreste enthält und zu Domänen des epidermal growth factor (EGF) homolog ist.
Innerhalb dieser EGF- Domänen sollen die Cysteinreste miteinander Disulfid-Brücken bilden (Cysteinrest 1 mit 3, 2 mit 4 und 5 mit 6) und so für die Struktur des Notch Protein hauptverantwortlich sein. Darüberhinaus enthält das Notch3 Genprodukt drei Notch/Lin12 Domänen, zwei hydrophobe Regionen, wie sie für Transmembrandomänen typisch sind und eine intrazelluläre Domäne. Diese enthält 6 Kopien eines 33 Aminosäure langen Repeats, das auch in ankyrin, cdc 10 und sw 16 gefunden wird. In der intrazellulären Domäne finden sich Glykolisierungsstellen und Phosphorylierungsstellen (Simpson et al., 1997).

Notch Genprodukte besitzen funktionell unterschiedliche Domänen. Eine der funktionell wichtigen konservierten, sich wiederholenden Einheiten des Notch3 Proteins bildet Abschnitte, die eine hohe Ähnlichkeit zu den Sequenzen des sogenannten epidermal growth factor (EGF) besitzen und deshalb als EGF ähnliche Domänen bezeichnet werden. Die EGF ähnliche Domäne befindet sich im extrazellulären Anteil des Genprodukts (siehe Abbildung 2). Innerhalb einer EGF Domäne wird zwischen den Cysteinresten ein typisches Bindungsmuster gebildet (siehe Abb.2), das durch Disulfidbrückenbindungen entsteht.
Die biologische Funktion von Notch3 Genprodukten liegt in der Regulation von embryonalen Differenzierungsvorgängen (Artavanis Tsakonas et al., 1997). Über eine Interaktion mit extrazellulären Liganden kontrollieren sie binäre Zellschicksalsentscheidungen wie beispielsweise die neurale/epidermale Zell-Spezifikation (Artavanis Tsakonas et al., 1991 und 1995). Die Funktion dieser EGF-Repeats besteht wahrscheinlich darin, einen regulatorischen Einfluß auf den Metabolismus und die Aktivität der intrazellulär gelegenen Domänen auszuüben (Artavanis Tsakonas et al., 1995; Struhl et al., 1993). Die intrazellulären Domänen des Genprodukts vermitteln die transkriptionelle Aktivierung bestimmter Gene (Artavanis Tsakonas et al., 1995). Es wurde die Modellvorstellung entwickelt, daß es durch Bindung eines Liganden (z.B. Delta, Serrate, Lag 2) zur proteolytischen Abspaltung der intrazellulären Domäne (S3) kommt, welche durch Einwanderung in den Zellkern weitere Gene aktiviert (Kopan et al., 1996). Dieses führt zur Aktivierung von Notch-Zielgenen (Gridley et al., 2003). Der extrazelluläre Anteil wird an der Schnittstelle (S2) geschnitten.

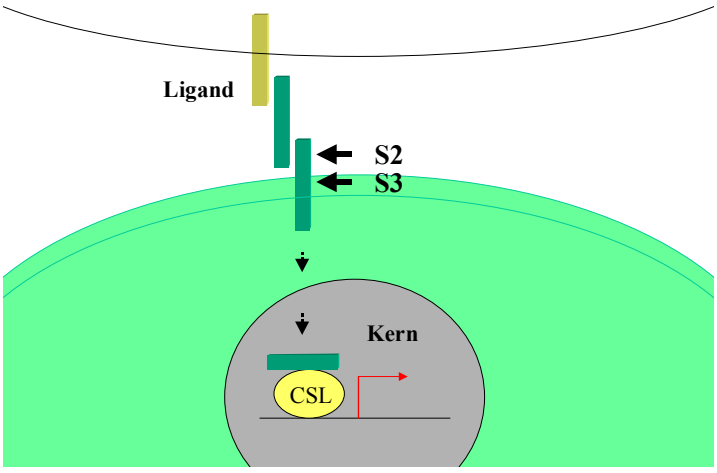


Abbildung 3: Vereinfachter Überblick über den Notch Signalweg bei Säugetieren. Die Liganden der Jagged (JAG1 und 2) und der Delta 1-4 Familie interagieren mit den Notch Transmembran Rezeptoren (Notch1-Notch4). Die Rezeptor-Liganden Interaktion induziert zwei proteolytische Schnitte (S2, S3) so daß die intrazelluläre Domäne die Zellmembran verläßt und in den Nucleus wandert, wo Sie mit CSL (CBF1, Su(H), and Lag-1) interagiert. Dieses führt zur Aktivierung von Notch-Zielgenen.

1.4.1. Molekulare Pathogenese

Über die Biochemie von humanem Notch3 und einem durch Aminosäureaustausch veränderten Notch3 ist wenig bekannt. Weiterhin unbekannt ist die molekulare Zusammensetzung und Entstehung der für die Krankheit charakteristischen osmiophilen Gefäßablagerungen. Notch3 wird ausschließlich in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert (Joutel et al., 2000). In Gehirnen von CADASIL Patienten wurden vermehrt Reste der proteolytischen Spaltprodukte von Notch3 gefunden. Dabei handelt es sich ausschließlich um Ablagerungen der extrazellulären Domäne (Molekulargewicht 210k Da) von Notch3 in den Gefäßwänden in der Nähe der osmiophilen Ablagerungen (Joutel et al., 2000).

1.5. Ausgangslage zu Beginn der Arbeit

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war durch eine französische Arbeitsgruppe (Joutel et al., 1996) das humane Notch3 kloniert worden. In der hier vorliegenden Arbeit ging es darum, das Mutationsspektrum in deutschen CADASIL Familien zu charakterisieren. Ausgangspunkt war dabei ein umfangreiches Kollektiv von Familien mit hautbioptisch gesicherter CADASIL Erkrankung. Für diese Untersuchungen wurde die Sequenzierung von *Notch3* etabliert. Bei der Erstauswahl (1996) der zu sequenzierenden Exons wurden zunächst die Exons 3, 4, 6 und 12 berücksichtigt, für die in der französischen Arbeit (Joutel et al., 1996) Mutationen nachgewiesen werden konnten.

Nachdem später die französische Arbeitsgruppe eine Häufung von Mutationen in Exon 3 und Exon 4 beschrieben hatte (Joutel et al., 1997) und da auch bei der eigenen Untersuchung an den ersten 20 Patienten fast nur in diesen Exons Mutationen auftraten, wurde die Mutationssuche auf diese beiden Exons konzentriert.

Dieser Bereich liegt in der Extrazellularregion des Rezeptors (siehe Abbildung 2). Der Clusterbereich befindet sich in der 5`-kodierenden Region des Gens. Ein Vergleich der humanen homologen Notch Polypeptidsequenzen ergab, daß diese Region in Bezug auf Cystein-Reste, wie in allen EGF Domänen, streng konserviert ist (Alignment siehe Abbildung 4). Cysteine bilden untereinander Disulfid-Brückenbindungen aus und bestimmen somit die räumliche Grundstruktur des Notch Proteins.

```
          1                                                    50
hnotchl   .MPPLLAPLL CLALL..PAL AARGPRCSQP GETCLNGGKC EA.ANGTEAC
hnotch3   .......... .......MGP GARGRRRRRR PMSPPPPPPP VR.ALPLLLL
hnotch4   MQPPSLLLLL LLLLLCVSVV RPRGLLCGSF PEPCANGGTC LSLSLGQGTC

          51                                                  100
hnotchl   VCGGAFVGPR CQDPNPCLST P.CKNAGTCH VV........ ..DRRGVADY
hnotch3   LAGPGAAAPP CLD.....GS P.CANGGRCT QL........ ..PSR...EA
hnotch4   QCAPGFLGET CQFPDPCQNA QLCQNGGSCQ ALLPAPLGLP SSPSPLTPSF

          150
hnotchl   ACSCALGFSG PLCLTPLDNA CLTNPCRNGG TCDLLTLT..  .EYKCRCPPG
hnotch3   ACLCPPGWVG ERC..QLEDP CHSGPCAGRG VCQSSVVAGT  ARFSCRCPRG
hnotch4   LCTCLPGFTG ERCQAKLEDP CPPSFCSKRG RCHIQASG..  .RPQCSCMPG

          151                                                 200
hnotchl   WSGKSCQQAD PCASNPCANG GQC.LPFEAS YICHCPPSFH GPTCRQDVNE
hnotch3   FRGPDCSLPD PCLSSPCAHG ARCSVGPDGR FLCSCPPGYQ GRSCRSDVDE
hnotch4   WTGEQCQLRD FCSANPCVNG GVC.LATYPQ IQCHCPPGFE GHACERDVNE

          201                                                 250
hnotchl   CGQKPRLCRH GGTCHNEVGS YRCVCRATHT GPNCERPYVP CSPSPCQNGG
hnotch3   C.RVGEPCRH GGTCLNTPGS FRCQCPAGYT GPLCENPAVP CAPSPCRNGG
hnotch4   CFQDPGPCPK GTSCHNTLGS FQCLCPVGQE GPRCELRAGP CPPRGCSNGG
```

Abbildung 4: Sequenzvergleich und Sequenzhomologie von humanem Notch1, 3 und 4 im Alignment, Ausschnitt vom Sequenzbeginn des Extrazellularteils = N-Terminus. Die hoch konservierten Cysteine sind grau unterlegt. Exon 3 beginnt mit dem gestrichelt umrandeten Cystein, danach stimmen alle Cysteine in ihrer relativen Lage überein d.h. sie sind stark konserviert.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

CADASIL ist unter anderem deshalb von erheblichem allgemeinen Interesse, weil man sich über das Verständniss von CADASIL hinaus auch Aufschlüsse über die häufigen Erkrankungen vaskuläre Demenz, Migräne und Schlaganfall verspricht. Über die molekulargenetischen und biochemischen Hintergründe dieser Erkrankungen ist bisher wenig bekannt.

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung des Mutationsspektrums in deutschen CADASIL Familien. Ausgehend von Befunden einer anderen Arbeitsgruppe, die über eine Häufung von Mutationen in Exon 3 und 4 berichtete (Joutel et al., 1997), sollte geklärt werden, ob sich diese Befunde auch in deutschen Familien bestätigen. Darüber hinaus waren die Ergebnisse aus der Sequenzierung genauer zu untersuchen. Neben der herkömmlichen Diagnosesicherung bei CADASIL durch klinische Befunde, Kernspintomographie, Hautbiopsie und Kopplungsanalyse wurde die Etablierung einer molekulargenetischen Diagnostik angestrebt. Sie soll zur frühen Erkennung der CADASIL-Erkrankung und Abgrenzung von anderen Erkrankungen dienen.

Ein weiteres Ziel war es, anhand der Untersuchungen Aussagen über mögliche Pathomechanismen bei CADASIL machen zu können. Deshalb sollten auch die Auswirkungen der Mutationen auf Proteinebene betrachtet werden.

2. Patienten

Untersucht wurden zunächst 70 Index-Fälle. Ausgewählt wurden die Index-Patienten nach folgenden Einschlusskriterien:

- Klinische Symptomatik mit ischämischen Episoden, kognitiven Störungen, Migräne mit Aura, psychiatrischen Auffälligkeiten oder einer Kombination davon.
- Mikroangiopathische Veränderungen im MRT
- Eine mit einem autosomal dominantem Erbgang vereinbare Familienanamnese und
- als wichtigstes Einschlußkriterium eine positive Hautbiopsie

Um zu zeigen, daß die Erkrankung und die gefundenen Mutationen im *Notch3* Gen kosegregieren, wurden neben den Index-Patienten 11 Familienangehörige in die Untersuchung einbezogen, wobei von sieben Index-Patienten jeweils ein Angehöriger untersucht wurde (Familie 1, 10, 13, 17, 22, 23, 27) und bei zwei Index Patienten (Familie 12 und 19) zwei Angehörige. Von den 11 Angehörigen waren zwei (Familie 13 und 27) nicht erkrankt.

Die klinischen Verläufe der in dieser Arbeit betrachteten Patienten sind größtenteils publiziert (Dichgans et al., 1998). Zusätzlich soll hier am Beispiel einer der in dieser Arbeit untersuchten Familien (Familie Nr.22) noch einmal eine typische CADASIL Familienanamnese dargestellt werden.

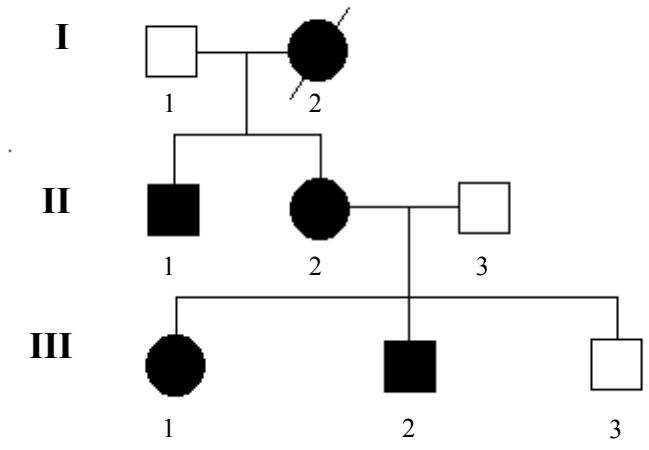


Abbildung 5: Stammbaum einer typischen CADASIL-Familie (Familie Nr. 22). Quadrate symbolisieren männliche Idividuen, Kreise weibliche Individuen. Die ausgefüllten Symbole stehen für die Erkrankten. Die durchgestrichenen Symbole kennzeichnen verstorbene Familienmitglieder.

Index-Patient (III;2): seit dem 25. Lebensjahr (Lj). Migräne mit Aura mit aufsteigenden Hemiparaesthesien, hemianopischen Gesichtsfelddefekten und nachfolgend kontralateralen, pochenden Kopfschmerzen retroorbital und fronto-temporal für bis zu mehreren Stunden.
Später rezidivierend Schlaganfälle, kognitive Störungen und Herzinfarkt.
MRT/CCT: ausgedehnte periventrikuläre Marklagerhypodensitäten, Lakunen im mittleren Pons, fronto-zentralen Marklager und in den Basalganglien.
Mutter (II;2): seit dem 45. Lj. rezidivierende fokal-neurologische Störungen, in den ersten Jahren im Sinne einer Migräne mit Aura. Später wurde sie zum Pflegefall mit zentraler Tetraparese und Pseudobulbärparalyse.
MRT/CCT: Schwere mikroangiopathische, supratentorielle Marklagerveränderungen. Lakunen im Pons, Basalganglien und im Corpus callosum.
Schwester (III;1): seit dem 39.Lj. Migräne mit Aura (rechts temporale Hemianopsie, links frontale Kopfschmerzen, leichte Dysphasie, einmalige Hemiparaesthesien).
MRT/CCT: deutliche beidseitige, fronto-zentral betonte Marklagerveränderungen.
Mütterlicherseits sind bei einem Onkel (II;1) Schlaganfälle beschrieben.
Großmutter mütterlicherseits (I;2) : früh einsetzende Schlaganfälle gefolgt von einer dementiellen Entwicklung.

3. Methoden

3.1. Gewinnung der DNA

Die Extraktion genomischer DNA aus peripherem Blut erfolgte durch Lyse von Lymphozyten mit anschließender alkoholischer Fällung der DNA.
Zur Gewinnung der DNA aus den Lymphozyten wurden folgende Puffer verwendet:

Erylyse - Puffer :	Ammoniumchlorid 155mM,
	Kaliumhydrogencarbonat 10mM, Na-EDTA 1mM, pH 7.4
SE-Puffer:	NaCl 75mM, Na-EDTA 25mM, pH 8.
TE - Puffer :	Tris-HCI 10mM, Na-EDTA 1mM, pH 7.4

Durchführung:
Jeweils ca. 20 ml EDTA-Blut der Patienten wurden in konische 50 ml Zentrifugenröhrchen eingefüllt, mit 30 ml Erylyse-Puffer aufgefüllt und geschwenkt. Nachfolgend wurde das Röhrchen 20 min. auf Eis gestellt, bis die Lösung dunkelrot und klar war, und mit 1700U/min. 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Röhrchen auf Papiertücher kopfüber abgestellt.
Damit sich das Pellet etwas vom Rand löste, mußte das Zentrifugenröhrchen mit dem spitzen Ende auf rauher Unterlage einige Male hin und her gerieben werden.
Nochmals wurden ca. 30 ml Erylyse-Puffer hinzugegeben und die oben beschriebenen Arbeitsschritte wiederholt. Anschließend wurden ca. 5 ml SE-Puffer eingefüllt und die Lösung gut geschüttelt (Vortex). Darauf wurden 250 µl SDS (20%-ige Lösung) hinzugegeben. Abschließend wurden 10 µl Pronase (20 mg/ml) dazu gegeben und alles gut auf dem Vortex gemischt. Der Ansatz inkubierte bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag schloss sich folgendes Procedere an: Zu der Lösung wurden 2,5ml NaCI (5M) dazugegeben und die Lösung wurde gemischt (Vortex) bis es schäumte. Daraufhin wurde erneut mit 2700 U/min, 10min bei 4°C zentrifugiert. Wenn das Pellet scharf begrenzt war, wurde die DNA-haltige Lösung in sterile 50 ml-Röhrchen abgefüllt. Wenn das Pellet unscharf begrenzt und die Lösung schlierig war, wurden weitere 50 ml NaCI (5 M) hinzugegeben und nochmals zentrifugiert. Nach der Zugabe von 2 Vol. absoluten Alkohols (bei -20°C gelagert) und leichtem Schütteln wurde die DNA sichtbar.
Die DNA wurde nochmals mit ca. 5-l0 ml 70%igen Alkohol gewaschen und dann mit einer Pipettenspitze herausgefischt und vorsichtig am Röhrchenrand hochgezogen. Die Flüssigkeit wurde herausgedrückt und die DNA in ein neues Reaktionsgefäß gefüllt, wo sie einige Stunden

offen zum Trocknen stehengelassen wurde, bis sie durchsichtig war. Schließlich wurden 500 µl – 1 ml TE Puffer hinzugegeben und alles bei 4°C bis zum Gebrauch gelagert. Zum Lösen der hochmolekularen DNA wurden die Gefäße über Nacht im Schüttler belassen und am nächsten Morgen die DNA- Menge im Photometer gemessen.

3.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

3.2.1. Theorie der PCR

Bei der PCR wird selektiv ein Abschnitt eines RNA oder DNA-Molekül vervielfältigt. Hierzu sind zwei sequenzspezifische Oligonukleotid-Primer notwendig, die, zueinander gegenläufig, sich an die komplementären DNA-Stränge binden. In einem Thermocycler durchläuft der Reaktionsansatz 30 bis 40 Zyklen. Im ersten Schritt des Zyklus wird die DNA denaturiert. Im zweiten Schritt, dem sogenannten Annealing, werden die Primer an die DNA hybridisiert, d.h. die Primer lagern sich an den komplementären DNA-Abschnitt.
Die Annealingtemperatur liegt zwischen 50°C und 65°C. Nun folgt die DNA-Synthese (Elongation) durch eine DNA-Taq-Polymerase entlang der Matrize in 5`->3`-Richtung bei ca. 72°C. Die aus Thermus aquaticus isolierte Taq-Polymerase sorgt für die exponentielle Vervielfältigung definierter doppelsträngiger DNA. Das Amplifikationsprodukt der PCR analysiert man durch eine Gelelektrophorese. Das vervielfältigte Fragment kann man nach Etidiumbromidfärbung als Bande erkennen. Das PCR-Produkt kann in Plasmid- Vektoren ligiert oder/und durch DNA-Sequenzierung weiter untersucht werden.

3.2.2. Primerdesign als Voraussetzung für die PCR

Um mit Hilfe der Taq-Polymerase eine PCR durchzuführen, sind Startmoleküle (Primer) notwendig. Primer sind Nukleinsäuresequenzen, die spezifisch für die Sequenzen des DNA-Abschnittes sind, der vermehrt werden soll. Diese Nukleinsäuresequenzen bestehen aus einzelsträngigen DNAs mit einer Länge von in der Regel 18 bis 25 Basen. Neben der Anwendung bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sind sie auch für die Sequenzierreaktion notwendig. Um ein spezifisches Produkt zu amplifizieren, müssen beim Design der Primer einige wichtige Regeln beachtet werden:
Der Gehalt an Guanin und Cytosin sollte nicht über 60 % liegen, um so eine hohe Anlagerungstemperatur zu erreichen. Sich wiederholende Motive sind zu vermeiden. Je höher die Anlagerungstemperatur, desto spezifischer ist das PCR-Produkt, weil aufgrund der höheren Bindungskräfte der adäquaten Primer/DNA Sequenz eine passende Paarbildung stattfindet. Am 3`-Ende sind G oder C wegen der stärkeren Bindung an die komplementäre Sequenz zu empfehlen. Um die Bildung von Artefakten durch Primerdimere zu verhindern, muß darauf geachtet werden, daß die Primerpaare nicht komplementär zueinander sind. Eine effektive PCR war dadurch gewährleistet, daß die Anlagerungstemperaturen von sense- und antisense-Primer gleich gewählt wurden.

3.2.3. Verwendete Primer

Zu Beginn der Arbeit lagen die Ergebnisse von Joutel et al. (1997), welche eine Häufung von Mutationen in Exon 3 und 4 des *Notch3* Gens zeigten, noch nicht vor. Bei der Auswahl der zu sequenzierenden Exons wurden daher zunächst solche berücksichtigt, für die in der ursprünglichen Arbeit (Joutel et al.; 1996) bereits Mutationen nachgewiesen werden konnten. Die verschiedenen Exons dienen jetzt auch zum Vergleich der Mutationsfrequenz und –arten.
In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit verwendeten intronischen Primer aufgeführt.

Exon	Domänen	Primer	5` → 3`	PCR-Produkt/ Länge in Bp	Annealing Temp.(°C)
3	EGF 1-2	N1F N1R	TGTGCTGCCCAACCAAGCCA ACTGACCACACCCCCGACTA	224	65
4	EGF 2-5	N2F N3R	TAGTCGGGGGTGTGGTCAGT CCTCTGACTCTCCTGAGTAG	420	65
6	EGF 6-8	N13F N13R	TGGACTGCTGCATCTGTGTG ATCCATGGCTCCCTGCAGAG	322	65
12	EGF 15-16	N5F N5R	TGGCCACTCCATGCCATGTT TCTCATGGCAGCCACTTGCC	166	65

Tabelle 1: verwendete intronische Primer für Exon3, 4, 6 und 12
F= Forward Primer
R=Revers Primer.

3.2.4. Protokoll zur Etablierung einer optimierten PCR

Um eine optimale Qualität der PCR-Produkte zu erhalten, mußten geeignete Bedingungen für die PCR-Reaktion etabliert werden. Im Reaktionsansatz wurden verschiedene $MgCl_2$-Konzentrationen, Primer-Konzentrationen und unterschiedliche Gesamtvolumenansätze erprobt. Im Rahmen der Arbeit wurde folgender optimaler Reaktionsansatz für die PCR ermittelt:

6 µl PCR-Puffer 10 x mit 15 mM $MgCl_2$
6 µl $MgCl_2$(25mM)
23,5 µl Bidest H_2O
je 1,4 µl (1pmol/µl) Forward und Revers Primer
1,2 µl dNTP (10mM)
0,5 µl Taq-Polymerase (5U/µl)
10 µl DNA (10ng/µl)

Der wichtigste Parameter bei der Etablierung der PCR ist die Bestimmung der Annealing Temperatur. Bei niedrigeren Temperaturen lagern sich die Primer zwar leichter an, dabei entstehen allerdings vermehrt unspezifische Produkte. Auch die Anzahl der Zyklen muß so angepaßt werden, daß ausreichend Produkt entsteht, aber die Menge an unerwünschten unspezifisch amplifizierten PCR-Produkten möglichst klein bleibt. Es wurden bei der Thermocyclerreaktion verschiedene Parameter, wie z.B. Annealing-Temperaturen von 54°C bis 65°C, Reaktionszeit und Zyklusanzahl (25-40) getestet. Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler mit oder ohne Deckelbeheizung unter Zusatz von 20µl Mineralöl durchgeführt. Für den Thermocycler haben sich folgende Bedingungen zur Amplifikation aller Exons bewährt:

Initiale Denaturierung für 5 min. bei 94°C, gefolgt von 35 Zyklen mit 94°C für 30 sec. (Denaturierung), 65°C für 30 sec. (Annealing) und 72°C für 30 sec. (Extension). Abschließend wurde ein weiterer Extensionsschritt für 7 Minuten programmiert und damit eine letzte Verlängerung für nicht vollständig synthetisierte Nukleotidsequenzen bei 72°C durchgeführt.

3.2.5. Elektrophorese für die PCR-Produkt Kontrolle

Als Standardverfahren ist die Agarosegel-Elektrophorese für eine erste Analyse von PCR-Produkten unerläßlich. Die Auftrennung der DNA-Produkte durch das Agarosegel im elektrischen Feld hängt von verschiedenen Bedingungen ab. Am wichtigsten ist die Größe (Länge) der DNA. Darüber hinaus haben die Stromstärke, die Pufferbedingung und vor allem die Agarosekonzentration Einfluß auf die Wanderung der DNA-Stücke. Die Elektrophorese wurde mit einer Stromstärke von 70 bis 150 mA für 30 bis 60 min durchgeführt. Für die ca. 300 bis 500 Bp langen PCR-Produkte wurde eine Agarosekonzentration von 2 % gewählt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel, das bereits Ethidiumbromid enthält, auf ein UV-Transilluminator gelegt und zur Dokumentation ein Foto angefertigt. Zur Bestimmung der Länge der PCR-Produkte wurde in einer Spur ein DNA-Größenmarker mitgeführt. Als Marker diente MspI-verdaute pBR 322 DNA. TBE wurde als Puffer für die Agarosegel-Elektrophorese verwendet. Zum Eluieren (Herauslösen) von PCR-Produkten aus Agarosegelen wurde TAE-Puffer verwendet, damit die Banden besser ausgeschnitten werden konnten.

3.2.6. Reinigung der PCR-Produkte

Das PCR-Produkt wurde für die Sequenzierreaktion verwendet. Damit die Sequenzierreaktion reibungslos ablief, mußten überschüssige Primer, Proteinreste, Mineralöl, wie auch freie Nukleotide und die Taq-Polymerase aus dem PCR- Ansatz entfernt werden. Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene Möglichkeiten der DNA-Isolierung und Reinigung getestet, u. a. mit Glasmilch, Amiconsäulen und die Reinigung mittels Qiaquick PCR purfication Kit. Die Anwendung des Quiagen Kits hat sich für die Sequenzierung als die am kostengünstigste und effektivste Methode erwiesen. Etwa 20 µl PCR-Produkt wurden gereinigt, indem sie in einer Säule mit Hilfe von chaotrophen Salzen an Glas- oder Silica-Oberflächen gebunden wurden. Nach mehreren Waschvorgängen wurde das PCR-Produkt mit einem Niedrigsalzpuffer (TE) eluiert. Zur erneuten Kontrolle, ob die Reinigung erfolgreich war, wurden 1/10 des gereinigten PCR-Produktes auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.
In einigen wenigen PCR-Proben war eine Abtrennung der gewünschten Produkte via Ausschneiden aus dem Agarosegel nötig, weil Nebenprodukte vorhanden waren. Ansonsten funktionierte die PCR für Exon3 und 4 ohne Nebenprodukte. Für das Eluieren von PCR-Produkten aus Agarosegelen wurde der Qiaquick Gel Extraktion Kit verwandt.

3.3. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe der biochemischen Methode von F. Sanger nach der Didesoxy- oder Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1992). Bei dieser Methode kann man entweder die Primer oder die Terminatoren mit Farbstoffen markieren. In dieser Arbeit wurden das ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit und später das Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit verwandt. Bei der Sequenzierreaktion wurde, mit Hilfe einer DNA-Polymerase an einer Einzelstrang-DNA mit einem Primer als Startmolekül, ein neuer komplementärer DNA-Strang hergestellt. Allerdings enthielt das Nukleotidgemisch zusätzlich Didesoxynukleotide (ddNTP). Diese Didesoxynukleotide oder Abbruchnukleotide haben keine 3`-OH-Gruppe, so daß es die Synthese unterbricht, sobald ein ddNTP eingebaut wird. Nach dem Zufallsprinzip entstehen so DNA-Stränge von unterschiedlicher Länge, die in einem 4,5%igen Polyacrylamidgel gemäß ihrer Größe aufgetrennt werden. Da die Abbruchnukleotide mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (Big Dye Terminatoren), konnten die vier verschiedenen Didesoxynucleotide anhand unterschiedlicher Farbstoffe bei unterschiedlichen Emmissionsmaxima detektiert und differenziert werden. Dies geschah nach einer gewissen Trennstrecke durch einen Laser mit einem Wellenlängenmaximum bei 488 und 512 nm. Das emittierte Licht wurde durch eine CC-Kamera detektiert und mit einer Matrix abgeglichen. Für die Elektrophorese (Sequenziergerät ABI PRISM 377 DNA Sequencer) wurde ein denaturierendes Polyacrylamidgel unter Zusatz von Harnstoff verwendet; es dient zur Trennung von Einzelstrang-DNA. Damit die DNA einzelsträngig ist, wurde sie vor dem Laden hitzedenaturiert und auf Eis abgekühlt. Eine Heizplatte sorgt während der Elektrophorese für konstante 50°C.

3.3.1. DNA-Sequenzierreaktion

Als DNA-Template wurden gereinigte PCR-Produkte mit Längen wie in Tabelle 1 beschrieben eingesetzt .
Für die Sequenzierung wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

2 µl	Sequenzier Reaktions Mix (Big Dye)
3-6 µl (60-100nm)	PCR-Produkt
1 µl	Primer
1-3 µl	H_2O

Beide Stränge wurden in je zwei Sequenzierreaktionen mit Sense- und Antisense-Primern (Forward und Reverse Primer) angesetzt. Zwar lassen sich in den meisten Fällen Mutationen auch schon durch Sequenzierung in einer Strangrichtung identifizieren. Zum Ausschluss von möglichen Sequenzier-Artefakten ist jedoch das Vorliegen der Daten von beiden Sequenzierrichtungen erforderlich. Für die Sequenzierreaktion im Thermocycler wurden folgende Bedingungen eingestellt: 96°C 10 sec., 50°C 5 sec., 60°C 4 min. (30 Zyklen).

3.3.2. Reinigung der Sequenzier-Produkte

Nach der Sequenzierreaktion erfolgte die Reinigung der Sequenzierprodukte zur Abtrennung von überschüssigen Dye-Terminatoren, DNA-Polymerase und Mg-Salzen. Hierzu wurde das Produkt der Sequenzreaktion mittels Alkohol gefällt. Um die vollständige Entfernung von Primern zu erreichen wurde das Sequenz-Produkt (ca. 60 µl) auf das Doppelte mit H_2O Bidest aufgefüllt und der Fällungsansatz verdoppelt. Es werden 4 µl Natriumacetat mit einem pH von 4,8 und 100 µl absoluter Ethanol dazugegeben. Nach dem Mischen wurde 30 min. bei Raumtemperatur mit 14.000 rpm zentrifugiert. Der die Verunreinigungen enthaltene Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde erneut für 10 min. bei Raumtemperatur mit 14.000 rpm zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wurde das Pellet getrocknet. Dies geschah entweder bei RT oder im Trockenschrank für 6 bis 12 h. oder in der Vakuumzentrifuge für 3 min. Danach wurden die Proben im Ladepuffer (Formamid 25 mM, EDTA pH 8,0) und 50 mg/ml Bluedextran im Verhältnis 4:1 resuspendiert. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurden die Proben 2 min bei 95°C denaturiert und dann auf Eis gehalten.

3.3.3. Gel-Aufbau, Zusammensetzung und Anwendungsbedingungen

Zur Sequenzierung wurde der ABI PRISM 377 DNA Sequencer verwendet. Dabei wurde ein 4,5%iges Polyacrylamidgel (29:1 Acrylamid/Bisacrylamid) mit Zusatz von 6 M Harnstoff verwendet. Harnstoff wirkt denaturierend auf die DNA. So wird das Entstehen von Sekundärstrukturen verhindert. Dadurch wird bei der elektrophoretischen Auftrennung die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA überwiegend durch ihre Größe und nicht durch die Sekundärstruktur bestimmt. Das Gel hatte folgende Zusammensetzung: 18 g Urea in 7,5 ml 30%iger deionisierter Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung, 6 ml zehnfach TBE Puffer und 20 ml H_2O Bidest. Nach dem Zusammenmischen wurde auf eine vollständige Lösung der Reagenzien geachtet. Die Gel-Lösung wurde dann mittels einer Wasserstrahlpumpe und einem Filter mit 0,2 µm Porengröße filtriert. Danach wurde die Lösung 15 min. in einem Vakuumexsikkator entgast. Zum Start der Polymerisation wurden 350 µl 10%ige Ammoniumperoxodisulfatlösung (APS) und 15 µl TEMED zugegeben.

Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen (36 cm WTR; 0,2 mm Gelstärke) und bis zur vollständigen Polymerisation zwei Stunden in horizontaler Lage belassen. Nach Anbringen des Gelrahmens an den automatischen Sequenzer, wurden die Pufferkammern mit 1 x TBE-Puffer gefüllt und der Vorlauf zur Equilibrierung des Gels gestartet. Das Gel wurde auf 51°C vorgewärmt, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen der DNA zu verhindern.

Nach Auftragen der DNA-Proben wurde die Sequenzanalyse bei einer Spannung von 2700 V und einer Temperatur von 51°C durchgeführt; die Laufzeit der Gele betrug ca. 1½ bis 2 h bei einer Basendurchlaufgeschwindigkeit im Gel von etwa 200 Basen/h. Es konnten bis zu 36 Proben mit 1,5 bis 2 µl der Probenlösung auf das Gel geladen werden.

3.3.4. Sequenzanalysenauswertung

Mit dem Factura Programm (Factura, Applied Biosystems) wurden die Sequenzdaten weiter bearbeitet, um Unklarheiten zu untersuchen. Anschliessend wurden die ermittelten Sequenzdaten mit der des Gegenstranges oder einer anderen bekannten Sequenz verglichen (Sequence Navigator, Applied Biosystems).

3.4. Restriktionsanalysen

Vor der praktischen Durchführung von Restriktionsanalysen erfolgte die Auswahl der Restriktionsenzyme mit Hilfe des Computerprogramms Lasergene; Unterprogramm Genequest der Firma DNASTAR. Hierzu wurden die WT-Sequenzen der Exons3 oder 4 in einer Fragmentlänge in den Rechner eingegeben (ohne Primer), wie sie annähernd bei der PCR-Reaktion entstehen. Die Sequenzen wurden dann mit dem größtmöglichen Kontingent an bekannten Restriktionsenzymen simulativ geschnitten. Anschließend wurde in der Wildtypsequenz eine Base ausgetauscht, wie sie einer bekannten Mutation z.B. R133-C entspricht, das bedeutet auf DNA Ebene eine Veränderung von cgc nach tgc. Die mutierte Sequenz wurde erneut mit den bekannten Restriktionsenzymen simulativ geschnitten. Bei dem anschließenden Vergleich der Restriktionsmuster der mutierten Sequenz mit der Wildtypsequenz können diese von einander diskriminiert werden. Mit dem Programm Genequest (Lasergen von DNASTAR) kann der Restriktionsverdau auf dem Gel simuliert werden.

3.5. Proteinmodelling

Mögliche Auswirkungen der Mutationen auf die dreidimensionale Struktur des Proteins können anhand von Computersimulationen ermittelt werden. Allerdings ist die Fehlerwahrscheinlichkeit einer Vorhersage recht hoch. Erschwerend kommt hinzu, daß für Notch Rezeptoren bislang keine Röntgenstrukturdaten vorliegen.
Das Proteinmodelling wurde daher auf Basis der NMR-Struktur der Calcium bindenden EGF Domäne (Domänen 32 und 33) des menschlichen Fibrillin-1, im Alignment mit der EGF Domäne des humanen Notch3 durchgeführt (Downing et al., 1996).

4. Ergebnisse

4.1. Molekulargenetische Untersuchungen

4.1.1. Zuordnung der Mutationen und Polymorphismen zu den Index-Patienten

Indexpatienten von 70 nicht verwandten CADASIL Familien wurden mittels Sequenzierung des PCR-Produkts der genomischen DNA auf Mutationen in Exon 3 und 4 des *Notch3* Gens untersucht. 20 Patienten wurden zusätzlich auf Mutationen in Exon 6 und 12 untersucht (siehe auch 1.5.). Bei 51 Index-Patienten (73%) wurden Mutationen gefunden (siehe Tabelle 2a). Von den 21 verschiedenen Mutationen waren 19 (90%) Missense-Mutationen und 2 (10%) waren Deletionen. Auβerdem wurden 41 Polymorphismen detektiert (siehe Tabelle 2a/b).

MUTATIONEN					POLYMORPHISMEN			
Familie	Mutation in Exon	Domäne	Nukleotid Austausch	AS Austausch	Polymor-phismus in Exon	Domäne	Nukleotid Austausch	AS Austausch
28	N3	EGF2	Deletion	del D80-S84	N3	EGF2	acc-act	T101-T
1	N3	EGF2	cgt-tgt	R90-C				
2	N3	EGF2	cgt-tgt	R90-C				
3	N3	EGF2	cgt-tgt	R90-C				
27	N3	EGF2	cgt-tgt	R90-C	N3	EGF2	acc-act	T101-T
59	N3	EGF2	cgc-tgc	R90-C				
65	N3	EGF2	cgc-tgc	R90-C	N4	EGF2	cct-ccc	P115-P
30	N3	EGF2	tgc-ttc	C93-F				
4	N3	EGF2	cgt-tgt	R110-C	N3	EGF2	acc-act	T101-T
31	N3	EGF2	cgt-tgt	R110-C				
48	N3	EGF2	cgt-tgt	R110-C				
8	N4	EGF3	tgc-ttc	C117-F				
13	N4	EGF3	tgc-ttc	C123-F	N3	EGF2	acc-act	T101-T
5	N4	EGF3	cgc-tgc	R133-C				
6	N4	EGF3	cgc-tgc	R133-C				
17	N4	EGF3	cgc-tgc	R133-C	N3	EGF2	cag-caa	Q94-Q
33	N4	EGF3	cgc-tgc	R133-C				
35	N4	EGF3	cgc-tgc	R133-C				
42	N4	EGF3	cgc-tgc	R133-C	N3	EGF2	acc-act	T101-T
49	N4	EGF3	cgc-tgc	R133-C	N3	EGF2	acc-act	T101-T
55	N4	EGF3	cgc-tgc	R133-C				
63	N4	EGF3	cgc-tgc	R133-C	N3	EGF2	acc-act	T101-T
68	N4	EGF3	cgc-tgc	R133-C	N3	EGF2	cag-caa	Q94-Q
25	N4	EGF3	cgc-tgc	R141-C	N3	EGF2	acc-act	T101-T
25					N4	EGF5	gcg-gca	A202-A
26	N4	EGF3	cgc-tgc	R141-C				
40	N4	EGF3	cgc-tgc	R141-C				
53	N4	EGF3	cgc-tgc	R141-C				
70	N4	EGF3	cgc-tgc	R141-C				
16	N4	EGF3	tgc-tcc	C144-S	N3	EGF2	acc-act	T101-T
62	N4	EGF3	tgc-tac	C144-Y				
67	N4	EGF3	tac-tgc	Y150-C	N4	EGF5	gcg-gca	A202-A
50	N4	EGF3	cgc-tgc	R153-C				

Familie	Mutation in Exon	Domäne	Nukleotid Austausch	AS Austausch	Polymor-phismus in Exon	Domäne	Nukleotid Austausch	AS Austausch
54	N4	EGF3	cgc-tgc	R153-C				
39	N4	EGF3	Deletion	delR153-C155				
7	N4	EGF4	cgc-tgc	R169-C				
23	N4	EGF4	cgc-tgc	R169-C				
52	N4	EGF4	cgc-tgc	R169-C				
60	N4	EGF4	cgc-tgc	R169-C	N4	EGF5	gcg-gca	A202-A
66	N4	EGF4	cgc-tgc	R169-C	N3	EGF2	acc-act	T101-T
66					N4	EGF5	gcg-gca	A202-A
10	N4	EGF4	tgc-tac	C174-Y	N3	EGF2	acc-act	T101-T
10					N4	EGF3	cga-cgg	R156-R
12	N4	EGF4	cgc-tgc	R182-C				
22	N4	EGF4	cgc-tgc	R182-C	N3	EGF2	acc-act	T101-T
34	N4	EGF4	cgc-tgc	R182-C				
38	N4	EGF4	cgc-tgc	R182-C	N3	EGF2	acc-act	T101-T
43	N4	EGF4	cgc-tgc	R182-C				
57	N4	EGF4	cgc-tgc	R182-C	N3	EGF2	acc-act	T101-T
57					N4	EGF5	gcg-gca	A202-A
9	N4	EGF4	tgc-cgc	C183-R	N4	EGF5	gcg-gca	A202-A
51	N4	EGF4	tgc-agc	C183-S	N4	EGF2	cct-ccc	P115-P
61	N4	EGF4	tgt-cgt	C185-R	N3	EGF2	acc-act	T101-T
15	N4	EGF4	tgt-ttt	C194-F	N3	EGF2	acc-act	T101-T
15					N4	EGF2	cct-ccc	P115-P
19	N6	EGF6	gcc-tgc	A319-C	N3	EGF2	cag-caa	Q94-Q

Tabelle 2a: Zuordnung der Mutationen und Polymorphismen zu den Index-Patienten.
Die Tabelle wurde aufsteigend nach der Aminosäurenummer geordnet.

Familie		Polymor-phismus in Exon	Domäne	Nukleotid Austausch	AS Austausch
45		N3	EGF2	ccc-cgc	P81-R
14		N3	EGF2	acc-act	T101-T
21		N3	EGF2	acc-act	T101-T
24		N3	EGF2	acc-act	T101-T
45		N3	EGF2	acc-act	T101-T
46		N3	EGF2	acc-act	T101-T
58		N3	EGF2	acc-act	T101-T
64		N3	EGF2	acc-act	T101-T
44		N4	EGF2	cct-ccc	P115-P
24		N4	EGF3	cga-cgg	R156-R
18		N4	EGF5	gcg-gca	A202-A
41		N4	EGF5	gcg-gca	A202-A
56		N4	EGF5	gcg-gca	A202-A
64		N4	EGF5	gcg-gca	A202-A

Tabelle 2b: Familien , bei deren Index-Patienten nur Polymorphismen gefunden wurden.

Bei den folgenden Familien wurden weder Mutationen noch Polymorphismen gefunden:

11, 20, 29, 32, 36, 37, 47, 69.

4.1.1. Mutationen

Folgende Mutationen des Notch3 Gens wurden bei der direkten Sequenzierung von Exon 3 und 4 bei 70 Index-Patienten gefunden (siehe Tabelle 3).
Dreizehn der gefundenen Mutationen waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch nicht beschrieben (in Tabelle 3 mit * gekennzeichnet).

Exon	Domäne	Nukleotid Austausch	Nukleotid Position	Aminosäure Austausch	Anzahl Mutationen deutsche Familien	Anzahl Mutationen französische Familien**	Gesamt
N3	EGF2	Deletion	317-331	del D80-S84*	1		1
N3	EGF2	cgt-tgt	346	R90-C	6	4	10
N3	EGF2	tgc-ttc	356	C93-F*	1		1
N3	EGF2	cgt-tgt	406	R110-C	3	2	5
N4	EGF3	tgc-ttc	428	C117-F*	1		1
N4	EGF3	tgc-ttc	446	C123-F*	1		1
N4	EGF3	cgc-tgc	475	R133-C	10	3	13
N4	EGF3	cgc-tgc	499	R141-C	5	6	11
N4	EGF3	tgc-tcc	509	C144-S*	1		1
N4	EGF3	tgc-tac	509	C144-Y*	1		1
N4	EGF3	tac-tgc	526	Y150-C*	1		1
N4	EGF3	cgc-tgc	535	R153-C	2	2	4
N4	EGF3	Deletion	537-545	del R153-C155*	1		1
N4	EGF4	cgc-tgc	583	R169-C	5	5	10
N4	EGF4	tgc-tac	599	C174-Y*	1		1
N4	EGF4	cgc-tgc	622	R182-C	6	3	9
N4	EGF4	tgc-cgc	625	C183-R*	1		1
N4	EGF4	tgc-agc	625	C183-S*	1		1
N4	EGF4	tgt-cgt	631	C185-R	1	1	2
N4	EGF4	tgt-ttt	659	C194-F*	1		1
Gesamtzahl					50	26	**76**

Tabelle 3: Mutationen in Exon3 und 4 bei 70 Index-Patienten. Zur Identifikation der Mutationen wurde in Spalte 4 die Position des betroffenen Nucleotids nach der Accession ID U97669 verwendet (siehe auch Anhang Abbildung 18 Seite 72). Nach dieser Nummerierung wurde die Tabelle geordnet. In Spalte 5 ist die ausgetauschte Aminosäure (AS) mit Nummer angegeben. Dabei ist die neu entstandene Aminosäure durch einen Bindestrich abgetrennt. Zur Nomenklatur der Aminosäuren siehe Tabelle 14 im Anhang. *= Neu beschriebene Mutationen. **= Aus der Arbeit von Joutel et al.(1997) sind hier nur diejenigen Mutationen berücksichtigt, die auch in der vorliegenden Arbeit gefunden wurden und die in den Berechnungen verwendet werden (Tabelle 10).

Insgesamt wurden bei 50 der 70 Indexpatienten Mutationen in Exon 3 oder 4 des *Notch3* Gens gefunden. Daraus ergibt sich eine Erfolgsrate bei der Detektion von Mutationen in diesen beiden Exons von 71%. Bevor bekannt wurde, daß sich die Mutationen in Exon 3 und 4 häufen (durch die französische Arbeitsgruppe (Joutel et al.,1997)), wurden Exon 6 und 12 bei 20 Indexpatienten sequenziert, von denen später ein Großteil Mutationen in Exon 3 oder 4 aufwiesen. Lediglich in Exon 6 wurde eine weitere Mutation (Tabelle 4) gefunden. In Exon 12 wurde keine Mutation gefunden. Aus diesen Ergebnissen ergeben sich Folgerungen für die genetische Diagnostik (siehe Diskussion). Einige Mutationen wurden mehrfach gefunden. Die Frage, ob bestimmte Mutationen gehäuft auftreten, wird weiter unten diskutiert
(siehe Auswertung).

Exon	Domäne	Nukleotid Austausch	Nukleotid Position	Aminosäure Austausch	Anzahl Mutationen deutsche Familien	Anzahl Mutationen französische Familien	Gesamt
N6	EGF6	gcc-tgc	1033-1034	A319-C*	1	0	1

Tabelle 4: Doppelmutation in Exon 6; Erläuterungen siehe Legende zu Tab.3

4.1.2. Polymorphismen

Zusätzlich zu den Mutationen wurde eine Reihe von Polymorphismen identifiziert (siehe Tabelle 5). In den meisten Fällen kommt es bei den gefundenen Polymorphismen zu keinem Aminosäureaustausch.

Bei 35 der 70 Indexpatienten, wurden insgesamt 42 Polymorphismen gefunden. Vorkommen im einzelnen: Q94=3, T101=23, P115=4, R156=2, A202=10. In den anderen untersuchten Exons (6 und 12) wurden keine Polymorphismen detektiert. Einige Indexpatienten wiesen mehrere Polymorphismen auf (siehe Tabelle 2a).

Exon	Domäne	Nukleotid Austausch	Nukleotid Position	Aminosäure-Austausch	Frequenz in 70 Individuen
N3	EGF2	cag-caa	360	keiner :Q94	3/70
N3	EGF2	acc-act	381	keiner :T101	23/70
N4	EGF2	cct-ccc	423	keiner :P115	4/70
N4	EGF3	cga-cgg	546	keiner :R156	2/70
N4	EGF5	gcg-gca	684	keiner :A202	10/70

Tabelle 5: Polymorphismen in Exon 3 und 4 in 70 Individuen.

4.1.3. Übersicht über die Mutationen und Polymorphismen in Exon 3 und 4

Die Mutationen und Polymorphismen in Exon 3 und 4, die bisher in deutschen Familien gefunden wurden, lassen sich zusammengefaßt wie folgt darstellen (siehe Abbildung.6 /7).

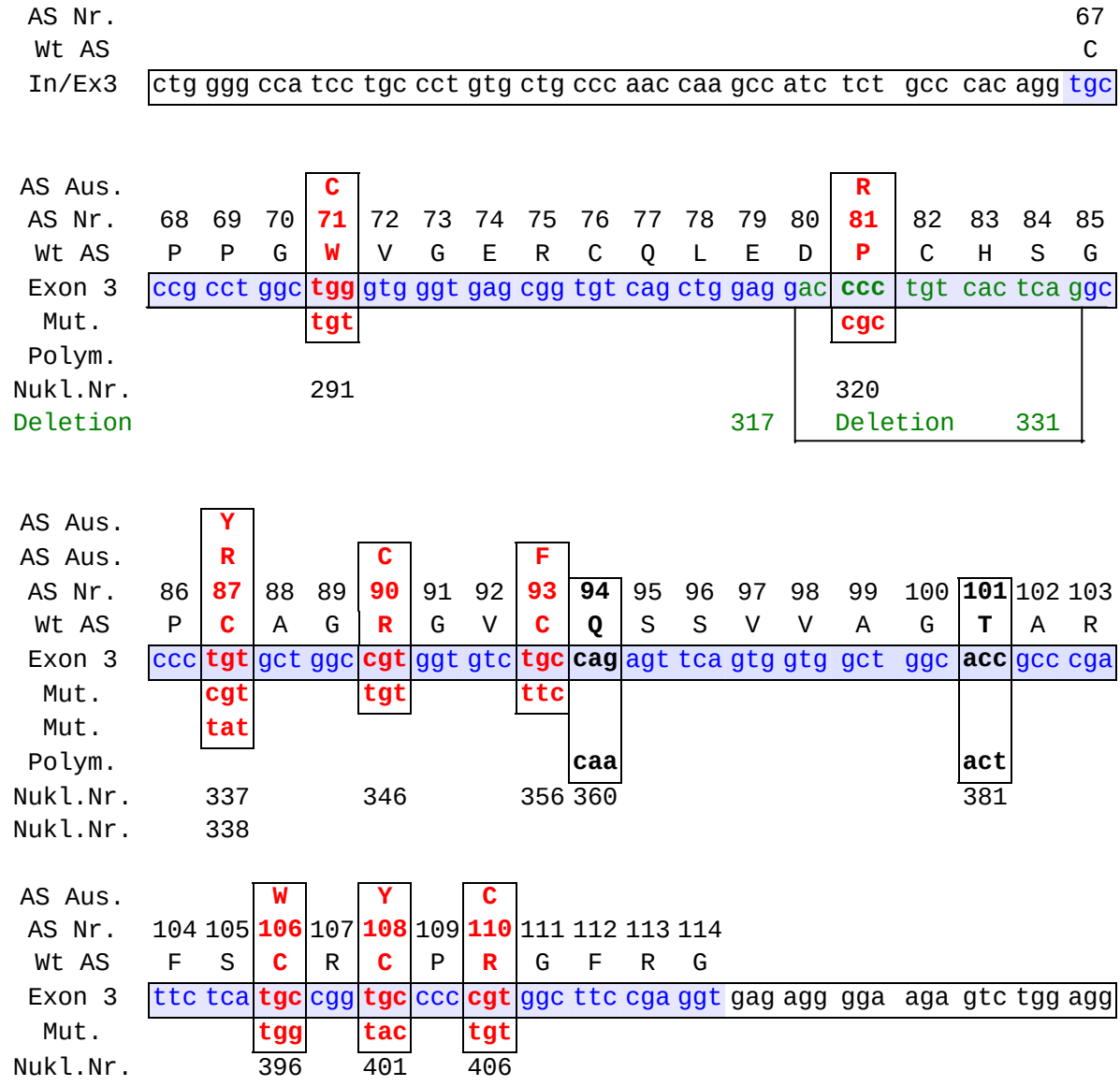


Abbildung 6: Übersicht über Mutationen und Polymorphismen in Exon 3.

Bedeutung der Abkürzungen: AS Aus.= ausgetauschte Aminosäure, AS Nr.= Nummer der Aminosäure, Wt AS= Aminosäure in der Wildtypsequenz, Exon 3= DNA Sequenz vom WT von Exon 3 (blau schraffiert), Mut.= mutierte DNA-Sequenz, Polym.= durch Polymorphismus veränderte DNA-Sequenz, Nukl.Nr.= Nukleotid Nummer.

Punktmutationen sind rot gezeichnet. Die Deletionen sind grün markiert. Polymorphismen sind dick gedruckt.

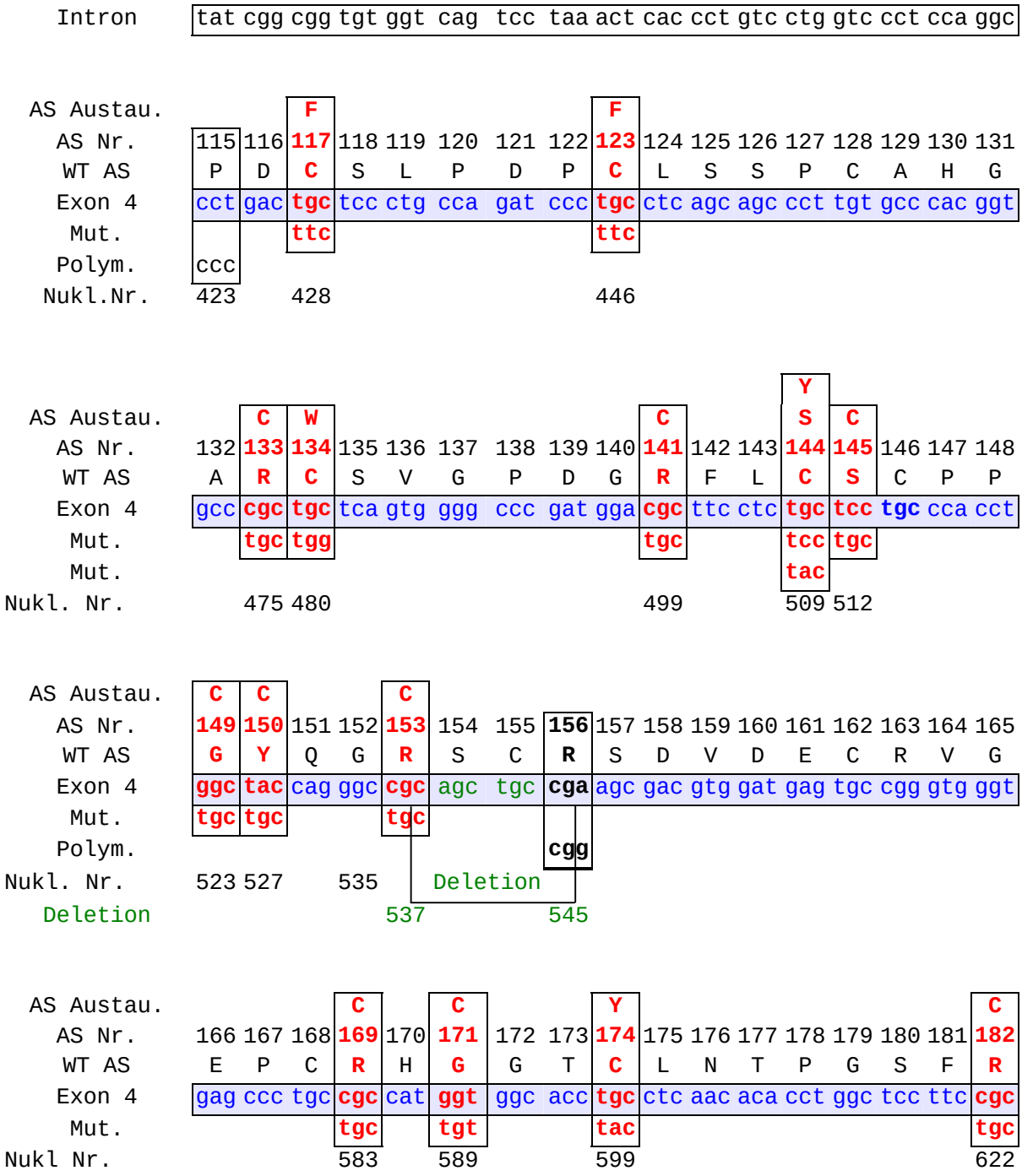


Abbildung 7a: Übersicht über Mutationen und Polymorphismen in Exon 4 bis Aminosäure Nr.182; Abkürzungen wie in Abbildung 6.

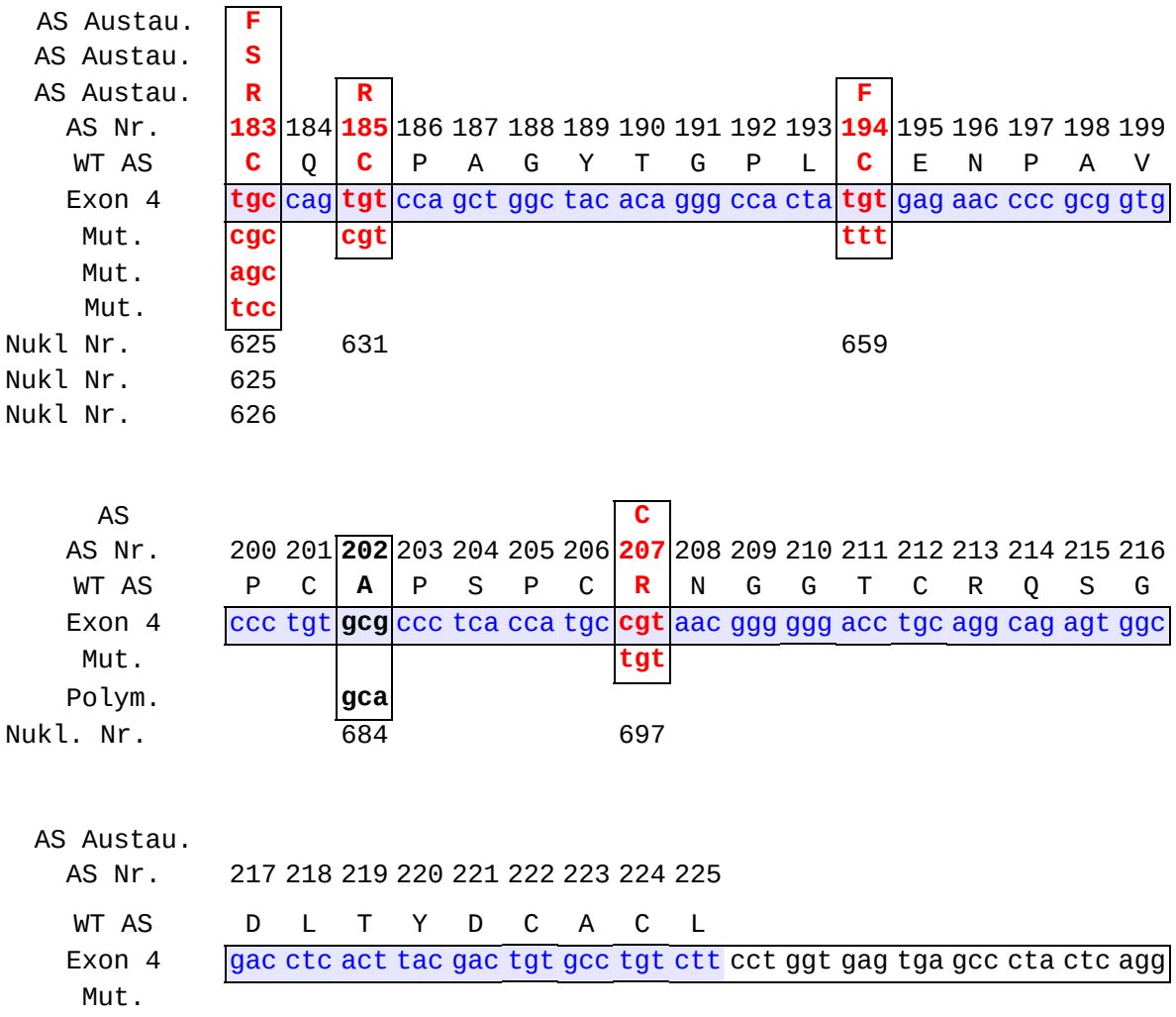


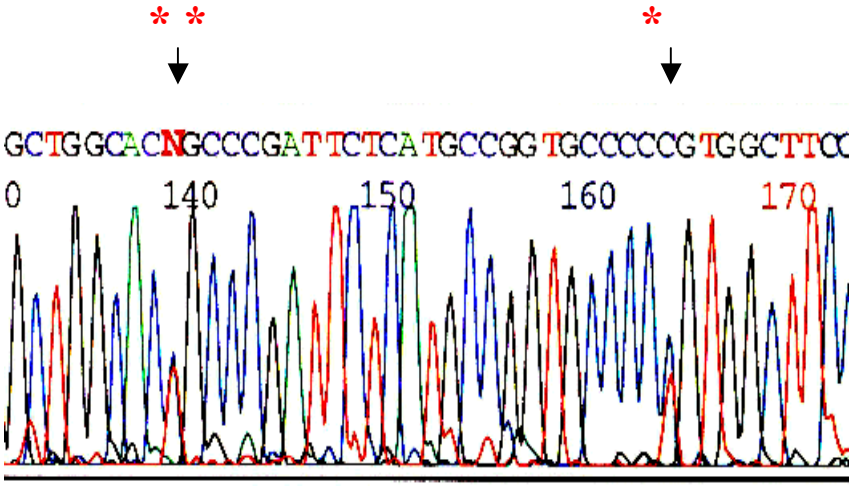
Abbildung 7b: Übersicht über Mutationen und Polymorphismen in Exon 4 ab Aminosäure Nr.183; Abkürzungen wie in Abbildung 6.

4.2. Die gefundenen Mutationstypen

4.2.1. Punktmutationen

Alle Missense-Mutationen involvieren Cystein-Reste: In neun Fällen wurde eine Wildtyp-Aminosäure durch einen Cystein-Rest ersetzt, während in den übrigen Fällen ein Cystein-Rest gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht ist (dreizehn Mutationen). Normalerweise paaren sich - wie bereits beschrieben - innerhalb einer Domäne die Cysteinreste zu Schwefelbrückenbindungen (Cysteinrest 1 mit 3, 2 mit 4 und 5 mit 6 siehe Abbildung 2). Bei allen Mutationen entsteht eine ungerade Anzahl von Cysteinresten innnerhalb einer EGF-Domäne, so daß die für die Stabilität des Proteins wichtigen Schwefelbrückenbindungen zerstört und damit vermutlich die Eigenschaften des Proteins verändert werden. Von allen gefundenen Mutationen tauchen einige Mutationen mehrfach auf, wobei die sieben häufigsten Mutationen (siehe Tabelle 3) 50 % der Untersuchten ausmachen, das sind 76 % aller gefundenen Mutationen. Bei den mehrfach auftretenden Mutationen führt jeweils eine Transition von Cytosin nach Thymin zur Substitution eines Arginin Restes durch einen Cystein-Rest. In denjenigen Fällen, in denen ein Cystein-Rest ausgetauscht wurde (z.B.C144-S), sind keine Häufungen von Mutationen zu beobachten.
In Abbildung 8 wird eine Mutation und ein stiller Polymorphismus gezeigt, wie sie sich als Veränderung in der DNA-Sequenz eines Pherogramms darstellen.

a)



b)

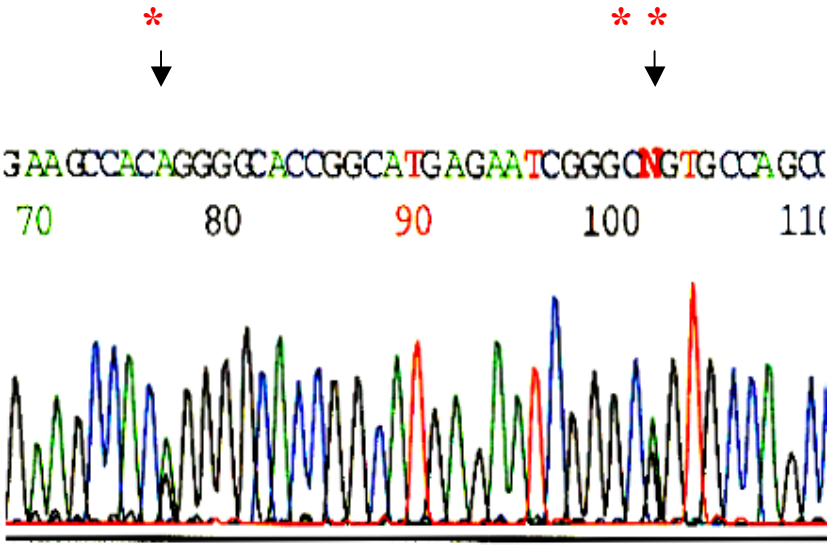


Abbildung 8: Punktmutation und stiller Polymorphismus

Beispiel: Ergebnis der Sequenzreaktion Index-Patient Familie 4, Exon 3 für

a) Sense-Richtung

b) Antisense-Richtung (reverse komplimentäre Sequenz) :

* Mutation R110-C

* * stiller Polymorphismus T101-T

A=Adenin, T=Thymin, C=Cytosin, G= Guanin, N= nicht bestimmbare Base durch Überlagerung mehrerer Basen mit ähnlicher Peakhöhe=mögliche Mutation oder Polymorphismus.

4.2.2. Exonische Dinukleotid Mutation (Exon 6)

Die hier erstmals beschriebene exonische Dinukleotid Mutation in Exon 6 der Familie Nr.19 (siehe Tab.2: EGF6; gcc-tgc; A319-C) zeigt einen Austausch von zwei nebeneinander liegenden Nukleotiden **gc**c in **tg**c (Nucleotidpositionen 1033-1034). Diese Veränderung führt innerhalb der Aminosäuresequenz zur Substitution eines Alanin- Restes durch einen Cystein-Rest. Daß die Mutationen tatsächlich auf einem Strang liegen, ließ sich anhand von Segregationsanalysen verifizieren:

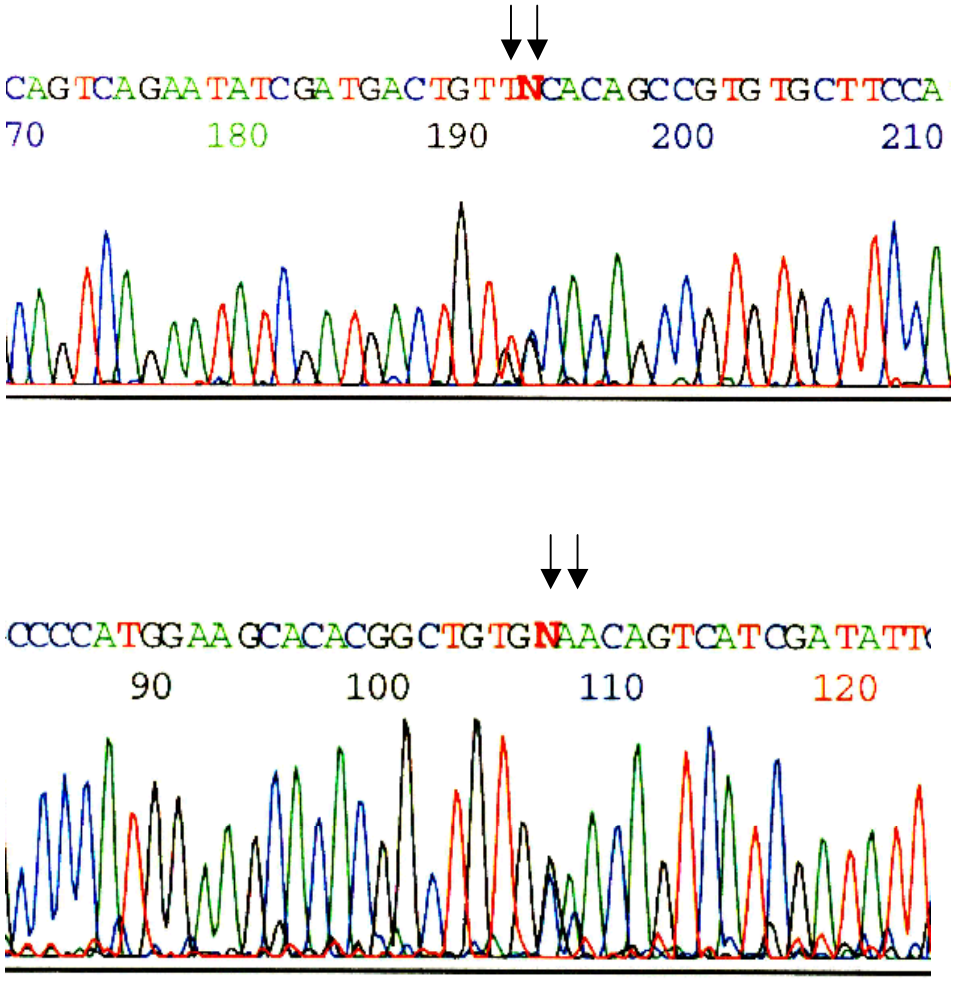


Abbildung 9: Ausschnitt eines Pherogramms der Sense und Antisense-Richtung von Exon 6 (Index-Patient, Familie 19).
Darstellung der exonischen Dinukleotid Mutation.

Um zu belegen, daß sich beide Nukleotidsubstitutionen tatsächlich auf einem DNA Strang befinden, wurden alle verfügbaren Familienmitglieder genotypisiert und Haplotypen generiert. Bei Sechs Familienmitgliedern wurde Exon 6 sequenziert. Anhand der Sequenzierung von an CADASIL erkrankten Familienmitgliedern (n=5) und von CADASIL nicht betroffenen Familienmitgliedern (n=1) konnte gezeigt werden, daß beide Mutationen tatsächlich auf einem DNA-Strang liegen.

4.2.3. Deletionen

Im Rahmen der Arbeit wurden zwei Deletionen gefunden. In beiden Fällen bleibt das Leseraster erhalten.

4.2.3.1 15-Basenpaar-Deletion in Exon 3

In Exon 3 wurde eine größere Deletion von 15 Bp gefunden. Diese Deletion entspricht einem Verlust von fünf Aminosäuren.

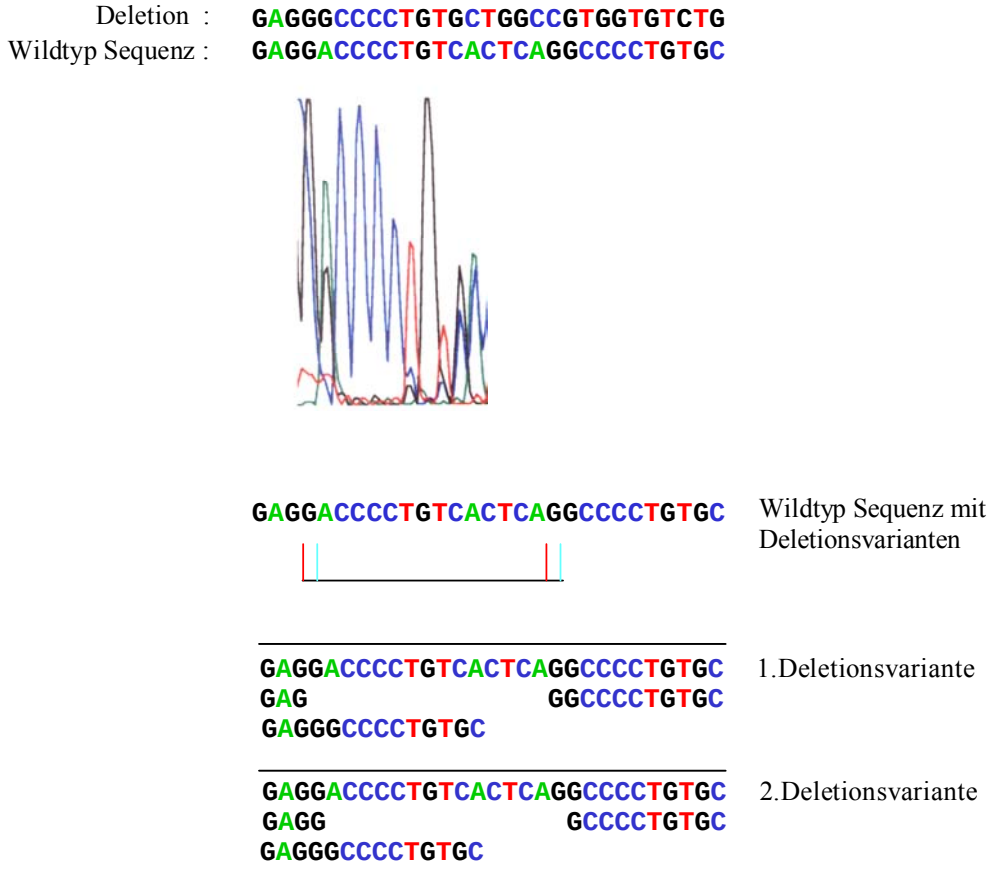


Abbildung 10: 15-Basenpaar-Deletion in Exon 3 (Indexpatient Familie 28) in Sense-Richtung.
Über dem ersten G der Grafik liegt ein Sequenzier-Artefakt. Die roten/türkisen Markierungren zeigen die erhalten bleibenden Basenpaare.

Da in den Randbereichen der Deletion jeweils zwei Guanin-Reste liegen, lässt sich die Position der Deletion nicht exakt definieren. Der Umfang der Deletion beträgt in jedem Fall 15 Basenpaare. Wie in Abbildung 10 dargestellt, kann sich die Deletion sowohl zwischen den Nukleotiden Nr.316-330 (roter Balken) als auch den Nukleotiden Nr.317-331 (türkiser Balken) befinden. Der Mutation entspricht auf Proteinebene ein Verlust der Aminosäuren D80 bis S84 =DPCHS . Entscheidend ist auch hier, daß ein Cystein-Rest involviert ist (siehe Abbildung 6).

4.2.3.2 9-Basenpaar-Deletion in Exon 4

In Exon 4 wurde eine 9 Basenpaar-Deletion gefunden. Dies entspricht einem Verlust von drei Aminosäuren.

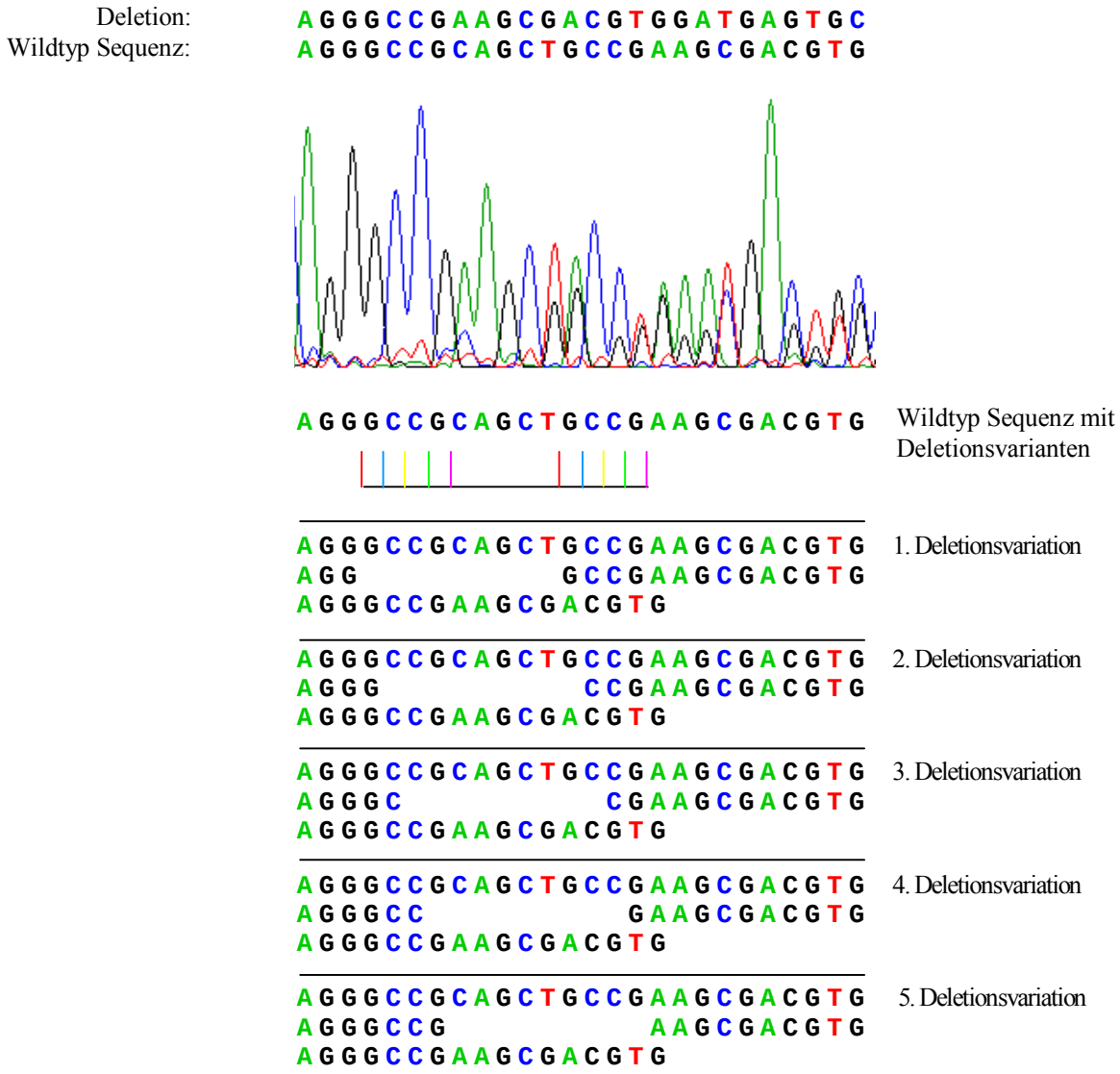


Abbildung 11: 9-Basenpaar-Deletion Exon 4 (Indexpatient Familie 39) in Sense Richtung.

Da die Deletion von einem 4 Bp Repeat GCCG flankiert wird, gibt es fünf mögliche Nukleotid Positionen (von Nukleotid Nr.533-537 bis 541-545), an denen die Deletion stattgefunden haben könnte. Auf der Proteinebene führt diese Mutation zur Deletion der Aminosäuren R153 bis C155 (Aminosäure Sequenz =RSC). Auch hier ist ein Cystein-Rest involviert.

4.3. Segregationsanalysen

Bei insgesamt 7 Familien wurden neben den Indexpatienten weitere Familienmitglieder untersucht (Familien Nr. (Zahl der Angehörigen): 1(1), 10(1), 12(2), 17(1), 19(5) 23(1) ,27(2)). Welche Familienmitglieder sequenziert wurden, hing von der Verfügbarkeit der DNA ab.

In allen Fällen trugen die von der Erkrankung CADASIL betroffene Familienmitglieder die gleiche Mutation. Bei nicht betroffenen Familienmitgliedern wurde die Mutation dagegen nicht gefunden. So konnten die Mutationen in Verbindung mit den Stammbäumen aus den Segregationsanalysen als ursächlich für die Erkrankung CADASIL den Patienten zugeordnet werden. Die Auswahl der Patienten erfolgte nach klinischem Erscheinungsbild mit zusätzlicher diagnostischer Sicherung durch Bildgebung (MRT, CCT) und Hautbiopsie.

4.4. Auswertung der Mutationsdaten

4.4.1 Austauschhäufigkeit der Aminosäuren

Aminosäuren, die in der Sequenz häufig vertreten sind, sollten der Wahrscheinlichkeit nach auch häufiger durch Mutationen auf DNA- Ebene verändert werden.

Die getesteten Aminosäuren sind jedoch deutlich verschieden häufig ausgetauscht, d.h. auch unter Berücksichtigung der Häufigkeit ihrer Nukleotid Positionen auf DNA Ebene in Exon 3 und Exon 4 sind die Austausche nicht zufällig auf die verschiedenen Aminosäuren verteilt.

Wie aus Tabelle 6 (Vergleich Spalte 3 zu Spalte 2) zu ersehen, werden die Aminosäuren Cystein und Arginin im Verhältnis zu ihrem Vorkommen häufiger ausgetauscht als man bei einer zufälligen Verteilung erwarten würde.
Im folgenden werden nur die mutierten Trinukleotid-Positionen angesehen.
Zusätzlich mußte berücksichtigt werden, daß einige Aminosäuren in bestimmter Nukleotid Position bei mehreren Patienten ausgetauscht wurden; folglich ist die Gesamtanzahl der Aminosäure Austausche größer als die Anzahl der Nukleotid Positionen mit Aminosäure Austausch.
In den folgenden Betrachtungen wird immer die Gesamtzahl der Aminosäure Austausche berücksichtigt.
Um statistisch aussagekräftige Werte zu erhalten, wurden die in dieser Arbeit untersuchten Familien und die von Joutel et al.(1997) publizierten Daten aus den französischen Familien zusammengefaßt (siehe Tabelle 6 Spalte 4 + 5).
Die Anzahl der Austausche der Aminosäure Cystein war so gering, daß eine statistische Untersuchung nicht sinnvoll war. Bei Arginin war die Stichprobenzahl hingegen ausreichend, daher wird in Punkt 4.4.2 darauf weiter eingegangen.

Exon 3:

AS	Anzahl AS Wt	Anzahl der Pos. an denen AS ausgetauscht sind	AS Austausch deutsch.	AS Austausch franz.
A	3	0		
C	**6**	**2**	1	1
D	1	0		
E	2	0		
F	2	0		
G	8	0		
H	1	0		
L	1	0		
N	0	0		
P	5	0		
Q	2	0		
R	**6**	**2**	9	6
S	4	0		
T	1	0		
V	4	0		
W	1	1		1
Y	0	0		

Exon 4:

AS	Anzahl AS Wt	Anzahl der Pos. an denen AS ausgetauscht sind	AS Austausch deutsch.	AS Austausch franz.
A	6	0		
C	**18**	**11**	9	5
D	7	0		
E	3	0		
F	2	0		
G	14	1		1
H	2	0		
L	7	0		
N	3	0		
P	16	0		
Q	2	0		
R	**9**	**5**	28	19
S	10	0		
T	5	0		
V	4	0		
W	0	0		
Y	3	1	1	

Tabelle 6: Vergleich der Anzahl der Aminosäuren in den Wildtyp (Wt)-Exons mit der Anzahl der ausgetauschten Aminosäuren in den mutierten Exons (Datenumfang: eigene Ergebnisse aus Tabelle3 und vollständig französische Familien (Joutel et al.,1997) Anhang Tabelle10 für Exon 3 und 4).

Spalte 1: alphabetisch geordnet die in Exon 3 oder 4 vorkommende Aminosäuren (AS)

Spalte 2: Häufigkeit des Vorkommens der jeweiligen Aminosäure in der Wt- Sequenz

Spalte 3: Anzahl der Aminosäure Positionen, die von Mutationen betroffen sind

Spalte 4: in der eigenen Untersuchung deutscher Familien gefundene Häufigkeit von Mutationen

Spalte 5: in französischen Familien (Joutel et al., 1997) gefundene Häufigkeit von Mutationen.

Interpretationenbeispiele des Exon 3 für Arginin (R; 13. Zeile):

1. Bei Vergleich Spalte 2 mit Spalte 3 sieht man: nur 2 der 6 Aminosäuren sind vom Austauch betroffen.
2. Bei Vergleich der Spalte3 mit 4/5 erkennt man, daß 15 Mutationen auf zwei R-Positionen akkumulieren.

Wie sich die Mutationen auf die Positionen verteilen sieht man in Abbildung 12 und Tabelle 7.

4.4.2. Analyse der Austausche an bestimmten R-Positionen

Es wurde festgestellt, daß die Aminosäure Arginin (R) bevorzugt von Austauschen betroffen ist. Bei Betrachtung derjenigen Mutationen, die Arginin betreffen (Abbildung 6 und 7a/b) fällt auf, daß es einige Trinukleotid Positionen gibt, die nicht durch Mutationen betroffen sind (R-75, 103, 107, 113, 156, 163, 207, 213), und solche, bei denen Mutationen gehäuft auftreten (R-90, 110, 133, 141, 153, 169, 182 (Siehe Abbildung 12). Um eine ausreichende Stichprobenanzahl zu erhalten, sind auch die französischen CADASIL Familien (Joutel et al., 1997) mit in die Berechnungen eingegangen (Tabelle3 und 6), die Gesamtzahl beträgt somit 62 Mutationen. Da die Aminosäure Arginin an 15 (6+9) Positionen vorkommt, würden bei Gleichverteilung 62/15 Mutationen pro Position auftreten (Erwartungswert).

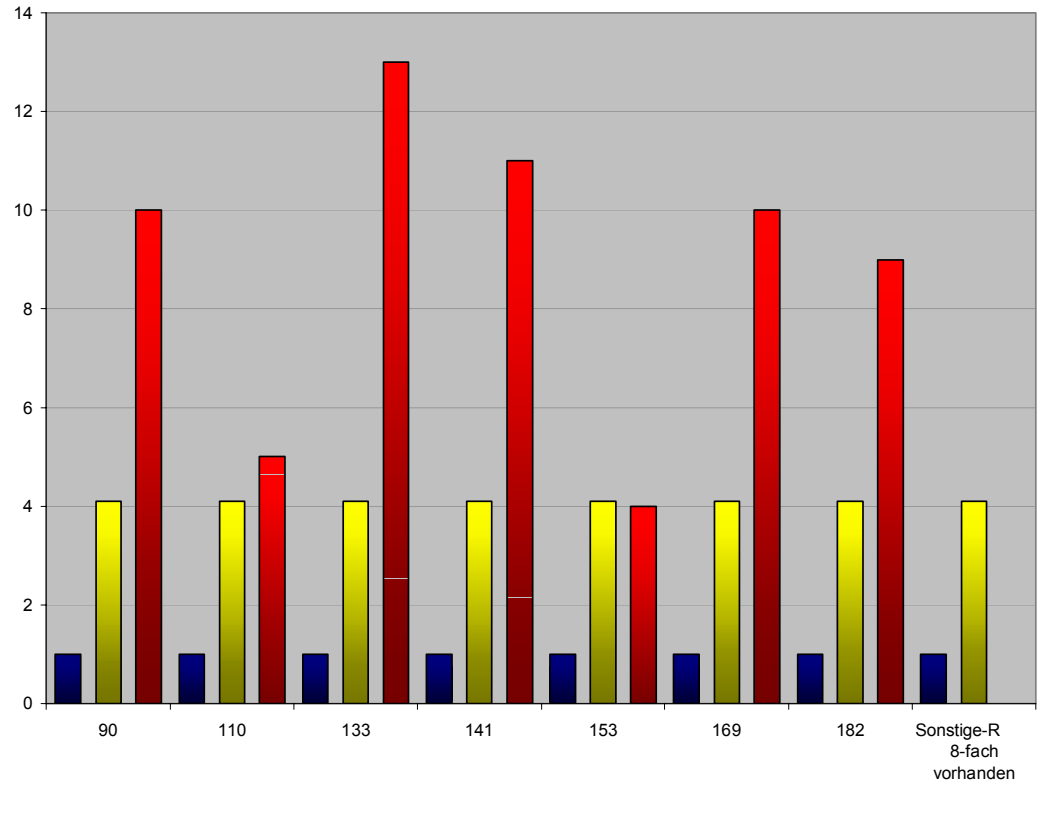


Abbildung 12: Trinukleotid Positionen von Argeninresten (R) mit Häufigkeit von Aminosäure Austauschen.
blau= Anzahl der Aminosäure Positionen
gelb= Erwartungswert von Aminosäure Austausch für jede R-Position
rot= Befund (Häufigkeit von Aminosäure Austausch)
Erwartungswert E= (Anzahl einer AS / Anzahl aller AS Wt) x Zahl aller ausgetauschten AS

Abbildung 12 lässt erkennen, daß sich an einigen Positionen Mutationen stärker häufen (z.B. R133), als an anderen Positionen (z.B. R153).
Mit dem Chi-Quadrat-Test wird die statistische Signifikanz dieser Unterschiede in Tabelle 7 überprüft. Dazu werden die von Mutationen betroffenen Arginin-Reste untereinander verglichen. Deshalb kommt es zu einer Änderung des Erwartungswertes E = (1/7) x 62= 8,9.

R-Position	**90**	**110**	**133**	**141**	**153**	**169**	**182**
Anzahl AS	1	1	1	1	1	1	1
Erwartung	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9
Befund	10	5	13	11	4	10	9

Tabelle 7: Austauschhäufigkeit von mutierten Argininresten (R) in Exon 3+4 unter Berücksichtigung der französischen Familien (siehe Tabelle 3 und 6) . Der Erwartungswert liegt höher als in der Abbildung 12, da nur die mutierten Argeninreste (R) berücksichtigt wurden.

Nach dem Chi-Quadrat-Test konnte kein signifikanter Unterschied in der Mutation der verschiedenen Positionen von Arginin in Exon 3+4 nachgewiesen werden (Chi-Quadrat= 5,5; k=7; N=62; FG=6; 0,5>p>0,3; Lamprecht 1992). Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß es sich um eine kleine Stichprobengröße (N=62) handelt (siehe auch Diskussion).

4.5. Entwicklung einer Methode zur Vereinfachung der Diagnostik

Das *Notch3* Gen ist mit 8091 Bp sehr groß, so daß eine vollständige Sequenzierung sehr aufwendig und teuer ist.
Die in Tabelle 3 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß bei ca 70 % der gesicherten CADASIL Fälle eine Mutation in Exon 3 oder 4 vorliegt. Damit erscheint eine molekulargenetische Diagnostik bei CADASIL sinnvoll (siehe auch Diskussion).

4.5.1. Sequenzierung

Die Sequenzierung von Exon 3 und 4 des *Notch3* Gens ist eine sehr sensitive Methode zur Detektion von Mutationen. Sie ist jedoch aufwendig und verhältnismäßig teuer. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß bestimmte Mutationen gehäuft auftreten. Es wurde deshalb nach einer technisch einfacheren Methode gesucht, welche die häufigsten Mutationen direkt nachweist.

4.5.2. Restriktionsanalysen

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, sind 5 der in dieser Arbeit gefundenen Mutationen (R90-C, R133-C, R141-C, R169-C, R182-C) für ca 50% (32 von 70 Familien) der Erkrankungsfälle in Deutschland verantwortlich. Zur einfacheren Detektion dieser Mutationen wurde eine Restriktionsanalyse für diese 5 Mutationen entwickelt.

Bei Risikopersonen aus Familien, in denen bei anderen Familienmitgliedern bereits eine Mutation bekannt ist, kann die Restriktionsanalyse zur molekulargenetischen Diagnostik herangezogen werden.

Es wurden einige Familien (Fam. 25 für R141-C, Fam. 3 für R90-C und Fam. 5 für R133-C) mit Restriktionsenzymen untersucht. Hier konnten die Mutationen entsprechend den Segregationsanalysen und Sequenzierungen gefunden werden. Vor der Durchführung des Restriktionsverdaus erfolgte die Auswahl der Restriktionsenzyme mit Hilfe eines Computerprogramms.

Zuerst wurden die Schnittstellen der Wildtyp-Sequenz von Exon 3 oder 4 mit einer großen Anzahl von Restriktionsenzymen berechnet. Dann wurde in die Sequenz eine der hier gefundenen Mutationen eingeführt und anschließend mit der Wildtyp-Sequenz verglichen.

Der Unterschied der Enzyme in Ihrer Schnittstellenerkennung konnte dann zur Differenzierung zwischen Wildtyp- und mutierter DNA genutzt werden.

Auf diese Weise wurde die Anzahl und Größe der zu erwartenden Fragmente in Abhängigkeit von Mutation und Restriktionsenzym ermittelt (s.Tabelle 8).

Aus der Fragment-Anzahl und -Größe wurde dann mitttels des Programms Genequest (Lasergene von DNASTAR) ein Gelbild vorhergesagt (s.Abbildung 13).

Beispiele für die Berechnung der Fragmentgrößen als Gel Report und optische Darstellung als Gel Simulation anhand von drei Mutationen:

A =Mutation R141-C

B =Mutation R90-C

C =Mutation R133-C

Gel	Spur	Notch3 PCR Produkt	Enzym	Anzahl der Fragmente	Länge der Fragmente in Basenpaaren
A	1	Exon 4/ R141 -C	BseGI	3	191, 158, 59.
	2	Exon 4/Wildtyp	BseGI	2	217, 191.
	3	Marker pBR322 HaeIII		22	587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80, 64, 57, 51, 21, 18, 11, 8.
B	4	Exon 3/ R90-C	BseDI	3	161, 68, 9.
	5	Exon 3/Wildtyp	BseDI	4	101, 68, 60, 9.
	6	Marker pBR322 HaeIII		22	587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80, 64, 57, 51, 21, 18, 11, 8.
C	7	Exon 4/Wildtyp	Aci1	7	123, 89, 60, 48, 47, 39, 2.
	8	Exon 4/ Rl33-C	Aci1	6	183, 108, 48, 47, 39, 2.
	9	Marker pBR322 HaeIII		22	587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80, 64, 57, 51, 21, 18, 11, 8.

Tabelle 8: Beispiele für Gel Reporte mit Angaben von Fragment- Anzahl und Länge in Bp für die Mutationen R141-C, R90-C und R133-C im Vergleich mit der jeweiligen WT- Sequenz und einem Molekulargewichts-Marker.

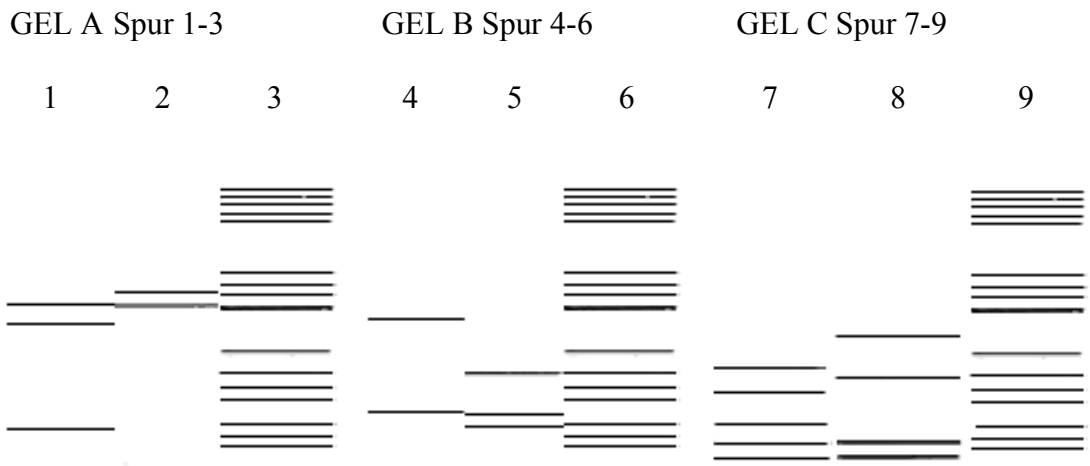


Abbildung 13: Ausschnitt aus der Gelsimulation.

Die Besetzung der Spuren entspricht denen im oben berechneten Gel Report.

Fragmente unter 20 Bp wurden hier nicht berücksichtigt, da sie sich im Agarosegel nicht darstellen.

Durchführung des Restriktionsverdaus:

Spur: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

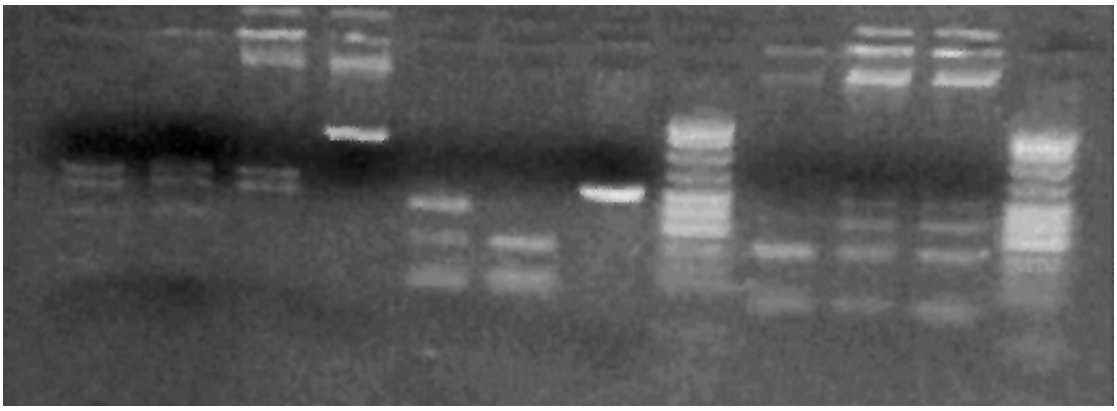


Abbildung 14: Restriktionsverdau einschließlich des ungeschnittenen PCR Produkts, wobei nur die größeren Fragmente zur Darstellung kommen.

1 Index Patient Familie 25 (R141-C)	
2 Familienangehöriger (R141-C)	Enzym BseGI
3 Wt Exon 4	
4 Exon 4 ungeschnitten (ca.440 Bp.)	
5 Index Patient Familie 3 (R90-C)	Enzym BseDI
6 Wt Exon 3	
7 Exon 3 ungeschnitten (ca. 240 Bp.)	
8 Marker pBR322/HaeIII	
9 Wt Exon 3	
10 Index Patient Familie 5 (R133-C)	Enzym Aci1
11 Familienangehöriger (R133-C)	
12 Marker pBR322/ HaeIII	

Einige der abgebildeten Spuren entsprechen den berechneten (Tab. 8) und dargestellten (Abb. 13) Spuren:

Spur in Abb.14		Spur in Tab. 8 bzw. Abb. 13
1, 2	⇔	1
3	⇔	2
5	⇔	4
6	⇔	5
9	⇔	7
10, 11	⇔	8
8, 12	⇔	3, 6, 9

Mutationen und Wt lassen sich gut unterscheiden. Geringe Abweichungen von dem errechneten Gel Report (Abbildung 13) ergeben sich z.T. daraus, daß die Bedingungen der experimentellen Durchführung (z.B. Laufzeit des Gels, angelegte Spannung) nicht mit in die theoretischen Berechnungen des Programms einbezogen werden können. Zum anderen ergibt sich bei dem in Abb. 14 dargestellten Restriktionsverdau bei Mutationsfragmenten ein gemischtes Muster aus Wildtyp und Mutante (heterozygote Merkmalsträger).

4.6. Proteinstrukturvorhersagen

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, wie sich Mutationen in *Notch3* auf die Proteinstruktur auswirken, wurden mit Hilfe eines PC Programms 3D-Modelle errechnet.
Für eine große Anzahl von EGF- ähnlichen Domänen sind bereits Strukturdaten bestimmt worden. Hier zeigte sich bei den meisten EGF Domänen ein ähnliches Disulfidbrückenmuster, bei der jeweils der erste und der dritte, der zweite und vierte und der fünfte und sechste Cysteinrest eine Disulfidbrückenbinduung eingehen (Downing et al., 1996).
Mit dem Programm SETOR konnte auf Grundlage von NMR-Strukturdaten zur EGF ähnlichen Domäne des menschlichen Fibrillin1 (Downing et al., 1996) eine Veränderung in der ß-Faltblatt Struktur bei einigen Mutationen vorhergesagt werden. Dabei gelten die Cystein-Reste als wichtige Elemente für die Ausbildung der Proteinstruktur, da sie mittels der Bildung von Schwefelwasserstoffbrücken für die Proteinkonfiguration von entscheidender Bedeutung sind.
Die Bedeutung dieser Cystein-Reste wird dadurch unterstrichen, daß sie bei allen bisher gefundenen Mutationen bei CADASIL Patienten involviert sind.

Durch die Mutationen entstehen innerhalb einer EGF- Domäne des *Notch3* Genprodukts eine ungerade Anzahl von Cysteinresten, so daß das Disulfidbrückenmuster zerstört wird. Durch die Einführung der in dieser Arbeit beschriebenen Mutationen in diese Modelle konnte gezeigt werden, daß CADASIL Mutationen mit einer normalen Faltung des Proteins nicht vereinbar sind. Dabei kann man noch zwischen drei Typen von Mutationen unterscheiden:

1. Missense Mutationen, bei denen eine Aminosäure (in 97% der Fälle die Aminosäure Arginin) durch einen Cysteinrest substituiert wird. Hierbei sind Aminosäurereste betroffen, die an der Oberfläche der EGF- ähnlichen Domäne gelegen sind.
2. Missense Mutationen, bei denen ein Cysteinrest durch eine andere Aminosäure substituiert wird. Hierbei kann man noch unterscheiden: zwischen Substitution durch eine Aminosäure mit großen Seitenketten (Arginin, Phenylallanin oder Tyrosin), die dann innerhalb der korrrekt gefalteten EGF Domäne räumlich interferieren können und einer Substition durch eine isosterische Aminosäure (Serin) oder einer Aminosäure mit einer kleineren Seitenkette (Glycin), die innerhalb der EGF Domäne nicht interferieren.
3. Deletionen, die sowohl in der N-Terminalen als auch in der C-Terminalen Region einen Cysteinrest eliminieren und damit eine Disulfidbrückenbindung zerstören.

Anhand dieser Modelle lassen sich Hypothesen über die Auswirkungen der Mutation auf Proteinebene machen. Und es können Folgerungen gezogen werden, wie sich diese Veränderungen auf den Notch Signalweg auswirken könnten.

4.7. Proteinmodell und Pathogenitätsmechanismus

Abb. 15 zeigt ein mit dem Programm Setor errechnetes Proteinmodell der 5. und 6. EGF ähnlichen Domäne von Notch3 auf der Basis der NMR-Struktur des humanen Fibrillin 1 (Downing et al., 199

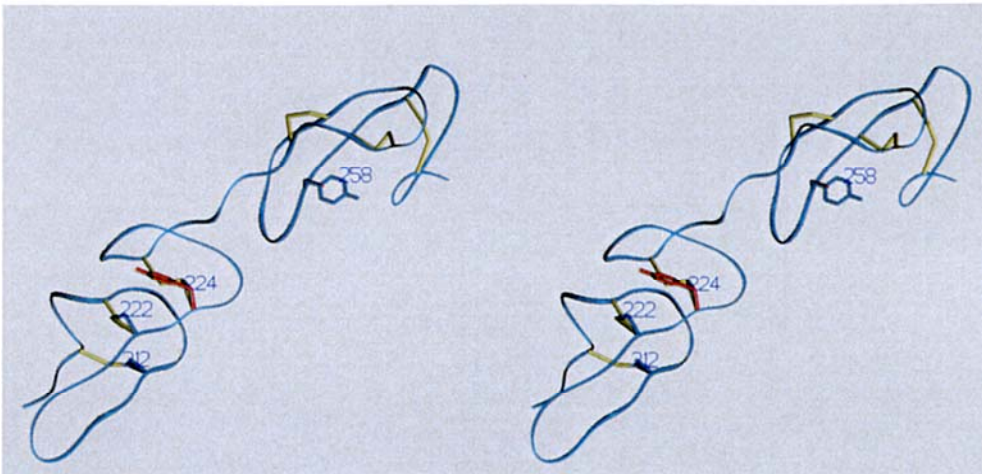


Abbildung 15: Stereo- Ansicht der modellierten Hauptketten von Notch3 EGF-ähnlichen Domänenpaaren: repeats 5-6. Hauptkette in blau. N-Termini in der unteren linken Ecke, C-Termini in der oberen rechten Ecke. Disulfid-Brücken in gelb. Seitenketten der Wildtypsequenz (blau) sind an Positionen dargestellt, für welche Missense Mutationen bekannt sind (mutierte Seitenketten in rot).

In diesem Modell sind Mutationen aus dieser Arbeit und einer vorausgegangenen Arbeit (Joutel et al., 1997) eingefügt. Weitere Beispiele finden sich bei Dichgans et al., (2000). Am N-Terminus befindet sich eine zweisträngige ss-Faltblatt-Struktur, gefolgt von einem zweiten kurzen Faltblatt am C-Terminus. Die sechs Disulfid-Brücken verbinden den ersten Cystein-Rest mit dem dritten, den zweiten mit dem vierten und den fünften mit dem Sechsten. Dieses bewirkt die Stabilisierung der ß-Faltblatt-Struktur (mit Disulfidbrücken (DSB) zwischen 1. und 3. Cystein-Rest und 2. und 4. Cystein-Rest) und der doppelten „hairpin“-Struktur (mit DSB zwischen 5. und 6. Cystein-Rest). Bei den mutierten Aminosäuren an der Oberfäche des Proteins handelt es sich zu 97% um Arginin-Reste. Anhand dieses Proteinmodells lassen sich mindestens zwei Pathogenitätsmechanismen vermuten (siehe auch Diskussion):

1. Faltungs –Probleme der Notch3 EGF- Domänen. Durch Veränderung der Disulfid-Brücken könnte es zur Destabilisierung der ss-Faltblattstruktur kommen.
2. Dimerisierung mit anderen Notch3 Molekülen oder anderen Proteinen über aberrante Disulfidbrücken.

5. Diskussion

5.1. Mutationstypen

Punktmutationen: Bei der Untersuchung von Exons 3 und 4 des *Notch3 Gens* an 79 Probanden aus 70 Familien mit bioptisch gesicherter Diagnose CADASIL wurde bei 71% der Index-Patienten eine krankheitsverursachende Mutation gefunden. Alle für CADASIL kausativen Mutationen involvierten einen Cystein-Rest: ein Basenaustausch führt entweder dazu, daß ein Cysteinrest entsteht (Mutationen an 8 Trinukleotid-Positionen) oder ein Cysteinrest durch eine andere Aminosäure ersetzt wird (10 Trinukleotid-Positionen). Der größte Anteil der Mutationen wurde, wie in einer französischen Population, auch bei den hier untersuchten deutschen Familien in Exon 3 und 4 gefunden. In beiden Gruppen liegt dabei der Anteil der in dieser Region gefundenen Mutationen zwischen 66-71 %. In der Arbeit von Joutel konnte in 90 % der Fälle eine Mutation in der Extrazellularregion nachgewiesen werden (Joutel et al., 1997). Auch andere Arbeitsgruppen haben im *Notch3-Gen* Mutationen gefunden (Mellies et al., 1995; Oberstein et al., 1999; Otto et al., 1997). Daß in der französischen Population nicht bei allen untersuchten Patienten eine Mutation nachgewiesen werden konnte, könnte daran liegen, daß Mutationen übersehen wurden, weil z.B. die SSCP- Analyse nur eine Sensitivität von 80-90 % aufweist, oder weil Mutationen in anderen Exons liegen, welche von Joutel nicht untersucht wurden (Joutel et al., 1997).

Ursachen dafür, daß bei CADASIL Patienten bislang keine Mutationen im Intrazellularteil des Notch3 Rezeptors gefunden wurden, könnten sein:

1. Im Intrazellularteil führen Mutationen nicht zu dem für CADASIL typischen Phänotyp.
2. Diese Mutationen sind bereits während der Embryonalentwicklung letal.

Auch im Membran nahen Teil des Proteins sind keine (Exon 24-33) bzw. nur vereinzelt (Exon 5-23) Mutationen beschrieben worden (siehe Tabelle 6). Innerhalb des Bereichs, in dem sich die Mutationen häufen, wurden in der vorliegenden Arbeit mehr Mutationen in Exon 4 (38 Mutationen) als in Exon 3 (10 Mutationen) gefunden. Dies könnte zum einen darauf beruhen, daß Exon 4 mit 420 Bp doppelt so groß ist wie Exon 3 mit 224 Bp. Zum anderen ist in jede Mutation ein Cysteinrest involviert. Bei denjenigen Mutationen, die von Cysteinresten wegführen (10 Positionen), sind die betroffenen Aminosäuren über die Clusterregion verteilt und es entstehen verschiedene andere Aminosäuren mit ganz leichter Bevorzugung der Aminosäure Phenylalanin (n = 4). Beim Austausch der Aminosäure Arginin ensteht regelhaft die Aminosäure Cystein (an sieben Positionen, aber mit starker Häufigkeit).

Für den vermehrten Austausch an Arginin-Positionen könnte es die folgenden Gründe geben: zum einem der genetische Code (Tabelle 14). Die für Argininreste kodierenden Basen-Triplets cgt und cgc haben eine höhere Wahrscheinlichkeit zu Cysteinresten mit den Triplets tgt und tgc zu mutieren, als die für Argininreste kodierenden Triplets cga, cgg, aga, agg, weil bei diesen letzt genannten Triplets zwei Nukleotide mutieren müßten. Tatsächlich sind in der vorliegenden Arbeit diese Triplets auch nicht von Mutationen betroffen. Eine zweite Erklärung für die Bevorzugung von Argininresten liegt möglicherweise in der DNA Struktur. Es ist bekannt, daß sich bei Eukaryonten vermehrt Mutationen an Stellen mit 5-Methylcytosin bilden. Durch hydrolytische Desaminierung entsteht Thymin, das vom Reparatursystem nicht erkannt wird, so daß die Mutation bestehen bleibt (Antonarakis et al., 2000). Das für Argininreste kodierende Basen- Triplet mit dem Triplet cgt beinhaltet die oft methylierte Dinukleotid–Folge 5`-CpG-3`, die durch Transition von Cytosin (c) nach Thymin (t) übergehen kann. Dies könnte erklären, weshalb Cysteinreste entstehen und warum die für Argininreste kodierenden Triplets cgt und cgc vermehrt von Mutationen betroffen sind. Auch in die Mutationen der anderen Exons (Tabelle 10,12 im Anhang) sind gehäuft CpG`s involviert.

Es lassen sich anhand der CpG´s bisher noch nicht bekannte Mutationsorte voraussagen, da die CpG-Folgen Orte mit erhöhter Neigung zur Mutationsbildung bei Säugetieren sind (Abbildung 18). Die Triplets cgc und cgt (rot dargestellt), haben zusätzlich zu den CpG-Folgen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den Cystein Triplets eine erhöhte Wahrscheinlichkeit das pathogene Mutationen entstehen, die zur Erkrankung CADASIL führen.

Diese CpG-Folgen (Inseln) sind bei Säugetieren häufig von Mutationen betroffen. Bekannt ist diese Art von Mutationen z.B. bei der Bluterkrankheit Hämophilie B durch Mutationen im Faktor IX Gen, das ebenfalls EGF-Repeats beinhaltet (Knippers et al., 2001). CpG-Folgen sind im Vertebraten–Genom wegen der irreparablen Mutationsgefahr vermindert. CpG-Folgen haben andererseits aber auch eine wichtige Funktion, da diese durch Methylierung ein Mittel zur Steuerung des DNA Metabolismus sind. Methylierung von Cytosin-Resten in CpG-Inseln ist ein Mechanismus zur entwicklungs- und differenzierungsspezifischen Regulation. Da Notch eine Rolle bei der embryonalen Zelldifferenzierung spielt, ist eine Genregulation über Methylierungsvorgänge während dieser Zeit denkbar (Holmgren et al., 2001; Knippers et al.,2001; Sekimata et al., 2001). Imprinting Phänomene sind bei *Notch3* allerdings noch nicht untersucht worden.

Statistik: Untersucht wurden die Index-Patienten aus Tabelle 3 des Ergebnisteils. Gesucht wurde nach Auffälligkeiten bezüglich der Häufung einzelner Aminosäureaustausche in Exon 3 und 4. Polymorphismen wurden nicht in die Berechnungen mit einbezogen, weil sie anderen Selektionsmechanismen unterliegen (siehe unten).

Dabei wurde festgestellt, daß Mutationen an Cystein (C) und Arginin (R) Positionen häufiger auftreten als an anderen Aminosäurepositionen. Die nachgewiesene Akkumulation von Mutationen an Argininpositionen läßt sich anhand des genetischen Codes und der DNA-Struktur mit Hilfe der CpG-Folgen erklären (siehe oben). Ob eine bestimmte Argininposition bevorzugt ist, läßt sich anhand der kleinen Stichprobe nicht nachweisen.

Polymorphismen: Es gibt keinen Anhalt dafür, daß die hier beschriebenen Polymorphismen (Tabelle2a/b), bei denen es in den meisten Fällen zu keinem Aminosäure Austausch kommt, etwas mit der Pathogenese von CADASIL zu tun haben. Obwohl es bei der Sequenzvariation P81-R zu einem Austausch einer kleinen, unpolaren Aminosäure durch eine große, polare Aminosäure kommt (vgl. Abbildung 19 die 20 Aminosäuren), gibt es keine offensichtliche Verbindung zur Pathogenese von CADASIL, obwohl dieser Polymorphismus nicht in der Normalpopulation gefunden wurde. Wie man am Sequenz-Alignment von *Notch1,3* und *4* sieht (Abb.16 im Anhang), liegen die Polymorphismen an Stellen, die nicht sehr stark konserviert sind. Auch finden sich bei den Homologen Notch1 und 4 - an den von Polymorphismen betroffenen Positionen Aminosäuren, die aus einer anderen Größen- und Polaritäts-Gruppe stammen, als bei Notch3. Dies weist darauf hin, daß solche Veränderungen die Rezeptor-Struktur aller Wahrscheinlichkeit nach nicht wesentlich beeinträchtigen. Wenn die Anzahl der Arginine (besonders mit den Tripletts cgt und cgc; s.o. Statistik, Mutationstypen) zunimmt, besteht auch die erhöhte Gefahr von Mutationen zum Cystein hin, die dann pathogen wären. Die Polymorphismen in Exon 3 und Exon 4 sind sehr häufig. Bei 70 Index- Patienten wurden in 50% der Fälle in Exon 3 oder Exon 4 ein oder mehrere Polymorphismen entdeckt (P81-R =1, Q94 =3, T101 =23, P115 =4, R156 =8 und A202 =10) . In den anderen Exons (6 und 12) wurden keine Polymorphismen detektiert. In Exon 3 und 4 häufen sich also offensichtlich nicht nur pathogene Mutationen sondern auch Polymorphismen. Von der französischen Arbeitsgruppe sind auch Polymorphismen in anderen Exons (7,9,16,17,21,22,25 und 33) beschrieben, wobei über die Häufigkeit keine Angaben gemacht wurden (siehe Tabelle 11 im Anhang) (Joutel et al., 1997). Bei der Untersuchung von holländischen Familien wurden bei 4 von 11 Indexpatienten Polymorphismen hauptsächlich in Exon 4 (Ala202-Ala=4mal) aber auch in Exon 3 (Thr101-Thr=1mal) gefunden (Oberstein et al.;1999). Diese Befunde weisen darauf hin, daß Exon 3 und 4 des *Notch3* Gen gehäuft von Sequenzveränderungen (Mutationen und Polymorphismen) betroffen sind. Es konnte kein Einfluß von Polymorphismen fur das Auftreten von Mutationen

festgestellt werden. Weder traten bestimmte Polymorphismen und Mutationen gehäuft gemeinsam auf noch gab es bei bestimmten Polymorphismen vermehrte Mutationen. (vergleiche Tabelle 2a/2b). Der Polymorphismus T101 ist der in dieser Arbeit am häufigsten gefundene Polymorphismus mit mehr als 50% (23 von 42) aller Polymorphismen (siehe Tabelle 5).

Exonische Dinukleotid Mutation (Exon 6): Dieser Mutationstyp führt wie alle anderen gefundenen Mutationen zu einem Cysteinaustausch, und zwar durch Mutation zweier auf einem DNA-Strang liegender benachbarter Nukleotide in Exon 6. Anhand der Haplotypanalysen konnte nachgewiesen werden, daß die beiden Basenaustausche tatsächlich auf einem DNA-Strang liegen. Die Entstehung dieser Mutation ist wahrscheinlich durch ein Mutationsereignis an diesen nebeneinander liegenden Stellen zu erklären (Dunnen und Antonarakis, 2000). Die Wahrscheinlichkeit, daß es sich um zwei nebeneinanderliegende Punkt-Mutationen handelt, die zeitlich unabhängig voneinander aufgetreten sind, ist als gering anzusehen. Bei dieser Familie (19) wurde in Exon 3 und 4 keine Mutation gefunden; das stützt die Hypothese der Pathogenität dieser Mutation. Aufgrund der ungewöhnlichen Mutation stellt sich zunächst auch hier die Frage, ob ein besonderer Phänotyp vorliegt. Dies ist allerdings nicht zu erwarten, da auf Proteinebene eine für CADASIL typische Mutation vorliegt. Auch daß die Mutation außerhalb der Clusterregion (Exon 3 und 4) liegt, scheint keine besondere Auswirkung hinsichtlich einer bestimmten Genotyp/Phänotyp Korrelation zu haben.

Deletionen: Auch bei den gefundenen Deletionen kann ein Mechanismus zur Deletionsentstehung diskutiert werden. Es gibt Hinweise darauf, daß ein Missalignment während der DNA- Replikation dafür verantwortlich sein könnte. Die Orte der Deletionen können auf die DNA–Struktur zurückgeführt werden. Klassischerweise sind Deletionen in der Nähe von Sequenzwiederholungen (z.B. in der Nähe von Replikationsgabeln) lokalisiert (Knippers et al., 2001; Krawczak et al., 1991). Bei der Deletion in Exon 3 flankiert das 7 Bp Repeat CCCCTGT und in Exon 4 das 4 Bp Repeat GCCG den Mutationsort. Die Deletion von Exon 3 wird flankiert von einer Sequenz, die ähnlich der Konsensus-Sequenz =TG $^{AAGA}_{GGTC}$ für Regionen ist, in denen Deletionen häufig sind (z.B. bei α2-globin, ss-globin, Faktor VIII, Antithrombin III, HPRT), sie enthalten die Sequenz TGGAGGAC (siehe Abbildung.6/7). Außerdem enthält diese Region das GAG- Element und ist sehr GC-reich, als Hinweis darauf, daß es sich um eine Polymerase α Haltestelle handelt. Für diese Stellen wird eine Initiationsfunktion an der Replikations-Gabel angenommen (Krawczak et al., 1991). Bei der Deletion in Exon 4 sind die Hinweise für einen solchen Mechanismus, abgesehen von dem GC-Reichtum der Stelle, geringer. In beiden Regionen kommen auch Mutationen vor: in Exon 3: P81-R und in Exon 4 : R153-C (siehe Abbildung.6/7a und b).

Splice Site Mutationen: In der französischen Arbeitsgruppe wurde auch eine sogenannte Splice Site Mutation, die den Übergang Exon/Intron betrifft, gefunden (Joutel et al., 2000). In der hier vorliegenden Arbeit wurden alle Intron/ Exon Grenzen überprüft, dabei wurde keine Splice Site Mutation entdeckt.

5.2. Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Zur Beurteilung von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bei CADASIL wurde ein quantitativ messbarer Parameter gewählt. Untersucht wurde das in der kraniellen Kernspintomographie (MRT) sichtbare Läsionsvolumen. Mit steigendem Alter der Patienten nimmt das Läsionsvolumen zu. Eine statistisch relevante Korrelation zwischen dem Läsionsvolumen und einzelnen, der in dieser Arbeit gefundenen Mutationen (Genotypen) konnte nicht gefunden werden (Dichgans et al., 1999). Bei der Erarbeitung des phänotypischen Spektrums von CADASIL Patienten wurde schon intrafamiliär eine große Variabilität festgestellt. Verschiedentlich wurde in einzelnen Familien eine ungewöhnlich hohe Prävalenz von migräneartigen Kopfschmerzen beobachtet (Chabriat et al., 1995; Verin et al., 1995). Bei einer ungewöhnlichen Splice-Site Mutation wurde ein Zusammmenhang mit Migräne vermutet (Joutel et al., 2000). In dieser Arbeit konnte keine besondere Genotyp/Phänotyp Korrelation festgestellt werden, auch nicht bei den ungewöhnlichen Deletionen. Alle Phänotypen liegen innerhalb des bisher beschriebenen klinischen Spektrums von CADASIL. Das Fehlen von Genotyp- Phänotyp-Korrelationen bei CADASIL steht im Einklang mit der auch in dieser Arbeit gefundenen Einheitlichkeit der Mutationen.

5.3. Möglichkeiten der CADASIL-Diagnostik

Für eine Sicherung der Diagnose CADASIL war zu Beginn der vorliegenden Arbeit eine positive Hautbiopsie mit Nachweis von granularen osmiophilen Ablagerungen in der Basalmembran der Gefäßwände ausschlaggebend. Diese Veränderungen lassen sich an Gefäßen im ganzen Körper nachweisen, weshalb die Diagnose aus dem Material einer Hautbiopsie gesichert werden kann. Trotz der Veränderungen am ganzen Körper sind bisher aber nur neurologische Symptome (TIA und Schlaganfall, vaskuläre Demenz etc.) bekannt (Kalimo et al., 1999). Ausserdem spielt die Bildgebung eine große Rolle zur Diagnosesicherung (Skehan et al., 1995; Chabriat et al., 1998). Diese Arbeit zeigt, daß sich mit der Sequenzierung von Exon 3 und Exon 4 bereits der größte Teil aller CADASIL Mutationen (rund 70%) gesichert finden läßt.

Diese Methode hat mittlerweile eine Verbreitung in mehreren Ländern gefunden (Arcos-Burgos et al., 2001; Chuah et al., 2001; Kotorii et al., 2001; Lopera et al., 2001). Wenn erforderlich, können in weiteren Sequenzierungen die restlichen 22 Exons der extrazellulären Domäne untersucht werden. Bei den nicht unerheblichen Kosten ist es wichtig, die Methode gezielt einzusetzen.

Alternativ bietet sich eine Untersuchung mit Hilfe von SSCP- oder Heteroduplex-Analysen an. Der Vorteil dieser Methoden liegt darin, daß sie kostengünstiger sind. Nachteile gegenüber der Direkt-Sequenzierung sind eine geringere Sensitivität (70-90%), eine eingeschränkte Reliabilität und die Schwierigkeit, zwischen Mutationen und Polymorphismen zu differenzieren. Bei erfolgreicher Detektion muß in der Regel immer noch eine Sequenzierung angeschlossen werden. Diese Arbeit zeigt, daß Polymorphismen in Exon 3 (Anzahl 28) und Exon 4 (Anzahl 16) recht häufig sind, schon deshalb sind SSCP-Analysen bei CADASIL nur eingeschränkt sinnvoll. Die chromatographische Methode der DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) hat mit 97% eine höhere Sensitivität als die SSCP- Analyse. Beide Methoden haben ihr Einsatzgebiet jedoch eher bei epidemiologisch-genetischen Studien, als in der Diagnostik (Escary et al., 2000). Die Vorgehensweise mit der Sequenzierung soll die bisherige bioptische Diagnosesicherung sowie die MRT Aufnahme ergänzen. Darüberhinaus kann mit der Sequenzierung auf sicherer molekulargenetischer Basis die Differentialdiagnose CADASIL abgegrenzt werden zu Morbus Binswanger (SAE) (Uhlenbrock et al., 1989), zur Multiplen Sklerose (Broadley et al., 2001; Rovaris et al., 1997), zu Vaskulitiden, zu anderen Ursachen einer Leukoenzephalopathie, hemiplegischen Migräne, cerebralen Hämorrhagie mit Amyloidose, hereditäre Dyslipoproteinämie, Thrombozyten-Erkrankungen und MELAS. Auch bei Abweichungen vom typischen klinischen Krankheitsbild bei CADASIL, gibt die genetische Untersuchung Klarheit über die Diagnose (Mikol et al., 2001). Durch die nun möglichen genetischen Methoden, ist die Diagnose CADASIL früher zu stellen, als durch Hautbiopsie oder MRT- Aufnahmen. Bei Bedarf können die gefundenen Methoden und Ergebnisse auch in der Pränatal-Diagnostik Anwendung finden.

Aufgrund der Häufung von Mutationen in Exon 3 und 4 wurde die Sequenzierung dieser beiden Exons inzwischen als diagnostisches Verfahren im Neurogenetischen Labor der Neurologischen Klinik, Klinikum Großhadern eingeführt. Bis dato wurden bei 268 Patienten mit dem Verdacht auf CADASIL ohne bioptische Diagnosesicherung 106 Mutationen gefunden (siehe Tabelle 13 im Anhang) und damit bei diesen Patienten die Diagnose bestätigt.

Mutationen, welche von Argininresten zu Cysteinresten führen (Anzahl 145), treten um ein Vielfaches häufiger auf als alle anderen Mutationen (Anzahl 40). Die Reihenfolge unter den 7 häufigsten Mutationen hat sich im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit geändert. Die Mutation R182-C ist hier die häufigste Mutation. Da die Diagnose bei den Patienten jedoch nicht primär über eine Hautbiopsie erfolgte, sind die Ergebnise nicht unmittelbar vergleichbar. Es sind neue Missense-Mutationen und Deletionen hinzugekommen.

5.4 Alternative Möglichkeiten der CADASIL Diagnostik

Ein alternatives oder unterstützendes Screenen nach CADASIL-Mutationen kann über die hier vorgestellte Restriktionsanalyse der PCR-Produkte erfolgen. In der Arbeit wurde gezeigt, daß bestimmte Mutationen gehäuft auftreten (siehe Statistik im Ergebnisteil).
Deshalb eignen sich diese Mutationen, die zusammen etwa 75% ausmachen, auch für ein Screening. Durch Einsatz von 3 Restriktionsenzymen für die Mutation R90-C, R133-C, und R141-C bei Untersuchung der 70 Indexpatienten aus dem Ergebnisteil hätten sich in 30% der Fälle (Anzahl= 21) Mutationen finden lassen. Bezogen auf die 50 gefundenen Mutationen sind es 42%. Unter Hinzuziehung der weiteren theoretisch berechneten Restriktionsenzyme der 7 häufigsten Mutationen erhält man 52% (Anzahl =37) der Mutationen von 70 Indexpatienten
(74% der gefundenen Mutationen).
Insgesamt lassen sich für die sieben häufigsten Mutationen folgende Vorschläge für die Analyse mit Restriktionsenzymen machen (Tabelle 9).
Dieser Vorschlag für eine einfache und schnell handhabbare Methode zur Diagnosesicherung bei Verdacht auf CADASIL wurde unter Verwendung des Lasergen Programms gemacht.

Mutationen	Empfohlenes Restriktionsenzym
R133-C	Aci I
R141-C	BseGI
R169-C	BbvI
R90-C	BseDI =Dsa I
R182-C	NSPbII
R110-C	Dsa I
R153-C	Aci I

Tabelle 9: Zuordnung der diagnostisch anwendbaren Restriktionsenzyme zu den häufigsten Mutationen.

Der Restriktionsenzymenverdau würde sich besonders für die genetische Testung von Familienangehörigen von Index-Patienten eignen, bei denen die Mutation bereits bekannt ist und nur ein Enzym zur Bestätigung der Mutation benötig wird. Der Restriktionsverdau ist schneller und kostengünstiger als die Sequenzierung. Nur bedingt zu empfehlen ist das Screenen nach der Mutation bei einem Patienten, der nur eine klinische Diagnose hat. Hier erscheint die Methode der Direkt-Sequenzierung sinnvoller, da neue Mutationen mit einer höheren Sensitivität zu finden sind. Die Analyse mit Restriktionsenzymen bietet sich jedoch als Ersatz an, wenn kein Sequenziergerät in einem Labor vorhanden ist.

5.5. Erkrankungen mit Mutationen im Notchsignalweg

Um Hypothesen aufstellen zu können, wie die veränderte Rezeptorstruktur mit der Pathogenese der Erkrankung CADASIL in Verbindung steht, soll hier kurz auf die Funktion und den Metabolismus von Notch Rezeptoren eingegangen werden.
Aufgrund der Homologie der anderen Notch Proteine werden Ergebnisse von dort für die Hypothesenbildung eingebracht.
Bei Notch sind mehrere sogenannte cleavage sites bekannt. Dabei handelt es sich um Schnittstellen, die unter Vermittlung eines Liganden erkannt und die durch Proteasen geschnitten werden (siehe Abb.3). Eine derartige cleavage site ist bei S3 zwischen Glycin 1743 und Valin 1744. Diese Schnittstelle liegt im Bereich der Transmembran-Region, wobei der intrazelluläre Teil des Rezeptors beim Schneiden in den Nucleus entlassen wird (Schroeter et al., 1998) und z.B. bei Notch1 als Transscriptionsfaktor für `suppressor of hairless` dient. (Jarriault et al., 1995). Eine zweite cleavage site befindet sich in der Extrazellulärregion im Notch1 Rezeptorprotein (Mumm et al., 2000).
Vom *Notch* Gen sind in Vertebraten bisher vier Homologe identifiziert worden. Die vier homologen Proteine besitzen eine große Übereinstimmung in der Proteinsequenz
(siehe Abb. 16). Der biochemische Mechanismus innerhalb der Notch Familie ist ebenfalls stark konserviert (Mizutani et al., 2001). Für die verschiedenen Notch Homologe ist bekannt, daß sie miteinander interagieren (Gridley T et al., 2001) und z.B. *Notch3* das *Notch1* hemmt (Beatus et al., 1999).

Obwohl die Signalwege der Notch-Homologe eng miteinander verflochten sind, haben Veränderungen in den verschiedenen Notch-Homologen und Notch-Liganden unterschiedliche Erkrankungen zur Folge. Im *Notch1* Gen hat eine chromosomale Translokation mit dem Genlokus 9q34 (Pilz et al., 1994) eine T-Zell Leukämie zur Folge. Die Translokation hat zwei Auswirkungen: Zum einem wird *Notch1* unter die Kontrolle eines T-Zell spezifischen Elements gestellt, zum anderen entsteht ein konstitutiv aktives trunkiertes Protein (Ellisen et al., 1991; Aster et al.,2001). Bei Mutationen in den Notch Liganden Jagged1 und 2 kann es zu Entwicklungsstörungen kommen, dabei wird ein Funktionsverlust (loss of funktion) angenommen. Bei 80% der Patienten mit Alagille Syndrom werden Mutationen in Jagged1 gefunden (Alagille et al., 1975; Watson et al.,1973; Kamath et al.,2002). Als Notch Liganden sind in Proteinbindungsexperimenten Delta 1-4, Jagged 1 und Jagged 2 identifiziert worden (Shimizu et al., 2000; Gray et al., 1999). Es gibt eine große Übereinstimmung in der DNA-Sequenz zwischen *Notch1* und *Notch3* (siehe Anhang Abbildung 16 Alignment).

Die spezifische Funktion von Notch3 beim Menschen ist noch nicht völlig aufgeklärt. Eine wichtige Funktion bei der embryonalen Entwicklung des Gehirns, speziell der Gliogenese, wurde postuliert (Irvin et al., 2001; Lundkvist et al., 2001). Als Entwicklungs Gen wird *Notch3* eine Rolle bei der Zelldifferenzierung vom Ektoderm zu Neuroderm zugesprochen (Wharton et al., 1985). Dabei sollen Notch (1 und 3) Rezeptoren vom Fibroblasten Growth Faktor, den Presenilinen und dem Liganden Delta beeinflußt werden (Faux et al., 2001). Presenilin1 ist als Bindungspartner in die proteolytische Spaltung des Notch Rezeptors involviert (Berezovska et al., 2000, Fortini et al., 2001).

Notch3 ist für die Embryogenese von entscheidender Bedeutung (Pourquie et al., 2001; Zakany et al., 2001); dennoch konnte bei CADASIL Patienten bisher kein Hinweis auf eine Entwicklungsstörung gefunden werden.

Bei CADASIL handelt es sich um eine Erkrankung des Erwachsenenalters, bei der es wahrscheinlich durch einen neomorphen Effekt zu Ablagerungen des Proteins in der vaskulären Basalmembran kommt. Angenommen werden kann eine fehlerhafte Prozessierung des Rezeptors, wodurch es zu einer Akkumulation von Notch3 in der Gefäßwand kommt. Durch die Akkumulation von Notch3 Rezeptorfragmenten in den glatten Muskelzellen der Gefäßwand wird der Gefäßdurchmesser reduziert, so daß es zu den für CADASIL typischen Symptomen wie Migräne und Schlaganfall kommen könnte.

5.6. Proteinmodell und Pathogenitätsmechanismen

Die Mechanismen, welche die pathogene Wirkung der bei CADASIL Patienten gefundenen Mutationen erklären, sind derzeit noch unbekannt.

Anhand des in Abb.15 gezeigten Proteinmodells laßen sich bezüglich der Auswirkungen der in dieser Arbeit gefundenen Mutationen zwei Pathogenitätsmechanismen diskutieren.

1. Faltungs -Probleme der Notch3 Domänen.

Durch Veränderung der Disulfid -Brücken könnte es zur Destabilisierung der ß-Faltblattstruktur kommen.

Dies trifft auf die Deletionen und die Missense Mutationen zu, bei denen die substituierenden Aminosäuren große Seitenketten tragen (Arg, Phe und His); hier sagt das 3D Modell eine sterische Interaktion voraus, die einer normalen Proteinfaltung im Wege steht. Ebenso wird für die Mutationen Cys zu Ser und Cys zu Gly von einer resultierenden Fehlfaltung ausgegangen, da hier die Disulfidbrückenbindungen zerstört werden. Bei den Mutationen Arg zu Cys und Tyr zu Cys wird ebenfalls von einer veränderten Faltung des Notch3 Proteins ausgegangen, in diesem Fall aufgrund der ungeraden Anzahl der Cysteinreste, die dann ein neues Disulfidbrückenschema innerhalb der betroffenen Domäne bilden.

2. Dimerisierung mit anderen Notch3 Molekülen =Homodimerisation oder

Dimerisierung mit anderen, freie Cysteinreste enthaltenden Proteinen =Heterodimerisation könnten eine Funktionsänderung des Notch3 Rezeptors und einen veränderten Rezeptormetabolismus bedingen (Dichgans et al., 2000).

Auch für andere Proteine mit EGF-Repeat-Domänen sind solche Strukturveränderungen durch Mutationen bekannt. Dies gilt z.B. für Fibrillin 1, das für die Marfan Erkrankung verantwortlich ist (Downing et al., 1996; Handford et al., 1995; Kettle et al.,1999).

Veränderungen des Notch3 Rezeptors durch CADASIL Mutationen könnten einen verminderten Abbau des Proteins oder eines Bindungspartners erklären. Wenn es zur Generierung neuer Cysteinreste im Notch3 Rezeptorprotein kommt, stehen diese Cysteinreste für Bindungspartner aus anderen Proteinen oder Liganden zur Verfügung und es kann zur Dimerisierung kommen. Ebenso kann der Ersatz eines Cysteinrestes zu neuen intermolekularen Bindungen führen, da diese Mutationen einen ungepaarten, reaktiven Cysteinrest entstehen lassen.

Die durch die Mutationen im *Notch3* entstehenden Fehlfaltungen im Protein und auch die Dimerisierung von Notch3 Protein ist mit einem neomorphen Effekt vereinbar.

Um die hier aufgestellten Hypothesen zu erhärten, wie es zu den bei CADASIL Patienten gefundenen Gefäßwand-Ablagerungen kommt, sind weitere experimentielle Untersuchungen nötig.

5.7. Ausblick

Für die Grundlagenforschung sind Tiermodelle von entscheidender Bedeutung. An Tiermodellen ist bisher eine Drosophila Mutante bekannt. (Fryxell et al., 2001). Auch die Involvierung bei T-Zell-Leukämie und Lymphomen wurde bei Mausmodellen nachgewiesen (Bellavia et al.,2000). Auf diesem Weg erhofft man sich neue Einsichten in den Notch Signalweg (Kitagawa et al., 2001; Kockel et al., 2001). Wegen der starken Konservierung der *Notch* Familie bei den Vertebraten und Nichtvertebraten hofft man Schlußfolgerungen für den Menschen aus solchen Modellen ziehen zu können (Weinmaster et al., 1997). Auf der Basis der Erforschung der molekulargenetischen Grundlagen von CADASIL möchte man letztendlich eine Therapie entwickeln können. Vorstellbar ist z.B. die Entwicklung einer Gentherapie. Grundlage hierfür sind transgene Tiermodelle in denen z.B. durch Überexpression von mutiertem Notch3 die vaskulären Veränderungen, wie sie bei CADASIL auftreten, erforscht werden können. In diesem Tiermodell wurden zwar keine CADASIL typischen Gehirnveränderungen gefunden, jedoch ließe sich in den Arterien die typischen granulären osmiophilen Ablagerungen und eine Notch3 Akkumulation feststellen (Rouchox et al.; 2003). Als Ursache für die Degeneration der glatten Muskelzellen der Arterien werden hier Zelladhäsionsprobleme postuliert. Tiermodelle sollen nicht nur dem Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge bei CADASIL und bei Schlaganfall allgemein dienen, sondern auch zur Erprobung möglicher Therapieansätze herangezogen werden.

6. Zusammenfassung

CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung der kleinen Gefäße, die u.a. zu migräneartigen Kopfschmerzen und früh einsetzenden Schlaganfällen führt.

Kurz vor Beginn dieser Arbeit wurde *Notch3* als verantwortliches Gen identifiziert. *Notch3* kodiert für einen großen Transmembranrezeptor mit 34 extrazellulär lokalisierten, epidermal growth factor (EGF) ähnliche Domänen.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei 70 nicht verwandten Familien (70 Index-Patienten und 13 Familienangehörigen) mit bioptisch gesicherter Diagnose im wesentlichen zwei Exons (3 und 4) untersucht, da in diesem Bereich die Mutationen akkumulieren. Dabei wurden durch Sequenzierung von Exon 3 und Exon 4 in 70 % der Fälle krankheitsauslösende Mutationen identifiziert. Drei Typen von Mutationen wurden gefunden: Punktmutationen (Missense-Mutationen) (n= 50), Dinukleotid-Mutation (n= 1) und Deletionen (n= 2). Darüberhinaus wurden zahlreiche stille Polymorphismen identifiziert (n= 43).

Bei sieben der mutierten Nukleotide traten Mutationen gehäuft auf, wobei es sich jeweils um Cytosin nach Thymin Transitionen handelte. Alle Mutationen inklusive der Deletionen führten entweder zu einem Erwerb oder Verlust eines Cystein-Restes. Deshalb ist es naheliegend anzunehmen, daß die Veränderung von einem Cystein in einer EGF-ähnlichen Domäne von Notch3 den entscheidenden Mutationsmechanis für CADASIL darstellt. Bei den Polymorphismen traten keine Änderungen der Cystein-Reste auf. Genotyp/Phänotyp Korrelationen ließen sich nicht nachweisen. Dies steht im Einklang mit der Einheitlichkeit der Mutationen.

Auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit ergibt sich für die bestehende Diagnostik eine Verbesserung im Vorgehen. Hautbiopsie und MRT-Aufnahmen können durch die Sequenzierung von Exon 3 und 4 ergänzt werden. Damit werden bereits 2/3 der Mutationen entdeckt. Wenn dort keine Mutationen gefunden werden, können noch die restlichen 22 Exons der extrazellulären Domäne sequenziert werden, wobei hier zunächst auf Exon 6 (und 12) der Schwerpunkt gelegt werden sollte. Dieses Vorgehen wird mittlerweile als Standardverfahren für die Diagnostik eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde als weitere ergänzende diagnostische Methode die Analyse mit mutationsspezifischen Restriktionsenzymen entwickelt. Unter Hinzuziehung der theoretisch berechneten Restriktionsenzyme der 7 häufigsten Mutationen erhält man 52% (Anzahl =37) der Mutationen von 70 Indexpatienten (74% der gefundenen Mutationen).

In Familien, in denen eine Mutation bereits bekannt ist, laßen sich weitere Familienmitglieder mit dieser Methode schneller und kostengünstiger untersuchen, als durch Sequenzierung.
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Entwicklung von Proteinmodellen Voraussagen von Mutationsauswirkungen auf die Proteinstruktur möglich machen. Als mögliche Arbeitshypothese kann eine Konformationsänderung oder eine Oberflächenveränderung angenommen werden, die eine Auswirkung auf den Bindungspartner haben kann und evtl. die Funktion beeinflußt. Ein fehlerhafter Abbau des Notch3 Rezeptors führt dazu, daß trunkierte Rezeptorfragmente sich in der Media der Gefäße in der Nähe von osmiophilen Ablagerungen ansammeln.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
c	Cytosin
cDNA	coding DNA = kodierende DNA
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin DiNukleotid
CT	Computertomographie
dd NTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleid Acid = Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EtOH	Ethanol
G	Guanin
h	Stunde
Kb	Kilobase
kD	Kilodalton
M	Molar
mt	Mutation
min	Minute
MRT	Magnetresonanztomographie
mRNA	Messenger-RNA
NaCI	Natriumchlorid
Notch	Kerbe
Nt	Nukleotid
OD	Optical Density = optische Dichte
PAS	periodic acid-Schiff
PBS	Phosphate Buffered Solution
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

RNA	Ribonucleic Acid = Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SSCP	Single Stranded Conformation Polymorphism = Einzelstrang – Konformationsanalyse
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TrisHCl	Tris-Lösung mit HCI gepuffert
U/min	Umdrehungen pro Minute
u	Units = Einheiten
U	Uracil
UV	Ultraviolettes Licht
Wt	Wildtyp

7.2. Material

7.2.1. Substanzen

Hier werden nur Substanzen aufgeführt, die nicht standardisiert sind bzw. die von einem bestimmten Hersteller bezogen wurden:

Substanzen	Hersteller
Acrylamid-Lösung 30 % (Acrylamid/bis 29:1)	Bio-Rad, München
Agarose	Gibco, Eggenstein
Amberlite MB 1A	Sigma, St.Louis
Big DyeTerminatorCycleSequencing Kit	PE-Applied-Biosystems,Weiterstadt
Bromphenolblau	Sigma, St. Louis
Dextran-Blau	PE-Applied-Biosystems,Weiterstadt
DMSO	Sigma, St. Louis
DNA 1 kb Marker	Boehringer- Mannheim
dNTP	Pharmacia- Biotech, Freiburg
Big DyeTerminatorCycleSequencing Kit	PE-Applied-Biosystems, Weiterstadt
Rhoddamine Matrix Standard	PE-Applied-Biosystems, Weiterstadt
dRhodamine Terminator Cycle Sequencing	PE-Applied-Biosystems, Weiterstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis
Ficoll	Sigma, St.Louis
Formamid	Amresco, Solon
Glycerin	Sigma, St. Louis
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid, MgCI2	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Na-EDTA	Sigma, St. Louis
pBR322DNA-MSPIDigest	Merck, Darmstadt
pBR322DNA-HaeIIIDigest	MBI Fermentas, Leon-Rot
Qiaquick gel extraction kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR purification Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR Reaction Kit	Qiagen, Hilden
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden

TEMED	Sigma, St.Louis
Tris	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma, St.Louis

7.2.2. Geräte

Geräte	Hersteller
ABI Prism DNA-Sequenzer, TM 377	Applied, Biosystems, Weiterstadt
Elektrophorese	Multiphor II, Pharmacia, Freiburg
Photometer GeneQuant	Pharmacia, Freiburg
Thermocycler	OmniGene
Temperature Cycler	MWG, Ebersberg
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Software; Lasergen (Genquest)	DNASTAR, Madison, Wisconsin
UV-Transilluminator	Bachofer, Reutlingen
Vakuumzentrifuge, Speed-Vac	Bachofer, Reutlingen

7.3. Ergänzende Tabellen und Abbildungen

Exon	Domäne	Nukleotid Austausch	Nukleotid Postion	Aminosäure Austausch	Anzahl
N2	EGF1	tgt->tat	224	C49-Y	1
N3	EGF1	tgg->tgt	291	W71-C	1
N3	EGF2	cgt->tgt	346	R90-C	4
N3	EGF2	cgt->tgt	406	R110-C	2
N4	EGF3	cgc->tgc	475	R133-C	3
N4	EGF3	cgc->tgc	499	R141-C	6
N4	EGF3	tgc->cgc	514	C146-R	1
N4	EGF3	cgc->tgc	535	R153-C	2
N4	EGF4	cgc->tgc	583	R169-C	5
N4	EGF4	ggt->tgt	589	G171-C	1
N4	EGF4	cgc->tgc	622	R182-C	3
N4	EGF4	tgt->cgt	631	C185-R	1
N4	EGF5	tgc->agc	712	C212-S	1
N4	EGF5	tgt->ggt	742	C222-G	1
N4	EGF5	tgt->tat	749	C224-Y	1
N5	EGF6	tat->tgt	851	Y258-C	1
N11	EGF13	tgt->tat	1703	C542-Y	1
N11	EGF14	cgc->tgc	1750	R558-C	2
N11	EGF14	cgc->tgc	1810	R578-C	1
N14	EGF18	cgc->tgc	2260	R728-C	1
N18	EGF25	cgc->tgc	3031	R985-C	2
N19	EGF26	cgc->tgc	3094	R1006-C	1
N19	EGF26	cgc->tgc	3169	R1031-C	1
N22	EGF31	cgt->tgt	3769	R1231-C	1
N23	EGF32	tgc->cgc	3859	C1261-R	1

Tabelle 10: Mutationen französische Patienten (Joutel, 1996)

Exon	Nukleotid Austausch	Nukleotid Position	Aminosäure-Austausch	Frequenz in Kontrollen
N3	acc->act	381	Keiner	ND
N4	gcc->gca	474	Keiner	ND
N4	ggc->gga	594	Keiner	ND
N4	gcg->gca	684	Keiner	0,17
N4	cat->cgt	687	His170->Arg	0,005
N7	cct->ccc	1218	Keiner	ND
N9	ccc->ctc	1565	Pro496->Leu	0,02
N16	tgt->tgc	2616	Keiner	ND
N17	ccg->cca	2820	Keiner	ND
N21	cac->caa	3477	His1133->Gln	0,10
N22	gtg->atg	3625	Val1183->Met	0,005
N25	ccg->cca	4641	Keiner	ND
N33	ccg->cca	6300	Keiner	ND
N33	gcg->gca	6516	Keiner	0,02
N33	gtg->gcg	6746	Val2223->Ala	0,20

Tabelle 11: Auflistung der Polymorphismen in französischen CADASIL Familien (Joutel et al., 1997)
ND= nicht detektiert

Exon	Domäne	Nukleotid Austausch	Nukleotid Position	Aminosäure Austausch	Referenz
N2	EGF1	tgt->tat	224	C49-Y	1
N2	EGF1	cgt->tgt	238	R54-C	2
N3	EGF1	tgg->tgt	291	W71-C	3
N3	EGF2	cgt->tgt	346	R90-C	1
N3	EGF2	tgc->ttc	356	C93-F	4
N3	EGF2	cgt->tgt	406	R110-C	1
N4	EGF3	tgc->ttc	428	C117-F	5
N4	EGF3	tgc->ttc	446	C123-F	4
N4	EGF3	tgc->tac	446	C123-Y	2
N4	EGF3	cgc->tgc	475	R133-C	1
N4	EGF3	tgc->tcc	509	C144-S	4
N4	EGF3	tgc->tac	509	C144-Y	4
N4	EGF3	tgc->cgc	514	C146-R	1
N4	EGF3	tac->tgc	526	T150-C	4
N4	EGF3	cgc->tgc	535	R153-C	1
N4	EGF3	tgc->agc	562	C162-S	2
N4	EGF4	cgc->tgc	583	R169-C	3
N4	EGF4	ggt->tgt	589	G171-C	1
N4	EGF4	tgc->tac	599	C174-Y	5
N4	EGF4	tcc->tgc	616	S180-C	2
N4	EGF4	cgc->tgc	622	R182-C	3
N4	EGF4	tgc->cgc	625	C183-R	5
N4	EGF4	tgc->agc	625	C183-S	4
N4	EGF4	tgt->cgt	631	C185-R	1
N4	EGF4	tgt->ttt	659	C194-F	4
N4	EGF4	tgt->tat	659	C194-Y	2
N4	EGF4	tgc->tac	694	C206-Y	6
N4	EGF4	cgt->tgt	697	R207-C	2
N4	EGF5	tgc->agc	712	C212-S	1
N4	EGF5	tgt->ggt	742	C222-G	1
N4	EGF5	tgt->tat	749	C224-Y	1
N5	EGF6	tat->tgt	851	Y258-C	1
N11	EGF13	tgt->tat	1703	C542-Y	3
N11	EGF14	cgc->tgc	1750	R558-C	3
N11	EGF14	cgc->tgc	1810	R578-C	3
N11	EGF14	cgc->tgc	1897	R607-C	2
N14	EGF14	cgc->tgc	2260	R728-C	1
N18	EGF25	ttc->tgc	3029	F984-C	2
N18	EGF25	cgc->tgc	3031	R985-C	1
N19	EGF26	cgc->tgc	3094	R1006-C	1
N19	EGF26	cgc->tgc	3169	R1031-C	1
N22	EGF31	cgt->tgt	3769	R1231-C	1
N23	EGF32	tgc->cgc	3859	C1261-R	3

Tabelle 12 : Mutationen mehrerer Arbeitsgruppen

Referenzen:
1 - Joutel (1997) Lancet 350, 1511
2 - Escary (2000) Hum Mutat 16, 518
3 - Joutel (1996) Nature 383, 707
4 - Dichgans (2000) Eur J Hum Genet 8, 280
5 - Dichgans (1999) Neurology 52, 1361
6 - Oberstein (1999) Neurology 52, 1913

Exon	Nukleotid Austausch	Nukleotid Position	AS Austausch	Vorliegende Arbeit	Diag-nostik	Anzahl deut. P.	Anzahl franz..P.	Gesamt
N3		309-326	Q77-H83		1	1		1
N3	Deletion	317-331	D80-S84	1		1		1
N3	tgt-cgt	337	C87-R		1	1		1
N3	tgt-tat	338	C87-Y		1	1		1
N3	cgt-tgt	346	R90-C	6	9	15	4	19
N3	tgc-ttc	356	C93-F	1	1	2		2
N3	tgc-tgg	396	C106-W		1	1		1
N3	tgc-tac	401	C108-Y		1	1		1
N3	cgt-tgt	406	R110-C	3	2	5	2	7
N4	tgc-ttc	428	C117-F	1	3	4		4
N4	tgc-ttc	446	C123-F	1	2	3		3
N4	cgc-tgc	475	R133-C	10	18	28	3	31
N4	tgc-tgg	480	C134-W		1	1		1
N4	cgc-tgc	499	R141-C	5	7	12	6	18
N4	tgc-tcc	509	C144-S	1		1		1
N4	tgc-tac	509	C144-Y	1	1	2		2
N4	tcc-tgc	512	S145-C		1	1		1
N4	ggc-tgc	523	G149-C		1	1		1
N4	tac-tgc	526	Y150-C	1	4	5		5
N4	cgc-tgc	535	R153-C	2	7	9	2	13
N4	Deletion	537-545	R153-C155	1		1		1
N4	cgc-tgc	583	R169-C	5	9	14	5	19
N4	tgc-tac	599	C174-Y	1	2	3		3
N4	cgc-tgc	622	R182-C	6	29	35	3	38
N4	tgc-cgc	625	C183-R	1		1		1
N4	tgc-agc	625	C183-S	1		1		1
N4	tgc-ttc	626	C183-F		1	1		1
N4	tgt-cgt	631	C185-R	1	1	2	1	3
N4	tgt-ttt	659	C194-F	1		1		1
N4	cgt-tgt	697	R207-C		1	1		1
N5	Deletion	792-836	D239-D253		1	1		1
N6	gcc-tgc	1033-1034	A319-C	1		1		1
			Gesamtzahl:	51	*106*	157	26	**185**

Tabelle 13: Darstellung aller bisher gefundenen Mutationen deutscher Familien einschliesslich der Ergebnisse aus der Diagnostik (Stand Sept. 2002) (Neurogenetisches Labor, Leitung PD Dr.med. M. Dichgans). In der letzten Spalte gehen auch die französischen Patienten mit ein, soweit auch in eigenen Untersuchungen an den Nukleotidpositionen Mutationen gefunden wurden. (Joutel et al.,1997). Bei der Diagnostischen Untersuchung wurde nicht nach Polymorphismen gesucht. In der französischen Arbeit wurden keine genauen Angaben zu den Polymorphismen gemacht.

```
          1                                                    50
hnotchl    .MPPLLAPLL CLALL..PAL AARGPRCSQP GETCLNGGKC EA.ANGTEAC
hnotch3    .......... .......MGP GARGRRRRRR PMSPPPPPPP VR.ALPLLLL
hnotch4    MQPPSLLLLL LLLLLCVSVV RPRGLLCGSF PEPCANGGTC LSLSLGQGTC
          51                                                   100
hnotchl    VCGGAFVGPR CQDPNPCLST P.CKNAGTCH VV........ ..DRRGVADY
hnotch3    LAGPGAAAPP CLD.....GS P.CANGGRCT QL........ ..PSR...EA
hnotch4    QCAPGFLGET CQFPDPCQNA QLCQNGGSCQ ALLPAPLGLP SSPSPLTPSF
         101                                                   150
hnotchl    ACSCALGFSG PLCLTPLDNA CLTNPCRNGG TCDLLTLT..  .EYKCRCPPG
hnotch3    ACLCPPGWVG ERC..QLEDP CHSGPCAGRG VCQSSVVAGT  ARFSCRCPRG
hnotch4    LCTCLPGFTG ERCQAKLEDP CPPSFCSKRG RCHIQASG..  .RPQCSCMPG
          151                                                  200
hnotchl    WSGKSCQQAD PCASNPCANG GQC.LPFEAS YICHCPPSFH GPTCRQDVNE
hnotch3    FRGPDCSLPD PCLSSPCAHG ARCSVGPDGR FLCSCPPGYQ GRSCRSDVDE
hnotch4    WTGEQCQLRD FCSANPCVNG GVC.LATYPQ IQCHCPPGFE GHACERDVNE
          201                                                  250
hnotchl    CGQKPRLCRH GGTCHNEVGS YRCVCRATHT GPNCERPYVP CSPSPCQNGG
hnotch3    C.RVGEPCRH GGTCLNTPGS FRCQCPAGYT GPLCENPAVP CAPSPCRNGG
hnotch4    CFQDPGPCPK GTSCHNTLGS FQCLCPVGQE GPRCELRAGP CPPRGCSNGG
          251                                                  300
hnotchl    TCR..PTGDV T.HECACLPG FTGQNCEENI DDCPGNNCKN GGACVDGVNT
hnotch3    TCR..QSGDL T.YDCACLPG FEGQNCEVNV DDCPGHRCLN GGTCVDGVNT
hnotch4    TCQLMPEKDS TFHLCLCPPG FIGPGCEVNP DNCVSHQCQN GGTCQDGLDT
         301                                                   350
hnotchl    YNCPCPPEWT GQYCTEDVDE CQLM.PNACQ NGGTCHNTHG GYNCVCVNGW
hnotch3    YNCQCPPEWT GQFCTEDVDE CQLQ.PNACH NGGTCFNTLG GHSCVCVNGW
hnotch4    YTCLCPETWT GWDCSEDVDE CEAQGPPHCR NGGTCQNSAG SFHCVCVSGW
         351                                                   400
hnotchl    TGEDCSENID DCASAACFHG ATCHDRVASF YCECPHGRTG LLCHLNDACI
hnotch3    TGESCSQNID DCATAVCFHG ATCHDRVASF YCACPMGKTG LLCHLDDACV
hnotch4    GGTSCEENLD DCIAATCAPG STCIDRVGSF SCLCPPGRTG LLCHLEDMCL
         401                                                   450
hnotchl    SNPCNEGSNC DTNPVNGKAI CTCPSGYTGP ACSQDVDECS L...GANPCE
hnotch3    SNPCHEDAIC DTNPVNGRAI CTCPPGFTGG ACDQDVDECS I...GANPCE
hnotch4    SQPCHGDAQC STNPLTGSTL CLCQPGYSGP TCHQDLDECL MAQQGPSPCE
          451                                                  500
hnotch1    HAGKCINTLG SFECQCLQGY TGPRCEIDVN ECVSNPCQND ATCLDQIGEF
hnotch3    HLGRCVNTQG SFLCQCGRGY TGPRCETDVN ECLSGPCRNQ ATCLDRIGQF
hnotch4    HGGSCLNTPG SFNCLCPPGY TGSRCEADHN ECLSQPCHPG STCLDLLATF
          501                                                  550
hnotchl    QCMCMPGYEG VHCEVNTDEC ASSPCLHNGR CLDKINEFQC ECPTGFTGHL
hnotch3    TCICMAGFTG TYCEVDIDEC QSSPCVNGGV CKDRVNGFSC TCPSGFSGST
hnotch4    HCLCPPGLEG QLCEVETNEC ASAPCLNHAD CHDLLNGFQC ICLPGFSGTR
          551                                                  600
hnotchl    CQYDVDECAS TPCKNGAKCL DGPNTYTCVC TEGYTGTHCE VDIDECDPDP
hnotch3    CQLDVDECAS TPCRNGAKCV DQPDGYECRC AEGFEGTLCD RNVDDCSPDP
hnotch4    CEEDIDECRS SPCANGGQCQ DQP..........................
          601                                                  650
hnotchl    CHYGSCKDGV ATFTCLCRPG YTGHHCETNI NECSSQPCRL RGTCQDPDNA
hnotch3    CHHGRCVDGI ASFSCACAPG YTGTRCESQV DECRSQPCRH GGKCLDLVDK
hnotch4    .......... GAFHCKCLPG FEGPRCQTEV DECLSDPCPV GASCLDLPGA
          651                                                  700
hnotchl    YLCFCLKGTT GPNCEINLDD CASSPCDSGT CLDKIDGYEC ACEPGYTGSM
hnotch3    YLCRCPSGTT GVNCEVNIDD CASNPCTFGV CRDGINRYDC VCQPGFTGPL
hnotch4    FFCLCPSGFT GQLCEVPL.. .......... .......... ..........
          701                                                  750
hnotchl    CNSNIDECAG NPCHNGGTCE DGINGFTCRC PEGYHDPTCL SEVNECNSNP
hnotch3    CNVEINECAS SPCGEGGSCV DGENGFRCLC PPGSLPPLCL PPSHPCAHEP
hnotch4    .......CAP NLCQPKQICK DQKDKANCLC PDGS..PGCA PPEDNCT...
```

Abbildung 16: Alignment hnotch1, 3 und 4; grau unterlegt sind Polymorphismen, die im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurden.

MGPGARGRRRRRRPMSPPPPPPPVRALPLLLLLAGPGAAAPPCLD
GSPCANGGRCTQLPSREAACLCPPGWVGERCQLEDPCHSGPCAGRGVCQSSVVAGTARF
SCRCPRGFRGPDCSLPDPCLSSPCAHGARCSVGPDGRFLCSCPPGYQGRSCRSDVDECR
VGEPCRHGGTCLNTPGSFRCQCPAGYTGPLCENPAVPCAPSPCRNGGTCRQSGDLTYDC
ACLPGFEGQNCEVNVDDCPGHRCLNGGTCVDGVNTYNCQCPPEWTGQFCTEDVDECQLQ
PNACHNGGTCFNTLGGHSCVCVNGWTGESCSQNIDDCATAVCFHGATCHDRVASFYCAC
PMGKTGLLCHLDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVDECSIGA
NPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSGPCRNQATCLDRIGQFTCICM
AGFTGTYCEVDIDECQSSPCVNGGVCKDRVNGFSCTCPSGFSGSTCQLDVDECASTPCR
NGAKCVDQPDGYECRCAEGFEGTLCDRNVDDCSPDPCHHGRCVDGIASFSCACAPGYTG
TRCESQVDECRSQPCRHGGKCLDLVDKYLCRCPSGTTGVNCEVNIDDCASNPCTFGVCR
DGINRYDCVCQPGFTGPLCNVEINECASSPCGEGGSCVDGENGFRCLCPPGSLPPLCLP
PSHPCAHEPCSHGICYDAPGGFRCVCEPGWSGPRCSQSLARDACESQPCRAGGTCSSDG
MGFHCTCPPGVQGRQCELLSPCTPNPCEHGGRCESAPGQLPVCSCPQGWQGPRCQQDVD
ECAGPAPCGPHGICTNLAGSFSCTCHGGYTGPSCDQDINDCDPNPCLNGGSCQDGVGSF
SCSCLPGFAGPRCARDVDECLSNPCGPGTCTDHVASFTCTCPPGYGGFHCEQDLPDCSP
SSCFNGGTCVDGVNSFSCLCRPGYTGAHCQHEADPCLSRPCLHGGVCSAAHPGFRCTCL
ESFTGPQCQTLVDWCSRQPCQNGGRCVQTGAYCLCPPGWSGRLCDIRSLPCREAAAQIG
VRLEQLCQAGGQCVDEDSSHYCVCPEGRTGSHCEQEVDPCLAQPCQHGGTCRGYMGGYM
CECLPGYNGDNCEDDVDECASQPCQHGGSCIDLVARYLCSCPPGTLGVLCEINEDDCGP
GPPLDSGPRCLHNGTCVDLVGGFRCTCPPGYTGLRCEADINECRSGACHAAHTRDCLQD
PGGGFRCLCHAGFSGPRCQTVLSPCESQPCQHGGQCRPSPGPGGGLTFTCHCAQPFWGP
RCERVARSCRELQCPVGVPCQQTPRGPRCACPPGLSGPSCRSFPGSPPGASNASCAAAP
CLHGGSCRPAPLAPFFRCACAQGWTGPRCEAPAAAPEVSEEPRCPRAACQAKRGDQRCD
RECNSPGCGWDGGDCSLSVGDPWRQCEALQCWRLFNNSRCDPACSSPACLYDNFDCHAG
GRERTCNPVYEKYCADHFADGRCDQGCNTEECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLTVLLP
PEELLRSSADFLQRLSAILRTSLRFRLDAHGQAMVFPYHRPSPGSEPRARRELAPEVIG
SVVMLEIDNRLCLQSPENDHCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGEPLEPPE
PSVPLLPLLVAGAVLLLVILVLGVMVARRKREHSTLWFPEGFSLHKDVASGHKGRREPV
GQDALGMKNMAKGESLMGEVATDWMDTECPEAKRLKVEEPGMGAEEAVDCRQWTQHHLV
AADIRVAPAMALTPPQGDADADGMDVNVRGPDGFTPLMLASFCGGALEPMPTEEDEADD
TSASIISDLICQGAQLGARTDRTGETALHLAARYARADAAKRLLDAGADTNAQDHSGRT
PLHTAVTADAQGVFQILIRNRSTDLDARMADGSTALILAARLAVEGMVEELIASHADVN
AVDELGKSALHWAAAVNNVEATLALLKNGANKDMQDSKEETPLFLAAREGSYEAAKLLL
DHFANREITDHLDRLPRDVAQERLHQDIVRLLDQPSGPRSPPGPHGLGPLLCPPGAFLP
GLKAAQSGSKKSRRPPGKAGLGPQGPRGRGKKLTLACPGPLADSSVTLSPVDSLDSPRP
FGGPPASPGGFPLEGPYAAATATAVSLAQLGGPGRAGLGRQPPGGCVLSLGLLNPVAVP
LDWARLPPPAPPGPSFLLPLAPGPQLLNPGTPVSPQERPPPYLAVPGHGEEYPVAGAHS
SPPKARFLRVPSEHPYLTPSPESPEHWASPSPPSLSDWSESTPSPATATGAMATTTGAL
PAQPLPLSVPSSLAQAQTQLGPQPEVTPKRQVLA"

Abbildung 17: Proteinsequenz des humanen *Notch3* (Accession ID. U97669)

```
acgcggcgcg gaggctggcc cgggacgcgc ccggagccca gggaaggagg gaggagggga      60
gggtcgcggc cggccgccat ggggccgggg gcccgtggcc gccgccgccg ccgtcgccgg     120
atgtcgccgc caccgccacc gccacccgtg cgggcgctgc ccctgctgct gctgctagcg     180
gggccggggg ctgcagcccc cccttgcctg gacggaagcc cgtgtgcaaa tggaggtcgt     240
tgcacccagc tgccctcccg ggaggctgcc tgcctgtgcc cgcctggctg ggtgggtgag     300
cggtgtcagc tggaggaccc ctgtcactca ggcccctgtg ctggccgtgg tgtctgccag     360
agttcagtgg tggctggcac cgcccgattc tcatgccggt gccccgtgg cttccgaggc      420
cctgactgct ccctgccaga tccctgcctc agcagccctt gtgcccacgg tgcccgctgc     480
tcagtggggc ccgatggacg cttcctctgc tcctgcccac ctggctacca gggccgcagc     540
tgccgaagcg acgtggatga gtgccgggtg ggtgagccct gccgccatgg tggcacctgc     600
ctcaacacac ctggctcctt ccgctgccag tgtccagctg gctacacagg gccactatgt     660
gagaaccccg cggtgccctg tgcgcctca ccatgccgta acgggggcac ctgcaggcag      720
agtggcgacc tcacttacga ctgtgcctgt cttcctgggt ttgagggtca gaattgtgaa     780
gtgaacgtgg acgactgtcc aggacaccga tgtctcaatg gggggacatg cgtggatggc     840
gtcaacacct ataactgcca gtgccctcct gagtggacag gccagttctg cacggaggac     900
gtggatgagt gtcagctgca gcccaacgcc tgccacaatg ggggtacctg cttcaacacg     960
ctgggtggcc acagctgcgt gtgtgtcaat ggctggacag gtgagagctg cagtcagaat    1020
atcgatgact gtgccacagc cgtgtgcttc catggggcca cctgccatga ccgcgtggct    1080
tctttctact gtgcctgccc catgggcaag actggcctcc tgtgtcacct ggatgacgcc    1140
tgtgtcagca acccctgcca cgaggatgct atctgtgaca caaatccggt gaacggccgg    1200
gccatttgca cctgtcctcc cggcttcacg ggtggggcat gtgaccagga tgtggacgag    1260
tgctctatcg gcgccaaccc ctgcgagcac ttgggcaggt gcgtgaacac gcagggctcc    1320
ttcctgtgcc agtgcggtcg tggctacact ggacctcgct gtgagaccga tgtcaacgag    1380
tgtctgtcgg ggccctgccg aaaccaggcc acgtgcctcg accgcatagg ccagttcacc    1440
tgtatctgta tggcaggctt cacaggaacc tattgcgagg tggacattga cgagtgtcag    1500
agtagcccct gtgtcaacgg tggggtctgc aaggaccgag tcaatggctt cagctgcacc    1560
tgcccctcgg gcttcagcgg ctccacgtgt cagctggacg tggacgaatg cgccagcacg    1620
ccctgcagga atggcgccaa atgcgtggac cagcccgatg gctacgagtg ccgctgtgcc    1680
gagggctttg agggcacgct gtgtgatcgc aacgtggacg actgctcccc tgacccatgc    1740
caccatggtc gctgcgtgga tggcatcgcc agcttctcat gtgcctgtgc tcctggctac    1800
acgggcacac gctgcgagag ccaggtggac gaatgccgca gccagccctg ccgccatggc    1860
ggcaaatgcc tagacctggt ggacaagtac ctctgccgct gcccttctgg gaccacaggt    1920
gtgaactgcg aagtgaacat tgacgactgt gccagcaacc cctgcacctt tggagtctgc    1980
cgtgatggca tcaaccgcta cgactgtgtc tgccaacctg gcttcacagg gccccttttgt    2040
aacgtggaga tcaatgagtg tgcttccagc ccatgcggcg agggaggttc ctgtgtggat    2100
ggggaaaatg gcttccgctg cctctgcccg cctggctcct tgcccccact ctgcctcccc    2160
ccgagccatc cctgtgccca tgagccctgc agtcacggca tctgctatga tgcacctggc    2220
gggttccgct gtgtgtgtga gcctggctgg agtggccccc gctgcagcca gagcctggcc    2280
cgagacgcct gtgagtccca gccgtgcagg gccggtggga catgcagcag cgatggaatg    2340
ggtttccact gcacctgccc gcctggtgtc cagggacgtc agtgtgaact cctctccccc    2400
tgcaccccga acccctgtga gcatgggggc cgctgcgagt ctgcccctgg ccagctgcct    2460
gtctgctcct gcccccaggg ctggcaaggc ccacgatgcc agcaggatgt ggacgagtgt    2520
gctggccccg caccctgtgg ccctcatggt atctgcacca acctggcagg gagtttcagc    2580
tgcacctgcc atggagggta cactggccct tcctgtgatc aggacatcaa tgactgtgac    2640
cccaacccat gcctgaacgg tggctcgtgc caagacggcg tgggctcctt ttcctgctcc    2700
tgcctccctg gtttcgccgg cccacgatgc gcccgcgatg tggatgagtg cctgagcaac    2760
ccctgcggcc cgggcacctg taccgaccac gtggcctcct tcacctgcac ctgccgccg     2820
```

```
ggctacggag gcttccactg cgaacaggac ctgcccgact gcagccccag ctcctgcttc      2880
aatggcggga cctgtgtgga cggcgtgaac tcgttcagct gcctgtgccg tcccggctac      2940
acaggagccc actgccaaca tgaggcagac ccctgcctct cgcggccctg cctacacggg      3000
ggcgtctgca gcgccgccca ccctggcttc cgctgcacct gcctcgagag cttcacgggc      3060
ccgcagtgcc agacgctggt ggattggtgc agccgccagc cttgtcaaaa cgggggtcgc      3120
tgcgtccaga ctggggccta ttgcctttgt ccccctggat ggagcggacg cctctgtgac      3180
atccgaagct tgccctgcag ggaggccgca gcccagatcg gggtgcggct ggagcagctg      3240
tgtcaggcgg gtgggcagtg tgtggatgaa gacagctccc actactgcgt gtgcccagag      3300
ggccgtactg gtagccactg tgagcaggag gtggacccct gcttggccca gccctgccag      3360
catgggggga cctgccgtgg ctatatgggg ggctacatgt gtgagtgtct tcctggctac      3420
aatggtgata actgtgagga cgacgtggac gagtgtgcct cccagccctg ccagcacggg      3480
ggttcatgca ttgacctcgt ggcccgctat ctctgctcct gtcccccagg aacgctgggg      3540
gtgctctgcg agattaatga ggatgactgc ggcccaggcc caccgctgga ctcagggccc      3600
cggtgcctac acaatggcac ctgcgtggac ctggtgggtg gtttccgctg cacctgtccc      3660
ccaggataca ctggtttgcg ctgcgaggca gacatcaatg agtgtcgctc aggtgcctgc      3720
cacgcggcac acacccggga ctgcctgcag gacccaggcg gaggtttccg ttgcctttgt      3780
catgctggct tctcaggtcc tcgctgtcag actgtcctgt ctccctgcga gtcccagcca      3840
tgccagcatg gaggccagtg ccgtcctagc ccgggtcctg ggggtgggct gaccttcacc      3900
tgtcactgtg cccagccgtt ctggggtccg cgttgcgagc gggtggcgcg ctcctgccgg      3960
gagctgcagt gcccggtggg cgtcccatgc cagcagacgc cccgcgggcc gcgctgcgcc      4020
tgccccccag ggttgtcggg accctcctgc cgcagcttcc cggggtcgcc gccgggggcc      4080
agcaacgcca gctgcgcggc cgccccctgt ctccacgggg gctcctgccg ccccgcgccg      4140
ctcgcgccct tcttccgctg cgcttgcgcg cagggctgga ccgggccgcg ctgcgaggcg      4200
cccgccgcgg cacccgaggt ctcggaggag ccgcggtgcc cgcgcgccgc ctgccaggcc      4260
aagcgcgggg accagcgctg cgaccgcgag tgcaacagcc caggctgcgg ctgggacggc      4320
ggcgactgct cgctgagcgt gggcgacccc tggcggcaat gcgaggcgct gcagtgctgg      4380
cgcctcttca acaacagccg ctgcgacccc gcctgcagct cgccgcctg cctctacgac      4440
aacttcgact gccacgccgg tggccgcgag cgcacttgca acccggtgta cgagaagtac      4500
tgcgccgacc actttgccga cggccgctgc gaccagggct gcaacacgga ggagtgcggc      4560
tgggatgggc tggattgtgc cagcgaggtg ccggccctgc tggccgcgcgg cgtgctggtg      4620
ctcacagtgc tgctgccgcc ggaggagcta ctgcgttcca gcgccgactt tctgcagcgg      4680
ctcagcgcca tcctgcgcac ctcgctgcgc ttccgcctgg acgcgcacgg ccaggccatg      4740
gtcttccctt accaccggcc tagtcctggc tccgaacccc gggccgtcg ggagctggcc      4800
cccgaggtga tcggctcggt agtaatgctg gagattgaca accggctctg cctgcagtcg      4860
cctgagaatg atcactgctt ccccgatgcc cagagcgccg ctgactacct gggagcgttg      4920
tcagcggtgg agcgcctgga cttccgtac ccactgcggg acgtgcgggg ggagccgctg      4980
gagcctccag aacccagcgt cccgctgctg ccactgctag tggcgggcgc tgtcttgctg      5040
ctggtcattc tcgtcctggg tgtcatggtg gcccggcgca agcgcgagca cagcaccctc      5100
tggttccctg agggcttctc actgcacaag gacgtggcct ctggtcacaa gggccggcgg      5160
gaaccgtgg gccaggacgc gctgggcatg aagaacatgg ccaagggtga gagcctgatg      5220
ggggaggtgg ccacagactg gatggacaca gagtgcccag aggccaagcg gctaaaggta      5280
gaggagccag gcatgggggc tgaggaggct gtggattgcc gtcagtggac tcaacaccat      5340
ctggttgctg ctgacatccg cgtggcacca gccatggcac tgacaccacc acagggcgac      5400
gcagatgctg atggcatgga tgtcaatgtg cgtggcccag atggcttcac cccgctaatg      5460
ctggcttcct tctgtggggg ggctctggag ccaatgccaa ctgaagagga tgaggcagat      5520
gacacatcag ctagcatcat ctccgacctg atctgccagg gggctcagct tggggcacgg      5580
actgaccgta ctggcgagac tgctttgcac ctggctgccc gttatgcccg tgctgatgca      5640
gccaagcggc tgctggatgc tggggcagac accaatgccc aggaccactc aggccgcact      5700
```

```
cccctgcaca cagctgtcac agccgatgcc cagggtgtct tccagattct catccgaaac      5760
cgctctacag acttggatgc ccgcatggca gatggctcaa cggcactgat cctggcggcc      5820
cgcctggcag tagagggcat ggtggaagag ctcatcgcca gccatgctga tgtcaatgct      5880
gtggatgagc ttgggaaatc agccttacac tgggctgcgg ctgtgaacaa cgtggaagcc      5940
actttggccc tgctcaaaaa tggagccaat aaggacatgc aggatagcaa ggaggagacc      6000
cccctattcc tggccgcccg cgagggcagc tatgaggctg ccaagctgct gttggaccac      6060
tttgccaacc gtgagatcac cgaccacctg gacaggctgc cgcgggacgt agcccaggag      6120
agactgcacc aggacatcgt gcgcttgctg gatcaaccca gtgggccccg cagccccccc      6180
ggtccccacg gcctggggcc tctgctctgt cctccagggg ccttcctccc tggcctcaaa      6240
gcggcacagt cggggtccaa gaagagcagg aggccccccg ggaaggcggg gctggggccg      6300
caggggcccc gggggcgggg caagaagctg acgctggcct gcccgggccc cctggctgac      6360
agctcggtca cgctgtcgcc cgtggactcg ctggactccc cgcggccttt cggtgggccc      6420
cctgcttccc ctggtggctt ccccccttgag gggccctatg cagctgccac tgccactgca      6480
gtgtctctgg cacagcttgg tggcccaggc cgggcaggtc tagggcgcca gccccctgga      6540
ggatgtgtac tcagcctggg cctgctgaac cctgtggctg tgcccctcga ttgggcccgg      6600
ctgcccccac ctgcccctcc aggcccctcg ttcctgctgc cactggcgcc gggaccccag      6660
ctgctcaacc cagggacccc cgtctccccg caggagcggc ccccgcctta cctggcagtc      6720
ccaggacatg gcgaggagta cccggtggct ggggcacaca gcagcccccc aaaggcccgc      6780
ttcctgcggg ttcccagtga gcacccttac ctgaccccat cccccgaatc ccctgagcac      6840
tgggccagcc cctcacctcc ctccctctca gactggtccg aatccacgcc tagcccagcc      6900
actgccactg gggccatggc caccaccact ggggcactgc ctgcccagcc acttcccttg      6960
tctgttccca gctcccttgc tcaggcccag acccagctgg ggccccagcc ggaagttacc      7020
cccaagaggc aagtgttggc ctgagacgct cgtcagttct tagatcttgg gggcctaaag      7080
agaccccgt cctgcctcct ttctttctct gtctcttcct tccttttagt ctttttcatc      7140
ctcttctctt tccaccaacc ctcctgcatc cttgccttgc agcgtgaccg agataggtca      7200
tcagcccagg gcttcagtct tcctttattt ataatgggtg ggggctacca cccaccctct      7260
cagtcttgtg aagagtctgg gacctccttc ttccccactt ctctcttccc tcattccttt      7320
ctctctcctt ctggcctctc atttccttac actctgacat gaatgaatta ttattatttt      7380
tctttttctt ttttttttta cattttgtat agaaacaaat tcatttaaac aaacttatta      7440
ttattatttt ttacaaaata tatatatgga gatgctccct ccccctgtga acccccccagt      7500
gccccgtgg ggctgagtct gtgggcccat tcggccaagc tggattctgt gtacctagta      7560
cacaggcatg actgggatcc cgtgtaccga gtacacgacc caggtatgta ccaagtaggc      7620
acccttgggc gcacccactg gggccagggg tcgggggagt gttgggagcc tcctccccac      7680
cccacctccc tcacttcact gcattccaga ttggacatgt tccatagcct tgctggggaa      7740
gggcccactg ccaactccct ctgccccagc cccacccttg gccatctccc tttgggaact      7800
agggggctgc tggtgggaaa tgggagccag ggcagatgta tgcattcctt tatgtccctg      7860
taaatgtggg actacaagaa gaggagctgc ctgagtggta ctttctcttc ctggtaatcc      7920
tctggcccag ccttatggca gaatagaggt atttttaggc tatttttgta atatggcttc      7980
tggtcaaaat ccctgtgtag ctgaattccc aagccctgca ttgtacagcc ccccactccc      8040
ctcaccacct aataaaggaa tagttaacac tcaaaaaaaa aaaaaaaaaa a               8091
```

Abbildung 18: Die humane *Notch3* cDNA-Sequenz (Joutel et al., 1996); Sequenzlänge 8091 BP; Anzahl der Nukleotide: 1311 A; 2716 C; 2488 G; 1576 T. Bei Nukleotid Nr.1002 (türkis markiert) wurde bei allen 25 untersuchten Patienten an dieser Position statt Thymin die Base Cytosin gefunden (die Abweichung der Sequenz von ggt zu ggc verändert die Aminosäure Glycin nicht). CpG-Repeats (nicht extra markiert) mit zusätzlicher Ähnlichkeit zu Cystein Triplets (rot) als potentielle, für CADASIL verantwortliche, Mutationsorte. Bei Sequenzierung wurde festgestellt, daß zu der veröffentlichten humanen *Notch3* cDNA-Sequenz (Abbildung 18) eine Abweichung in Exon 6 der DNA-Sequenz besteht.

Aminosäure	Basen-Triplett	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code
Alanin	GCA, GCC, GCG, GCT	Ala	A
Cystein	TGC, TGT	Cys	C
Asparaginsäure	GAC, GAT	Asp	D
Glutaminsäure	GAA, GAG	Glu	E
Phenylalanin	TTC, TTT	Phe	F
Glycin	GGA, GGC, GGG, GGT	Gly	G
Histidin	CAC, CAT	His	H
Isoleucin	ATA, ATC, ATT	Ile	I
Lysin	AAA, AAG	Lys	K
Leucin	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG	Leu	L
Methionin	ATG	Met	M
Asparagin	AAC, AAT	Asn	N
Prolin	CCA, CCC, CCG, CCT	Pro	P
Glutamin	CAA, CAG	Gln	Q
Arginin	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGT	Arg	R
Serin	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT	Ser	S
Threonin	ACA, ACC, ACG, ACT	Thr	T
Valin	GTA, GTC, GTG, GTT	Val	V
Tryptophan	TGG	Trp	W
Stopcodon	TAA, TAG, TGA	X	X
Tyrosin	TAC, TAT	Tyr	Y

Tabelle 14: Die 20 Aminosäuren und Stopcodon.

8. Literaturverzeichnis

Alagille D, Odievre M, Gautier M, Dommergues JP.: Hepatic ductular hypoplasia associated with characteristic facies, vertebral malformations, retarded physical, mental and sexual development, and cardiac murmur. J. Pediat. 1975; 86: 63-71.

Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN: Disease-causing mutations in the human genome. Eur J Pediatr. 2000 Dec; 159 Suppl 3:S173-8. Review.

Arcos-Burgos OM, Restrepo Arango T, Rivera Valencia D, Palacio LG, Castaneda M, Palacio O, Arboleda Velazquez J, Lopera Restrepo F.: Vascular hereditary dementia cadasil type in colombia linkage analysis to *Notch3* gene. Rev Neurol. 2001 May, 1;32(8):701-704.

Artavanis Tsakonas S.: Alagille syndrome a notch up for the Notch rezeptor. Nature Genetics 1997; 7:212-213

Artavanis Tsakonas S, Matsuno K, Tortini ME.: Notch signaling. Science 1995; 268:225-32

Artavanis Tsakonas S, Sompson P.: Choosing a cell fate: a view from the Notch locus. Trends Gene 1991; 7:403-8

Aster Jon C, Pear Warren S.: Notch signaling in leukemia. Current Opinion in Hematology 2001; 8: 237-244

Baudrimont M, Dubas F, Joutel A, Tournier Lasserve E, Bousser MG: Autosomal dominant eukoencephalopathy and subcortical ischemic stroke. A clinicopathological study. Stroke 1993; 24:122-125

Beatus P, Lundkvist J, Oberg C and Lendahl U.: The Notch3 intracellular domain represses notch1-mediated activation through Hairy/Enhancer of split (HES) promoters Development, Vol 126, Issue 1999; 17 3925-3935

Bellavia D, Campese AF, Alesse E, Vacca A, Felli MP, Balestri A,Stoppacciaro A, Tiveron C, Tatangelo L, Giovarelli M, Gaetano C, Ruco L,Hoffman ES, Hayday AC, Lendahl U, Frati L, Gulino A, Screpanti I.: Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. EMBO J. 2000 Jul 3; 19(13):3337-48.

Berezovska O, Jack C, McLean P, Aster JC, Hicks C, Xia W, Wolfe MS, Weinmaster G, Selkoe DJ, Hyman BT.:Rapid Notch1 nuclear translocation after ligand binding depends on presenilin-associated gamma-secretase activity. Ann N Y Acad Sci. 2000;920:223-6.

Bergmann M, Ebke M, Yuan Y, Bruck W, Mugler M, Schwendemann G.: Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts an leukoencephalopathy (CADASIL): A morphological study of a German family. Acta Neuropathol 1996; 92:341-350

Broadley SA, Sawcer SJ, Chataway SJ, Coraddu F, Coles A, Gray J, Roxburgh R, Clayton D, Compston DA.: No association between multiple sclerosis and the Notch3 gene responsible for cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2001 Jul; 1(1):97-9.

Chabriat H, Levy C, Taillia H, et al.: Patterns of MRI lesions in CADASIL. Neurology 1998;51:452-457

Chabriat H, Tournier Lasserve E, Vahedi K, Leys D, Joutel A, Nibbio A, Escaillas JP, Iba Zizen MT, Bracard S, Tehindrazanarivelo A, et al.: Autosomal dominant migraine with MRI whitematter abnormalities mapping to the CADASIL locus. Neurology 1995; 45:1086-91

Chabriat H, Vahedi K, Iba Zizen MT, et al.: Clinical spectrum of CADASIL: a study of 7 families. Lancet 1995; 346:934-939

Chuah TL, Tan SM, Flanagan S, Hyland V, Sullivan AA, Henderson R, MacMillan J, Lander C.: CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leucoencephalopathy):an Australian perspective. J Clin Neurosci. 2001 Sep; 8(5):404-6.

Dichgans M.: CADASIL: A Monogenic Condition Causing Stroke and Subcortical Vascular Dementia. Cerebrovasc Dis 2002;13(suppl 2):37–41

Dichgans M, Filippi M, Brüning R, Iannucci G,Berchtenbreiter C,Minicucci L,Uttner I,Crispin A,Ludwig H,Gasser T,YousryT.A.: Quantitative MR1 in CADASIL: correlation with disability and cognitive performance. Neurology 1999; 52:1361-1367

Dichgans M, Gasser T.: CADASIL:Klinik und Diagnostik. Dtsch Med Wochenschr. 1998 Aug 14;123(33):979-81. Review. German

Dichgans M, Ludwig H, Müller-Höcken J, Messerschmidt A, Gasser T.: Small in-frame deletions and missense mutations in CADASIL: 3 D models predict misfolding of Notch3 EGF-like repeat domains. European Journal of Human Genetics 2000; 8:280-285

Dichgans M, Mayer M, Muller Myhsok B, Straube A, Gasser T.: Identification of a key recombinant narrows the CADASIL gene region to 8 cM and argues against allelism of CADASIL and familial hemiplegic migraine. Genomics 1996; 32:151-4

Dichgans M, Mayer M, Uttner I, et al.: The phenotypic spectrum of CADASIL: clinical findings in 102 cases. Ann Neurol 1998; 44:731-739

Dichgans M, Petersen D. Angiographic complications in CADASIL.

Lancet. 1997 Mar 15;349(9054):776-7.

Downing AK, Knott V, Werner JM, Cardy CM, Campbell ID, Handford PA.: Solution structure of a pair of calcium-binding epidermal growth factor-like domains: implications for the Marfan syndrome an other genetic disorders. Cell 1996; 85:597-605

Ducros A, Nagy T, Alamowitch S, Nibbio A, Joutel A, Vahedi K, Chabriat H, Iba Zizen MT, Julien J, Davous P, Goas JY, Kyon Caen O, Dubois B, Ducrocq X, Salsa F, Ragno M, Burkhard P, Bassetti C, Hutchinson M, Verin M Viader F, Chapon F, Levasseur M, Mas JL, Delrieu O, et al.: Cerebral autosomal dominant arterio-pathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, genetic homogeneity, and mapping of the locus within a 2-cM interval. Am J Hum Genet 1996; 58:171-81

Dunnen JT and Antonarakis SE: Mutation Nomenclature Extensions and Suggestions to Describe Complex Mutations: A Discussion. Human Mutation 2000;15:7.12

Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J.: TAN-1, the human homolog of the Drosophila Notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell 1991; 66:649-661.

Escary JL, Cecillion M, Maciazek J, Lathrop M, Tournier-Lasserve E, Joutel A.: Evaluation of DHPLC analysis in mutational scanning of Notch3, a gene with ahigh G-C content. Human Mutation 2000; 16:518-526.

Faux CH, Turnley AM, Epa R, Cappai R, Bartlett PF.: Interactions between fibroblast growth factors and Notch regulate neuronal differentiation. J Neurosci. 2001 Aug 1; 21(15):5587-96.

Fortini ME.: Notch and Presenilin: a proteolytic mechanism emerges. Curr Opin Cell Biol. 2001 Oct; 13(5):627-34.

Fryxell KJ, Soderlund M, Jordan TV.: An animal model for the molecular genetics of CADASIL. (Cerebral autosomaldominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy). Stroke. 2001 Jan; 32(1):6-11

Gray GE, Mann RS, Mitsiadis E, Henrique D, Carcangiu ML, Banks A, Leiman J, Ward D, Ish-Horowitz D, Artavanis-Tsakonas S.: Human ligands of the Notch receptor. Am J Pathol. 1999 Mar;154(3):785-94.

Gridley T.:Notch signaling and inherited disease syndromes, Human Molecular Genetics, 2003, Vol. 12, Review Issue 1, R9-13.

Gridley T.: Notch signaling during vascular development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 May 8; 98(10):5377-8.

Handford P, Downing AK, Rao Z, Hewett DR, Sykes BC, Kielty CM. The calcium binding properties and molecular organization of epidermal growth factor-like domains in human fibrillin-1. J Biol Chem. 1995 Mar 24;270(12):6751-6. HGMD, Human Gene Mutation Database: Notch3 Nukleotid Substitution

Holmgren C, Kanduri C, Dell G, Ward A, Mukhopadhya R, Kanduri M, Lobanenkov V, Ohlsson R.: CpG methylation regulates the Igf2/H19 insulator. Curr Biol. 2001 Jul 24; 11(14):1128-30

Huang X, Miller M.: A Time-Efficient, Linear-Space Local Similarity Algorithm Adv. Appl. Math. 1991; 12:337-357.

Hutchinson M, O´Riordan J, Javed M, et al.: Familial hemiplegie migraine and autoeomal dominant arberiopathy with leukoencephalopathy (CADASIL). Ann Neurol 1995; 38:517-824

Irvin DK, Zurcher SD, Nguyen T, Weinmaster G, Kornblum HI.: Expression patterns of Notch1, Notch2, and Notch3 suggest multiple functional roles for the Notch-DSL signaling system during brain development. J Comp Neurol. 2001 Jul 23; 436(2):167-81.

Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A.: Signalling downstream of activated mammalian Notch. Nature 1995; 377:355-358

Johansen KM, Fehon RG, Artavanis Tsakonas S.: The notch gene product is a glycoprotein expressed on the cell surface of both epidermal and neuronal precursor cells during Drosophila development. J Cell Biol 1989; 109:2427-40

Joutel A, Bousser MG, Biousse V, Labauge P, Chabriat H, Nibbo A. Maciazek J, Meyer B, Bach MA, Weissenbach J, et al.: A gene for familial hemiplegic migraine maps to chromosome 19. Nat Genet 1993; 5:40-5

Joutel A, Chabriat H, Vahedi K, Domenga V, Vayssiere C, Rucho outel A, Chabriat H, Vahedi K, Domenga V, Vayssiere C, Ruchoux MM, Lucas C, Leys D, Bousser MG, Tournier-Lasserve E.: Splice site mutation causing a seven amino acid Notch3 in-frame deletion in CADASIL. Neurology. 2000 May 9;54(9):1874-5.

Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cecillion M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissanbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier Lasserve E.: Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. Nature 1996; 383:707-710.

Joutel A, Dodick DD, Parisi JE, Cecillon M, Tournier-Lasserve E,Bousser MG.: De novo mutation in the Notch3 gene causing CADASIL. Ann Neurol. 2000 Mar; 47(3):388-91.

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-Lasserve E. Skin biopsy immunostaining with a Notch3 monoclonal antibody for CADASIL diagnosis. Lancet. 2001 Dec 15;358(9298):2049-51

Joutel A, Francois A, Chabriat H, Vahedi K, Andreux F, Domenga V, Cecillon M, Maciazek J, Bousser MG, Tournier-Lasserve E.: [CADASIL: genetics and physiopathology]. Bull Acad Natl Med. 2000; 184(7):1535-42; discussion 1542-4. Review. French.

Joutel A, Vahedi K, Corpechot C, et al.: Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. Lancet 1997; 350:1511-1515

Kalimo H, Viitanen M, Amberla K, Juvonen V, Marttila R, Poyhonen M, Rinne JO, Savontaus M, Tuisku S, Winblad B.: CADASIL: hereditary disease of arteries causing brain infarcts and dementia. Neuropathol Appl Neurobiol. 1999 Aug; 25(4):257-65. Review

Kamath BM, Stolle C, Bason L, Colliton RP, Piccoli DA, Spinner N, Krantz ID.: Craniosynostosis in Alagille syndrome. Am J Med Genet. 2002 Oct 1;112(2):176-80.

Kettle S, Yuan X, Grundy G, Knott V, Downing AK, Handford PA.: Defective calcium binding to fibrillin-1: consequence of an N2144S change for fibrillin-1 structure and function. J Mol Biol. 1999 Jan; 22;285(3):1277-87.

Kitagawa M, Oyama T, Kawashima T, Yedvobnick B, Kumar A, Matsuno K, Harigaya K.: Nucleotide, Protein A human protein with sequence similarity to Drosophila mastermind coordinates the nuclear form of notch and a CSL protein to build a transcriptional activator complex on target promoters. Mol Cell Biol. 2001 Jul; 21(13):4337-46.

Knippers R.: Molekulare Genetik. 7. Auflage 2001

Kockel L, Homsy JG, Bohmann D. Drosophila AP-1: Lessons from an invertebrate. Oncogene. 2001 Apr 30; 20(19):2347-64. Review.

Kopan R, Schroeter EH, Weintraub H, Nye JS.Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Feb 20;93(4):1683-8.

Kotorii S, Takahashi K, Kamimura K, Nishio T, Arima K, Yamada H, Uyama E,Uchino M, Suenaga A, Matsumoto M, Kuchel G, Rouleau GA, Tabira T.: Mutations of the Notch3 gene in non-caucasian patients with suspected CADASIL syndrome. Dement Geriatr Cogn Disord. 2001 May-Jun; 12(3):185-93

Krawczak M, Cooper DN: Gene deletions causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment. Hum Genet 1991; 86:425-441

Lamprecht J.: Biologische Forschung: Von der Planung bis zur Publikation, Verlag Paul Parey, Berlin/Hamburg, 1992

Lopera F, Rivera N, Arboleda J, Restrepo T, Arcos-Burgos M.: [Analysis of complex segregation in a large family with hereditary cerebrovascular disease in Antioquia, Colombia]. Rev Neurol. 2001 Feb 1-15; 32(3):222-5. Spanish.

Lundkvist J, Lendahl U.: Notch and the birth of glial cells. Trends Neurosci.

2001 Sep; 24(9):492-4.

Mayer M, Dichgans M, Gasser T, Buttner U, Uttner L, Straube A.: Hereditary CADASIL cerebral arteriopathy. Report of a family. Nervenarzt 1995; 66:927-32

Mellies JK, Bäumer T, Müller JA, et al.: SPECT study of a German CADASIL family: a phenotype with migraine and progressive dementia only. Neurology 1995; 50:1715-1721

Mikol J, Henin D, Baudrimont M, Gaulier A, Bacri D, Tillier JN, Davous P.: [Atypical CADASIL phenotypes and pathological findings in two new French families]. Rev Neurol (Paris). 2001 Jul; 157(6-7):655-67.

Mizutani T, Taniguchi Y, Aoki T, Hashimoto N, Honjo T.: Conservation of the biochemical mechanisms of signal transduction among mammalian Notch family members. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jul 31; 98(16):9026-3

Morris AL, MacArthur MW, Hutchinson EG, Thornton JM.: Stereochemical Quality of Protein Structure Coordinates. PROTEINS: Structure, Function, and Genetics 1992; 12:345-364.

Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Ray WJ, Kopan R.: A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. Molec. Cell, 2000; 5:197-206.

Oberstein SA, Ferrari MD, Bakker E, et al.: Diagnostic Notch3 sequence analysis in CADASIL: three new mutations in Dutch patients. Dutch CADASIL Research Group. Neurology 1999; 52:1913-1915

Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mohrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJ, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR.: Familial hemiplegic migraine an episodic ataxia type-2 are caused by mutations in der Ca2+ channel gene CACNLIA4. Cell 1996; 87:543-52

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 Mar 13; 56(5):628-34.

Otto V, Kaps M, Burgmann T, Kompf D.: CADASIL Two case reports on hereditary multiple-infarct dementio, Fortschr Neurol Psychiatr 1997; 65:90-95

Pilz A, Prohaska R, Peters J, Abbott C.: Genetic linkage analysis of the Ak1, Col5a1, Epb7.2, Fpgs, Grp78, Pbx3, and Notch1 genes in the region of mouse chromosome 2 homologous to human chromosome 9q. Genomics 1994; 21: 104-109,

Pourquie O.: The vertebrate segmentation clock. J Anat. 2001 Jul-Aug; 199(Pt 1-2):169-75.

Rovaris M, Filippi M, Caleri G, et al.: Intra-observar reproducibility in measuring new putative MR markers of demyclinution and axonal loss in multiple sclerosis: a comparison with T2-weighted images. J Neurol 1997; 244:266-270

Ruchoux MM, Chabriat H, Bousser MG, Baudrimont M, Tournier Lasserve E: Presence of ultrastructural arterial lesions in muscle and skin vessels of patients with CADASIL. Stroke 1994; 25:2291-2922

Ruchoux MM, Domenga V, Brulin P, Maciazek J, Limol S, Tournier-Lasserve E, Joutel A.Transgenic mice expressing mutant Notch3 develop vascular alterations characteristic of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. A J Pathol. 2003 Jan;162(1):329-42.

Ruchoux MM, Maurage CA: CADASIL: cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. J Neuropathol Exp Neurol 1997; 56:947-964

Sabbadini G, Francia A, Calandriello L, et al.: Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy (CADASIL). Clinical, neuroimaging, pathological and genetic study of a large Italian family. Brain 1995; 118:207-215

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. Biotechnology. 1992;24:104-8.

Sawada A, Fritz A, Jiang Y, Yamamoto A, Yamasu K, Kuroiwa A, Saga Y, Takeda H.: Zebrafish Mesp family genes, mesp-a and mesp-b are segmentally expressed in the presomitic mesoderm, and Mesp-b confers the anterior identity to the developing somites.Development. 2000 Apr;127(8):1691-702.

Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R.: Notch1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. Nature 1998; 393:382-386.

Sekimata M, Takahashi A, Murakami-Sekimata A, Homma Y.: Involvement of a novel zinc finger protein, MIZF, in transcriptional repression by interacting with a methyl-CpG binding protein, MBD2. J Biol Chem. 2001 Sep 11. 2001 Nov 16;276(46):42632-8.

Shimizu K, Chiba S, Saito T, Kumano K, Hirai H.: Physical interaction of Delta1, Jagged1, and Jagged2 with Notch1 and Notch3 receptors. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Sep 16; 276(1):385-9.

Simpson P.: Notch Signaling in Development. Perspectivesin Developmental Neurobiology, 1997, Vol4.pp:297-304

Sippl J.M.: Calculation of Conformational Ensembles from Potentials of Mean Force: an approach to the knowledge based prediction of local structures in globular proteins. J. Mol. Biol. 1990; 213:859-883.

Skehan SJ, Hutchinson M, MacErlaine DP.: Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencophalopathy, AJNR Am J Neuroradiol 1995; 16:2116-2119

Sourander P, Walinder J.: Hereditary multi-infarct dementia. Morphological and clinical studies of a new disease. Acta Neuropathol Berl 1977; 39:247-54

Struhl G, Fitzgerald K, Greenwald I.: Intrinsic activity of the Lin-12 and Notch intracellular domains in vivo. Cell 1993; 74:331-45

Tournier Lasserve E, Iba Zizen MT, Romero N, Bousser MG.: Autoomal dominant syndrome with strokelike episodes and leukoencephalopathy. Neurology 1995; 45:1086-91

Tournier Lasserve E, Joutel A, et al.: Cerebral autosomal moninant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps on chromosome19q12. Nat Genet 1993; 3:256-259

Trojano L, Ragno M, Manca A, Caruso G.: A kindred affected by cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL): a 2-year neuropsychological follow-up. J Neurol 1998; 245:217-222

Uhlenbrock D, Sehlen S.: The value of T1-weighted images in the differentiation between MS, white matter lesions and subcortical arteriosclerotic endephalopathy (SAE). Neuroradiology 1989; 31:203- 212

Verin M, Rolland Y, Landgraf F, Chabriat H, Bompais B, Michel A, Vahedi K, Martinet J, Tournier Lasserve E, Lemaitre MH, Eden G.: New phenotype of the cerebral autosomal dominant arteriopathy mapped to chromosome 19. Migraine as the prominent clinical feature. I Neurol Neurosurg Psychiatry 1995; 59:579-585

Watson, G. H.; Miller, V. : Arteriohepatic dysplasia: familial pulmonary arterial stenosis with neonatal liver disease. Arch. Dis. Child., 1973; 48:459-466

Weiner, S.J., Kollman, P.A., Case, D.A., Singh, U.C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S.,Weiner, P.K.: A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids proteins. J. Am. Chem. Soc. .1984; 106:765-784

Weinmaster G: The ins and outs of Notch signaling. Mol Cell Neurosci 1997; 9:91-102

Wharton KA, Johansen KM, Xu T, Artavanis Tsakonas S.: Nucleotide sequence from the neurogenetic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. Cell 1985; 43:567-81

Zakany J, Kmita M, Alarcon P, de la Pompa JL, Duboule D.: Localized and transient transcription of Hox genes suggests a link between patterning and the segmentation clock. Cell. 2001 Jul 27; 106(2):207-17.

Internetaddressen:

Building Clustalw Alignment: http://www.bork.embl-heidelberg.de/cgl/alignment

HGMD: http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/ns/1/361136.html

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Thomas Gasser in der Arbeitsgruppe Neurogenetik, Neurologische Klinik, im Klinikum Großhadern angefertigt.
An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ausdrücklich bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Martin Dichgans für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

Für die Einführung in experimentelle Techniken möchte ich mich u.a. auch bei Herrn Dr.Ulrich Grau aus der Klinischen Chemie bedanken.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bedanken für Anregungen und Unterstützungen bei der Durchführung der Experimente bei Frau Peggy Mann und Herrn Dr. Leonhard Riedel.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung, für die entspannte und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Für die Beratung zur Erstellung der Statistik bedanke ich mich bei Frau Aydimir von der Statistikabteilung der LMU in Großhadern.

10. Veröffentlichungen

Der Inhalt dieser Doktorarbeit geht in folgende Publikationen/Abstracts mit ein:

H Ludwig, U Grau, H.P. Klein, T.Gasser, M. Dichgans: DNA Diagnostik bei CADASIL: Sequenzierung der `Cluster Region´ des Notch3 Gens in 44 Familien. Poster: Research Festival´98 Klinikum Großhadern

M Dichgans, H Ludwig, U Grau, T Gasser: Mutation detection in CADASIL: Direct sequencing of the Notch3 `cluster region in 44 families. Abstract: 5th Workshop Neurogenetics in Germany; October 22-24.1998, Freiburg I, Brsg

Dichgans M, Filippi M, Brüning R, Iannucci G, Berchtenbreiter C, Minicucci L, Uttner I, Crispin A, Ludwig H, Gasser T, YousryT.A: Quantitative MRT in CADASIL correlation with disability and cognitive performance. Neurology 1999. 52:1361-1367

Dichgans M, Ludwig H, Müller-Höcken J, Messerschmidt A, Gasser T: Small in-frame deletions and missense mutations in CADASIL: 3 D models predict misfolding of Notch3 EGF-like repeat domains. European Journal of Human Genetics 2000; 8:280-285

11. Lebenslauf

Name:	Harald Ludwig	
Addresse:	Am Vogelsang3 App.201 37075 Göttingen (hludwigm@yahoo.de)	
Geburtstag und Ort:	21.6.1967 in Hamburg	
Familienstand:	ledig	
Schule:	1974-1978 Grundschule in Trittau	
	1991 Allgemeine Hochschulreife in Hamburg	
Dienst:	1989-1990 Zivildienst	
Studium:	1992	Biochemiestudium in Berlin
	1994	Studium der Humanmedizin in München
	1997	Physikum in Berlin
	1998	1.Staatsexamen in München
	2000	2.Staatsexamen in München
	2002	3.Staatsexamen in München
AIP:	2003	Innere Medizin Geriatrie in Nürnberg