

Aus der Klinik für Neurologie
(Direktorin Prof. Dr. Daniela Berg)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchung der miR-29 Bindestelle in der 3'-untranslatierten
Region des COL4A1 Gens bei Patient*innen mit Infarkten im
vertebrobasilären Stromgebiet und Leukenzephalopathie**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Jessica Roos
aus Madison

Kiel 2023

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Dr. Gregor Kuhlenbäumer, Klinik für Neurologie

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Almuth Caliebe, Institut für Humangenetik

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 22.10.2024

gez.: Prof. Dr. Dr. Gregor Kuhlenbäumer

(Vorsitzende/r der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	- 1 -
1.1. Epidemiologie und Klassifikation von Hirninfarkten	- 1 -
1.1.1. Juvenile Hirninfarkte	- 3 -
1.1.2. Bedeutung der Genetik bei Hirninfarkten	- 4 -
1.2. Zerebrale Mikroangiopathien	- 5 -
1.3. Hereditäre zerebrale Mikroangiopathien	- 7 -
1.3.1. Diagnostik der hereditäre zerebralen Mikroangiopathien	- 9 -
1.3.2. Therapie der hereditären zerebralen Mikroangiopathien	- 11 -
1.3.3. Pontine autosomal dominante Mikroangiopathie mit Leukenzephalopathie	- 12 -
1.4. Physiologische Bedeutung der miR-29 Bindestelle in der 3'UTR von COL4A1	- 16 -
1.5. Molekulargenetische Untersuchungen	- 17 -
1.6. Zielsetzung	- 19 -
2. Material und Methoden	- 20 -
2.1. Material	- 20 -
2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterial	- 20 -
2.1.2. Chemikalien	- 21 -
2.1.3. Software und Datenbanken	- 21 -
2.2. Studienkollektiv	- 22 -
2.3. Molekulargenetische Untersuchungen	- 23 -
2.3.1. Polymerase-Kettenreaktion	- 23 -
2.3.2. DNA-Amplifikation	- 25 -
2.3.3. Gelelektrophorese	- 26 -
2.3.4. Sanger-Sequenzierung	- 26 -
2.3.5. Mutationsanalyse	- 26 -
2.4. Pathohistologie und immunhistochemische Färbungen	- 27 -
3. Ergebnisse	- 29 -
3.1. Studienkollektiv	- 29 -
3.2. Mutationsanalyse	- 32 -
3.2.1. miR-29 Bindestelle in der 3'UTR von COL4A1	- 32 -
3.2.2. Variante rs886049956	- 33 -

3.2.3.	Variante rs551436530	- 35 -
3.3.	Histologie und Immunhistochemie	- 37 -
4.	Diskussion	- 40 -
4.1.	Varianten in der 3'UTR des <i>COL4A1</i> Gens.....	- 40 -
4.1.1.	Varianten in der miR-29 Bindestelle (NM_001854.6:c.*31-36)	- 40 -
4.1.2.	Variante rs886049956 (NM_001845.6:c.*137G>A)	- 43 -
4.1.3.	Variante rs551436530 (NM_001845.6:c.*47-*49del).....	- 44 -
4.2.	Histologie und Immunhistochemie	- 45 -
4.3.	Limitationen	- 47 -
4.4.	Ausblick	- 49 -
5.	Zusammenfassung	- 51 -
6.	Literaturverzeichnis	- 52 -
	Publikationen	- 68 -
	Danksagung	- 69 -
	Eidesstattliche Erklärung.....	- 70 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Klassifikation ischämischer Hirninfarkte nach der „Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST)“-Klassifikation (H. P. Adams et al., 1993)	-2-
Tabelle 2 Fazekas Skala: Einteilung der Hyperintensitäten der weißen Substanz nach Schweregrad	-6-
Tabelle 3 verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial	-20-
Tabelle 4 verwendete Chemikalien	-21-
Tabelle 5 verwendete Software und Datenbanken	-21-
Tabelle 6 verwendete Oligonukleotid-Primer	-23-
Tabelle 7 PCR-Programm zur Amplifizierung der 3'UTR von <i>COL4A1</i> mit den spezifischen Oligonukleotid-Primern	-24-
Tabelle 8 PCR-Reaktionsansätze für unterschiedliche Proben abhängig von der DNA- Konzentrationen	-25-
Tabelle 9 Verteilung der Infarktlokalisationen in der Kohorte	-30-
Tabelle 10 Einteilung der ischämischen Hirninfarkte nach TOAST Klassifikation und Verteilung von Alter und Geschlecht	-30-
Tabelle 11 Prävalenz von Risikofaktoren in der Kohorte	-32-
Tabelle 12 Allelzahl und relative Häufigkeit der Variante rs886049956 in der vorliegenden Studie und in verschiedenen Bevölkerungsgruppen der GnomAD-Kohorte	-35-
Tabelle 13 Allelzahl und relative Häufigkeit der Variante rs551436530 in der vorliegenden Arbeit und in verschiedenen Bevölkerungsgruppen der GnomAD-Kohorte	-37-

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Elastica van Gieson Färbung und immunhistochemische Färbung intraparenchymaler Arterien bei PADMAL	-13-
Abbildung 2 Darstellung der miR-29 Bindestelle in der 3'UTR des COL4A1 Gens	-14-
Abbildung 3 Stammbaum einer PADMAL Familie	-15-
Abbildung 4 Histogramm über die Altersverteilung bei Auftreten des Hirninfarkts	-29-
Abbildung 5 Häufigkeitsverteilung der untersuchten Fälle nach TOAST-Klassifikation und Infarktlokalisierung.	-31-
Abbildung 6 Beispielsequenzen der miR-29 Bindestelle von zwei Probanden mit Referenzsequenz	-33-
Abbildung 7 Sequenz des Patienten mit PADMAL und heterozygoter Punktmutation in der miR-29 Bindestelle (GRCh37.p13, chr13:110,802,674G>T; c.*36C>A)	-33-
Abbildung 8 Sequenz des Patienten mit der Variante rs886049956 (GRCh37.p13, chr13:110,802,573C>T)	-34-
Abbildung 9 Sequenz der Patientin mit der Variante rs551436530 (GRCh37.p13, chr13:110,802,661-110,802,663 -/AAG).	-36-
Abbildung 10 Gegenüberstellung von Gefäßanschnitten aus dem Putamen von PADMAL und Hypertonie-bedingter Atherosklerose	-38-
Abbildung 11 MRT-Bilder eines Patienten mit PADMAL und linksseitiger Hemiparese	-39-

Abkürzungsverzeichnis

AchE	Acetylcholinesterase
CAA	Zerebrale Amyloidangiopathie
CADASIL	Zerebrale autosomal dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie
CARASIL	Zerebrale autosomal rezessive Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNM	De novo Mutationen
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
EEG	Elektroenzephalographie
EGFR	Epidermal Growth Factor-like Repeat
EvG	Elastica van Gieson
HANAC	Hereditäre Angiopathie mit Nephropathie, Aneurysmen und Muskelkrämpfen
HERNS	Hereditäre Endotheliopathie mit Retinopathie, Nephropathie und Hirninfarkten
MELAS	Mitochondriale Enzephalopathie mit Laktatazidose und Schlaganfall-ähnlichen Episoden
miRNA	MikroRNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NGS	Next Generation Sequencing
NIHSS	National Institutes of Health Stroke Score
PADMAL	Pontine autosomal dominante Mikroangiopathie mit Leukenzephalopathie
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rs-Nummer	Referenz SNP-Nummer
RVCL	Retinale Vaskulopathie mit zerebraler Leukodystrophie
shMID	Schwedische hereditäre Multiinfarktdemenz
Sifap	Stroke in Young Fabry Patients- Studie
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TIA	Transitorische ischämische Attacke
TOAST	Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment
WES	Whole exome sequencing
WGS	Whole genome sequencing
ZMA	Zerebrale Mikroangiopathie

1. Einleitung

Die pontine autosomal dominante Mikroangiopathie mit Leukenzephalopathie (PADMAL) ist eine sehr seltene zerebrale Mikroangiopathie, die autosomal dominant vererbt wird. Bei den betroffenen Personen treten ab einem durchschnittlichen Manifestationsalter von 35-45 Jahren wiederholt lakunäre ischämische Infarkte vor allem in der Pons und eine progrediente Leukoaraiose auf, die zu fortschreitenden neurologischen Symptomen wie Ataxie, Dysarthrie, Paresen und Demenz führen. Im Jahr 2016 konnte durch genetische Untersuchungen betroffener Familien die DNA-Region identifiziert werden, in der bei PADMAL heterozygote Punktmutationen auftreten (Verdura et al., 2016). Diese Region liegt in der 3'-untranslatierten-Region des *COL4A1* Gens und ist eine Bindestelle für die MikroRNA miR-29. Folge der Mutation ist eine verminderte Bindung der miR-29, was zu einer gestörten Regulation der Genexpression mit Überexpression von *COL4A1* führt. Die vorliegende Arbeit geht der Frage nach, ob pathogene Varianten in der miR-29 Bindestelle von *COL4A1* gehäuft bei jungen Menschen mit Infarkten im vertebrobasilären Stromgebiet und Leukenzephalopathie auftreten.

1.1. Epidemiologie und Klassifikation von Hirninfarkten

Hirninfarkte sind weltweit die zweithäufigste Todesursache und die häufigste Ursache bleibender Behinderung bei Erwachsenen (GBD 2016 DALYs and HALE Collaborators et al., 2017). Pro Jahr sterben mehr als sechs Millionen Menschen an den Folgen eines Hirninfarkts, womit Hirninfarkte für 12 % aller Todesfälle weltweit verantwortlich sind (World Health Organization, 2018a) und 2017 etwa 113 Millionen verlorene Lebensjahre weltweit zur Folge hatten (GBD 2017 Causes of Death Collaborators et al., 2018)). Bis 2030 wird ein Anstieg der Hirninfarkt-bedingten Todesfälle auf 8,5 Millionen pro Jahr erwartet (World Health Organization, 2018b). Statistisch gesehen wird weltweit etwa jede vierte Person über 25 Jahre im Leben einen Hirninfarkt erleiden (GBD 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators et al., 2018).

Ein Hirninfarkt wird definiert als das plötzliche Auftreten eines neurologischen Defizits, welches sich einem spezifischen arteriellen Versorgungsgebiet zuordnen lässt (Kasper et al., 2015). Dabei wird die Blutzufuhr zu Teilen des Gehirns unterbrochen. Der resultierende Mangel an Sauerstoff und Glucose führt zu einem rasch voranschreitenden Absterben der Neurone. Aufgrund der komplexen Anatomie des Gehirns und seiner vaskulären Versorgung ist die klinische Manifestation eines Hirninfarkts sehr variabel. Zu den häufigsten Symptomen gehören: sensorische und/oder motorische Hemiparese (85 % der Betroffenen), Aphasie, Dysarthrie und Sehstörungen (Kasper et al., 2015). Etwa 90 % des Hirninfarkttrisikos kann durch das Vorhandensein modifizierbarer Risikofaktoren erklärt werden (O'Donnell et al., 2010). Wichtige modifizierbare Risikofaktoren sind Bluthochdruck, Hyperlipidämie,

Vorhofflimmern, Diabetes mellitus, Nikotinkonsum und exzessiver Alkoholkonsum, körperliche Inaktivität und psycho-sozialer Stress (Boehme et al., 2017; O'Donnell et al., 2010). Hinzu kommen unveränderliche Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht und genetische Faktoren (Boehme et al., 2017).

Hirninfarkte werden grob in ischämische und hämorrhagische Infarkte unterteilt. Ischämische Infarkte entstehen aufgrund eines reduzierten zerebralen Blutflusses über mehrere Sekunden. Hämorrhagische Infarkte bezeichnen intrazerebrale oder subarachnoidale Blutungen (Kasper et al., 2015). Ischämische Infarkte machen mit etwa 82 % der Fälle in Europa den Großteil der Hirninfarkte aus (Wolfe, 2009). Sie können mithilfe der „Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST)“ - Klassifikation in fünf ätiologische Subtypen klassifiziert werden (Tabelle 1). Die TOAST-Klassifikation wurde 1993 entwickelt, um die ätiologische Zuordnung von Hirninfarkten in multizentrischen klinischen Studien zu standardisieren (H. P. Adams et al., 1993). Sie ist heute die am häufigsten verwendete Klassifikation für ischämische Hirninfarkte (Gökçal, Niftaliyev, & Asil, 2017; Wolf, Sauer, Alonso, & Hennerici, 2011).

Tabelle 1 Klassifikation ischämischer Hirninfarkte nach der „Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST)“ -Klassifikation (H. P. Adams et al., 1993)

<i>TOAST-Klassifikation</i>	
I. Makroangiopathie	Nachweis einer mindestens 50-prozentigen Stenose oder Verschluss einer hirnzuführenden Arterie, meist aufgrund einer Atherosklerose. Infarkte mit einem Durchmesser >1,5 cm in der zerebralen Bildgebung.
II. Kardiale Embolie	Verschluss einer hirnversorgenden Arterie durch einen kardialen Embolus. Nachweis kardialer Risikofaktoren.
III. Mikroangiopathie	Verschluss kleiner zerebraler Gefäße. In der Bildgebung subkortikale lakunäre Läsionen mit einem Durchmesser <1,5 cm. Klinisch lakunäres Syndrom.
IV. Andere definierte Ätiologie	Seltenere Infarktursachen wie Vaskulitiden, hämatologische Erkrankungen oder Gerinnungsstörungen.
V. Unklare Ätiologie	Keine eindeutige Ursache trotz ausführlicher Diagnostik, >1 infrage kommende Ursache oder inkomplette Diagnostik.

Die Einteilung ischämischer Hirninfarkte anhand der Ätiologie ist sinnvoll, da die Therapie und die Prognose von der Ätiologie abhängig sind. Makroangiopathische Infarkte gehen mit einer höheren Mortalität einher als mikroangiopathische (Sacco, Whisnant, Broderick, Phillips, & Michael, 1991) und kardioembolische Infarkte haben das höchste Risiko für einen erneuten Hirninfarkt (Kolominsky-Rabas,

Weber, Gefeller, Neundoerfer, & Heuschmann, 2001). Die TOAST-Klassifikation erleichtert die schnelle ätiologische Einordnung in der Akutsituation (Fure, Wyller, & Thommessen, 2005). Klinisch kann die wahrscheinliche Ätiologie bereits anhand der Symptomatik und Anamnese bestimmt werden. Makroangiopathische Infarkte verursachen kortikale Defizite wie Aphasie, Neglect und Paresen. Auch zerebelläre Defizite und Hirnstammsymptome sind möglich. Anamnestische und klinische Hinweise auf eine Makroangiopathie sind eine vorausgegangene transiente ischämische Attacke (TIA) oder Infarkt im selben Stromgebiet und ein Strömungsgeräusch über der A. carotis (H. P. Adams et al., 1993). Kardioembolische Infarkte rufen eine ähnliche Symptomatik hervor wie makroangiopathische. Vorherige TIAs oder Infarkte in unterschiedlichen Stromgebieten und das Vorliegen von kardialen Risikofaktoren deuten auf eine kardioembolische Ursache hin. Hochrisikofaktoren sind beispielsweise mechanische Herzklappen, eine Mitralklappenstenose mit Vorhofflimmern, linksventrikuläre Thromben und die infektiöse Endokarditis. (H. P. Adams et al., 1993). Mikroangiopathische Infarkte werden auch als lakunäre Infarkte bezeichnet. Das Vorliegen eines lakunären Syndroms stützt die Diagnose einer Mikroangiopathie. Zu den lakunären Syndromen gehören der „pure motor stroke“, „pure sensory stroke“, „sensorymotor stroke“ und das „dysarthria and clumsy hand syndrome“ (Boiten & Lodder, 1991). Als Ausdruck der subkortikalen Schädigung kommt es zu progredienten kognitiven Defiziten, psychomotorischer Verlangsamung und affektiven Störungen (Jokinen et al., 2009). Kortikale Dysfunktionen und Defizite des episodischen Gedächtnis sind dagegen nicht typisch für eine Mikroangiopathie (Bennett, Gilley, Lee, & Cochran, 1994). Anamnestisch liegen häufig ein Diabetes mellitus oder eine arterielle Hypertonie vor (Khan, Porteous, Hassan, & Markus, 2007). Die Kategorie „andere definierte Ätiologie“ beinhaltet seltenere Ursachen wie Dissektionen, hämatologische Erkrankungen, Vaskulitiden und Hyperkoagulopathien (H. P. Adams et al., 1993; Yesilot Barlas et al., 2013). Bei manchen Patient*innen kann trotz ausführlicher diagnostischer Abklärung mittels Bildgebung, Duplexsonographie und TEE keine eindeutige Diagnose gestellt werden. Bei anderen ist die Diagnostik unvollständig oder es sind mehrere verschiedene Ursachen denkbar. Diese Hirninfarkte fallen in die Kategorie „unklare Ätiologie“ (H. P. Adams et al., 1993). Je nach vaskulärem Stromgebiet sind die verschiedenen Subtypen der TOAST-Klassifikation unterschiedlich häufig vertreten. So treten kardiale Embolien am häufigsten im Carotis-Stromgebiet auf, während Mikroangiopathien häufig auch im vertebrobasilären Stromgebiet vorzufinden sind (Chung et al., 2014).

1.1.1. Juvenile Hirninfarkte

Das Hirninfarktrisiko steigt mit zunehmenden Lebensalter deutlich an (Busch, Schienkiewitz, Nowossadeck, & Gößwald, 2013; Ekker et al., 2019; Putaala et al., 2009). In Europa liegt das Durchschnittsalter bei erstmaligem Hirninfarkt bei 73 Jahren (Wolfe, 2009). Nur 2-12 % der

Hirnfarkte ereignen sich bei Personen, die jünger als 45 Jahre sind (Kissela et al., 2012; Marini et al., 2001; Nedeltchev et al., 2005). Allerdings zeigt die Inzidenz ischämischer Hirnfarkte bei jungen Menschen eine steigende Tendenz (Ekker et al., 2019; Kissela et al., 2012; Tibaek et al., 2016). Die Definition juveniler Hirnfarkte ist in der Literatur nicht einheitlich. Meist werden hierzu Hirnfarkte gezählt, die zwischen dem 18. und dem 45. bis 55. Lebensjahr auftreten (Ekker et al., 2019; Maaijwee, Rutten-Jacobs, Schaapsmeeders, Van Dijk, & De Leeuw, 2014; Rolfs et al., 2013). Im Gegensatz zu Hirnfarkten bei älteren Personen werden Hirnfarkte bei unter 45-jährigen nach der TOAST-Klassifikation am häufigsten als „andere definierte Ursache“ oder „unklare Ätiologie“ klassifiziert (Nedeltchev et al., 2005; Telman, Kouperberg, Sprecher, & Yarnitsky, 2008). Bei Patient*innen zwischen 46 und 60 Jahren sind dagegen mikroangiopathische Infarkte und kardiale Embolien die häufigsten Ätiologien (Telman et al., 2008). Die kurzfristige Prognose funktioneller Defizite wird bei jungen Hirnfarkt- Patient*innen generell als besser angegeben als bei älteren (Knoflach et al., 2012; Varona, Bermejo, Guerra, & Molina, 2004). Allerdings sind bleibende neurologische Defizite bei jüngeren Menschen besonders schwerwiegend, da sie viele Jahre mit den Folgen leben müssen. Zudem erfordern berufliche und soziale Ansprüche bei jungen Menschen ein höheres Maß an Funktionalität (Maaijwee et al., 2014). Kognitive Defizite, Depression und Fatigue sind häufige Langzeit-Folgen juveniler Hirnfarkte (Naess, Nyland, Thomassen, Aarseth, & Myhr, 2005; Waje-Andreassen et al., 2013). In einer Studie mit 277 Hirnfarkt- Patient*innen zwischen 18 und 50 Jahren konnten noch 11 Jahre nach dem Ereignis in 35 % der Fälle kognitive Defizite nachgewiesen werden. Besonders das Arbeitsgedächtnis, die kognitive Flexibilität und die geistige Geschwindigkeit waren beeinträchtigt (Schaapsmeeders et al., 2013). Die langfristigen psychosozialen Implikationen juveniler Hirnfarkte sind aufgrund des Verlusts produktiver Arbeitsjahre auch aus ökonomischer Sicht relevant (Persson, Ferraz-Nunes, & Karlberg, 2012). Eine dänische prospektive Studie über den Zeitraum von zwei Jahren zeigte, dass nur etwas mehr als die Hälfte der Betroffenen nach einem Hirnfarkt an den Arbeitsplatz zurückkehrte (Andersen, Christensen, Kirkevold, & Johnsen, 2012). Die Lebenszeit-Kosten eines Hirnfarkts bei Personen unter 55 Jahre sind sechsmal so hoch wie die eines Hirnfarkts bei über 84-Jährigen, da sich zu den hohen Gesundheitsausgaben die Kosten des Produktivitätsverlusts addieren (Persson et al., 2012).

1.1.2. Bedeutung der Genetik bei Hirnfarkten.

Mithilfe neuer Technologien wie genomweiter Assoziationsstudien konnten in den letzten Jahren zahlreiche Gene identifiziert werden, die das Hirnfarktrisiko mit beeinflussen (Chauhan et al., 2016; Malik et al., 2018). Insgesamt wird die Erblichkeit für nicht-monogene ischämische Hirnfarkte auf 37,9 % geschätzt (Bevan et al., 2012). Innerhalb der TOAST-Kategorien variiert die Erblichkeit zwischen

40,3 % für makroangiopathische und 16,1 % für mikroangiopathische Hirninfarkte (Bevan et al., 2012). Mutationen können auf unterschiedliche Weise zu einem Hirninfarkt führen. Einige genetische Polymorphismen sind mit einer erhöhten Prädisposition für Hirninfarkte assoziiert. Dabei ist der Einfluss jeder einzelnen Variante gering, sodass meist erst die Kombination mehrerer Faktoren das Risiko für einen ischämischen Hirninfarkt stark erhöht (Boehme et al., 2017). In einer 2018 veröffentlichten Meta-Analyse wurden insgesamt 32 Genloci mit einem statistisch signifikanten Einfluss auf das Hirninfarktrisiko gefunden. Bei fast der Hälfte dieser Genloci besteht zudem eine Korrelation mit vaskulären Risikofaktoren wie Bluthochdruck. Manche Genloci sind mit einem bestimmten Hirninfarkt-Subtyp assoziiert. Beispielsweise ist ein Risiko-Allel im *EDNRA* Gen, das mit einer Häufigkeit von 21 % auftritt, speziell mit makroangiopathischem Hirninfarkt und Atherosklerose assoziiert. (Malik et al., 2018).

Im Gegensatz dazu stehen monogen vererbbare Erkrankungen, die durch eine einzelne genetische Variante mit hoher Penetranz verursacht werden. Bei bekanntem Genotyp können hier sehr genaue Angaben zum Phänotyp gemacht werden (Falcone & Woo, 2017). Hierzu gehören die familiären zerebralen Mikroangiopathien, aber auch Multisystemerkrankungen wie die Sichelzellanämie, bei denen Hirninfarkte zum Manifestationsspektrum gehören (Boehme et al., 2017).

1.2. Zerebrale Mikroangiopathien

Mikroangiopathische Hirninfarkte machen etwa 15 % der Hirninfarkte bei unter 45-jährigen aus (Telman et al., 2008). Als zerebrale Mikroangiopathien (ZMA) werden pathologische Prozesse bezeichnet, die die kleinen Arterien, Arteriolen, Venolen und Kapillaren des Gehirns betreffen (Pantoni, 2010). ZMA gehören zu den wichtigsten Ursachen für ischämische und hämorrhagische Hirninfarkte und vaskuläre Demenz (Cai et al., 2015; Debette, Schilling, Duperron, Larsson, & Markus, 2019; Rensma, van Sloten, Launer, & Stehouwer, 2018). Häufig sind die langen penetrierenden Arterien betroffen, die einen geringen Gefäßdurchmesser und kaum Kollateralisierungen aufweisen (Ringelstein & Kuhlenbäumer, 2004). Sie versorgen die Basalganglien, Thalamus, Pons und die subkortikale weiße Substanz (Chabriat et al., 1999; Fisher, 1965). Ein Verschluss dieser kleinen Gefäße führt zu subkortikalen lakunären Infarkten, die sich in der T2-gewichteten Magnetresonanztomographie (MRT) als kleine hyperintense Läsionen der weißen Substanz darstellen (B. Patel & Markus, 2011). Konfluierende hyperintense Läsionen und diffuse Hyperintensitäten der weißen Substanz entstehen aufgrund von inkompletten Ischämien und werden als Leukoaraiose oder Leukenzephalopathie bezeichnet (Hachinski, Potter, & Merskey, 1987; Pantoni & Garcia, 1997). Das pathophysiologische Korrelat der Leukoaraiose sind Axonverluste, Demyelinisierung und Gliose (Jones

et al., 1999). Hyperintensitäten der weißen Substanz sind ein häufiger Befund in der älteren Bevölkerung und können bei mehr als 80 % der über 70-jährigen Personen nachgewiesen werden (Zhuang, Chen, He, & Cai, 2018). Mithilfe der Fazekas Skala (Tabelle 2) können sie in verschiedene Schweregrade unterteilt werden (Fazekas, Chawluk, & Alavi, 1987).

Tabelle 2 Fazekas Skala. Einteilung der Hyperintensitäten der weißen Substanz nach Schweregrad

	<i>PVH</i>	<i>HTWS</i>
0	abwesend	abwesend
1	Linienförmige Hyperintensität	Punktförmige Foci
2	Hyperintensität ≥ 5 mm Dicke	Konfluierende Foci
3	Unregelmäßig, bis in die TWS reichend	Große konfluierende Areale

PVH: periventrikuläre Hyperintensitäten, TWS: tiefe weiße Substanz, HTWS: Hyperintensitäten der tiefen weißen Substanz. (Fazekas et al., 1987; Rolfs et al., 2011)

Das Spektrum der klinischen Befunde der Betroffenen reicht von asymptomatisch über milde kognitive Defizite bis hin zu schwerer vaskulärer Demenz (Prins & Scheltens, 2015). Die Qualität der kognitiven Defizite unterscheidet sich von denen einer Alzheimer Demenz, bei der vor allem das episodische Gedächtnis gestört ist (Graham, Emery, & Hodges, 2004). Charakteristisch für die subkortikale Demenz sind dagegen Störungen des semantischen Gedächtnisses, der gerichteten Aufmerksamkeit und der exekutiven Funktionen, wie die Planung komplexer Handlungsabläufe. (Graham et al., 2004; O'sullivan, Morris, & Markus, 2005). Meist treten ZMA sporadisch auf und werden durch eine Atherosklerose der kleinen Gefäße verursacht wird (Pantoni, 2010). Ein hohes Alter und vaskuläre Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie sind die wichtigsten Risikofaktoren (Khan et al., 2007; Pantoni, 2010; Takx, Zanen, Leiner, van der Graaf, & de Jong, 2015). Mit steigendem Lebensalter nimmt die Gefäßelastizität ab. Hämodynamische Veränderungen aufgrund einer arteriellen Hypertonie führen zusätzlich zu einem Umbau der Gefäßwand und einer Schädigung des Endothels. Diese Mechanismen verursachen eine Hypoperfusion und eine Ischämie der umliegenden weißen Substanz (Pantoni, 2002). Zusätzlich kann die Barrierefunktion der Bluthirnschranke gestört werden, was zu einem ungehinderten Durchtritt von neurotoxischen Substanzen in das Gehirn und einer Schädigung von Neuronen und Gliazellen führt (Wardlaw, Sandercock, Dennis, & Starr, 2003). Weitere Ursachen für zerebrale Mikroangiopathien sind die zerebrale Amyloidangiopathie (CAA), Amyloidosen, venöse Kollagenosen und die selteneren monogen vererbten ZMA (Pantoni, 2010). Die CAA nimmt eine Sonderstellung ein, da sie sowohl sporadisch als auch (seltener) familiär vorkommt. Sie ist gekennzeichnet durch Ablagerungen von Amyloid- β in zerebralen Gefäßwänden und pathophysiologisch eng mit der Alzheimer Demenz assoziiert (Greenberg et al., 2020). Folge der vaskulären Amyloidablagerungen sind Mikroblutungen, intrazerebrale hämorrhagische Infarkte und ischämische Mikroinfarkte mit Leukenzephalopathie (Mandybur, 1986; Yamada, 2000). Die hereditären Formen der CAA werden unterteilt in die hereditäre

zerebrale Hämorrhagie mit Amyloidose – niederländischer Typ, verursacht durch eine Mutation im *APP* (Aβ Precursor Protein)-Gen (Maat-Schieman, Roos, & Duinen, 2005), und die hereditäre zerebrale Hämorrhagie mit Amyloidose – isländischer Typ, welche durch eine Mutation im Cystatin C-Gen verursacht wird (Wei et al., 1998).

1.3. Hereditäre zerebrale Mikroangiopathien

Etwa 1,5 % - 5 % aller mikroangiopathischen Hirninfarkte werden durch monogene Varianten verursacht (Tan et al., 2019; Yamamoto, Craggs, Baumann, Kalimo, & Kalaria, 2011). Die mit einer Prävalenz von etwa 0,002 % (Narayan, Gorman, Kalaria, Ford, & Chinnery, 2012; Razvi, Davidson, & Bone, 2005) häufigste hereditäre ZMA ist die zerebrale autosomal dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie (CADASIL). Es existieren zahlreiche weitere, seltenere monogene Mikroangiopathien, zu denen unter anderem die pontine autosomal dominante Mikroangiopathie mit Leukenzephalopathie (PADMAL), die zerebrale autosomal rezessive Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie (CARASIL), die autosomal-dominanten retinalen Vaskulopathien mit zerebraler Leukodystrophie (AD-RVCL) und *COL4A1*-assoziierte Mikroangiopathien gehören.

Die Untersuchung familiärer zerebraler Mikroangiopathien ist von Bedeutung, da sie auch zur Erforschung der häufigeren sporadischen zerebralen Mikroangiopathien beitragen kann (Choi, 2015; Giau, Bagyinszky, Youn, An, & Kim, 2019). Aufgrund der Parallelen zu sporadischen zerebralen Mikroangiopathien und vaskulärer Demenz können sie als Modell für die sporadischen Erkrankungen gesehen werden und zur Untersuchung der Pathogenese und Therapie dieser beitragen (Charlton, Morris, Nitkunan, & Markus, 2006). Beispielsweise dienten Patient*innen mit CADASIL als Proband*innen in einer Studie, in der die Wirkung des Cholinesterase-Inhibitors Donepezil auf vaskuläre Demenz untersucht wurde. Ein häufiges Problem der Therapiestudien zu vaskulärer Demenz ist die hohe Prävalenz von Morbus Alzheimer in der älteren Bevölkerung. Somit liegt bei den Proband*innen neben der vaskulären Demenz häufig eine Alzheimer Demenz vor, wodurch die Ergebnisse der Studie verfälscht werden können. Da sich bei CADASIL bereits früh im Verlauf eine demenzielle Entwicklung manifestiert, ist das gleichzeitige Vorliegen anderer Erkrankungen unwahrscheinlicher (Dichgans et al., 2008). Dieses Beispiel zeigt, dass familiäre zerebrale Mikroangiopathien als Modell für sporadische Formen dienen können und somit zu einer besseren Erforschung der Therapie sowohl der familiären als auch der sporadischen zerebralen Mikroangiopathien beitragen.

Die häufigste hereditäre zerebrale Mikroangiopathie, CADASIL, wird durch Mutationen im *NOTCH3* Gen verursacht (Joutel et al., 1996; Tan et al., 2019). Die Erkrankung wurde erstmals 1976 bei einem 50-jährigen Mann beobachtet (Chabriat, Joutel, Tournier-Lasserre, & Bousser, 2020; Tournier-Lasserre, Iba-Zizen, Romero, & Bousser, 1991). CADASIL verursacht subkortikale ischämische Infarkte, die zu progressiver subkortikaler Demenz führen. Weitere typische Symptome sind Migräne mit Aura, kognitive Beeinträchtigung, Apathie und affektive Störungen (Chabriat, Joutel, Dichgans, Tournier-Lasserre, & Bousser, 2009). Von der Arteriopathie sind hauptsächlich kleine Arterien betroffen. Hier kommt es zu einer Lumeneinengung, Degeneration glatter Muskelzellen und Einlagerung von pathognomonischem granulären osmiophilen Material in der Gefäßwand (Bergmann et al., 1996). Obwohl die Symptome fast ausschließlich das Gehirn betreffen, kann das osmiophile Material auch in den Gefäßwänden anderer Organe, wie der Haut, nachgewiesen werden. Daher wird der elektronenmikroskopische Nachweis osmiophilen Materials in Hautbiopsien als diagnostisches Mittel mit hoher Spezifität - jedoch geringer Sensitivität - eingesetzt (Malandrini et al., 2007; Ruchoux et al., 1995). Der diagnostische Goldstandard ist die molekulargenetische Testung mit Nachweis einer Mutation im *NOTCH3* Gen, welches für einen Transmembranrezeptor kodiert (A. Joutel et al., 1996). Auf der extrazellulären Seite dieses Transmembranrezeptors befinden sich 34 *Epidermal Growth Factor-like Repeats* (EGFR), die jeweils aus sechs Cystein-Resten bestehen. Die Mutation führt zu einer ungeraden Anzahl an Cystein-Resten innerhalb einer der 34 EGFR (Chabriat et al., 2009; Federico, Bianchi, & Dotti, 2005). *NOTCH3* wird überwiegend in glatten Muskelzellen kleiner und mittelgroßer Arterien exprimiert (Prakash, Hansson, Betsholtz, Mitsiadis, & Lendahl, 2002). Stenosierte Gefäßlumen und eine verminderte Vasoreaktivität der betroffenen Arterien führen zu Hypoperfusion der weißen Substanz und subkortikalen Ischämien (Joutel et al., 2010; Miao et al., 2004).

Seit der Entdeckung von *NOTCH3* Mutationen als Ursache von CADASIL wurden zunehmend weitere Gene bekannt, die für die zerebralen Mikroangiopathien von Bedeutung sind. Die sehr seltene und überwiegend bei japanischen Familien nachgewiesene zerebrale autosomal rezessive Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie (CARASIL) wird durch eine homozygote Mutation im *HTRA1* Gen verursacht und ist durch eine präsenile und rasch progrediente Demenz mit motorischen Störungen und extraneurologischen Manifestationen wie Alopezie und Spondylose gekennzeichnet (Di Donato et al., 2017; Nozaki, Nishizawa, & Onodera, 2014). Heterozygote *HTRA1* Mutationen verursachen dagegen eine zerebrale Mikroangiopathie, die sich meist erst im höheren Lebensalter manifestiert und seltener mit extraneurologischen Symptomen einhergeht (Di Donato et al., 2017). Studien weisen darauf hin, dass in 1,3 – 5 % der *NOTCH3* negativen Fällen mit CADASIL-typischer Symptomatik eine heterozygote *HTRA1*-Variante vorliegt (Tan et al., 2019; Verdura et al., 2015).

Morbus Fabry ist ein Beispiel für eine Multisystemerkrankung, die mit einer ZMA mit Leukenzephalopathie und Hirninfarkten einhergehen kann. Es handelt sich um eine X-chromosomal vererbte lysosomale Speicherkrankheit, bei der es infolge einer Mutation des *GLA* Gens zu einer reduzierten Aktivität des Enzyms α -Galaktosidase A kommt (Schäfer, Baron, et al., 2005; Schäfer, Mehta, & Gal, 2005). Dadurch ist der Abbau von Glykosphingolipiden gestört, sodass diese in einer Vielzahl unterschiedlicher Organe und Zellen akkumulieren (Zarate & Hopkin, 2008). Das Spektrum möglicher Symptome ist vielfältig und beinhaltet unter anderem renale, kardiale, dermatologische und neurologische Manifestationen (Mehta et al., 2004; M. Patel et al., 2011). Die Patient*innen haben ein erhöhtes Risiko für mikro- und makroangiopathische Hirninfarkte, die bevorzugt im hinteren Stromgebiet auftreten (Mitsias & Levine, 1996; Moore, Herscovitch, & Schiffmann, 2001). Im „Fabry Outcome Survey“ wurden 388 Patient*innen mit M. Fabry erfasst, um die Prävalenz von Hirninfarkten, sowie von renalen und kardialen Erkrankungen zu untersuchen. Die Hirninfarkt-Prävalenz war in dieser Studie bei Patient*innen zwischen 25 und 44 Jahren etwa 12 mal so hoch wie in der allgemeinen Bevölkerung (Mehta & Ginsberg, 2005). Die Daten der „Stroke in young Fabry Patients (Sifap)“-Studie zeigen, dass bei ca. 1 % der juvenilen Hirninfarkte bei zwischen 18- und 55-jährigen ein M. Fabry vorliegt. Betrachtet man hier nur die kryptogenen Hirninfarkte, liegt der Anteil bei 4 %. In der Kohorte der M. Fabry- Patient*innen konnten zudem alte MRT-Läsionen, die auf einen stummen Infarkt in der Vergangenheit hindeuteten, häufiger nachgewiesen werden als in der Vergleichs-Kohorte (Rolfs et al., 2013). In anderen Studien lag die Prävalenz von M. Fabry bei juvenilen Hirninfarkten deutlich niedriger als die Ergebnisse der Sifap-Studie suggerieren, sodass die Bedeutung von M. Fabry als Ursache juveniler Hirninfarkte weiterhin nicht vollständig geklärt ist (Brouns et al., 2007; Kilarski et al., 2015; Lanthier et al., 2017; Wozniak et al., 2009).

1.3.1. Diagnostik der hereditäre zerebralen Mikroangiopathien

An eine genetische Ursache sollte insbesondere bei einem frühen Krankheitsbeginn, fehlenden Risikofaktoren, positiver Familienanamnese und unklaren Hyperintensitäten der weißen Substanz gedacht werden (Mancuso et al., 2020; Razvi & Bone, 2005). Häufig verlaufen die familiären Mikroangiopathien schwerer als sporadische und führen früh zum Verlust motorischer und kognitiver Fähigkeiten (Choi, 2015). Da für einzelne Entitäten unterschiedliche Therapieoptionen zur Verfügung stehen, ist die korrekte Diagnose von Bedeutung für den weiteren Verlauf.

Familienanamnestisch sind Verwandte ersten Grades mit ischämischen oder hämorrhagischen Hirninfarkten oder Demenz relevant, insbesondere dann, wenn diese bei Verwandten im jungen Erwachsenenalter auftraten. Diese Symptome können bei gehäuften familiären Auftreten ein Hinweis auf CADASIL, CARASIL oder PADMAL sein. Hämorrhagien bei Kindern und Neugeborenen können auf

eine *COL4A1*- oder *COL4A2*-assoziierte Mikroangiopathie (ausgenommen PADMAL) hindeuten (Søndergaard, Nielsen, Hansen, & Christensen, 2017). Eine fehlende Familienanamnese ist jedoch kein Ausschlusskriterium für hereditäre zerebrale Mikroangiopathien, ebenso wenig wie ein spätes Manifestationsalter (Mancuso et al., 2020). Fehlende Risikofaktoren können den Verdacht auf eine hereditäre Erkrankung stärken, diese kann aber auch durch das zusätzliche Vorliegen von Risikofaktoren aggraviert und der Verlauf beschleunigt werden (Mancuso et al., 2020).

Neben Hirninfarkten und Leukenzephalopathie ist Migräne ein häufiges Symptom von CADASIL, kann jedoch auch ein Symptom der hereditären Endotheliopathie mit Retinopathie, Nephropathie und Hirninfarkten (HERNS) sein. Die HERNS gehört zur Gruppe der Retinalen Vaskulopathien mit zerebraler Leukodystrophie (RVCL), ein Überbegriff für verschiedene Syndrome, deren Gemeinsamkeit eine ZMA in Verbindung mit retinaler Vaskulopathie ist (Søndergaard et al., 2017). Zum Symptomkomplex der HERNS gehören außerdem extrazerebrale Symptome wie Sehstörungen, Nephropathie mit Proteinurie und Hämaturie und weitere neurologische Symptome wie Dysarthrie, Hemiparese und Apraxie (Jen et al., 1997). Extrazerebrale Organmanifestationen treten auch bei M. Fabry und bei *COL4A1*-assoziierten Mikroangiopathien auf: Die hereditäre Angiopathie mit Nephropathie, Aneurysmen und Muskelkrämpfen (HANAC) wird durch Mutationen im *COL4A1* Gen verursacht, die die Aminosäure Glycin betreffen und führt zu zystischer Nierenerkrankung, intrakraniellen Aneurysmen, Hirninfarkten, Muskelkrämpfen und Raynaud-Syndrom (Plaisier et al., 2010, 2007). Andere mit *COL4A1* Mutationen assoziierte Erkrankungen sind Porencephalie und (perinatale) intrazerebrale Hämorrhagien (Gould et al., 2005, 2006).

Die hereditären zerebralen Mikroangiopathien sind also eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen. Die Ausprägung der Symptome kann zudem stark variabel sein. Es handelt sich überwiegend um seltene Erkrankungen, wodurch die Diagnose erschwert wird. Ein wertvolles diagnostisches Mittel in der Diagnose der hereditären zerebralen Mikroangiopathien ist die Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie. Hyperintensitäten der weißen Substanz und lakunäre Infarkte in der T2-gewichteten MRT sind häufige Befunde von zerebralen Mikroangiopathien (Søndergaard et al., 2017). Die Lokalisation der Läsionen kann Aufschluss über die spezifische Entität geben. Lakunen und Hyperintensitäten der weißen Substanz im anterioren Temporallappen, Corpus Callosum oder Capsula externa werden bei CADASIL beobachtet (Singhal, Rich, & Markus, 2005), pontine Läsionen sprechen für PADMAL (Hagel, Groden, Niemeyer, Stavrou, & Colmant, 2004). Charakteristisch für fortgeschrittene CARASIL ist das sogenannte *arc sign*, eine hyperintense bogenförmige Läsion im Bereich des Pons und des Pedunculus cerebellaris medius (Nozaki et al., 2015). *COL4A1*-assoziierte Mikroangiopathien verursachen meist (mit Ausnahme von PADMAL) intrazerebrale Hämorrhagien

(Falcone & Woo, 2017). Bei CADASIL können zusätzlich Mikroblutungen auffallen (Dichgans et al., 2002).

Goldstandard für die definitive Diagnosestellung ist die molekulargenetische Testung auf bekannte Mikroangiopathie-assoziierte Mutationen (Mancuso et al., 2020). Das molekulargenetische Screening auf bekannte Mikroangiopathie-assoziierte Varianten führt jedoch in nur etwa 15 % der Fälle mit Verdacht auf eine familiäre ZMA zur Diagnose. Daraus kann geschlossen werden, dass weitere, bisher unbekannte Varianten für familiäre Mikroangiopathien relevant sein könnten (Verdura et al., 2016).

1.3.2. Therapie der hereditären zerebralen Mikroangiopathien

Ziel der Therapie zerebraler Mikroangiopathien ist es, weitere Infarkte, Lakunen und Mikroblutungen zu verhindern, und das Voranschreiten der kognitiven und motorischen Defizite zu verlangsamen (Bath & Wardlaw, 2015). Für die meisten hereditären zerebralen Mikroangiopathien existieren keine spezifischen Therapiemöglichkeiten. Eine Ausnahme ist M. Fabry, der durch eine Enzyersatztherapie behandelt werden kann, um Komplikationen vorzubeugen (Schiffmann, Kopp, Austin, Balow, & Brady, 2001). Allerdings ist aufgrund der unzureichenden Evidenzlage unklar, ob die Enzyersatztherapie auch das Auftreten von Hirninfarkten verhindern kann (Mancuso et al., 2020).

Allgemeine Empfehlungen für die Prophylaxe eines ischämischen Infarkts beinhalten eine optimale Blutdruck- und Blutzuckereinstellung, Nikotinverzicht und regelmäßige sportliche Betätigung. Sekundärprophylaktisch wird die Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern und Statinen empfohlen (DEGAM, 2020). Bei *COL4A1* oder *COL4A2*-assoziierten Mikroangiopathien, die mit einer erhöhten Gefahr eines hämorrhagischen Infarktes einhergehen, sollte der Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmern, Antikoagulation und intravenöser Thrombolyse aufgrund der erhöhten Blutungsgefahr vermieden werden (Mancuso et al., 2020). Da auch bei einigen Patient*innen mit CADASIL unter der Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern Mikroblutungen oder intrazerebrale Hämorrhagien auftraten, ist der Nutzen hier fraglich (Oh, Lee, Kang, Kang, & Choi, 2008; Rinnoci et al., 2013). Wenn notwendig, sollte Patient*innen mit hereditärer ZMA eine psychologische Unterstützung angeboten werden (Mancuso et al., 2020). Acetylcholinesterase (AChE)-Inhibitoren, die in der Therapie der Alzheimer-Erkrankung eingesetzt werden, haben in einigen Studien positive Effekte auf die kognitiven Fähigkeiten von Patient*innen mit vaskulärer Demenz gezeigt (Auchus et al., 2007; Black et al., 2003; O'Brien & Thomas, 2015). Kognitive Beeinträchtigungen und vaskuläre Demenz sind häufige Folgen mikroangiopathischer Hirninfarkte. Eine Meta-Analyse ergab, dass AChE-Inhibitoren die kognitiven Fähigkeiten nach einem Hirninfarkt langfristig verbessern können (Kim, Lee, & Pyo, 2020). Da diese Studien nicht nur Patient*innen mit mikroangiopathischen Infarkten einschließen, ist die

Bedeutung von AChE-Inhibitoren in der Therapie der ZMA jedoch unklar (Bath & Wardlaw, 2015). Eine aktuelle Pilotstudie untersuchte den Effekt von Nimodipin und Cholinylfoscerat bei vaskulärer kognitiver Beeinträchtigung aufgrund einer ZMA (Salvadori et al., 2020). Cholinylfoscerat ist ein Phosphat-Cholin-Derivat und eine Vorstufe von Acetylcholin. Nimodipin ist ein Calcium-Antagonist vom Dihydropyridin-Typ mit vasoaktiven und neuroprotektiven Eigenschaften, für den eine Verbesserung der Kognition bei vaskulärer Demenz nachgewiesen werden konnte (Birks & López-Arrieta, 2002). Die Studie konnte bei geringer Therapieadhärenz jedoch keine signifikante Verbesserung der kognitiven Funktionen durch die kombinierte Gabe von Nimodipin und Cholinylfoscerat nachweisen (Salvadori et al., 2021).

1.3.3. Pontine autosomal dominante Mikroangiopathie mit Leukenzephalopathie

1.3.3.1. Epidemiologie und Klinik

Die pontine autosomal dominante Mikroangiopathie mit Leukenzephalopathie (PADMAL) wurde erstmals von Hagel et al. bei einer norddeutschen Familie beschrieben. (Hagel et al., 2004) In dieser Familie litten 22 Familienmitglieder aus sechs aufeinanderfolgenden Generationen an einer neurologischen Erkrankung, die mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie einherging. Bei den betroffenen Familienmitgliedern traten ab einem Manifestationsalter von 12-50 Jahren wiederholte lakunäre ischämische Infarkte auf, die zu progredienten neurologischen Symptomen wie Dysarthrie, Ataxie, Gangstörungen, Paresen und Demenz führten. Beispielsweise manifestierte sich die Erkrankung bei einem Patienten im Alter von 38 Jahren mit einer Parese des rechten Fußes, Parästhesien und Gangschwierigkeiten. Aufgrund des schubhaften Verlaufs wurde die Erkrankung anfangs als Multiple Sklerose fehldiagnostiziert. Mit 40 Jahren fielen Veränderungen im EEG und beidseitig positive Babinski-Zeichen auf. In den folgenden zwei Jahren entwickelte der Patient eine Aphasie, Perseverationen, Desorientiertheit, Nystagmus und Doppelbilder. Mit 42 Jahren starb der Patient an einem Myokardinfarkt. Eine Cousine des Patienten erkrankte mit 49 Jahren. Auch sie entwickelte anfangs Gangstörungen. Hinzu kamen eine Dysarthrie, beidseitige Muskelschwäche, Euphorie und Amnesie. Nach langem Koma starb die Patientin schließlich mit 59 Jahren. In der postmortalen Autopsie von insgesamt 5 Familienmitgliedern fielen eine Atrophie des Frontalhirns und multiple lakunäre Infarkte auf. Auch bei anderen betroffenen Familienmitgliedern waren Paresen, Gangstörungen, Dysarthrie, affektive Störungen und Demenz häufige Symptome. Die zerebrale Bildgebung zeigte bei fast allen Betroffenen multiple lakunäre Infarkte und Hyperintensitäten der weißen Substanz, die im Verlauf der Erkrankung zunahmen. Die Erkrankungsdauer betrug zwei bis 33 Jahren und endete in zwei Fällen durch Suizid, in anderen Fällen nach langer Bettlägerigkeit. Die Vererbung innerhalb der Familie folgte einem typischen autosomal dominanten Erbgang. Es zeigte sich

keine Korrelation mit Risikofaktoren und kein Hinweis auf eine diabetische oder hypertensive Mikroangiopathie. Da bei dieser Familie keine Mutation im *NOTCH3* Gen und kein granuläres osmiophiles Material nachgewiesen werden konnte, gingen die Autoren von einer neuen nosologischen Entität aus, die sich von CADASIL unterscheidet. (Hagel et al., 2004)

Histologisch fallen insbesondere die pathologischen Veränderungen der kleinen Hirnarterien und -arteriolen auf. Dazu zählten eine konzentrische Intimaproliferation, Fragmentierung der Tunica elastica interna, Atrophie der Tunica media und Fibrose der Adventitia (Hagel et al., 2004). In post-mortem durchgeführten immunhistochemischen Färbungen von Hirnschnitten der Basalganglien und des Frontallappens demonstrierten die von PADMAL betroffenen Präparate bei Färbung mit Kollagen IV (COL4)-Antikörpern eine - im Vergleich zu sporadischen und anderen hereditären zerebralen Mikroangiopathien - gesteigerte Expression in Gefäßen der grauen Substanz. (Abbildung 1, Craggs et al., 2013)

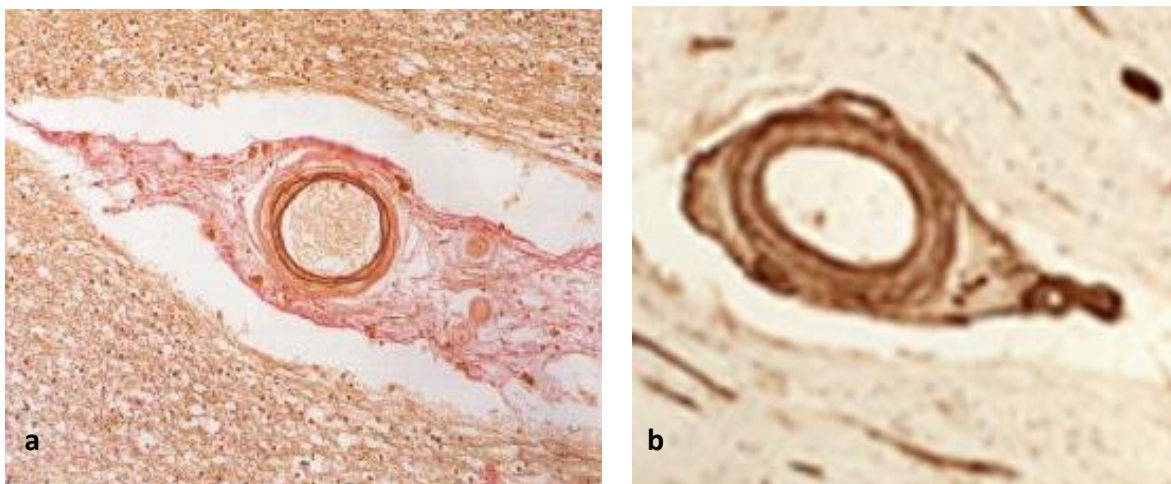


Abbildung 1 (a) Elastica van Gieson Färbung einer intraparenchymalen Arterie bei PADMAL. Media-Atrophie und Fibrose der Adventitia sichtbar. (Hagel et al., 2004) (b) immunhistochemische Färbung einer kleinen zerebralen Arterie mit einem COL4-Antikörper. Die COL4 Expression ist bei PADMAL deutlich gesteigert (Craggs et al., 2013)

Neuroradiologische Untersuchungen dieser Familie zeigten bei 6 von 18 untersuchten Familienmitgliedern ein pathologisches MRT, von denen 3 Personen symptomatisch waren. Besonders auffällig waren Läsionen im Pons, die bei allen 6 Personen nachgewiesen wurden. Weitere häufige Läsionen waren in der subkortikalen und periventrikulären weißen Substanz (5/6), Basalganglien (4/6) und Corpus Callosum (3/6) lokalisiert. Mikroblutungen und Läsionen im Temporallappen waren im Gegensatz zu CADASIL selten. Die MR-Angiographie demonstrierte bei allen sechs Familienmitgliedern einen inkompletten Circulus arteriosus Willisii. (Ding et al., 2010)

1.3.3.2. Genetische Grundlage

Im Jahr 2016 identifizierten Verdura et al. mittels Linkage Analyse, *Whole Exome Sequencing* und Sanger-Sequenzierung die für PADMAL ursächlichen Mutationen (Verdura et al., 2016). Bei zwei betroffenen Geschwistern fiel eine heterozygote Punktmutation in einer nicht-kodierenden regulatorischen Region des *COL4A1* Gens (GRCh37, chr13: 110.802.675G>T; c.*35C>A) auf. Für diese Variante konnte anschließend eine Segregation für alle phänotypisch betroffenen Familienmitglieder nachgewiesen werden, während bei gesunden Familienmitgliedern der Wildtyp vorlag. Die Variante liegt in der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) des *COL4A1* Gens. Um die Relevanz der Variante zu ermitteln, wurde bei 202 Proband*innen mit der Verdachtsdiagnose einer monogen erblichen zerebralen Mikroangiopathie die 3'UTR von *COL4A1* sequenziert. Fünf nicht-verwandte Proband*innen wiesen in dieser Region eine heterozygote Punktmutation auf. Alle Varianten lagen im selben, sechs Basenpaare langen DNA-Abschnitt, der eine Bindestelle für die MikroRNA miR-29 darstellt (Abbildung 2). Durch eine Mutation wird die Bindung der miR-29 an die mutierte Allele gestört. Dies hat eine Beeinträchtigung der Genregulation zur Folge, sodass es zu einer Überexpression von *COL4A1* kommt. (Verdura et al., 2016)

WT-DNA:	5' - CTCAGCTAATGTCACAACAT GGTGCT ACTTCTT - 3'
miR-29c:	3' - AUUGGCUAAAGUUU ACCACGA U - 5'

Abbildung 2 Darstellung der miR-29 Bindestelle in der 3'UTR des *COL4A1* Gens (GRCh37, chr13: 110,802,674-110,802,679). Wildtyp-DNA (WT-DNA) der miR-29 Bindestelle und korrespondierende MikroRNA miR-29c. Die sechs Basenpaare umfassende miR-29 Bindestelle ist fett markiert. Sie liegt an den Positionen 2 – 7 vom 5' – Ende der miR-29c (nach Verdura et al., 2016)

Auch die erstbeschriebene PADMAL-Familie wurde mittels DNA-Sequenzierung auf Mutationen in der miR29-Bindestelle getestet: Bei insgesamt 12 Familienmitgliedern wurde die Variante GRCh37.p13, chr13:110802679C>A; NM_001845.6:c.*31G>T identifiziert. Hiervon waren sechs Personen klinisch und radiologisch betroffen, drei weitere wiesen radiologisch Läsionen auf, waren jedoch klinisch unauffällig (Unveröffentlichte Daten). Als radiologisches Kriterium wurden pontine Lakunen in der zerebralen MRT definiert, die in manchen Fällen von supratentoriellen Läsionen begleitet waren. Drei weitere Variantenträger*innen waren klinisch und radiologisch unauffällig und wurden somit als Risikopatienten*innen identifiziert. Die Segregationsanalyse ergibt einen autosomal dominanten Erbgang (Abbildung 3). Typischerweise traten die ersten radiologischen Zeichen in der 40. bis 50. Lebensdekade auf, gefolgt von den ersten klinischen Symptomen etwa 10 Jahre später. Klinische Zeichen waren in den meisten Fällen Ausdruck von Hirnstammläsionen, wie Dysarthrie und Ataxie. Die Krankheitsdauer betrug etwa 10 bis 20 Jahre. (Unveröffentlichte Daten)

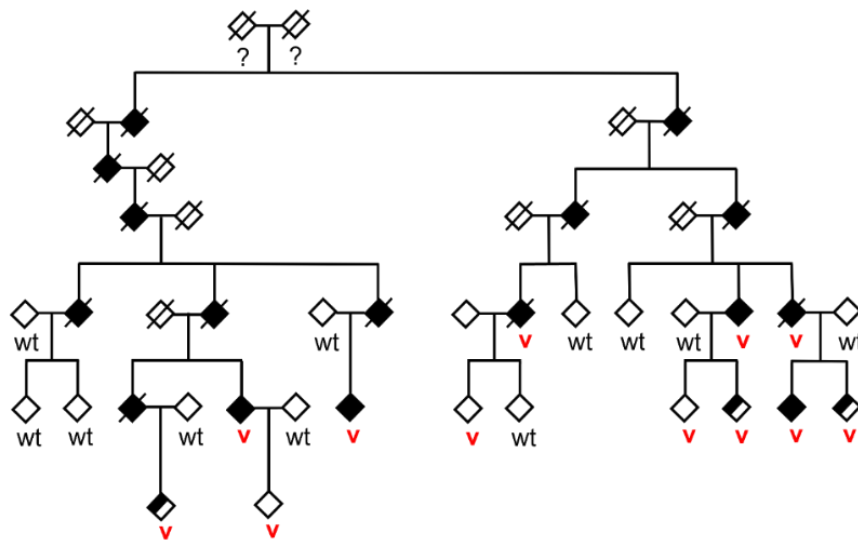


Abbildung 3 Stammbaum einer Familie mit PADMAL. Weiße Symbole stehen für nicht betroffene Familienmitglieder, schwarze für klinisch und radiologisch betroffene, und halb schwarze Symbole für radiologisch betroffene aber klinisch unauffällige Familienmitglieder. Durchgestrichene Symbole kennzeichnen verstorbene Personen. v = heterozygote Mutation in der miR29-Bindestelle von COL4A1 (NM_001845.6:c.*31G>T), wt = Wildtyp der Variante. Das Alter und Geschlecht werden aus Gründen der Anonymisierung nicht angezeigt.

Zhao et al. beschrieben 2019 eine chinesische Familie mit PADMAL. Eine betroffene Patientin präsentierte sich mit einer im 40. Lebensjahr akut aufgetretenen Parese des linken Armes und Dysarthrie. In den folgenden Jahren verschlechterte sich die Symptomatik. In der MRT zeigten sich bilaterale Lakunen im Pons, Läsionen der weißen Substanz sowie spinale Läsionen. Bereits zwei Geschwister und ihr Vater hatten im Alter von 39-40 Jahren Paresen und Demenz entwickelt und waren 10-12 Jahre nach Auftreten der ersten Symptome verstorben. Durch *Whole Exome Sequencing* der Patientin und des Bruders wurde die zugrundeliegende Mutation nachgewiesen: eine Punktmutation in der miR-29 Bindestelle in der 3'UTR des COL4A1 Gens (c.*32G>A). Die Segregationsanalyse ergab, dass die Variante bei allen betroffenen Familienmitgliedern vorhanden war. (Zhao, Duan, Ji, Liu, & Yan, 2019)

Interessanterweise wurde bereits 2017 dieselbe Variante (c.*32G>A) von Siitonen et al. als verantwortlich für die schwedische hereditäre Multiinfarktdemenz (shMID) identifiziert. Die shMID ist eine autosomal dominant vererbte ZMA, die sich mit rezidivierenden lakunären Infarkten vor allem in der Pons, Demenz und neuropsychiatrischen Symptome manifestiert (Sourander & Walinder, 1977). Wie bei PADMAL fielen bei der histologischen Betrachtung eine Fibrohyalinose und Elastose der kleinen Arterien mit Mediaatrophie und Intimaproliferation auf. Immunhistochemische Färbungen mit

einem COL4-Antikörper zeigten eine gesteigerte COL4-Expression in den Gefäßen der grauen Substanz in den Basalganglien (Craggs et al., 2013). Die Ähnlichkeiten in der klinischen Erscheinung, der Bildgebung und der Ergebnisse der histologischen und molekulargenetischen Untersuchungen sprechen dafür, dass es sich bei der shMID und PADMAL um unterschiedliche Ausprägungen derselben nosologischen Entität handelt. Für beide Erkrankungen ist eine Hochregulation von *COL4A1* aufgrund einer Mutation in der miR-29 Bindestelle ursächlich, sodass auf einen gemeinsamen Pathomechanismus geschlossen werden kann (Zhao et al., 2019).

1.4. Physiologische Bedeutung der miR-29 Bindestelle in der 3'UTR von COL4A1

Mutationen im Bereich der miR-29 Bindestelle von *COL4A1* führen zu einer gestörten Bindung der MikroRNA miR-29 an die Messenger RNA (mRNA). MikroRNAs (miRNA) sind kleine RNAs mit einer Länge von 20-25 Nukleotiden, die zu den nicht-kodierenden RNAs gehören (Ambros et al., 2003; Lagos-Quintana, Rauhut, Lendeckel, & Tuschl, 2001). Ihre Funktionen beinhalten die Regulation der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Fehlfunktionen verschiedener miRNAs werden unter anderem mit neurologischen, kardiovaskulären und onkologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Christensen & Schratt, 2009; Melo & Esteller, 2011; Sayed, Hong, Chen, Lypowy, & Abdellatif, 2007). Nach der Entdeckung der ersten MikroRNA in *Caenorhabditis elegans* 1993, wurden 2001 die ersten humanen MikroRNAs beobachtet (Lagos-Quintana et al., 2001; Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993). Inzwischen sind etwa 2300 verschiedene miRNAs beim Menschen bekannt (Alles et al., 2019). Ihre physiologische Bedeutung liegt in der posttranskriptionalen Genregulation, wodurch sie einen wesentlichen Einfluss auf die Genexpression ausüben (Bartel, 2004). Zusammen mit einem Protein aus der Argonauten Proteinfamilie bildet die miRNA den *RNA-induced Silencing Complex* (RISC) (Bartel, 2009; Hammond, Bernstein, Beach, & Hannon, 2000). Indem die miRNA komplementär an die mRNA bindet, löst der RISC den Abbau der mRNA aus. Infolgedessen wird die Proteinsynthese unterdrückt und damit die Genexpression reduziert (Bartel, 2009; Huntzinger & Izaurralde, 2011). Mehr als 60 % aller protein-kodierenden Gene werden so von MikroRNAs reguliert (Friedman, Farh, Burge, & Bartel, 2009). In Tierstudien wurden Bindestellen für die MikroRNA miR-29 in den 3'UTR von 20 Kollagen-Genen und weiteren matrixbildenden Genen festgestellt (Y. Liu et al., 2010). Dies erklärt die stark antifibrotischen Eigenschaften der miR-29 (Cushing, Kuang, & Lü, 2015; Maurer et al., 2010). Aber auch andere Gene werden von der miR-29 reguliert. Yang et al. wiesen eine neuroprotektive Wirkung der miR-29c auf die Neurone des Hippocampus nach. Die Regulation der hippocampalen Neurogenese erfolgt über das Protein BACE1. Eine verminderte miR-29 Bindung an die 3'UTR von *BACE1* führt zu einer vermehrten Ablagerung von A β -Proteinen, die für die Pathogenese des Morbus Alzheimer von

Bedeutung sind (Yang et al., 2015). Auch für die Funktion des Immunsystems spielt die miR-29 eine Rolle, da sie die Produktion von Interferon- γ und die Differenzierung von T-Helferzellen reguliert (Steiner et al., 2011).

Durch eine Bindung an die 3'UTR von *COL4A1* hemmt die miR-29 die Kollagensynthese. *COL4A1* kodiert für Kollagen Typ IV alpha 1. Kollagen Typ IV ist einer von 28 bekannten Kollagentypen, die wichtige Komponenten der Extrazellulärmatrix sind. Es ist im Körper ubiquitär als Grundgerüst der Lamina densa von Basallaminae zu finden. Es gibt drei Kollagen IV Subtypen, die sich aus sechs unterschiedlichen alpha-Ketten zusammensetzen. Der häufigste Subtyp ist eine Kombination aus zwei alpha 1- und einer alpha 2-Kette, die sich zu einer Tripelhelix verbinden. Durch kovalente intermolekulare Bindungen wird eine Quervernetzung der Kollagenmoleküle erreicht. Kollagen Typ IV wird von Epithel-, Endothel-, Fett-, Muskel- und Gliazellen produziert. (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019)

Mutationen im *COL4A1* Gen wurden zuvor bereits bei anderen zerebralen Mikroangiopathien beschrieben. Dazu gehören Porenzephalie und perinatale Hämorrhagien, HANAC und intrazerebrale Hämorrhagien (Gould et al., 2005, 2006; Plaisier et al., 2010, 2007). Der Pathomechanismus und Phänotyp dieser Erkrankungen unterscheidet sich deutlich von PADMAL, bei der die Mutation in der miR-29 Bindestelle zu ischämischen Infarkten kleiner zerebraler Arterien führt. Die anderen *COL4A1*-assoziierte Mikroangiopathien sind dagegen stark durch Hämorrhagien geprägt, welche bei PADMAL fehlen. Verursacht werden sie größtenteils durch Missense-Mutationen, die zu einem Austausch von Glycin führen. Glycin-Reste sind wesentlich für die Helix Bildung der Kollagen-Heterotrimere. Fehlgefaltete Heterotrimere können in Endothelzellen akkumulieren und eine zytotoxische Wirkung haben, oder nach Einbau in die Basalmembran diese destabilisieren, indem der Zell-Matrix-Signalweg gestört wird (Jeanne et al., 2012; Kuo, Labelle-Dumais, & Gould, 2012).

1.5. Molekulargenetische Untersuchungen

Die Entwicklung neuer Sequenzierungsmethoden Anfang der 2000er Jahre revolutionierte die Genforschung. Dank neuer Methoden, die unter dem Stichwort *Next Generation Sequencing* (NGS) zusammengefasst werden, ließen sich Gensequenzen schneller und effizienter entschlüsseln als mit der klassischen Sanger-Sequenzierung. Ein gesamtes Genom kann heute innerhalb eines einzigen Tages entschlüsselt werden (Grada & Weinbrecht, 2013; Van Dijk, Auger, Jaszczyszyn, & Thermes, 2014). Zum Vergleich: Die Entschlüsselung des ersten vollständigen Genoms im Rahmen des *Human Genome Project* mittels Sanger-Sequenzierung benötigte 13 Jahre (Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Die Didesoxymethode nach Sanger beruht auf einer Kettenabbruchreaktion. Zu einer Template DNA, einer DNA-Polymerase und einem Primer werden neben Desoxyribonukleotiden

(dNTP) auch fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotide (ddNTP) gegeben. Bei Einbau eines ddNTP bricht die Polymerisierung ab, da keine 3'OH-Gruppe zur Kettenverlängerung zur Verfügung steht. Nach dem Zufallsprinzip entstehen Nukleotidketten unterschiedlicher Länge. Mithilfe der unterschiedlich farbig markierten ddNTP kann nach hochauflösender elektrophoretischer Auftrennung schließlich die Reihenfolge der Basen abgelesen werden (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977).

Lange Zeit war die Kopplungsanalyse die Standardmethode, um die genetische Ursache hereditärer Erkrankungen zu entschlüsseln. Sie basiert auf der Grundlage, dass nah beieinander liegende DNA-Sequenzen häufiger zusammen vererbt werden, während weiter entfernte Abschnitte während der Meiose getrennt werden. Durch polymorphe DNA-Marker wie *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) oder Mikrosatelliten, wird die Segregation innerhalb einer Familie bestimmt. Kandidatengene, die in einer durch die Kopplungsanalyse gefundenen chromosomalen Kandidatenregion liegen, können anschließend mittels Sanger-Sequenzierung auf die potenziell ursächliche Varianten untersucht werden (Duncan, Brown, & Shore, 2014). Die Kausalität der Variante ist wahrscheinlich, wenn eine Segregation innerhalb der Familie vorliegt, statistische Analysen zeigen, dass die Segregation wahrscheinlich nicht auf Zufall beruht („Null-Hypothese“), die Variante nicht in Kontrollgruppen und Datenbanken existiert, und die Variante zu einem Aminosäure-Austausch, einer Proteinverkürzung oder einem Spleißfehler führt. Der Nachweis von weiteren Varianten im selben Gen in weiteren Familien erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass Varianten in dem identifizierten Gen tatsächlich kausal sind. Allerdings sind für eine Kopplungsanalyse meist große Familien notwendig, bei denen der Stammbaum über mindestens drei Generationen zurückverfolgt werden kann (Kuhlenbäumer, Hullmann, & Appenzeller, 2011). Bei Erkrankungen mit unvollständiger Penetranz oder starker Gen-Umwelt-Interaktion und bei früh letal verlaufenden Erkrankungen ist die Linkage Analyse häufig nicht erfolgreich (Duncan et al., 2014).

In der Diagnostik genetischer Erkrankungen ist NGS vor allem von Vorteil, wenn ein Phänotyp durch Varianten in vielen verschiedenen Genen hervorgerufen werden kann. Eine Sanger-Sequenzierung einzelner Gene wäre in diesem Fall sehr viel zeitintensiver (Tan et al., 2019). NGS ermöglicht die simultane Sequenzierung von Millionen von DNA-Fragmenten. Zum Einsatz kommen häufig spezifische Gen-Panels, aber auch eine komplette Exomsequenzierung (*Whole Exome Sequencing*, WES) oder Genomsequenzierung (*Whole Genome Sequencing*, WGS) sind möglich. Das Exom beinhaltet die Protein-kodierenden Abschnitte und macht 1-2 % des Genoms aus. Im Genom sind zusätzlich alle Introns und regulatorischen Regionen enthalten (D. R. Adams & Eng, 2018; Yohe & Thyagarajan, 2017). Die Schwierigkeit des WES und des WGS besteht in der Beurteilung der Pathogenität der Varianten, insbesondere wenn der Pathomechanismus und die Segregation innerhalb der Familie ungeklärt sind

(Tan et al., 2019). Aufgrund der hohen Anzahl sequenzierter Gene ist die a priori Wahrscheinlichkeit für die Kausalität einer Variante viel geringer als bei der Sequenzierung weniger aufgrund klinischer und pathogenetischer Befunde selektierter Kandidatengene (Kuhlenbäumer et al., 2011).

1.6. Zielsetzung

Nur ein kleiner Teil der Gesamtheit der Hirninfarkte wird durch monogene Varianten verursacht. Während Hirninfarkte bei älteren Personen stark mit bestimmten Risikofaktoren in Verbindung gebracht werden können, sind die Ursachen bei jungen Menschen weniger eindeutig. Hier scheinen genetische Ursachen eine größere Bedeutung zu haben. Es ist möglich, dass monogene zerebrale Mikroangiopathien größtenteils unterdiagnostiziert sind und daher häufiger die Ursache von Hirninfarkten sein könnten als bisher bekannt (Federico et al., 2005; Søndergaard et al., 2017; Vahedi et al., 2007). PADMAL wird durch eine Punktmutation im Bereich der miR-29 Bindestelle in der 3'-untranslatierten Region des *COL4A1* Gens verursacht. Bisher sind weltweit erst wenige Fälle mit dieser Mutation bekannt. Diese traten familiär auf und folgten einer autosomal dominanten Vererbung (Hagel et al., 2004; Verdura et al., 2016). Die Bedeutung der Variante bei sporadischen zerebralen Mikroangiopathien ist jedoch unklar. Ziel dieser Arbeit ist, herauszufinden, ob Mutationen in der miR-29 Bindestelle von *COL4A1* auch bei Patient*innen mit sporadischem Hirninfarkt und Leukenzephalopathie nachgewiesen werden können. Hierfür wurde die DNA von 649 Patient*innen, bei denen im Alter zwischen 18 und 55 Jahren ein Infarkt im vertebrobasilären Stromgebiet auftrat und eine Leukenzephalopathie vorlag, auf Varianten in der 3'UTR von *COL4A1* untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 3 verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial

<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Alphamager EC Gel Analysis System	Alpha Innotech, Santa Clara, USA
Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5430	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FlexCycler	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	G&P Kunststofftechnik GbR, Kassel, Deutschland
Mikrowelle	Robert-Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe Deutschland
Mini Centrifuge	NIPPON Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland
Perfect Spin Mini Centrifuge	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Mixer Uzusio VTX 3000L	LMS CO., Ltd, Tokyo, Japan
ThermoCell cooling & heating block Modell CHB-202	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
NanoDrop One	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Waage S-403	Denver Instrument GmbH, Göttingen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrotestplatte, 96 Well	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
PCR-8er-Kette, 200 µL	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
PCR-Platte, 96 Well, 200 µL	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

2.1.2. Chemikalien

Tabelle 4 verwendete Chemikalien

<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
LE Agarose	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Amplitaq Gold 360 Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DNA-Gel 6x Ladepuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
REPLI-g Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
1-fach Tris-Borat-EDTA-Puffer	Eigene Herstellung: 0,9 M Tris + 0,9 M Borsäure + 20 mM Na ₂ EDTA gelöst in 1 L HPLC-H ₂ O

2.1.3. Software und Datenbanken

Tabelle 5 verwendete Software und Datenbanken

<i>Name</i>	<i>Hersteller/ Institut</i>
Lasergene SeqMan™ 5.00	DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA
Lasergene EditSeq™ 5.00	DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA
Primer3web 4.1.0 (https://bioinfo.ut.ee/primer3)	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA
UCSC Genome Browser (http://genome.ucsc.edu)	UCSC Genome Informatics Group, Santa Cruz, CA, USA
dbSNP Single Nucleotide Polymorphism Database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA
GnomAD v3.1.1 (https://gnomad.broadinstitute.org/)	Broad Institute, Cambridge, MA, USA

ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/)	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA
1000Genomes (https://www.internationalgenome.org/)	The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Cambridgeshire, UK
MutationTaster (http://www.mutationtaster.org/)	Berliner Institut für Gesundheitsforschung, Charité, Berlin, Deutschland
Targetscan (http://www.targetscan.org/vert_72/)	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA
R version 4.2.3	The R Foundation for Statistical Computing

2.2. Studienkollektiv

Die untersuchten Patient*innen waren Teil der „Stroke in Young Fabry Patients“-Studie (Rolfs et al., 2013)). Hauptziel dieser prospektiven, multizentrischen Studie war die Untersuchung der Prävalenz von M. Fabry bei jungen Menschen mit Hirninfarkt. Ein weiteres Ziel war die genaue klinische, radiologische und ätiologische Charakterisierung einer jungen Hirninfarkt-Kohorte. 47 Zentren in 15 europäischen Ländern beteiligten sich an der Studie, die von der Universität Rostock koordiniert wurde. Insgesamt wurden 5023 Patient*innen im Alter von 18 bis 55 Jahren in die Studie eingeschlossen. Voraussetzung für die Teilnahme war ein in den letzten drei Monaten aufgetretener Hirninfarkt jeglicher Ursache. Zu den qualifizierenden zerebrovaskulären Ereignissen gehörten TIAs, ischämische Hirninfarkte, intrazerebrale Blutungen, Subarachnoidalblutungen, zerebrale Venenthrombosen und Vaskulitiden. Der NIHSS bei Aufnahme betrug im Median sechs Punkte. Die Diagnose wurde durch ein zerebrales MRT bestätigt (82 %) oder klinisch gestellt (18 %). In fast 20 % der Fälle war bereits mindestens ein Hirninfarkt oder eine TIA in der Vorgeschichte bekannt. In weiteren 20 % der Patient*innen mit erstmaligem Hirninfarkt konnten in der MRT alte, klinisch stumme Infarkte nachgewiesen werden. Die Prävalenz von Hyperintensitäten der weißen Substanz lag bei 46,8 % und stieg mit zunehmendem Alter an. (Rolfs et al., 2013)

Für die vorliegende Arbeit wurden nur Proband*innen mit Infarkten im vertebrobasilären Stromgebiet und Leukenzephalopathie ausgewählt. Als Leukenzephalopathie wurden hyperintense Läsionen der weißen Substanz im T2-gewichteten MRT definiert, basierend auf der Fazekas Skala. Die von diesen Proband*innen vorliegenden DNA-Proben wurden auf Mutationen der miR-29 Bindestelle in der 3'-UTR des *COL4A1*-Gens untersucht.

2.3. Molekulargenetische Untersuchungen

2.3.1. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der exponentiellen Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Region. Dafür werden neben der zu vervielfältigenden DNA eine DNA-Polymerase, spezifische einzelsträngige Oligonukleotid-Primer und freie Nukleotide (Desoxynukleosidtriphosphate, dNTPs) benötigt. Die freien dNTPs beinhalten die Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin. Sie sind die Bausteine der neu gebildeten DNA-Stränge. Zunächst wird die doppelsträngige Ausgangs-DNA im Thermocycler erhitzt, wodurch sie denaturiert. An die einzelnen Stränge können nun spezifische Primer komplementär anlagern, die die zu amplifizierende Sequenz am 3'- und am 5'-Ende der DNA begrenzen. Für den Schritt der Primer-Anlagerung (Annealing) wird ein Wert unterhalb der spezifischen Schmelztemperatur der gewählten Primer eingestellt, die üblicherweise zwischen 53 °C und 63 °C liegt. Am 3'-Ende der angelagerten Primer kann die DNA-Polymerase ansetzen und in 5'-3'-Richtung komplementär freie Nukleotide anlagern, sodass erneut eine doppelsträngige DNA entsteht. Aufgrund der Eigenschaft der DNA-Polymerase, freie Nukleotide nur an bereits bestehenden 3'-OH-Gruppen anlagern zu können, wird nur die von den Primern eingerahmte Region amplifiziert. Dieser Zyklus – Denaturierung, Annealing, Elongation – wird nun mehrfach wiederholt. Nach jedem Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der Kopien der Zielregion, sodass am Ende der Reaktion mehrere Milliarden Kopien vorliegen können. (Mülhardt, 2009; Müller & Prange, 2016)

Für die Untersuchung der miR29-Bindestelle in der 3'UTR von *COL4A1* wurden spezifische Oligonukleotid-Primer mithilfe des Primer3-Programms (Koressaar & Remm, 2007; Untergasser et al., 2012) entwickelt und von der Firma Eurofins Genomics hergestellt (Tabelle 6). Die Amplikonlänge dieses Primerpaares beträgt 198 Basenpaare. Die Primer wurden mit sterilem, pyrogenfreien Wasser auf eine Konzentration von 3,5 µM verdünnt.

Tabelle 6 verwendete Oligonukleotid-Primer

	Primername	Primersequenz
Vorwärtsprimer	COL4A1_UF1	TACGCCGTCCACCTTGAA
Rückwärtsprimer	COL4A1_UR1	AGGTCAATGAAGCAGGGTGT

Die Reaktionsansätze für die PCR enthielten neben der Probanden-DNA je 2,5 µL Vorwärts- und Rückwärts-Primer, den *Amplitaq Gold 360 Master Mix* und gegebenenfalls H₂O, um ein Gesamtvolumen von 25 µL zu erhalten. Der *Amplitaq Gold 360 Master Mix* enthält die thermostabile Taq-Polymerase und die dNTPs. Um eine Kontamination der Ansätze auszuschließen, erfolgte von

jedem Ansatz eine Negativkontrolle ohne DNA. Zur Ermittlung der optimalen Schmelztemperatur der Primer wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Hierfür wurde Test-DNA mit den vorliegenden Primern und mit sechs verschiedenen Annealing-Temperaturen zwischen 54 °C und 64,5 °C amplifiziert. Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde beurteilt, welche Temperatur zu der größten Menge des PCR-Produkts führte. Als am effizientesten erwies sich das in Tabelle 7 dargestellte PCR-Schema mit einer Annealing-Temperatur von 59,9 °C.

Tabelle 7 PCR-Programm zur Amplifizierung der 3'UTR von *COL4A1* mit den spezifischen Oligonukleotid-Primern

	<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Dauer</i>	<i>Anzahl der Zyklen</i>
Initiale Denaturierung	95	10 min	1
Denaturierung	95	45 sec	
Annealing	59,9	45 sec	35
Elongation	72	1 min	
Finale Extension	72	10 min	1

Anschließend wurde die PCR mit verschiedenen Konzentrationen einer Test-DNA durchgeführt, um die optimale DNA-Konzentration für die spezifischen Primer zu ermitteln. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe aufgestellt, die Konzentrationen zwischen $c = 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ und $c = 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ enthielt. Die stärkste Bande in der Gelelektrophorese fand sich bei $c = 20 \text{ ng}$, sodass diese Konzentration als Optimum festgelegt wurde. Die Konzentrationen der Proben wurden mithilfe des NanoDrop One bestimmt. Die Proben wiesen DNA-Konzentrationen zwischen $c = 2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ und $c = 595 \text{ ng}/\mu\text{L}$ auf. Für Proben mit einer Konzentrationen zwischen $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ und $64 \text{ ng}/\mu\text{L}$ wurde der in Tabelle 8 dargestellte Standard PCR-Reaktionsansatz verwendet. Proben mit einer sehr hohen Konzentration ($c > 64 \text{ ng}/\mu\text{L}$) wurden auf eine Konzentration von $c = 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ verdünnt und anschließend ebenfalls mit dem Standard-Reaktionsansatz amplifiziert. Um eine für die PCR ausreichende Menge Template-DNA zu erreichen, wurde bei Proben mit geringer DNA-Konzentration ($c < 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$) das Volumen der Template-DNA im PCR-Ansatz erhöht. Wenn die DNA-Konzentration weniger als $7 \text{ ng}/\mu\text{L}$ betrug, wurde vor der PCR eine Amplifikation der gesamten DNA mithilfe des REPLI-g Mini Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Dadurch konnte eine Konzentration von $40 \text{ ng}/\mu\text{L}$ erreicht werden. Die PCR wurde bei diesen Proben anschließend mit dem Standard-Reaktionsansatz, jedoch mit $3 \mu\text{L}$ statt $2 \mu\text{L}$ Template-DNA durchgeführt.

Tabelle 8 PCR-Reaktionsansätze für unterschiedliche Proben abhängig von der DNA- Konzentration

Reagenzien	Ansatz 1 [μL]	Ansatz 2 [μL]	Ansatz 3 [μL]
Amplitaq Gold 360 Master Mix	12,5	12,5	12,5
Vorwärts-Primer	2,5	2,5	2,5
Rückwärts-Primer	2,5	2,5	2,5
H ₂ O	5,5	3,5	0
Template-DNA	2	4	7,5
Summe	25	25	25

Ansatz 1: Standard-Reaktionsansatz für Proben mit einer Konzentration zwischen $c = 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ und $c = 64 \text{ ng}/\mu\text{L}$, Ansatz 2: Reaktionsansatz für Proben mit einer DNA-Konzentration von $10 \text{ ng}/\mu\text{L} < c < 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$, Ansatz 3: Reaktionsansatz für Proben mit einer DNA-Konzentration von $7 \text{ ng}/\mu\text{L} < c < 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

2.3.2. DNA-Amplifikation

Bei Proben mit einer DNA-Konzentration $c < 7 \text{ ng}/\mu\text{L}$ wurde zunächst eine Amplifikation mithilfe des REPLI-g Mini Kits der Firma Qiagen durchgeführt, um eine für die PCR ausreichende Template-DNA Menge zu erreichen. Das hier angewandte Prinzip wird *Multiple Displacement Amplification* genannt. Dabei wird bei der Denaturierung der DNA-Stränge auf hohe Temperaturen verzichtet. Stattdessen erfolgt eine alkalische Denaturierung, um die DNA in Einzelstränge zu trennen. So können Strangbrüche und DNA-Schäden durch hohe Temperaturen vermieden werden (Dean et al., 2002). Anstatt der bei der PCR üblichen Taq-Polymerase wird für die Replikation eine Phi29-DNA-Polymerase eingesetzt, die aufgrund ihrer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität eine *proofreading*-Funktion besitzt und deshalb eine geringe Fehlerrate aufweist.

Für die alkalische Denaturierung wurde ein Denaturierungspuffer aus 0,24 μL rekonstituiertem *denaturing lysis buffer* und 0,85 μL nukleasefreiem H₂O pro Reaktion hergestellt. Der Neutralisierungspuffer bestand aus 0,32 μL Stopp Lösung und 1,81 μL nukleasefreiem H₂O pro Reaktion. Zu 1 μL Template DNA wurde 1 μL Denaturierungspuffer gegeben und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 μL Neutralisierungspuffer hinzugefügt. Der Mastermix wurde auf Eis präpariert. Er bestand aus 11,6 μL *REPLI-g Mini Reaction Buffer*, 0,4 μL *REPLI-g Mini DNA-Polymerase* und 4 μL nukleasefreiem H₂O pro Reaktion. 16 μL Mastermix wurden zu den 4 μL denaturierter DNA gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 20-22 Stunden bei 30 °C. Danach wurde die DNA-Polymerase durch dreiminütiges Erhitzen auf 65°C wieder deaktiviert. Jede amplifizierte DNA wurde mit 380 μL H₂O verdünnt (Verhältnis 1:20), sodass die erreichte DNA-Konzentration 40 ng/ μL betrug. Alle verwendeten Lösungen wurden nach Herstellung und nach Zugabe der DNA gevortext und zentrifugiert.

2.3.3. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Durch den Vergleich mit einem DNA-Größenmarker kann die ungefähre Kettenlänge der amplifizierten DNA abgeschätzt werden. Für die Gelelektrophorese wurde ein 1,5 %iges Agarosegel hergestellt. Hierfür wurden 4,5 g Agarose abgewogen und zu 300 ml Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) gegeben. Die Mischung wurde unter regelmäßigem Schwenken in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlen auf Handwärme wurden 40 µL Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel in einen Gelträger gegossen. Wenn Ethidiumbromid mit DNA in Kontakt tritt, interkaliert es zwischen die Nukleinsäuren. Dadurch verstärken sich seine fluoreszendierenden Eigenschaften, die man sich zur Darstellung der DNA mit UV-Licht zu Nutze macht. Nach Aushärten des Gels wurde der Gelträger in eine mit TBE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Je 3 µL des PCR-Produktes wurden mit 2 µL eines sechsfachen Probenaufragspuffers versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenmarker diente der *Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus*. An die Elektrophoresekammer wurde eine Spannung von 180V angeschlossen, wodurch die DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode wandern. Nach 30-40 Minuten wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen. Mittels UV-Licht konnten nun die DNA-Banden dargestellt werden.

2.3.4. Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung erfolgte im Institut für klinische Molekularbiologie in Kiel. Zur Sequenzierung wurden die DNA-Proben in 96-Well-Platten eingereicht. In jedem Well befanden sich 22 µL des PCR-Produktes. Jede Probe wurde mit 5 µL des Vorwärts-Primers (COL4A1_UF1) sequenziert. Bei unklaren Ergebnissen in der Auswertung wurde die PCR wiederholt und mit dem Rückwärts-Primer (COL4A1_UR1) erneut sequenziert.

2.3.5. Mutationsanalyse

Die Sequenzen wurden mit der Software *Lasergene SeqMan 5.00* der Firma DNASTAR, Inc. ausgewertet. Um abweichende Basen zu identifizieren, wurde jede Sequenz der Probanden-DNA mit dem entsprechenden Abschnitt der 3'UTR des COL4A1 Gens aus der Referenzsequenz des humanen Genoms (Version GRCh37/hg19) verglichen. Wenn in dem sequenzierten Abschnitt Varianten vorhanden waren, wurden diese mit den Datenbanken *ClinVar*, *dbSNP*, *gnomAD* und *1000 Genomes* weiter analysiert. Mithilfe dieser Datenbanken kann die Häufigkeit einer Variante in der allgemeinen Bevölkerung und gegebenenfalls die klinische Bedeutung geprüft werden.

Die *Single Nucleotide Polymorphism Database* (dbSNP, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) wurde vom *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) gegründet, um eine Sammlung aller pathogenen und nicht-pathogenen Polymorphismen sowie seltener Varianten zu erstellen. Neben Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP) sind kurze Deletionen, Insertionen und *Short Tandem Repeats* enthalten. Jede Variante erhält eine Referenz SNP-Nummer (rs#), um die eindeutige Identifikation der Variante und die Verknüpfung zu anderen Datenbanken zu ermöglichen (Sherry et al., 2001). Diese Referenznummer wird beispielsweise im *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu>) angezeigt, einer Suchmaschine mit der die Basenfolge jedes beliebigen DNA-Abschnittes zahlreicher Genome unterschiedlicher Organismen in Erfahrung gebracht werden kann (Kent et al., 2002). Für Kontrolldaten wurde die Datenbank *Genome Aggregation Database* (GnomAD) hinzugezogen. Sie beinhaltet zum Zeitpunkt der Analyse die Genomdaten von 15.708 Personen, bei denen ein WGS durchgeführt wurde. Zusätzlich wurden von weiteren 125.748 Person die Exomdaten erfasst (Karczewski et al., 2020). Die GnomAD-Kohorte setzt sich aus Personen unterschiedlicher Herkunft und aus unterschiedlichen globalen Regionen zusammen (Karczewski et al., 2020). Somit ist sie eine geeignete Kontroll-Kohorte, um Aussagen über die Häufigkeit einer Variante in der allgemeinen Bevölkerung und in spezifischen ethnischen oder regionalen Subgruppen treffen zu können. Für Vergleiche von Frequenzen in verschiedenen Population wurde ein Fisher-Exact-Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde $p=0.05$ festgelegt.

ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) ist ein Archiv, welches genetische Varianten in Zusammenhang mit bestimmten Phänotypen bringt (Landrum et al., 2018). Informationen zu neuen Varianten und Angaben zum zugehörigen Phänotyp liefern Forschungslabore, klinische Testlabore und Patientenregister. Mithilfe dieser Daten kann die klinische Bedeutung und die Pathogenität der Varianten beurteilt werden (Landrum et al., 2018).

2.4. Pathohistologie und immunhistochemische Färbungen

Von einem Patienten der erstbeschriebenen PADMAL Familie standen postmortal zerebrale Gewebeproben zur Verfügung. In Kooperation mit dem Institut für Neuropathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München wurden histologische und immunhistochemische Untersuchungen dieser Proben durchgeführt. Ziel war es, Aussagen über die pathologischen Veränderungen der kleinen Gefäße und über die Expression von *COL4A1* in Gefäßwänden treffen zu können. Dafür wurden Färbungen von Gefäßanschnitten des PADMAL-Falls und einem Kontroll-Präparat angefertigt. Als Kontrolle wurde ein Fall mit Hypertonie-bedingter Atherosklerose gewählt, um die PADMAL-

spezifischen Veränderungen von den allgemeinen Vorgängen bei Atherosklerose unterscheiden zu können.

Für die Färbungen wurden zwei Regionen gewählt, in denen in der Literatur bereits pathologische Befunde beschrieben wurden: Jeweils ein arterielles Gefäß im Bereich des Putamens und eines in der Leptomeninx auf Höhe der Pons. In den Kontroll-Proben wurden die korrespondierenden Gefäße präpariert. Von allen Präparaten wurden eine Elastica van Gieson (EvG) Färbung und eine immunhistochemische Färbung mit einem *COL4A1* Antikörper angefertigt. Da die EvG Färbung und die immunhistochemische Färbung eines Präparats an konsekutiven Schnitten durchgeführt wurden, sind die Gefäßanschnitte in beiden Färbungen nahezu identisch.

3. Ergebnisse

3.1. Studienkollektiv

Für die Untersuchung auf Mutationen in der miR-29 Bindestelle in der 3'-UTR des *COL4A1*-Gens wurden 649 Proband*innen ausgewählt. Bei diesen trat im Alter zwischen 18 bis 55 Jahren ein Hirninfarkt im vertebrobasilären Stromgebiet auf und es bestand eine Leukenzephalopathie. Im Durchschnitt waren die Proband*innen bei Auftreten des Hirninfarkts 44,4 Jahre alt. Der Median lag bei 46 Jahren. Von den 649 Proband*innen waren 429 (66,1 %) männlich, 220 (33,9 %) waren weiblich. Die Altersverteilung ist in Abbildung 4 dargestellt.

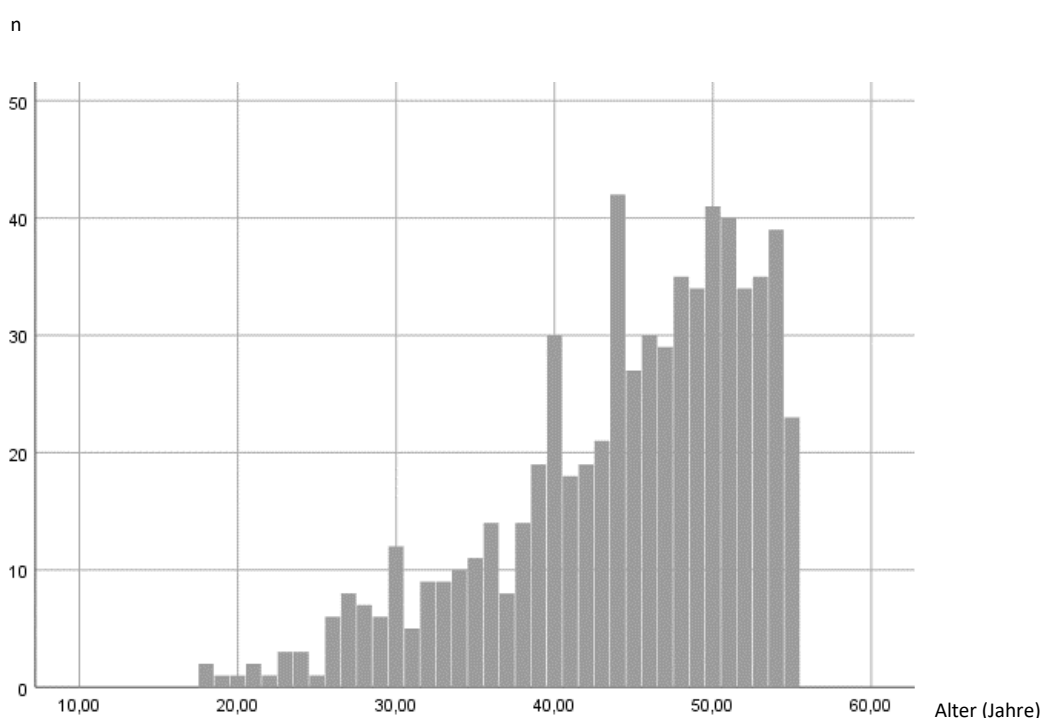


Abbildung 4 Histogramm der Altersverteilung bei Auftreten des Hirninfarkts. X-Achse: Alter (Jahre), Y-Achse: Anzahl der Proband*innen (n), Mittelwert: 44,41 Jahre; Standardabweichung: 8,022; 25. Perzentile: 41; 75. Perzentile: 51; N= 649 (Graphik mit freundlicher Genehmigung von Dr. Ulrike Grittner, Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie, Charité Berlin)

Tabelle 9 Verteilung der Infarktlokalisationen in der Kohorte

<i>Infarktlokalisation</i>	<i>n (%)</i>
Kortikal-subkortikal	109 (16.8)
Weißer Substanz	53 (8.2)
Basalganglien	30 (4.6)
Thalamus	50 (7.7)
Hirnstamm	301 (46.4)
Zerebellum	411 (63.3)

n = Anzahl der Proband*innen, *N* (gesamt) = 649. Einige Proband*innen wiesen mehrere Läsionen an unterschiedlichen Lokalisationen auf.

Die Lokalisation der Infarkte wurde unterteilt in Kortikal-subkortikal, Weißer Substanz, Basalganglien, Thalamus, Hirnstamm und Zerebellum (Tabelle 9). Einige Patient*innen wiesen mehrere Infarktlokalisationen auf. Da nur Proband*innen mit mindestens einem Infarkt im vertebrobasilären Stromgebiet in die Studie aufgenommen wurden, ist der Anteil der im Hirnstamm und im Zerebellum lokalisierten Infarkte am größten

Tabelle 10 Einteilung der ischämischen Hirninfarkte nach TOAST Klassifikation und Verteilung von Alter und Geschlecht

<i>TOAST-Klassifikation</i>	<i>N (%)</i>	<i>AD (SD)</i>	<i>n männlich (%)</i>	<i>n weiblich (%)</i>
Makroangiopathie	103 (16,3)	49 (5)	83 (80,6)	20 (19,4)
Kardiale Embolie	106 (16,8)	44 (9)	74 (69,8)	32 (30,2)
Mikroangiopathie	66 (10,5)	47 (8)	43 (65,2)	23 (34,8)
Andere definierte Ätiologie	165 (26,2)	41 (8)	90 (54,5)	75 (45,5)
Unklare Ätiologie	190 (30,2)	44 (8)	125 (65,8)	65 (34,2)
<i>Gesamt</i>	<i>630 (100)</i>	<i>44 (8)</i>	<i>415 (65,9)</i>	<i>215 (34,1)</i>

TOAST = Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment, *AD* = Altersdurchschnitt in Jahren, *SD* = Standardabweichung, *n* = Anzahl der Proband*innen. Nicht alle Proband*innen konnten einer TOAST-Kategorie zugeordnet werden.

Bei 630 Patient*innen konnte der Hirninfarkt einer Kategorie der TOAST-Klassifikation zugeordnet werden. Tabelle 10 zeigt die Verteilung der Infarktersachen in Zusammenhang mit Alter und Geschlecht. In 14 Fällen wurde der Hirninfarkt als primär hämorrhagisch klassifiziert und somit nicht nach der TOAST-Klassifikation kategorisiert. In 30 % der Fälle wurde der Infarkt als „unbekannte Ätiologie“ klassifiziert. In diesen Fällen wurde entweder trotz umfangreicher Diagnostik keine Ursache

gefunden, es wurden mehrere Ursachen gefunden oder die Diagnostik konnte nicht abgeschlossen werden. Ein mikroangiopathischer Hirninfarkt wurde in 66 Fällen diagnostiziert. Hiervon waren 65 % männlich und 35 % weiblich, was in etwa der Geschlechterverteilung der gesamten Kohorte entspricht. Dagegen traten in Relation zur gesamten Kohorte überproportional viele makroangiopathische Infarkte bei Männern auf ($p < .001$, $OR = 2.4$, $95\%CI\ 1.4-4.3$) und bei Frauen war der Anteil der als „anderen definierte Ätiologie“ klassifizierten Infarkte vergleichsweise hoch ($p < .001$, $OR = 1.9$, $95\%CI = 1.3-2.8$).

Da die Infarktlokalisation mit der TOAST-Klassifikation zusammenhängt, wird in Abbildung 5 die Verteilung der Lokalisationen in den unterschiedlichen Kategorien der TOAST-Klassifikation dargestellt. Während insgesamt in dieser Kohorte die Infarkte am häufigsten im Zerebellum lokalisiert sind, ist bei den mikroangiopathischen Infarkten der größte Anteil – 82 % aller mikroangiopathischen Infarkte – im Hirnstamm zu finden. Ein Chi-Quadrat-Test zeigte, dass der Anteil der im Hirnstamm oder im Zerebellum lokalisierten Läsionen signifikant mit der Ätiologie zusammenhängt ($\chi^2 (4, N = 689) = 57.84, p < .001$).

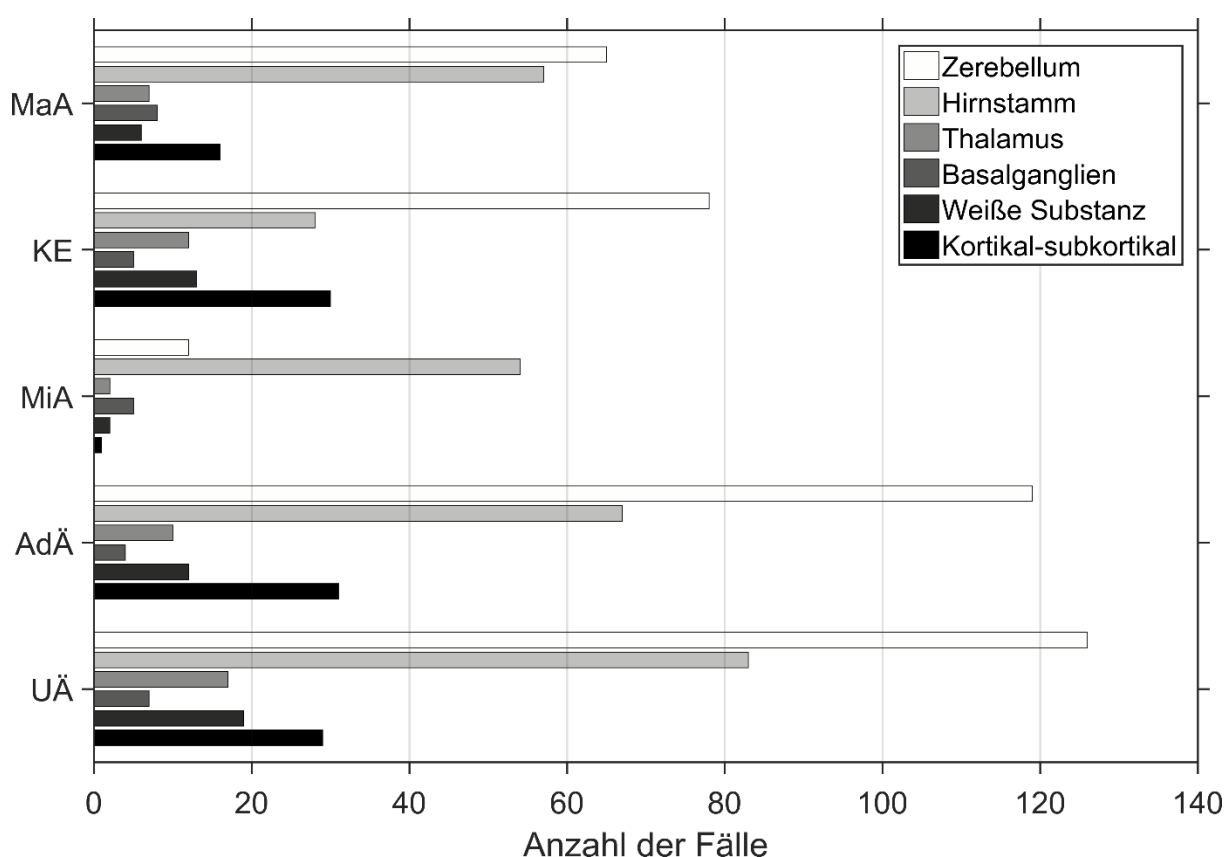


Abbildung 5 Häufigkeitsverteilung der untersuchten Fälle nach TOAST-Klassifikation und Infarktlokalisation. Einige Patient*innen wiesen mehrere Lokalisationen auf. TOAST = Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment, MaA = Makroangiopathie, KE = Kardiale Embolie, MiA = Mikroangiopathie, AdÄ = Andere definierte Ätiologie, UÄ = Unbekannte Ätiologie.

Tabelle 11 Prävalenz von Risikofaktoren in der Kohorte

<i>Risikofaktoren</i>		<i>n/N (%)</i>
Diabetes mellitus		84/647 (13.0)
Vorhofflimmern		20/646 (3.1)
Arterielle Hypertonie		310/646 (48.0)
Nikotinabusus	Aktueller Nikotinabusus	259/649 (39.9)
	Früherer Nikotinabusus	166/649 (25.6)
Ischämische Herzkrankheit		31/643 (4.8)
Myokardinfarkt in der Vorgeschichte		18/648 (2.8)
Periphere arterielle Verschlusskrankheit		17/644 (2.6)
TIA oder Hirninfarkt in der Vorgeschichte		101/646 (15.6)

*TIA = transitorische Ischämische Attacke, n = Anzahl der Proband*innen mit dem Risikofaktor, N = Anzahl der Proband*innen, bei denen Informationen zu dem jeweiligen Risikofaktor vorlagen. Bei einigen Proband*innen lagen mehrere Risikofaktoren vor.*

Bei den meisten Proband*innen lagen ein oder mehrere Risikofaktoren vor, die das Risiko für einen Hirninfarkt erhöhen (Tabelle 11). Am höchsten war die Prävalenz der arteriellen Hypertonie, die bei fast der Hälfte der Proband*innen vorlag. Auch früherer oder aktueller Nikotinabusus war ein häufig vorliegender Risikofaktor. Bei 15,6 % der Proband*innen war bereits eine TIA oder ein Hirninfarkt in der Vorgeschichte bekannt.

3.2. Mutationsanalyse

3.2.1. miR-29 Bindestelle in der 3'UTR von COL4A1

Die Region GRCh37, chr13:110,802,674-110,802,679, NM_001854.6:c.*31-*36 liegt in der 3'UTR von *COL4A1* und ist eine Bindestelle für die MikroRNA miR-29. Keine der 649 untersuchten Patientenproben wies eine Mutation in diesem Bereich auf. Abbildung 6 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt von zwei Sequenzen, in dem die miR-29 Bindestelle dargestellt ist. Bei beiden Proband*innen liegt der Wildtyp vor.

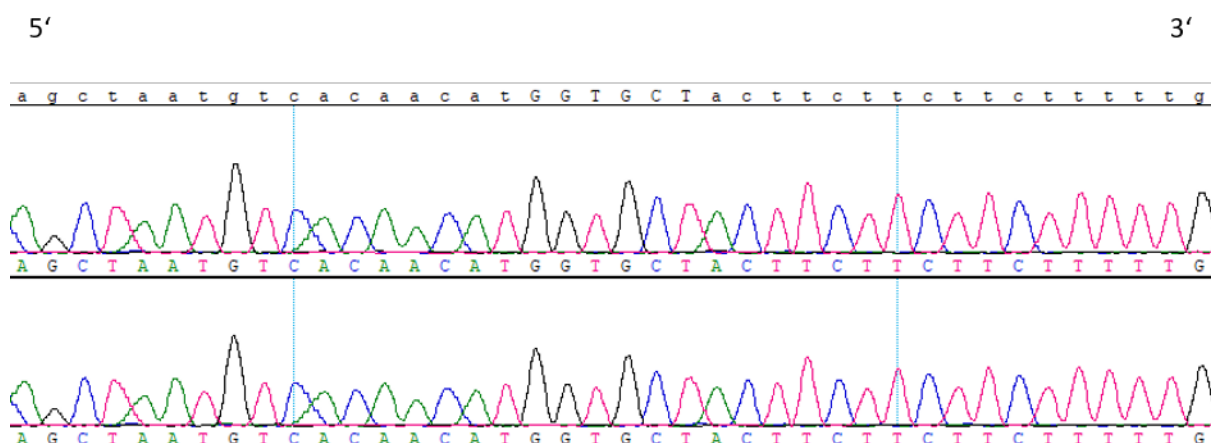


Abbildung 6 Zwei Beispielsequenzen der untersuchten Proband*innen mit Referenzsequenz. Der Ausschnitt zeigt die miR-29 Bindestelle in der 3'UTR von COL4A1 mit der Basenfolge GGTGCT (in der Referenzsequenz durch Großbuchstaben markiert). Die Sequenzen weisen den Wildtyp auf.

Zum Vergleich ist in Abbildung 7 die Sequenz eines Patienten aus der erstbeschriebenen PADMAL-Familie dargestellt. In dieser Sequenz liegt eine heterozygote Punktmutation in der miR-29 Bindestelle vor (GRCh37.p13, chr13:110802679C>A; NM_001845.6:c.*31G>T). Der Basenaustausch ist in der Referenzsequenz rot markiert.

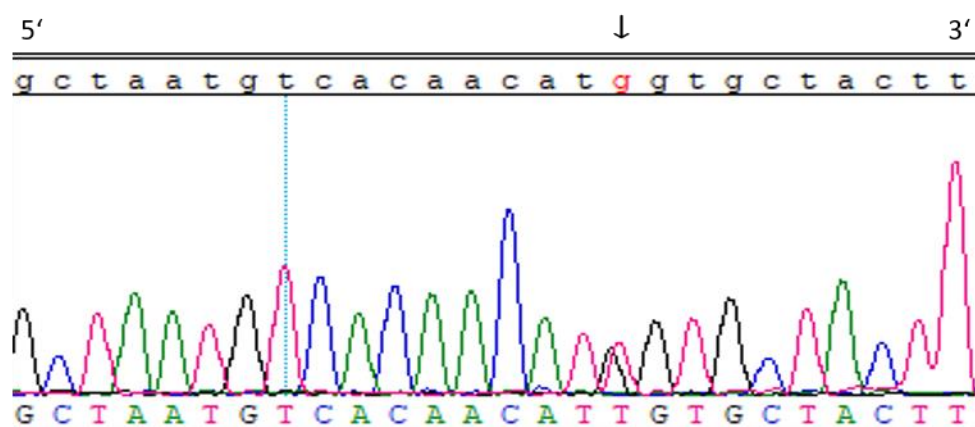


Abbildung 7 Sequenz des Patienten mit PADMAL und heterozygoter Punktmutation in der miR-29 Bindestelle (GRCh37.p13, chr13:110802679C>A; NM_001845.6:c.*31G>T). Der Basenaustausch ist in der Referenzsequenz rot markiert.

3.2.2. Variante rs886049956

Bei einem Patienten ließ sich eine heterozygote Punktmutation in der 3'UTR-Region des COL4A1 Gens an der Lokalisation GRCh37.p13, chr13:110802573C>T; NM_001845.6:c.*137G>A feststellen. Der betroffene Patient ist männlich und war zum Zeitpunkt des Infarkts 34 Jahre alt. Die MRT-radiologischen Untersuchungen erbrachten den Nachweis von zwei Läsionen, von denen sich eine im Zerebellum und eine im Hirnstamm befand. Die Ätiologie der Infarkte nach TOAST-Klassifikation wird

als „andere definierte Ursache“ angegeben, wobei die genaue Ursache aus den mir zur Verfügung stehenden pseudonymisierten Daten nicht zu klären war.

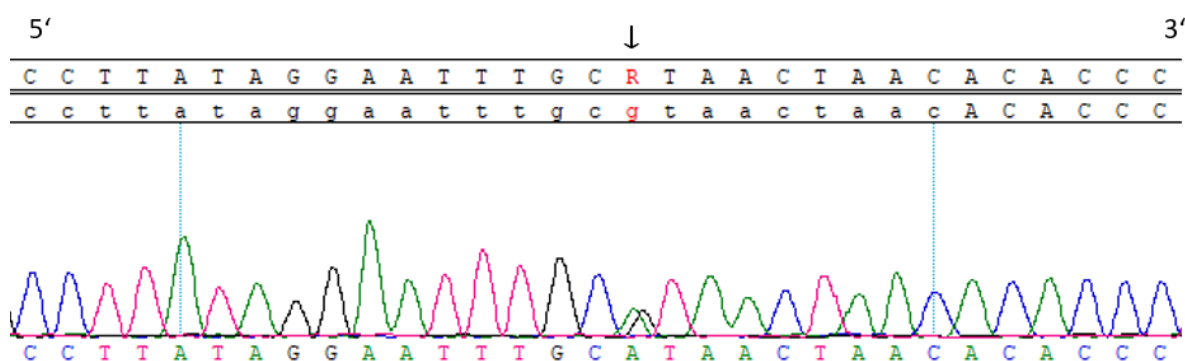


Abbildung 8 Sequenz des Patienten mit der Variante (GRCh37.p13, chr13: 110802573C>T; NM_001845.6:c.*137G>A). Der Pfeil markiert die heterozygote Punktmutation mit dem Austausch von Guanin durch Adenin.

Die in Abbildung 8 dargestellte Variante mit der Referenz SNP-Nummer rs886049956 (dbSNP, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) liegt nicht in der miR29-Bindestelle und auch in keiner anderen miRNA-Bindestelle (www.targetscan.org). Der Abstand zur miR-29 Bindestelle beträgt 101 Basenpaare. Die Variante ist selten: Die relative Häufigkeit der Allele beträgt weltweit 0,0001709 (gnomAD, <https://gnomad.broadinstitute.org>) bis 0,0001994 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). In der GnomAD-Population tragen 26 von insgesamt 152134 untersuchten Allele die Variante rs886049956. Die Variante wurde in der gnomAD-Population nur bei Menschen mit „nicht-finnisch europäischer“ und „afrikanischer/ afroamerikanischer“ Abstammung nachgewiesen. Die Variante war in der nicht-finnisch europäischen Bevölkerung nicht signifikant häufiger als in der afrikanischen/afroamerikanischen ($p=.84$, $OR=1.15$, $95\%CI=0.49-2.93$) und signifikant häufiger bei Frauen als bei Männern ($p=.03$, $OR=2.59$, $95\%CI=1.04-7.3$). In den anderen untersuchten Bevölkerungsgruppen (Latino, Finnisch, Ostasiatisch u.a.) war die Variante nicht vorhanden (siehe Tabelle 12).

Würde man voraussetzen, dass sich die Prävalenz der Variante in der Studienkohorte nicht von der Kontrollkohorte unterscheidet, läge die erwartete Anzahl der betroffenen Allele bei 0,22182 ($=0,0001709 \times 1298$). Die tatsächlich beobachtete Prävalenz in der Studienkohorte ist somit etwa 4,5-mal so hoch. Der Zusammenhang ist aufgrund der Tatsache, dass die Variante nur einmal in der Fallstichprobe vorkam, nicht signifikant ($p=.205$, $OR=4.5$, $95\%CI=0.1-27.5$).

Tabelle 12 Allelanzahl und relative Häufigkeit der Variante rs886049956 in der vorliegenden Studie und in verschiedenen Bevölkerungsgruppen der GnomAD-Kohorte. Die GnomAD-Kohorte dient als Kontrollgruppe.

	Population	Allele mit Variante (n)	Allele gesamt (N)	Relative Häufigkeit (n/N)
GnomAD- Kohorte	Europäisch (nicht-finnisch)	17	68028	0,0002499
	Afrikanisch/afroamerikanisch	9	41418	0,0002173
	Latino	0	15272	0,00
	Europäisch (finnisch)	0	10604	0,00
	Ostasiatisch	0	5196	0,00
	Südasiatisch	0	4824	0,00
	Andere	0	6792	0,00
	Weiblich	19	77834	0,0002441
	Männlich	7	74300	0,0000942
	Gesamt	26	152134	0,0001709
Vorliegende Studie	Gesamt	1	1298	0,0007704

Andere: aschkenasisch, nahöstlich, amisch, und Personen die keiner Bevölkerungsgruppe zugeordnet werden können. Homozygotenanzahl in allen Bevölkerungsgruppen = 0, n = Anzahl der Allele mit der Variante rs886049956, N = Gesamtanzahl der Allele. GnomAD = Genome Aggregation Database (https://gnomad.broadinstitute.org/variant/13-110150226-C-T?dataset=gnomad_r3)

Die klinische Bedeutung der Variante ist bisher unklar. Sie wurde jedoch bereits im Zusammenhang mit zerebralen Mikroangiopathien beobachtet. In der Datenbank ClinVar werden folgende mögliche assoziierte Erkrankungen genannt. Keiner der Einträge lässt aber eine definitive Einordnung als pathologisch zu und die Variante ist bislang auch nicht als ursächlich für eine ZMA in der medizinischen Literatur publiziert.:

- Hereditäre Angiopathie mit Nephropathie, Aneurysmen und Muskelkrämpfen (HANAC)
- Zerebrale Mikroangiopathie mit Hämorrhagie
- Porenzephalie

MutationTaster, ein Programm zur Beurteilung des Pathogenitätspotenzials von Varianten, sagt voraus, dass die Variante rs886049956 „disease causing“ sei.

3.2.3. Variante rs551436530

Eine Sequenz fiel durch eine heterozygote Basentriplettdeletion auf, die nur elf Basenpaare entfernt von der miR-29 Bindestelle liegt (GRCh37.p13, chr13:110802661-110802663del; NM_001845.6:c.*47-*49del). Die Deletion des Basentripletts AAG führt zu einer um drei Basenpaare verschobenen

Basenfolge der betroffenen Allele (siehe Abbildung 9). Die Variante trat bei einer weiblichen Patientin auf, die zum Zeitpunkt des Infarkts 23 Jahre alt war. Die Läsion befand sich im Zerebellum. Die Ursache des Infarkts wird nach der TOAST-Klassifikation als „andere definierte Ätiologie“ klassifiziert. Erneut konnte die genaue Ätiologie mit den mir zur Verfügung stehenden pseudonymisierten Daten nicht geklärt werden.

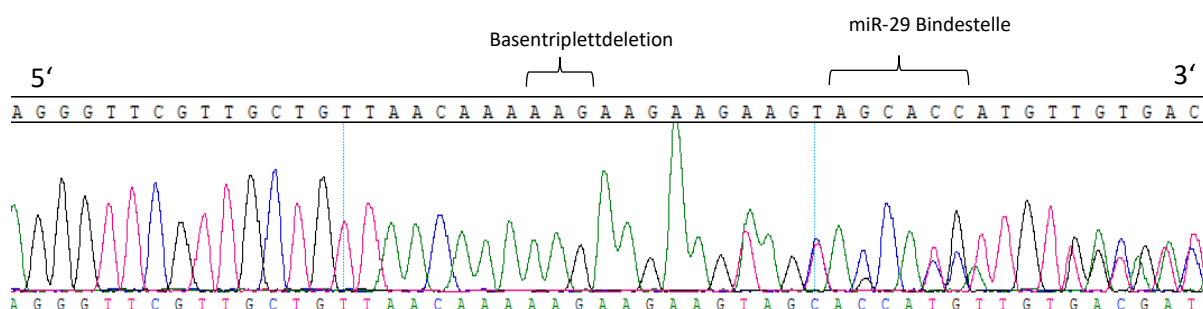


Abbildung 9 Sequenz der Patientin mit der Variante rs551436530 (GRCh37.p13, chr13:110802661-110802663del; NM_001845.6:c.*47-*49del). Die heterozygote Deletion eines Basentriplets führt zu einer um drei Basen verschobenen Basenabfolge auf einer Allele. Elf Basenpaare entfernt von der Basentriplett Deletion liegt die Bindestelle für die miR-29.

Die Variante ist durch die rs-Nummer rs551436530 gekennzeichnet. Die relative Häufigkeit beträgt weltweit zwischen 0,0004205 (*gnomAD*) und 0,0024 (*1000Genomes*). Dabei fallen Unterschiede in bestimmten Subpopulationen auf. Mehr als 1 % der südasiatischen Population von GnomAD weist die Variante auf (Tabelle 13). Der Unterschied zwischen der Häufigkeit in der südasiatischen und anderen Populationen ist statistisch signifikant ($p < .001$, $OR = 149.2$, $95\%CI = 76.6-317.9$). Auch die Daten des *1000Genomes Browsers* ergeben eine stark variierende Häufigkeit in den verschiedenen Subpopulationen. Die höchste Prävalenz liegt mit 0,0233 bei der Gruppe der „Bengali from Bangladesh“.

Bei einer gleichen relativen Häufigkeit der Variante in der Studien- und in der Kontrollkohorte läge die erwartete Anzahl der betroffenen Allele bei 0,545809 ($= 0,0004205 \times 1298$). Die tatsächlich beobachtete Prävalenz in der Studienkohorte liegt damit etwa 1,8-mal höher. Der Unterschied zwischen Studien- und Kontrollkohorte ist statistisch nicht signifikant ($p = .42$, $OR = 1.8$, $95\%CI = 0.05-10.6$). Bisher wurde keine klinische Signifikanz in der Datenbank ClinVar registriert und es finden sich keine Angaben zum Pathogenitätspotenzial bei *MutationTaster*.

Tabelle 13 Allelanzahl und relative Häufigkeit der Variante rs551436530 in der vorliegenden Arbeit und in verschiedenen Bevölkerungsgruppen der GnomAD-Kohorte. Die GnomAD-Kohorte dient als Kontrollgruppe.

	<i>Population</i>	<i>Allele mit Variante (n)</i>	<i>Allele gesamt (N)</i>	<i>Relative Häufigkeit (n/N)</i>
GnomAD-Kohorte	Südasiatisch	53	4824	0,0109900
	Europäisch (nicht-finnisch)	7	68022	0,0001029
	Europäisch (finnisch)	1	10626	0,0000941
	Afrikanisch/afroamerikanisch	3	41450	0,0000724
	Latino	0	15282	0,00
	Ostasiatisch	0	5190	0,00
	Andere	0	6790	0,00
	Weiblich	25	77840	0,0003212
	Männlich	39	74344	0,0005246
	Gesamt	64	152184	0,0004205
Vorliegende Studie	Gesamt	1	1298	0,0007704

Andere: aschenasisch, nahöstlich, amisch, und Personen die keiner Bevölkerungsgruppe zugeordnet werden können. Homozygotenanzahl in allen Bevölkerungsgruppen = 0, n = Anzahl der Allele mit der Variante rs551436530, N = Gesamtanzahl der Allele. GnomAD = Genome Aggregation Database (https://gnomad.broadinstitute.org/variant/13-110150313-AAAG-A?dataset=gnomad_r3)

3.3. Histologie und Immunhistochemie

Zur Analyse der *COL4A1* Expression wurden Gefäß-Präparate eines PADMAL Patienten immunhistochemisch mit einem *COL4A1* Antikörper gefärbt. Diese Färbung bringt Kollagen Typ IV zur Darstellung. Zusätzlich wurde eine Elastica van Gieson Färbung von konsekutiven Schnitten angefertigt. Als Kontrolle dienten korrelierende Präparate eines Falls mit Hypertonie-bedingter Atherosklerose. Abbildung 10 zeigt die Gegenüberstellung der Färbungen der PADMAL-Präparate mit denen der Hypertonie-bedingten Atherosklerose. Es handelt sich um kleine Arterien aus dem Bereich des Putamens.

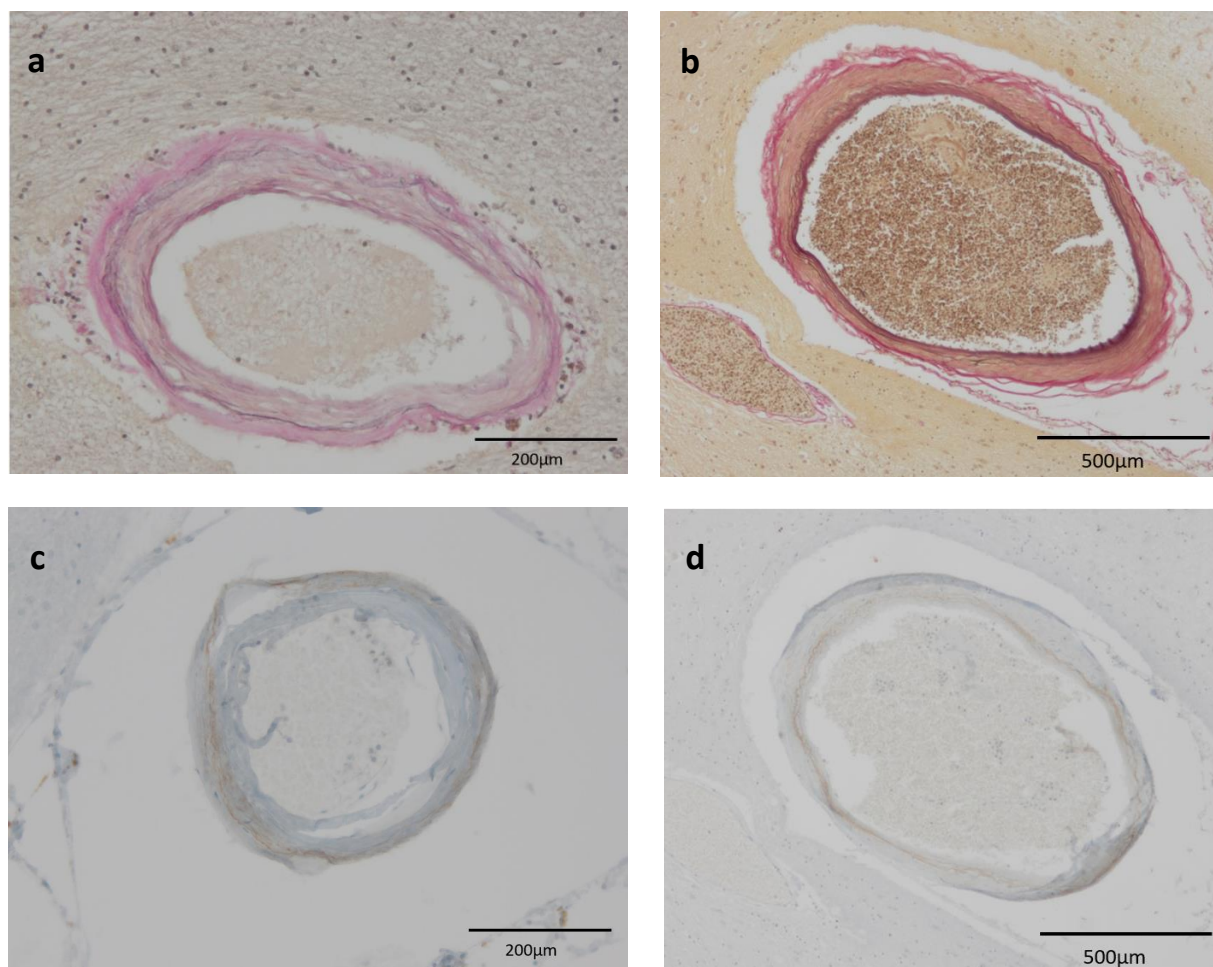


Abbildung 10 Gegenüberstellung von Gefäßanschnitten aus dem Putamen von PADMAL und Hypertonie-bedingter Atherosklerose. a) PADMAL, Elastica van Gieson (EvG), Vergrößerung x10. Auffällig sind die zahlreichen dunkelviolet angefärbten elastischen Fasern in der Media und Adventitia. Insbesondere die Muscularis weist eine deutliche Hyperelastose auf. b) Atherosklerose, EvG, Vergrößerung x4. Die elastischen Fasern stellen sich hauptsächlich in der Intima dar. Die Intima ist leicht hypertrophiert. c) PADMAL, Immunhistochemie, Vergrößerung x10. Die Färbung mit COL4A1 Antikörpern zeigt die vermehrte Anreicherung von Kollagen IV im Übergang der Intima zur Media und in der Media. Die Kollagen IV Fasern sind bräunlich angefärbt. d) Atherosklerose, Immunhistochemie, Vergrößerung x4. Darstellung von Kollagen IV-Fasern vor allem zwischen Intima und Media. (Bilder mit freundlicher Genehmigung von Dr. Thomas Arzberger, Institut für Neuropathologie München)

Beim Vergleich der immunhistochemischen Färbungen der PADMAL-Präparats und des Präparats der Hypertonie-bedingten Atherosklerose zeigt sich quantitativ nur ein geringer Unterschied der Expression von COL4A1. Allerdings unterscheidet sich die Lokalisation der COL4A1 Expression. Bei dem Atherosklerose-Präparat zeigt sich eine deutliche Fibrose der Intima. Dagegen präsentieren sich die Kollagen IV-Fasern im PADMAL-Fall eher im Übergang der Intima zur Media und in der Media selbst. In der Elastica van Gieson Färbung des Hypertonie-bedingten Atherosklerose Falls stellt sich die Intima leicht verdickt dar. Die hier starke Anfärbung der elastischen Fasern lässt auf eine Fibroelastose der Intima schließen. Im PADMAL-Präparat präsentieren sich die elastischen Fasern dagegen vermehrt in

der Media und Adventitia. Die Muscularis erscheint atrophiert und ist mit elastischen Fasern durchsetzt.

Bei dem Patienten war erstmals im Alter von 55 Jahren eine linksseitige Hemiparese aufgetreten, aufgrund eines lakunären Infarkts der Capsula interna. MRT-radiologisch waren zusätzlich ältere Läsionen sichtbar, die auf bereits zuvor aufgetretene stumme Infarkte hindeuteten. Im Verlauf kam es zu weiteren mikroangiopathischen Infarkten im vertebrobasilären Stromgebiet, die zu Doppelbildwahrnehmungen, Schwindel und persistierender Fallneigung nach rechts führten. Die lückenlose Familienanamnese für zerebrale Mikroangiopathien und die auffällige Lokalisation der Infarkte im Pons waren wegweisend für die Diagnose PADMAL. Der Patient verstarb im Alter von 65 Jahren. Abbildung 11 zeigt die zahlreichen Hyperintensitäten der weißen Substanz, die in den MRT-Bildern des Patienten zu sehen sind.

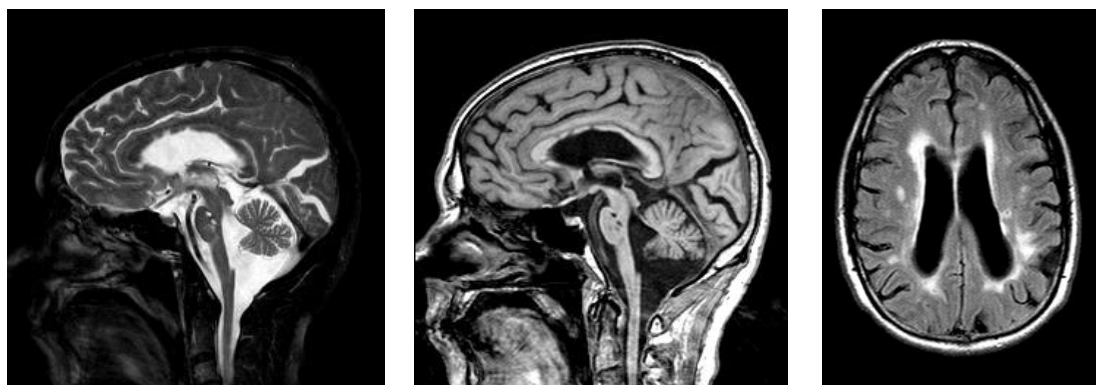


Abbildung 11 MRT-Bilder des Patienten mit PADMAL und linksseitiger Hemiparese. a) T2 gewichtetes sagittales MRT b) T1 gewichtetes sagittales MRT c) axiales T2-FLAIR MRT. In der sagittalen Achse fallen multiple hyperintense Lakunen im dorsalen Pons auf. Der Hirnstamm wirkt atrophiert. Im Bereich des Corpus Callosum und subkortikal sind konfluierende Hyperintensitäten der weißen Substanz zu sehen. Die axiale Achse zeigt multiple und teilweise konfluierende periventrikuläre Hyperintensitäten frontal und parieto-occipital.

4. Diskussion

Für die Untersuchung der miR-29 Bindestelle des *COL4A1* Gens wurde die 3'UTR von *COL4A1* von jungen Patient*innen mit Hirninfarkten im vertebrobasilären Stromgebiet und Leukenzephalopathie sequenziert. Mutationen in der miR-29 Bindestelle wurden bei keiner der 649 Patient*innen nachgewiesen. Allerdings konnten bei einem Patient und einer Patientin Varianten in der Nähe der miR-29 Bindestelle identifiziert werden. Die Pathogenität dieser Varianten ist bisher nicht geklärt.

4.1. Varianten in der 3'UTR des *COL4A1* Gens

4.1.1. Varianten in der miR-29 Bindestelle (NM_001854.6:c.*31-36)

Bisher wurden Mutationen in der miR-29 Bindestelle von *COL4A1* ausschließlich bei Patient*innen mit den beiden familiären Mikroangiopathien PADMAL und shMID nachgewiesen. Sporadische Fälle von Mutationen in diesem Bereich sind nicht bekannt. Im Vergleich zu anderen Ursachen mikroangiopathischer Infarkte wie Atherosklerose ist PADMAL eine extrem seltene Erkrankung. Daher ist es nicht verwunderlich, dass im Normalfall Patient*innen mit zerebraler Mikroangiopathie nicht auf Varianten in der miR-29 Bindestelle getestet werden, wenn keine passende Familienanamnese vorliegt. Es wäre also nicht ausgeschlossen, dass PADMAL häufiger vorkommt als angenommen und bisher weitgehend unterdiagnostiziert ist. Insbesondere für sporadische Fälle von zerebralen Mikroangiopathien und juvenilen Hirninfarkten liegen bisher keine Daten zu Untersuchungen der miR-29 Bindestelle vor. Sporadische Fälle von CADASIL, der häufigsten hereditären zerebralen Mikroangiopathie, sind bereits bekannt (Anne Joutel, Dodick, Parisi, Cecillon, & Tournier-Lasserre, 2000). Auch über einzelne sporadische Fälle anderer monogener Hirninfarkt-Erkrankungen wurde bereits berichtet. Beispiele sind: Ein Fall sporadischer HERNs mit neuartiger TREX1 Mutation (Scurry, Wellings, Goel, & Pluschke, 2016), ein Patient mit sporadischen intrazerebralen Hämorrhagien verursacht durch eine neuartige *COL4A1* Mutation (Vahedi et al., 2007), eine sporadische, Mitochondriale Enzephalopathie mit Laktatazidose und Schlaganfall-ähnlichen Episoden (MELAS) verursachende Mutation im mitochondrialen ND3 Gen (Mezuki et al., 2017). Die vorliegende Arbeit untersucht erstmals den Zusammenhang zwischen Hirninfarkten im vertebrobasilären Stromgebiet bei jungen Menschen und Mutationen in der miR-29 Bindestelle. Die Ergebnisse unterstreichen die Seltenheit der Erkrankung und sprechen gegen ein gehäuftes Auftreten von Mutationen in der miR-29 Bindestelle bei sporadischen Fällen juveniler Hirninfarkte.

Mutationen bei sporadischer ZMA könnten de-novo aufgetreten sein, alternativ könnten Mutationen bei den Eltern der Betroffenen aufgrund einer reduzierten Penetranz phänotypisch inapparent sein. Da die PADMAL/shMID in den bisher untersuchten Familien eine hohe Penetranz zeigt, kämen hierfür

vor allem Mutationen in Frage, die Nukleotide der miR-29 Bindestelle betreffen, welche bisher nicht im Zusammenhang mit einer hereditären ZMA beschrieben wurden oder die in der Nähe der Bindestelle liegen und die Bindung möglicherweise beeinflussen.

Empirische Daten zeigen, dass Menschen im Durchschnitt mit 58-70 de novo Mutationen (DNM) im gesamten Genom geboren werden, entsprechend einer genomweiten Mutationsrate von etwa 1×10^{-8} bis $1,2 \times 10^{-8}$ (Conrad et al., 2011; Kong et al., 2012; Michaelson et al., 2012). Davon haben schätzungsweise 0,9-4,5 Varianten einen schädlichen Effekt (Conrad et al., 2011; Lynch, 2010). Das gesamte Genom besteht aus über drei Milliarden Basenpaaren (Lander et al., 2001). Die miR-29 Bindestelle ist dagegen nur sieben Basenpaare lang. Die Wahrscheinlichkeit, dass ausgerechnet eines der sieben Basenpaare der miR-29 Bindestelle von einer de novo Mutation betroffen ist, wäre bei einer zufälligen Verteilung der Mutationen im Genom demnach sehr gering. Zum Vergleich: Mindestens 170 CADASIL-verursachende Mutationen sind im *NOTCH3* Gen bekannt, dessen kodierende Region ungefähr (in Abhängigkeit von der Spleißvariante) 7000 Basenpaare umfasst. (Tikka et al., 2009). Somit kann die a priori Wahrscheinlichkeit für DNM bei CADASIL als höher angenommen werden.

Mutationen entstehen zwar durch zufällige Prozesse, die Verteilung der Mutationen in den verschiedenen Regionen des Genoms ist jedoch nicht gänzlich zufällig. Die Anzahl der DNM variiert sowohl zwischen den Chromosomen als auch innerhalb eines Chromosoms aufgrund von intrinsischen Faktoren wie CpG-Dinukleotid-Motiven und unterschiedlichen Chromatinstrukturen (Ellegren, Smith, & Webster, 2003; Michaelson et al., 2012). Michaelson et al. beobachteten eine erhöhte Mutabilität von Genen, die mit autosomal-dominanten Erkrankungen assoziiert sind. Auch Gene, die hauptsächlich im Gehirn exprimiert werden, wiesen eine signifikant höhere Mutabilität auf (Michaelson et al., 2012). Eine weitere Studie stellte bei Menschen mit Autismus eine erhöhte Anzahl DNM in regulatorischen Regionen fest, insbesondere in den 3'UTR (Turner et al., 2017). PADMAL ist eine autosomal-dominante Erkrankung, die sich im Gehirn manifestiert und durch Mutationen in der 3'UTR verursacht wird. Demnach wäre es denkbar, dass auch die PADMAL verursachenden genetischen Strukturen von einer erhöhten Spontanmutationsrate betroffen sind. Die genannten Studien legen allerdings ihren Fokus auf Proband*innen mit Autismus-Spektrum-Störung und lassen sich daher nicht vollständig auf PADMAL übertragen, da Autismus multifaktorielle genetische Ursachen hat und durch eine Vielzahl an Varianten in unterschiedlichen Genen mit verursacht werden kann. Die meisten Studien untersuchen DNM im Zusammenhang mit sich früh manifestierenden Erkrankungen wie Autismus oder Schizophrenie. Je älter die Patient*innen sind, desto schwieriger wird die Detektion von DNM, da die elterliche DNA seltener zur Verfügung steht. Trotzdem werden DNM auch bei Erkrankungen beobachtet, die sich erst im Erwachsenenalter manifestieren (Nicolas et al., 2015). Es wurden bereits

mehrere Fälle von sporadischer CADASIL beschrieben, die sich mit der typischen Symptomatik früh einsetzender lakunärer Hirninfarkte und Migräne, jedoch mit negativer Familienanamnese präsentierten (Coto, Menendez, Navarro, Carcia-Castr, & Alvarez, 2006; Anne Joutel et al., 2000; Stojanov et al., 2014). Aufgrund dessen empfehlen einige Autoren, dass die Differentialdiagnose CADASIL bei passender Klinik nicht aufgrund einer negativen Familienanamnese verworfen werden sollte (Anne Joutel et al., 2000). Allerdings kann daraus nicht geschlossen werden, dass *NOTCH3* Mutationen für einen größeren Anteil der sporadischen Hirninfarkte verantwortlich sind. Eine Studie untersuchte die Prävalenz der häufigsten Mutationen in Exon drei und vier des *NOTCH3* Gens bei jüngeren Menschen mit sporadischen ischämischen Hirninfarkten (Durchschnittsalter 64,4 Jahre) und Menschen mit Alzheimer Demenz (Wang et al., 2000). Unter den 70 Patient*innen mit sporadischem Hirninfarkt, 55 Alzheimer-Erkrankten und 117 Kontrollen wurden keine Mutationen im *NOTCH3* Gen detektiert (Wang et al., 2000). Eine größere Studie untersuchte eine noch jüngere Kohorte (Durchschnittsalter 56,7) auf *NOTCH3* Mutationen mittels *denaturing high performance liquid chromatography* von acht verschiedenen Exons und Sanger-Sequenzierung von Exon 3 und 4. Von insgesamt 994 Patient*innen mit sporadischen lakunären Hirninfarkten konnten bei 5 Patient*innen Mutationen im *NOTCH3* Gen nachgewiesen werden, was einer Prävalenz von 0,5 % entspricht (Kilarski et al., 2015). Bei allen 5 Patient*innen war eine Leukenzephalopathie vorhanden (Kilarski et al., 2015). Die erneute Untersuchung von Exon 2-24 von *NOTCH3* mittels *high-throughput sequencing panels* bei 950 Patient*innen derselben Kohorte identifizierte *NOTCH3* Mutationen bei sechs weiteren Patient*innen, sodass die CADASIL-Prävalenz insgesamt auf 1,2 % und unter den Patient*innen mit Leukenzephalopathie auf 2,9 % steigt (Tan et al., 2019). Werden nur die Patient*innen mit Leukenzephalopathie ≤ 60 Jahre betrachtet, liegt die Prävalenz bei 3,7 % (Tan et al., 2019). Daraus kann geschlossen werden, dass *NOTCH3* Mutationen zwar nicht verantwortlich für einen größeren Anteil aller sporadischen Hirninfarkte sind, jedoch die CADASIL Prävalenz bei einer definierten Kohorte von jungen Menschen mit lakunären Infarkten und Leukenzephalopathie vergleichsweise hoch ist. Je genauer die Untersuchungsmethoden waren und je besser das klinische Bild der Proband*innen mit dem von CADASIL übereinstimmte, desto größer war der Anteil der Proband*innen, bei denen eine Mutation im *NOTCH3* Gen nachgewiesen werden konnte. Die vorliegende Arbeit untersucht eine anhand der Klinik von PADMAL definierte Kohorte aus 649 Patient*innen ≤ 55 Jahre mit Infarkten im vertebrobasilären Stromgebiet und Leukenzephalopathie. Selbst in dieser eng definierten Kohorte wurden mittels Sanger-Sequenzierung keine Mutationen in der miR-29 Bindestelle von *COL4A1* detektiert. Die Ergebnisse lassen somit darauf schließen, dass Mutationen in der miR-29 Bindestelle von *COL4A1* keine häufige Ursache für sporadische Hirninfarkte darstellen.

4.1.2. Variante rs886049956 (NM_001845.6:c.*137G>A)

Die Variante rs886049956 wurde bereits in drei Fällen in der Datenbank ClinVar mit verschiedenen mikroangiopathischen Erkrankungen assoziiert. Ob die Variante tatsächlich kausal mit den genannten Phänotypen zusammenhängt, ist jedoch unklar. Alle drei Erkrankungen, mit denen die Variante assoziiert wurde, gehen typischerweise mit zerebralen Hämorrhagien einher. Der Proband, bei dem hier die Variante identifiziert wurde, wird nach TOAST als Hirninfarkt einer „anderen definierten Ursache“ klassifiziert. Es handelte sich also um einen ischämischen Hirninfarkt aufgrund einer der selteneren Ursachen und nicht um einen hämorrhagischen Hirninfarkt. Die genaue Ursache ist nicht bekannt. Weitere klinische Details sind weder zu der anonymisierten DNA-Probe noch zu weiteren Mitgliedern der Familie erhältlich.

Die relative Häufigkeit einer Variante ist ein wichtiges Kriterium, ob diese als pathogene Variante in Betracht kommt. Für dominante Erkrankungen kann als Richtwert eine relative Häufigkeit von höchstens 0,1 % in der Gesamtbevölkerung festgelegt werden, da bei häufigeren Varianten eine Korrelation zwischen Variante und Erkrankung unwahrscheinlich ist (Bamshad et al., 2011). In der GnomAD-Kohorte, die hier als Kontrollgruppe dient, liegt die Häufigkeit der Variante deutlich unter 0,1 %. Aufgrund der Seltenheit der Variante in der Kontrollgruppe wäre eine Pathogenität der Variante somit denkbar. Ein weiteres Kriterium ist eine statistisch höhere genetische Prävalenz in Betroffenen als in Kontrollen (Richards et al., 2015). Dieses Kriterium ist mit einer 4,5-mal so hohen Prävalenz in der Studienkohorte gegenüber der GnomAD-Kontrollkohorte erfüllt. Allerdings ist dieser Wert aufgrund der geringen Anzahl an Proband*innen in der Studienkohorte nicht signifikant und müsste in einer größeren Kohorte überprüft werden. Von *MutationTaster* wird eine hohe Prädisposition zur Pathogenität der Variante errechnet. Funktionelle Daten zu einem möglicher Pathomechanismus fehlen jedoch. Eine weitere interessante Information wäre, ob auch Familienmitglieder des Patienten die Variante tragen oder ob es sich um eine de novo Mutation handelt. Segregationsanalysen können bei großen Familien mit mehreren Betroffenen wegweisend zur Einschätzung der Pathogenität einer Variante sein.

Im Gegensatz zu der GnomAD-Kohorte lagen für die Studienkohorte dieser Arbeit keine Informationen zur Zugehörigkeit zu bestimmten Bevölkerungsgruppen vor. Daher lassen sich die Kohorten nicht direkt miteinander vergleichen. In der GnomAD-Population tragen 26 von insgesamt 152134 untersuchten Allele die Variante rs886049956 (entsprechend einer relativen Häufigkeit von 0,0001709). Die Variante wurde in der GnomAD-Population nur bei Menschen mit europäischer (außer finnisch) und afrikanisch/afro-amerikanischer Abstammung nachgewiesen. In den anderen untersuchten Bevölkerungsgruppen war die Variante nicht vorhanden. Das könnte zum einen daran

liegen, dass die Anzahl der untersuchten Allele in diesen Gruppen geringer war. Andererseits ist es denkbar, dass die Variante tatsächlich seltener in anderen Bevölkerungsgruppen vorkommt. Die Gruppe der „Latino/Admixed American“ war mit 15272 untersuchten Allelen die am dritthäufigsten vertretene Bevölkerungsgruppe nach der nicht-finnischen europäischen und der afrikanischen Gruppe. Setzt man eine allgemeine Häufigkeit von 0,0001709 voraus, entspräche dies - bei insgesamt 15272 untersuchten Allelen - einer Anzahl von 2,61 Varianten tragenden Allelen. Nachgewiesen wurde die Variante aber bei keiner Allele in dieser Population. Auch wenn der Unterschied nicht signifikant ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Prävalenz in der Gruppe der „Latino/Admixed American“ möglicherweise geringer ist als in der allgemeinen Bevölkerung ($p=.10$). Um die beiden Kohorten direkt vergleichen zu können, müsste demnach eine ähnliche Verteilung der Subpopulationen vorliegen. Eine größere Studienkohorte wäre notwendig, um beurteilen zu können, ob die Variante gehäuft bei jungen Menschen mit Hirninfarkt und Leukenzephalopathie auftritt.

4.1.3. Variante rs551436530 (NM_001845.6:c.*47-*49del)

Die Pathogenität der Variante rs551436530 ist bisher nicht geklärt. Die Variante ist insgesamt selten in den Vergleichsgruppen der GnomAD- und 1000genomes-Kohorten. Ihre relative Häufigkeit liegt in der GnomAD-Kohorte bei 0,0004205 und damit unter dem von Bamshad et al. suggerierten Grenzwert für eine mögliche Pathogenität von 0,1 % (Bamshad et al., 2011). Auffällig ist aber das gehäufte Vorkommen der Allele in der südasiatischen Subpopulation. Bei ähnlicher Prävalenz des von der Variante ausgelösten Phänotyps wäre auch eine ähnliche Prävalenz des Genotyps zu erwarten (Whiffin et al., 2017). Eine insgesamt seltene Variante ist somit eher nicht pathogen, wenn sie in einer bestimmten Bevölkerungsgruppe sehr häufig vorkommt, ohne dass dort die Prävalenz der Erkrankung höher ist. Die höhere genetische Prävalenz in der 1000genomes Kohorte im Vergleich zur GnomAD-Kohorte lässt sich durch eine unterschiedlich starke Vertretung einzelner Subpopulationen in den Kohorten erklären. Während häufige Varianten meist gleichmäßig in der gesamten Weltbevölkerung verteilt sind, konzentrieren sich 84 % der seltenen Varianten (definiert als Varianten mit einer Häufigkeit < 0,5 %) nur auf eine bestimmte Subpopulation (Auton et al., 2015). Diese Varianten beruhen auf gemeinsamen Vorfahren, die je nach Population und Variante zwischen 143 und 296 Generationen zurückliegen (Auton et al., 2015).

Ein Zusammenhang der Variante mit dem Phänotyp der Probandin ist trotzdem nicht sicher auszuschließen, da auch pathogene Varianten mit geringer Penetranz eine hohe Prävalenz in der Bevölkerung aufweisen können. Eine Fall-Kontrollstudie von Chong et. al (2017) untersuchte die Prävalenz von Varianten in acht bekannten Hirninfarktgenen (u.a. *COL4A1*, *NOTCH3* und *GLA*) bei sporadischen Fällen mikroangiopathischer ischämischer und hämorrhagischer Hirninfarkte. Passend

zu der Tatsache, dass CADASIL mit Abstand die häufigste monogene Hirninfarkterkrankung ist, wurden bei 0,54 % der Fallkohorte Mutationen im *NOTCH3* Gen identifiziert. Da jedoch auch in 0,23 % der Kontrollgruppe Mutationen im *NOTCH3* Gen vorlagen, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Fall- und Kontrollgruppe. Auch in der Exome Aggregation Consortium Kohorte, die als weitere Kontrollgruppe diente, war die relative Häufigkeit mit 0,34 % hoch. Die hohe Prävalenz von Mutationen im *NOTCH3* Gen in der Kontrollgruppe könnte ein Hinweis auf eine unvollständige Penetranz sein (Chong et al., 2017). Setzt man eine geringe Penetranz der Variante rs551436530 voraus, wäre also auch hier eine Pathogenität nicht ausgeschlossen. Interaktionen mit anderen Varianten und mit Umweltfaktoren können die pathophysiologischen Konsequenzen einer Mutation beeinflussen (D. J. Liu & Leal, 2010). In Anbetracht der Tatsache, dass ein durchschnittliches menschliches Genom an 4 bis 5 Millionen Positionen von dem Referenzgenom abweicht (darunter 40.000 bis 200.000 mit einer Prävalenz <0,5 % in der allgemeinen Bevölkerung (Auton et al., 2015)), ist es aber wahrscheinlicher, dass es sich bei der Probandin um einen Zufallsfund handelt. Bisher sind keine funktionellen Daten zu dieser Variante bekannt. Die Variante liegt nicht in einer Bindestelle für eine miRNA und führt auch nicht zu einem Aminosäureaustausch, da sie sich in einer untranslatierten Region befindet. Ein plausibler Pathomechanismus, der eine Leukenzephalopathie und einen ischämischen Infarkt aufgrund dieser Variante erklären könnte, lässt sich daher nicht herleiten.

4.2. Histologie und Immunhistochemie

Die hier untersuchten Arterien eines PADMAL-Patienten zeigten ähnliche pathologische Veränderungen wie die histologischen Untersuchungen vorheriger Arbeiten. Die von Hagel et al. beschriebene Hyperelastose und die atrophizierte, fibrotische Tunica Media in Gefäßen der Leptomeninx und des Parenchyms konnte auch in der vorliegenden Arbeit bei einer Arterie des Putamens beobachtet werden. Bei immunhistochemischen Färbung mit *COL4A1*-Antikörpern ist eine vermehrte Darstellung von Kollagenfasern in kleinen Arterien und Arteriolen auffällig (Craggs et al., 2013; Hagel et al., 2004). Craggs et al. wiesen eine im Vergleich zu anderen sporadischen und hereditären zerebralen Mikroangiopathien erhöhte COL4-Expression in Gefäßen der Basalganglien und des Frontallappens von PADMAL und shMID nach. Den allgemeinen Schweregrad der vaskulären Pathologien von PADMAL beschrieben die Autoren als geringer im Vergleich zu CADASIL und vergleichbar mit sporadischen ZMA. Dies passt zu der Beobachtung der vorliegenden Arbeit, dass der Unterschied in der quantitativen Expression von *COL4A1* zwischen PADMAL und sporadischer ZMA gering ist. Stattdessen unterschieden sich die Präparate hauptsächlich in der Verteilung der Kollagenfasern auf die verschiedenen vaskulären Wandschichten.

Wie bereits von Hagel et al. (2004) beschrieben, präsentierten sich die Kollagenfasern bei PADMAL auch in der vorliegenden Arbeit vermehrt in der Muscularis. Im Fall einer Hypertonie-bedingten Atherosklerose reicherten sie sich dagegen vermehrt in der Intima an. Dass die Unterschiede der *COL4A1* Expression zwischen PADMAL und sporadischer Atherosklerose hier weniger ausgeprägt sind als in der Studie von Craggs et al. (2013) könnte an den unterschiedlichen Hirnregionen liegen, aus denen die Gefäßproben entnommen wurden. Craggs. et al. beschrieben bei PADMAL die stärkste COL4-Expression in den Gefäßen des Frontallappens mit einer geringeren Ausprägung in den Basalganglien. Diese Beobachtung passt zu der Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit Gefäße des Putamens untersucht wurden und hier nur ein geringer Unterschied zur *COL4A1*-Expression bei sporadischer Atherosklerose festgestellt wurde. Allerdings beobachteten die Autoren bei Patient*innen mit shMID einen umgekehrten Effekt mit stärkerer *COL4A1*-Expression in den Basalganglien als im Frontallappen. Mittlerweile weiß man, dass PADMAL und shMID durch dieselbe Mutation verursacht werden und somit sehr wahrscheinlich nur unterschiedliche Ausprägungen derselben Erkrankung beschreiben. Es ist also anzunehmen, dass die Ausprägung der gesteigerten *COL4A1*-Expression sich bei verschiedenen Patient*innen mit PADMAL unterscheidet und verschiedene Hirnregionen unterschiedlich stark betroffen sein können.

Der Grund für die unterschiedliche Ausprägung in verschiedenen Hirnregionen und die auffällige Affektion pontiner Gefäße ist unklar. Auch die Frage, warum bei PADMAL neben den neurologischen Symptomen nur selten andere Organmanifestationen auftreten, ist nicht geklärt. *COL4A1* ist im Körper fast ubiquitär vorhanden und wird in der Basallamina vieler verschiedener Organe exprimiert. Die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix spielt dabei eine wesentliche Rolle, da Kollagen VI mit allen Bestandteilen der Basalmembran interagiert (Anne Joutel, Haddad, Ratelade, & Nelson, 2016). Auch die MikroRNA miR-29 ist nicht ZNS-spezifisch, sondern wird auch in Herz, Lunge, Leber und weiteren Organen exprimiert. Beispielsweise wiesen Van Rooij et al. eine Beteiligung der miR-29b bei kardialer Fibrose nach Myokardinfarkt nach. Die drei verschiedenen MikroRNAs in der Gruppe der miR-29 (miR-29a, miR-29b, miR-29c) weichen jeweils nur in einem Basenpaar voneinander ab und zeigten bei Mäusen ein ähnliches Expressionsmuster in Herz, Niere und Lunge (Hirn nicht getestet). Drei Tage nach einem Myokardinfarkt war die kardiale Expression aller drei Unterformen der miR-29 vermindert. Dadurch wurden COL1, COL2 und COL3 hochreguliert, was zu Kollagenablagerungen im Bereich der Myokardinfarkts führte (Van Rooij et al., 2008). Eine andere Studie zeigte eine verminderte Expression der miR-29 bei kardialer Hypertrophie. Allerdings wurde auch eine veränderte Expression von 50 weiteren miRNAs nachgewiesen, von denen die miR-1 als am relevantesten identifiziert wurde (Sayed et al., 2007). Das zeigt, dass miRNAs in unterschiedlichen Organen eine unterschiedlich große Bedeutung haben. Im Fall von PADMAL wäre also denkbar, dass sich die Mutation in der miR-29

Bindestelle auch auf andere Organe -beispielsweise auf das Herz über eine Fibrose der Koronargefäße- auswirkt, jedoch in einem geringeren Ausmaß als auf das ZNS. Dafür spricht, dass bei mindestens zwei PADMAL-Patienten neben neurologischen auch kardiale Symptome beobachtet wurden. Beide starben in einem jungen Alter an einem Myokardinfarkt (Hagel et al., 2004; Zhao et al., 2019).

4.3. Limitationen

Bei dem untersuchten Studienkollektiv handelte es sich mit 649 Patient*innen nur um eine für die Fragestellung relativ kleine Kohorte. Dabei muss aber bedacht werden, dass nur wenige Kohorten junger Patient*innen mit ischämischen Hirninfarkten im vertebrobasilären Stromgebiet existieren. Zur Detektion sehr seltener Varianten mit hoher Wahrscheinlichkeit wäre eine deutlich größere Studienkohorte notwendig. Zwar gibt diese Arbeit einen Hinweis, dass Mutationen in der miR-29 Bindestelle von *COL4A1* keine häufige Ursache von sporadischen Fällen juveniler Hirninfarkte sind. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass eine deutlich größere Studie trotzdem einen Zusammenhang feststellen könnte. Um valide Aussagen über die Prävalenz von PADMAL in einer definierten Kohorte treffen zu können, ist die genaue Charakterisierung der Kohorte wichtig. Der Fokus dieser Arbeit lag auf jungen Patient*innen mit Infarkten im vertebrobasilären Stromgebiet und Leukenzephalopathie. Diese Kriterien wurden aufgrund der Charakteristika der bisher publizierten Fälle von PADMAL bestimmt. Nicht berücksichtigt wurde hingegen, dass PADMAL vorwiegend kleine Gefäße betrifft und deshalb zu mikroangiopathischen Hirninfarkten führt. Stattdessen wurden auch Patient*innen anderer Kategorien der TOAST-Klassifikation in die Studie aufgenommen. Auch ein hämorrhagischer Hirninfarkt war kein Ausschlusskriterium, obwohl PADMAL in der Regel ischämische Läsionen verursacht. Trotzdem ist der Einschluss hämorrhagischer Hirninfarkte nicht unberechtigt, da andere Mutationen im *COL4A1* Gen überwiegend Hämorrhagien verursachen. Auch die Variante rs886049956, die bei einem Probanden identifiziert wurde, wurde bisher nur mit hämorrhagischen ZMA assoziiert. Als mikroangiopathisch wurden insgesamt nur 66 Hirninfarkte klassifiziert. Da nur Probanden mit zusätzlich diagnostizierter Leukenzephalopathie in die Studie aufgenommen wurden, wurde der Aspekt einer Mikroangiopathie dennoch berücksichtigt. In einer Studie, in der die Prävalenz von CADASIL in einer definierten Kohorte ermittelt wurde, stieg die Prävalenz bei einem höheren Fazekas Grad deutlich an (Tan et al., 2019). In die vorliegende Studie wurden zwar nur Patient*innen mit Leukenzephalopathie eingeschlossen, es wurde aber nicht weiter nach der Fazekas Skala differenziert. Wie viele Patient*innen einen hohen Fazekas Grad aufweisen ist also nicht bekannt. Da mit zunehmendem Alter der Anteil der durch Risikofaktoren erklärbaren Hirninfarkte ansteigt und bei jüngeren Patient*innen der Anteil seltener Ursachen, wie genetische Erkrankungen, vergleichsweise höher ist (Telman et al., 2008; Yesilot Barlas et al., 2013), wurden nur Patient*innen bis 55 Jahre

berücksichtigt. Andere Studien zu juvenilen Hirninfarkten legen die Grenze noch niedriger, zum Beispiel bei 45 Jahren (Marini et al., 2001; Nedeltchev et al., 2005). Dies schien hier nicht sinnvoll, da manche Patient*innen mit PADMAL erst nach dem 45. Lebensjahr erstmals symptomatisch werden (Hagel et al., 2004; Verdura et al., 2016). Fast ein Drittel aller nach TOAST klassifizierten Hirninfarkte wurde in die Kategorie „unklare Ätiologie“ eingeordnet, weitere 26 % als „andere definierte Ätiologie“. Auch in anderen Studien zu juvenilen Hirninfarkten war der Anteil der als „unklare Ätiologie“ oder „andere definierte Ätiologie“ klassifizierten Hirninfarkte groß und betraf zusammen mehr als die Hälfte der Patient*innen (Nedeltchev et al., 2005; Telman et al., 2008; Yesilot Barlas et al., 2013). Da diese zwei Kategorien nicht sehr viel über die tatsächliche Ätiologie aussagen, stellt sich die Frage, ob eine Kategorisierung nach TOAST-Klassifikationen bei jungen Patient*innen sinnvoll ist. Für ältere Patient*innen, bei denen mikroangiopathische und kardioembolische Infarkte die häufigsten Ätiologien darstellen, ist die TOAST-Klassifikation ein bewährtes und einfaches Mittel zur schnellen Einteilung eines Hirninfarkts nach Ätiologie. Bei jüngeren Menschen sind die Ursachen vielfältiger, sodass ein adäquates Klassifikationssystem auch seltenere Ursachen berücksichtigen sollte. Andere Klassifikationssysteme sind die A-S-C-O-Klassifikation und das „Causative Classification of Stroke“-System, die jedoch weniger verbreitet sind (Amarenco, Bogousslavsky, Caplan, Donnan, & Hennerici, 2009; Arsava et al., 2010). Wie Tabelle 11 zeigt, waren bei vielen Proband*innen Risikofaktoren, wie arterielle Hypertonie und Nikotinabusus bekannt. Es ist anzunehmen, dass ein bedeutender Anteil der Hirninfarkte auf das Vorliegen von Risikofaktoren zurückgeführt werden kann, auch wenn dies eine gleichzeitig vorliegende genetische Ursache nicht ausschließt. Dass sich juvenile Hirninfarkte insbesondere ab dem 35. Lebensjahr aufgrund ähnlicher Risikofaktoren ätiologisch weniger von den Hirninfarkten älterer Personen unterscheiden, wurde bereits in anderen Kohorten junger Hirninfarkt-Patient*innen beobachtet (Maaijwee et al., 2014; Rolfs et al., 2013).

Eine Herausforderung liegt in der Beurteilung der Pathogenität zufällig identifizierter Varianten. Ein bewährtes Kriterium ist die relative Häufigkeit der varianten Allele in einer Kontrollgruppe, die die allgemeine Bevölkerung widerspiegelt. Je häufiger die Variante in der allgemeinen Bevölkerung vorkommt, desto unwahrscheinlicher ist es, dass sie eine schwere Erkrankung verursacht. Als Kontrollgruppe diene hier hauptsächlich die Population der GnomAD-Kohorte. Eine Stärke der GnomAD-Kohorte ist die Repräsentation verschiedener Bevölkerungsgruppen. Wie anhand des Beispiels der Variante rs551436530 beschrieben, hilft die Information der genetischen Prävalenz in unterschiedlichen Subpopulationen bei der Beurteilung der Pathogenität einer Variante. Auch unterschiedliche Altersgruppen sind in der GnomAD-Kohorte vertreten (Karczewski et al., 2020). Junge Menschen mit sich spät manifestierenden pathogenen Varianten werden jedoch meist als gesund klassifiziert, da sie noch keine Symptome zeigen. Eine an Alter und Geschlecht angepasste

Kontrollgruppe könnte möglicherweise besser vergleichbare Daten liefern. Beide Proband*innen, bei denen eine Variante in der 3'UTR von *COL4A1* detektiert wurde, wurden in die Kategorie „andere definierte Ätiologie“ eingeordnet. Die tatsächliche Ursache ist aber nicht bekannt, sodass keine Aussage über die Plausibilität der Varianten als Auslöser getroffen werden kann. Es liegen keine funktionellen Studien vor, die Informationen zu einem möglichen Pathomechanismus liefern könnten.

4.4. Ausblick

Aufgrund der Entwicklung neuer Methoden wie WGS und WES können Patient*innen mit Verdacht auf eine erbliche Erkrankung mittlerweile schneller und kostengünstiger getestet werden als noch vor wenigen Jahren. So kann nicht nur auf einzelne Mutationen getestet, sondern mithilfe bestimmter Panels eine ganze Reihe von Kandidatengenen geprüft werden. Sogar das gesamte Genom kann innerhalb weniger Stunden entschlüsselt werden, um zusätzlich noch unbekannte Mutationen detektieren zu können. Diese Entwicklungen werfen jedoch auch die Frage auf, wann eine genetische Untersuchung überhaupt sinnvoll ist. Verdura et al. diskutierten, dass auch bei abwesender Familienanamnese eine genetische Untersuchung erfolgen sollte, wenn aufgrund einer Diskrepanz zwischen Risikofaktoren und Schweregrad der MRT-Befunde mit pontinen Läsionen ein starker Verdacht auf PADMAL besteht (Verdura et al., 2016). Denn nicht immer ist eine vollständige Familienanamnese vorhanden und auch sporadische Fälle sind denkbar. Die vorliegende Arbeit ging der Frage nach, ob Mutationen in der miR-29 Bindestelle von *COL4A1* eine häufige Ursache von Hirninfarkten und Leukenzephalopathie bei jungen Menschen darstellen. In diesem Fall wäre bei jungen Menschen mit einem Hirninfarkt unklarer Ursache eine genetische Testung auf Mutationen in der miR-29 Bindestelle von *COL4A1* möglicherweise eine sinnvolle diagnostische Maßnahme. Die Erkrankung ist zwar ursächlich nicht therapierbar, doch der Krankheitsverlauf kann durch eine Kontrolle der Risikofaktoren wesentlich beeinflusst werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit können eine genetische Testung bei jungen Patient*innen mit Hirninfarkt ohne Familienanamnese jedoch nicht rechtfertigen. Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung und der sehr geringen Wahrscheinlichkeit eines positiven Befundes würden die Kosten der Untersuchung den Nutzen deutlich überwiegen. Auch die ethischen Implikationen von genetischen Untersuchungen auf nicht heilbare Erkrankungen sollten bedacht werden. Die Diagnose kann gerade bei jungen Menschen eine große psychische Belastung verursachen, da die Patient*innen jederzeit mit dem Auftreten erneuter Hirninfarkte und der Verschlechterung ihrer kognitiven und motorischen Fähigkeiten rechnen müssen.

Die Erforschung der genetischen Ursachen bei jungen Menschen mit Hirninfarkt ist dennoch von großer Bedeutung. Die Betroffenen müssen häufig lange mit den Folgen wie körperliche Behinderung,

kognitive Defizite und psychische Probleme leben. Obwohl sie nur einen geringen Anteil der Patient*innen mit Hirninfarkt insgesamt ausmachen, sind sie in Hinblick auf Langzeitbehinderungen aufgrund eines Hirninfarkts überproportional stark vertreten (Katzenellenbogen et al., 2010; Maaijwee et al., 2014). Damit verbunden sind hohe Kosten für das Gesundheitswesen (Persson et al., 2012). Neue Behandlungsmöglichkeiten, die in Zukunft die Therapie genetischer Erkrankungen revolutionieren könnten, werden die Bedeutung der Erforschung monogener Erkrankungen weiter steigern. Genetische Therapien sind bereits heute für einzelne monogene Erkrankungen wie die spinale Muskelatrophie zugelassen. Die Entdeckung der Genschere *Crispr/Cas9* ermöglichte neue Ansätze in der Gentherapie. Beispielsweise können durch sogenanntes *base editing* einzelne mutierte Basen ausgetauscht und durch die korrekte Base ersetzt werden (Molla & Yang, 2019). Bis diese Techniken als Gentherapie breit eingesetzt werden können und Patient*innen mit sehr seltenen Erkrankungen wie PADMAL zugutekommen, ist es aber noch ein weiter Weg. Für viele hereditäre Erkrankungen ist die genetische Grundlage noch unbekannt. In Datenbanken wie ClinVar existieren unzählige Varianten mit unklarer klinischer Signifikanz und Pathogenität. Hierzu gehören auch die hier beschriebenen Mutationen in der 3'UTR von *COL4A1* außerhalb der miR-29 Bindestelle. Funktionelle Studien, Segregationsanalysen und groß angelegte Fall-Kontroll-Studien werden in Zukunft die Bedeutung einiger dieser Varianten klären können.

5. Zusammenfassung

Die Ursachen von Hirninfarkten bei jungen Menschen sind vielfältig und bleiben häufiger ungeklärt als bei älteren Patient*innen. Ein kleiner Anteil der juvenilen Hirninfarkte kann durch monogen vererbte, familiäre zerebrale Mikroangiopathien erklärt werden. Die pontine autosomal dominante Mikroangiopathie mit Leukenzephalopathie (PADMAL) ist eine sehr seltene familiäre zerebrale Mikroangiopathie, die zu wiederholten lakunären ischämischen Infarkten vor allem im Pons und zu einer progredienten Leukenzephalopathie führt. Ursächlich ist eine Mutation in einer Bindestelle der MikroRNA miR-29, die in der 3'-untranslatierten Region (UTR) des *COL4A1* Gens liegt. Da die miR-29 die Genexpression reguliert, führt eine gestörte Bindung an die 3'UTR von *COL4A1* zu einer Überexpression mit vermehrter Kollagen IV Synthese. Um zu untersuchen, welche Rolle diese Mutation bei jungen Menschen mit sporadischem Hirninfarkt spielt, wurden 649 Patient*innen unter 55 Jahre mit Hirninfarkten im vertebrobasilären Stromgebiet und Leukenzephalopathie auf Mutationen in der 3'UTR getestet. Eine Mutation in der miR-29 Bindestelle wurde bei keiner der Patient*innen in dieser Kohorte nachgewiesen, allerdings zeigten ein Patient und eine Patientin Varianten, die nur elf beziehungsweise 100 Basenpaare entfernt der miR-29 Bindestelle liegen. Ihre Bedeutung ist unklar. Die Variante rs8860499956 wurde jedoch bereits mit verschiedenen zerebralen Mikroangiopathien in Verbindung gebracht. Aufgrund ihrer Seltenheit in der allgemeinen Bevölkerung kann eine Pathogenität nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen gegen ein gehäuftes Auftreten von Mutationen in der miR-29 Bindestelle bei sporadischen Fällen juveniler Hirninfarkte und unterstreichen die Seltenheit von PADMAL. Funktionelle Studien wären notwendig, um die Pathogenität der Varianten rs8860499956 und rs551436530 zu klären.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, D. R., & Eng, C. M. (2018). Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders. *New England Journal of Medicine*, 379(14), 1353–1362. <https://doi.org/10.1056/nejmra1711801>
- Adams, H. P., Bendixen, B. H., Kappelle, L. J., Biller, J., Love, B. B., Gordon, D. L., & Marsh, E. E. (1993). Classification of subtype of acute ischemic stroke. *Stroke*, Vol 24(1), 35–41.
- Alles, J., Fehlmann, T., Fischer, U., Backes, C., Galata, V., Minet, M., ... Meese, E. (2019). An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Research*, 47(7), 3353–3364. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz097>
- Amarenco, P., Bogousslavsky, J., Caplan, L. R., Donnan, G. A., & Hennerici, M. G. (2009). New approach to stroke subtyping: The A-S-C-O (phenotypic) classification of stroke. *Cerebrovascular Diseases*, 27(5), 502–508. <https://doi.org/10.1159/000210433>
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., ... Tuschl, T. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 9(3), 277–279. <https://doi.org/10.1261/rna.2183803>
- Andersen, G., Christensen, D., Kirkevold, M., & Johnsen, S. P. (2012). Post-stroke fatigue and return to work: A 2-year follow-up. *Acta Neurologica Scandinavica*, 125(4), 248–253. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2011.01557.x>
- Arsava, E. M., Ballabio, E., Benner, T., Cole, J. W., Delgado-Martinez, M. P., Dichgans, M., ... Ay, H. (2010). The causative classification of stroke system: An international reliability and optimization study. *Neurology*, 75(14), 1277–1284. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181f612ce>
- Auchus, A. P., Brashear, H. R., Salloway, S., Korczyn, A. D., De Deyn, P. P., & Gassmann-Mayer, C. (2007). Galantamine treatment of vascular dementia: A randomized trial. *Neurology*, 69(5), 448–458. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000266625.31615.f6>
- Auton, A., Abecasis, G. R., Altshuler, D. M., Durbin, R. M., Bentley, D. R., Chakravarti, A., ... Schloss, J. A. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526(7571), 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>
- Bamshad, M. J., Ng, S. B., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Emond, M. J., Nickerson, D. A., & Shendure, J. (2011). Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature Publishing Group*, 12, 745. <https://doi.org/10.1038/nrg3031>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Bath, P. M., & Wardlaw, J. M. (2015). Pharmacological treatment and prevention of cerebral small vessel disease: A review of potential interventions. *International Journal of Stroke*, 10(4), 469–478. <https://doi.org/10.1111/ijvs.12466>
- Bennett, D. A., Gilley, D. W., Lee, S., & Cochran, E. J. (1994). White matter changes: Neurobehavioral

- manifestations of binswanger's disease and clinical correlates in alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 5(3–4), 148–152. <https://doi.org/10.1159/000106713>
- Bergmann, M., Ebke, M., Yuan, Y., Brück, W., Mugler, M., & Schwendemann, G. (1996). Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL): A morphological study of a German family. *Acta Neuropathologica*, 92(4), 341–350. <https://doi.org/10.1007/s004010050528>
- Bevan, S., Traylor, M., Adib-Samii, P., Malik, R., Paul, N. L. M., Jackson, C., ... Markus, H. S. (2012). Genetic heritability of ischemic stroke and the contribution of previously reported candidate gene and genomewide associations. *Stroke*, 43(12), 3161–3167. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.665760>
- Birks, J., & López-Arrieta, J. (2002). Nimodipine for primary degenerative, mixed and vascular dementia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3). <https://doi.org/10.1002/14651858.cd000147>
- Black, S., Román, G. C., Geldmacher, D. S., Salloway, S., Hecker, J., Burns, A., ... Pratt, R. (2003). *Efficacy and Tolerability of Donepezil in Vascular Dementia Positive Results of a 24-Week, Multicenter, International, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial*. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000091396.95360.E1>
- Boehme, A. K., Esenwa, C., Elkind, M. S. V., Fisher, M., Iadecola, C., & Sacco, R. (2017). *Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention Effects of Neurologic Injury on Cardiovascular Function Vascular Cognitive Impairment*. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308398>
- Boiten, J., & Lodder, J. (1991). Lacunar infarcts Pathogenesis and Validity of the Clinical Syndromes. *Stroke*. <https://doi.org/10.1016/b0-12-226870-9/00177-5>
- Brouns, R., Sheorajpanday, R., Braxel, E., Eyskens, F., Baker, R., Hughes, D., ... De Deyn, P. P. (2007). Middelheim Fabry Study (MiFaS): A retrospective Belgian study on the prevalence of Fabry disease in young patients with cryptogenic stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 109(6), 479–484. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2007.03.008>
- Busch, M. A., Schienkewitz, A., Nowossadeck, E., & Gößwald, A. (2013). Prävalenz des Schlaganfalls bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 56(5–6), 656–660. <https://doi.org/10.1007/s00103-012-1659-0>
- Cai, Z., Wang, C., He, W., Tu, H., Tang, Z., Xiao, M., & Yan, L.-J. (2015). Cerebral small vessel disease and Alzheimer's disease. *Clinical Interventions in Aging*, 10, 1695–1704. <https://doi.org/10.2147/CIA.S90871>
- Chabriat, H., Joutel, A., Dichgans, M., Tournier-Lasserre, E., & Boussier, M.-G. (2009). Review CADASIL. In *The Lancet Neurology* (Vol. 8). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70127-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70127-9)
- Chabriat, H., Joutel, A., Tournier-Lasserre, E., & Boussier, M. G. (2020). CADASIL: yesterday, today, tomorrow. *European Journal of Neurology*, 27(8), 1588–1595. <https://doi.org/10.1111/ene.14293>

- Chabriat, H., Mrissa, ; R, Levy, ; C, Vahedi, ; K, Taillia, ; H, Iba-Zizen, ; M T, ... Bousser, M.-G. (1999). *Brain Stem MRI Signal Abnormalities in CADASIL*. Retrieved from <http://ahajournals.org>
- Charlton, R. A., Morris, R. G., Nitkunan, A., & Markus, H. S. (2006). The cognitive profiles of CADASIL and sporadic small vessel disease. *Neurology*, 66(10), 1523–1526. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000216270.02610.7e>
- Chauhan, G., Arnold, C. R., Chu, A. Y., Fornage, M., Reyahi, A., Bis, J. C., ... Debette, S. (2016). Identification of additional risk loci for stroke and small vessel disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *The Lancet Neurology*, 15(7), 695–707. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00102-2)
- Choi, J. C. (2015). Genetics of cerebral small vessel disease. *Journal of Stroke*, 17(1), 7–16. <https://doi.org/10.5853/jos.2015.17.1.7>
- Chong, M., O'Donnell, M., Thijs, V., Dans, A., López-Jaramillo, P., Gómez-Arbeláez, D., ... Paré, G. (2017). Mendelian Genes and Risk of Intracerebral Hemorrhage and Small-Vessel Ischemic Stroke in Sporadic Cases. *Stroke*, 48(8), 2263–2265. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.017322>
- Christensen, M., & Schratt, G. M. (2009). microRNA involvement in developmental and functional aspects of the nervous system and in neurological diseases. *Neuroscience Letters*, 466(2), 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.04.043>
- Chung, J.-W., Park, S. H., Kim, N., Kim, W.-J., Park, J. H., Ko, Y., ... Bae, H.-J. (2014). Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) classification and vascular territory of ischemic stroke lesions diagnosed by diffusion-weighted imaging. *Journal of the American Heart Association*, 3(4). <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001119>
- Conrad, D. F., Keebler, J. E. M., Depristo, M. A., Lindsay, S. J., Zhang, Y., Casals, F., ... Awadalla, P. (2011). Variation in genome-wide mutation rates within and between human families. *Nature Genetics*, 43(7), 712–714. <https://doi.org/10.1038/ng.862>
- Coto, E., Menendez, Navarro, R., Carcia-Castr, R., & Alvarez, V. (2006). A new de novo Notch3 mutation causing CADASIL. 628–631. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01337.x>
- Craggs, L. J. L., Hagel, C., Kuhlenbaeumer, G., Borjesson-Hanson, A., Andersen, O., Viitanen, M., ... Kalaria, R. N. (2013). Quantitative vascular pathology and phenotyping familial and sporadic cerebral small vessel diseases. *Brain Pathology*, 23(5), 547–557. <https://doi.org/10.1111/bpa.12041>
- Cushing, L., Kuang, P., & Lü, J. (2015). The role of miR-29 in pulmonary fibrosis. *Biochem. Cell Biol.*, 93, 1–10.
- Dean, F. B., Hosono, S., Fang, L., Wu, X., Fawad Faruqi, A., Bray-Ward, P., ... Lasken, R. S. (2002). *Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification*. Retrieved from www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.082089499
- Debette, S., Schilling, S., Duperron, M. G., Larsson, S. C., & Markus, H. S. (2019). Clinical Significance of Magnetic Resonance Imaging Markers of Vascular Brain Injury: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurology*, 76(1), 81–94. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.3122>

DEGAM. (2020). *Schlaganfall S3-Leitlinie*. (053).

Di Donato, I., Bianchi, S., Gallus, G. N., Cerase, A., Taglia, I., Pescini, F., ... Dotti, M. T. (2017). Heterozygous mutations of HTRA1 gene in patients with familial cerebral small vessel disease. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 23(9), 759–765. <https://doi.org/10.1111/cns.12722>

Dichgans, M., Holtmannspötter, M., Herzog, J., Peters, N., Bergmann, M., & Yousry, T. A. (2002). *Cerebral Microbleeds in CADASIL A Gradient-Echo Magnetic Resonance Imaging and Autopsy Study*. Retrieved from <http://ahajournals.org>

Dichgans, M., Markus, H. S., Salloway, S., Verkkoniemi, A., Moline, M., Wang, Q., ... Chabriat, H. (2008). *Donepezil in patients with subcortical vascular cognitive impairment : a randomised double-blind trial in CADASIL*. 7(April). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70046-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70046-2)

Ding, X. Q., Hagel, C., Ringelstein, E. B., Buchheit, S., Zeumer, H., Kühlenbäumer, G., ... Fiehler, J. (2010). MRI features of pontine autosomal dominant microangiopathy and leukoencephalopathy (PADMAL). *Journal of Neuroimaging*, 20(2), 134–140. <https://doi.org/10.1111/j.1552-6569.2008.00336.x>

Duncan, E., Brown, M., & Shore, E. M. (2014). The Revolution in Human Monogenic Disease Mapping. *Genes*, 5, 792–803. <https://doi.org/10.3390/genes5030792>

Ekker, M. S., Verhoeven, J. I., Vaartjes, I., Van Nieuwenhuizen, K. M., Klijn, C. J. M., & De Leeuw, F. E. (2019). Stroke incidence in young adults according to age, subtype, sex, and time trends. *Neurology*, 92(21), e2444–e2454. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000007533>

Ellegren, H., Smith, N. G. C., & Webster, M. T. (2003). Mutation rate variation in the mammalian genome. *Current Opinion in Genetics and Development*, 13(6), 562–568. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2003.10.008>

Falcone, G. J., & Woo, D. (2017). Genetics of spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 48(12), 3420–3424. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.017072>

Fazekas, F., Chawluk, J. B., & Alavi, A. (1987). MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *American Journal of Neuroradiology*, 8(3), 421–426.

Federico, A., Bianchi, S., & Dotti, M. T. (2005). *The spectrum of mutations for CADASIL diagnosis*. <https://doi.org/10.1007/s10072-005-0444-3>

Fisher, C. M. (1965). Lacunes: Small, deep cerebral infarcts. *Neurology*, 15(8), 774–784. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000410087.34228.7d>

Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), 92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>

Fure, B., Wyller, T. B., & Thommessen, B. (2005). TOAST criteria applied in acute ischemic stroke. *Acta Neurologica Scandinavica*, 112(4), 254–258. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2005.00470.x>

GBD 2016 DALYs and HALE Collaborators, Hay, S. I., Abajobir, A. A., Abate, K. H., Abbafati, C., Abbas, K. M., ... Bryane, C. E. G. (2017). Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs)

- for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*, 390(10100), 1260–1344. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32130-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32130-X)
- GBD 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators, Feigin, V. L., Nguyen, G., Cercy, K., Johnson, C. O., Alam, T., & Parmar, P. G. (2018). Global, Regional, and Country-Specific Lifetime Risks of Stroke, 1990 and 2016. *New England Journal of Medicine*, 379(25), 2429–2437. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1804492>
- GBD 2017 Causes of Death Collaborators, Roth, G. A., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet (London, England)*, 392(10159), 1736–1788. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7)
- Giau, V. Van, Bagyinszky, E., Youn, Y. C., An, S. S. A., & Kim, S. Y. (2019). Genetic Factors of Cerebral Small Vessel Disease and Their Potential Clinical Outcome. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4298. <https://doi.org/10.3390/ijms20174298>
- Gökçal, E., Niftaliyev, E., & Asil, T. (2017). *Etiological classification of ischemic stroke in young patients: a comparative study of TOAST, CCS, and ASCO*. <https://doi.org/10.1007/s13760-017-0813-8>
- Gould, D. B., Campbell Phalan, F., Breedveld, G. J., van Mil, S. E., Smith, R. S., Schimenti, J. C., ... M John, S. W. (2005). Mutations in Col4a1 Cause Perinatal Cerebral Hemorrhage and Porencephaly. *Science*, 308(11), 1167–1170. <https://doi.org/10.1126/science.1109267>
- Gould, D. B., Phalan, F. C., Mil, S. E. van, Sundberg, J. P., Vahedi, K., Massin, P., ... John, S. W. M. (2006). *Role of COL4A1 in Small-Vessel Disease and Hemorrhagic Stroke*. Retrieved from www.nejm.org
- Grada, A., & Weinbrecht, K. (2013). Next-generation sequencing: Methodology and application. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(8), e11-4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.248>
- Graham, N. L., Emery, T., & Hodges, J. R. (2004). Distinctive cognitive profiles in Alzheimer's disease and subcortical vascular dementia. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 75(1), 61–71. [https://doi.org/10.1016/s0084-3970\(08\)70286-x](https://doi.org/10.1016/s0084-3970(08)70286-x)
- Greenberg, S. M., Bacskai, B. J., Hernandez-Guillamon, M., Pruzin, J., Sperling, R., & van Veluw, S. J. (2020). Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease — one peptide, two pathways. *Nature Reviews Neurology*, 16(1), 30–42. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0281-2>
- Hachinski, V. C., Potter, P., & Merskey, H. (1987). Leuko-Araiosis. *Archives of Neurology*, 44(1), 21–23. <https://doi.org/10.1001/archneur.1987.00520130013009>
- Hagel, C., Groden, C., Niemeyer, R., Stavrou, D., & Colmant, H. J. (2004). Subcortical angiopathic encephalopathy in a German kindred suggests an autosomal dominant disorder distinct from CADASIL. *Acta Neuropathologica*, 108(3), 231–240. <https://doi.org/10.1007/s00401-004-0887-2>
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells Scott. *Nature*, 404, 293–296. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/35005107>

- Human Genome Sequencing Consortium, I. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome International Human Genome Sequencing Consortium*. *Nature*, 431, 931–945. Retrieved from <http://www.genome.gov/10000923>.
- Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Argonaute family proteins Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/nrg2936>
- Jeanne, M., Labelle-Dumais, C., Jorgensen, J., Kauffman, W. B., Mancini, G. M., Favor, J., ... Gould, D. B. (2012). COL4A2 mutations impair COL4A1 and COL4A2 secretion and cause hemorrhagic stroke. *American Journal of Human Genetics*, 90(1), 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.022>
- Jen, J., Cohen, A. H., Yue, Q., Stout, J. T., Vinters, H. V., Nelson, S., & Baloh, R. W. (1997). Hereditary endotheliopathy with retinopathy, nephropathy, and stroke (HERNS). *Neurology*, 49(5), 1322–1330. <https://doi.org/10.1212/wnl.49.5.1322>
- Jokinen, H., Kalska, H., Ylikoski, R., Madureira, S., Verdelho, A., Van Der Flier, W. M., ... Erkinjuntti, T. (2009). Longitudinal cognitive decline in subcortical ischemic vascular disease -the ladis study. *Cerebrovascular Diseases*, 27(4), 384–391. <https://doi.org/10.1159/000207442>
- Jones, D. K., Lythgoe, D., Horsfield, M. A., Simmons, A., Williams, S. C. R., & Markus, H. S. (1999). *Characterization of White Matter Damage in Ischemic Leukoaraiosis with Diffusion Tensor MRI*. Retrieved from <http://ahajournals.org>
- Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., ... Tournier-Lasserre, E. (1996). Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature*, 383(6602), 707–710. <https://doi.org/10.1038/383707a0>
- Joutel, Anne, Dodick, D. D., Parisi, J. E., Cecillon, M., & Tournier-Lasserre, E. M. G. B. (2000). De Novo Mutation in the Notch3 Gene Causing CADASIL. *Annals of Neurology*, 47(3). [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200003\)47:3<361::AID-ANA12>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200003)47:3<361::AID-ANA12>3.0.CO;2-N)
- Joutel, Anne, Haddad, I., Ratelade, J., & Nelson, M. T. (2016). *Perturbations of the cerebrovascular matrisome: A convergent mechanism in small vessel disease of the brain?* <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.62>
- Joutel, Anne, Monet-Leprêtre, M., Gosele, C., Baron-Menguy, C., Hammes, A., Schmidt, S., ... Hubner, N. (2010). Cerebrovascular dysfunction and microcirculation rarefaction precede white matter lesions in a mouse genetic model of cerebral ischemic small vessel disease. *Journal of Clinical Investigation*, 120(2), 433–445. <https://doi.org/10.1172/JCI39733>
- Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., ... MacArthur, D. G. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans , Genome Aggregation Database Consortium. 434 | *Nature* |, 581, 19. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>
- Kasper, D. L., Hauser, S. L., Jameson, L. J., Fauci, A. S., Longo, D. L., & Loscalzo, J. (2015). *Harrison's Principles of Internal Medicine - 19th edition* (19th ed.).
- Katzenellenbogen, J. M., Begg, S., Somerford, P., Anderson, C. S., Semmens, J. B., Codde, J. P., & Vos, T. (2010). Disability burden due to stroke in Western Australia: New insights from linked data

- sources. *International Journal of Stroke*, 5(4), 269–277. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2010.00439.x>
- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., & Haussler, a. D. (2002). The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Research*, 12(6), 996–1006. <https://doi.org/10.1101/gr.229102>
- Khan, U., Porteous, L., Hassan, A., & Markus, H. S. (2007). Risk factor profile of cerebral small vessel disease and its subtypes. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 78(7), 702–706. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2006.103549>
- Kilarski, L. L., Rutten-Jacobs, L. C. A., Bevan, S., Baker, R., Hassan, A., Hughes, D. A., ... Coyle, J. (2015). Prevalence of CADASIL and fabry disease in a cohort of MRI defined younger onset Lacunar Stroke. *PLoS ONE*, 10(8), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136352>
- Kim, J. O., Lee, S. J., & Pyo, J.-S. (2020). *Effect of acetylcholinesterase inhibitors on post-stroke cognitive impairment and vascular dementia: A meta-analysis*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227820>
- Kissela, B. M., Jane Khoury, M. C., Alwell, K., Charles Moomaw, B. J., Woo, D., Opeolu Adeoye, M., ... Kleindorfer, D. O. (2012). *Age at stroke Temporal trends in stroke incidence in a large, biracial population*. Retrieved from www.neurology.org
- Knoflach, M., Matosevic, B., Rücker, M., Furtner, M., Mair, A., Wille, G., ... Willeit, J. (2012). Functional recovery after ischemic stroke - A matter of age: Data from the Austrian Stroke Unit Registry. *Neurology*, 78(4), 279–285. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31824367ab>
- Kolominsky-Rabas, P. L., Weber, M., Gefeller, O., Neundoerfer, B., & Heuschmann, P. U. (2001). *Epidemiology of Ischemic Stroke Subtypes According to TOAST Criteria Incidence, Recurrence, and Long-Term Survival in Ischemic Stroke Subtypes: A Population-Based Study*. Retrieved from <http://ahajournals.org>
- Kong, A., Frigge, M. L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., Magnusson, G., ... Stefansson, K. (2012). Rate of de novo mutations and the importance of father-s age to disease risk. *Nature*, 488(7412), 471–475. <https://doi.org/10.1038/nature11396>
- Koressaar, T., & Remm, M. (2007). *Enhancements and modifications of primer design program Primer3*. 23(10), 1289–1291. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm091>
- Kuhlenbäumer, G., Hullmann, J., & Appenzeller, S. (2011). Novel genomic techniques open new avenues in the analysis of monogenic disorders. *Human Mutation*, 32(2), 144–151. <https://doi.org/10.1002/humu.21400>
- Kuo, D. S., Labelle-Dumais, C., & Gould, D. B. (2012). COL4A1 and COL4A2 mutations and disease: insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets. *Human Molecular Genetics*, 21(R1), R97–R110. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds346>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853–858. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>

- Lander, S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., ... Yeh, R.-F. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. In *NATURE* (Vol. 409). Retrieved from www.nature.com
- Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G. R., Chao, C., Chitipiralla, S., ... Maglott, D. R. (2018). ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Research*, 46. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1153>
- Lanthier, S., Saposnik, G., Lebovic, G., Pope, K., Selchen, D., & Moore, D. F. (2017). *Prevalence of Fabry Disease and Outcomes in Young Canadian Patients With Cryptogenic Ischemic Cerebrovascular Events Sylvain*. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.016083>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- Liu, D. J., & Leal, S. M. (2010). A Novel Adaptive Method for the Analysis of Next-Generation Sequencing Data to Detect Complex Trait Associations with Rare Variants Due to Gene Main Effects and Interactions. *PLoS Genet*, 6(10), 1001156. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001156>
- Liu, Y., Taylor, N. E., Lu, L., Usa, K., Cowley, A. W., Ferreri, N. R., ... Liang, M. (2010). *Renal Medullary MicroRNAs in Dahl Salt-Sensitive Rats miR-29b Regulates Several Collagens and Related Genes*. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.144428>
- Lüllmann-Rauch, R., & Asan, E. (2019). Taschenlehrbuch Histologie. In *Taschenlehrbuch Histologie*. <https://doi.org/10.1055/b-006-163361>
- Lynch, M. (2010). Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation. *PNAS*, 107(3), 961–968. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912629107>
- Maaijwee, N. A. M. M., Rutten-Jacobs, L. C. A., Schaapsmeeders, P., Van Dijk, E. J., & De Leeuw, F. E. (2014). Ischaemic stroke in young adults: Risk factors and long-term consequences. *Nature Reviews Neurology*, 10(6), 315–325. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.72>
- Maat-Schieman, M., Roos, R., & Duinen, S. Van. (2005). *Maat-schieman, Roos, Duinen - 2005 - Review Ar ticle Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis- Dutch type*. (February), 288–297.
- Malandrini, A., Gaudiano, C., Gambelli, S., Berti, G., Serni, G., Bianchi, S., ... Dotti, M. T. (2007). *DIAGNOSTIC VALUE OF ULTRASTRUCTURAL SKIN BIOPSY STUDIES IN CADASIL*. Retrieved from www.neurology.org
- Malik, R., Chauhan, G., Traylor, M., Sargurupremraj, M., Okada, Y., Mishra, A., ... Yamaji, T. (2018). Multiancestry genome-wide association study of 520,000 subjects identifies 32 loci associated with stroke and stroke subtypes. *Nature Genetics*, 50(4), 524–537. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0058-3>
- Mancuso, M., Arnold, M., Bersano, A., Burlina, A., Chabriat, H., Debette, S., ... Markus, H. S. (2020). Monogenic cerebral small-vessel diseases: diagnosis and therapy. Consensus recommendations of the European Academy of Neurology. *European Journal of Neurology*, 27(6), 909–927. <https://doi.org/10.1111/ene.14183>

- Mandybur, T. I. (1986). Cerebral Amyloid Angiopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 45(1), 79–90. <https://doi.org/10.1097/00005072-198601000-00007>
- Marini, C., Totaro, R., Federica, , Santis, D., Ciancarelli, I., Baldassarre, M., & Carolei, A. (2001). *Stroke in Young Adults in the Community-Based L'Aquila Registry Incidence and Prognosis*. Retrieved from <http://ahajournals.org>
- Maurer, B., Stanczyk, J., Jüngel, A., Akhmetshina, A., Trenkmann, M., Brock, M., ... Distler, O. (2010). MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis and Rheumatism*, 62(6), 1733–1743. <https://doi.org/10.1002/art.27443>
- Mehta, A., & Ginsberg, L. (2005). Natural history of the cerebrovascular complications of Fabry disease. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, Supplement*, 94(447), 24–27. <https://doi.org/10.1080/08035320510028076>
- Mehta, A., Ricci, R., Widmer, U., Dehout, F., Garcia de Lorenzo, A., Kampmann, C., ... Beck, M. (2004). Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *European Journal of Clinical Investigation*, 34(3), 236–242. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2004.01309.x>
- Melo, S. A., & Esteller, M. (2011). Dysregulation of microRNAs in cancer: Playing with fire. *FEBS Letters*, 585(13), 2087–2099. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.08.009>
- Mezuki, S., Fukuda, K., Matsushita, T., Fukushima, Y., Matsuo, R., Goto, Y., ... Ago, T. (2017). *Isolated and repeated stroke-like episodes in a middle-aged man with a mitochondrial ND3 T10158C mutation : a case report*. 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12883-017-1001-4>
- Miao, Q., Paloneva, T., Tuominen, S., Pöyhönen, M., Tuisku, S., Viitanen, M., & Kalimo, H. (2004). Fibrosis and Stenosis of the Long Penetrating Cerebral Arteries: the Cause of the White Matter Pathology in Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy. *Brain Pathology*, 14(4), 358–364. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2004.tb00078.x>
- Michaelson, J. J., Shi, Y., Gujral, M., Zheng, H., Malhotra, D., Jin, X., ... Sebat, J. (2012). Whole-genome sequencing in autism identifies hot spots for de novo germline mutation. *Cell*, 151(7), 1431–1442. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.019>
- Mitsias, P. D., & Levine, S. R. (1996). Cerebrovascular Complications of Fabry Disease. *Uncommon Causes of Stroke*, (1996), 158–169. <https://doi.org/10.1017/9781316551684.022>
- Molla, K. A., & Yang, Y. (2019). CRISPR/Cas-Mediated Base Editing: Technical Considerations and Practical Applications. *Trends in Biotechnology*, 37(10), 1121–1142. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.008>
- Moore, D. F., Herscovitch, P., & Schiffmann, R. (2001). Selective arterial distribution of cerebral hyperperfusion in fabry disease. *Journal of Neuroimaging*, 11(3), 303–307. <https://doi.org/10.1111/j.1552-6569.2001.tb00051.x>
- Mülhardt, C. (2009). Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics. In *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2158-6>

- Müller, H.-J., & Prange, D. R. (2016). PCR - Polymerase-Kettenreaktion. In *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-48236-0>
- Naess, H., Nyland, H. I., Thomassen, L., Aarseth, J., & Myhr, K. M. (2005). Fatigue at long-term follow-up in young adults with cerebral infarction. *Cerebrovascular Diseases*, 20(4), 245–250. <https://doi.org/10.1159/000087706>
- Narayan, S. K., Gorman, D. G., Kalaria, M. R. N., Ford, G. A., & Chinnery, P. F. (2012). *Clinical/Scientific Notes THE MINIMUM PREVALENCE OF CADASIL IN NORTHEAST ENGLAND*. Retrieved from www.neurology.org
- Nedeltchev, K., Der Maur, T. A., Georgiadis, D., Arnold, M., Caso, V., Mattle, H. P., ... Baumgartner, R. W. (2005). Ischaemic stroke in young adults: predictors of outcome and recurrence. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76, 191–195. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.040543>
- Nicolas, G., Wallon, D., Goupil, C., Richard, A.-C., Pottier, C., Frebourg, T., ... Rovelet-Lecrux, A. (2015). Mutation in the 3′ untranslated region of APP as a genetic determinant of cerebral amyloid angiopathy. *Bebene Ndamba-Bandzouzi*, 5, 20. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.61>
- Nozaki, H., Nishizawa, M., & Onodera, O. (2014). Features of cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Stroke*, 45(11), 3447–3453. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.004236>
- Nozaki, H., Sekine, Y., Fukutake, T., Nishimoto, Y., Shimoe, Y., Shirata, A., ... Onodera, O. (2015). Characteristic features and progression of abnormalities on MRI for CARASIL. *Neurology*, 85(5), 459–463. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001803>
- O’Brien, J. T., & Thomas, A. (2015, October 24). Vascular dementia. *The Lancet*, Vol. 386, pp. 1698–1706. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00463-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00463-8)
- O’Donnell, M. J., Xavier, D., Liu, L., Zhang, H., Chin, S. L., Rao-melacini, P., ... Fossal, L. (2010). *Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study*. 376. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60834-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60834-3)
- O’Sullivan, M., Morris, R. G., & Markus, H. S. (2005). Brief cognitive assessment for patients with cerebral small vessel disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76, 1140–1145. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.045963>
- Oh, J. H., Lee, J. S., Kang, S. Y., Kang, J. H., & Choi, J. C. (2008). Aspirin-associated intracerebral hemorrhage in a patient with CADASIL. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 110(4), 384–386. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2007.12.001>
- Pantoni, L. (2002). Pathophysiology of age-related cerebral white matter changes. *Cerebrovascular Diseases*, 13(SUPPL. 2), 7–10. <https://doi.org/10.1159/000049143>
- Pantoni, L. (2010). Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *The Lancet Neurology*, 9(7), 689–701. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70104-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70104-6)
- Pantoni, L., & Garcia, J. H. (1997). Pathogenesis of leukoaraiosis: A review. *Stroke*, Vol. 28, pp. 652–659. <https://doi.org/10.1161/01.STR.28.3.652>

- Patel, B., & Markus, H. S. (2011). Magnetic resonance imaging in cerebral small vessel disease and its use as a surrogate disease marker. *International Journal of Stroke*, 6(1), 47–59. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2010.00552.x>
- Patel, M., Cecchi, F., Cizmarik, M., Kantola, I., Linhart, A., Nicholls, K., ... Abiose, A. (2011). Cardiovascular events in patients with Fabry disease: Natural history data from the Fabry Registry. *Journal of the American College of Cardiology*, 57(9), 1093–1099. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.11.018>
- Persson, J., Ferraz-Nunes, J., & Karlberg, I. (2012). *Economic burden of stroke in a large county in Sweden*. <https://doi.org/10.1186/1472-6963-12-341>
- Plaisier, E., Chen, Z., Gekeler, F., Benhassine, S., Dahan, K., Marro, B., ... Ronco, P. (2010). Novel COL4A1 mutations associated with HANAC syndrome: A role for the triple helical CB3[IV] domain. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 152 A(10), 2550–2555. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33659>
- Plaisier, E., Gribouval, O., Alamowitch, S., Mougenot, B., Prost, C., Christine Verpont, M., ... Ronco, P. (2007). *COL4A1 Mutations and Hereditary Angiopathy, Nephropathy, Aneurysms, and Muscle Cramps*. Retrieved from www.nejm.org
- Prakash, N., Hansson, E., Betsholtz, C., Mitsiadis, T., & Lendahl, U. (2002). Mouse Notch 3 expression in the pre- and postnatal brain: Relationship to the stroke and dementia syndrome CADASIL. *Experimental Cell Research*, 278(1), 31–44. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5544>
- Prins, N. D., & Scheltens, P. (2015). White matter hyperintensities, cognitive impairment and dementia: An update. *Nature Reviews Neurology*, 11(3), 157–165. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.10>
- Putala, J., Metso, A. J., Metso, T. M., Konkola, N., Kraemer, Y., Haapaniemi, E., ... Tatlisumak, T. (2009). *Analysis of 1008 Consecutive Patients Aged 15 to 49 With First-Ever Ischemic Stroke The Helsinki Young Stroke Registry*. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.529883>
- Razvi, S. S. M., & Bone, I. (2005). *REVIEW Single gene disorders causing ischaemic stroke*. <https://doi.org/10.1007/s00415-006-0048-8>
- Razvi, S. S. M., Davidson, R., & Bone, I. (2005). The prevalence of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy (CADASIL) in the west of Scotland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76, 739–741. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.051847>
- Rensma, S. P., van Sloten, T. T., Launer, L. J., & Stehouwer, C. D. A. (2018). Cerebral small vessel disease and risk of incident stroke, dementia and depression, and all-cause mortality: A systematic review and meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 90(October 2017), 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.04.003>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

- Ringelstein, E. B., & Kuhlenbäumer, G. (2004). Zerebrale Mikroangiopathien. *Klinische Neuroradiologie*, 14(1), 64–76. <https://doi.org/10.1007/s00062-004-5378-2>
- Rinnoci, V., Nannucci, S., Valenti, R., Donnini, I., Bianchi, S., Pescini, F., ... Pantoni, L. (2013). Cerebral hemorrhages in CADASIL: Report of four cases and a brief review. *Journal of the Neurological Sciences*, 330(1–2), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.04.002>
- Rolfs, A., Fazekas, F., Grittner, U., Dichgans, M., Martus, P., Holzhausen, M., ... Norrving, B. (2013). Acute cerebrovascular disease in the young: The stroke in young fabry patients study. *Stroke*, 44(2), 340–349. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.663708>
- Rolfs, A., Martus, P., Heuschmann, P. U., Grittner, U., Holzhausen, M., Tatlisumak, T., ... Norrving, B. (2011). Protocol and methodology of the stroke in young fabry patients (sifap1) study: A prospective multicenter european study of 5,024 young stroke patients aged 18-55 years. *Cerebrovascular Diseases*, 31(3), 253–262. <https://doi.org/10.1159/000322153>
- Ruchoux, M. M., Guerouaou, D., Vandenhaute, B., Pruvo, J. P., Vermersch, P., & Leys, D. (1995). Systemic vascular smooth muscle cell impairment in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Acta Neuropathologica*, 89(6), 500–512. <https://doi.org/10.1007/BF00571504>
- Sacco, S. E., Whisnant, J. P., Broderick, J. P., Phillips, S. J., & Michael, W. O. F. (1991). Epidemiological characteristics of lacunar infarcts in a population. *Stroke*, 22(10), 1236–1241. <https://doi.org/10.1161/01.STR.22.10.1236>
- Salvadori, E., Poggesi, A., Donnini, I., Rinnoci, V., Chiti, G., Squitieri, M., ... Pantoni, L. (2020). Association of nimodipine and choline alphoscerate in the treatment of cognitive impairment in patients with cerebral small vessel disease: study protocol for a randomized placebo-controlled trial-the CONIVaD trial. *Aging Clinical and Experimental Research*, 32, 449–457. <https://doi.org/10.1007/s40520-019-01229-z>
- Salvadori, E., Poggesi, A., Donnini, I., Rinnoci, V., Chiti, G., Squitieri, M., ... Pantoni, L. (2021). Efficacy and Safety of the Association of Nimodipine and Choline Alphoscerate in the Treatment of Cognitive Impairment in Patients with Cerebral Small Vessel Disease. The CONIVaD Trial Key Points. *Drugs & Aging*, 38, 481–491. <https://doi.org/10.1007/s40266-021-00852-8>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174)* (Vol. 74).
- Sayed, D., Hong, C., Chen, I.-Y., Lypowy, J., & Abdellatif, M. (2007). *MicroRNAs Play an Essential Role in the Development of Cardiac Hypertrophy*. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000257913.42552.23>
- Schaapsmeeders, P., Maaijwee, N. A. M., Dijk, E. J. van, Loes C.A. Rutten-Jacobs, R. M. A., & Roy P.C. Kessels, F.-E. de L. H. C. S. L. D. A. D. (2013). *Long-Term Cognitive Impairment After First-Ever Ischemic Stroke in Young Adults*. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.000792>
- Schäfer, E., Baron, K., Widmer, U., Deegan, P., Neumann, H. P. H., Sunder-Plassmann, G., ... Gal, A. (2005). Thirty-four novel mutations of the GLA gene in 121 patients with Fabry disease. *Human Mutation*, 25(4), 412. <https://doi.org/10.1002/humu.9327>
- Schäfer, E., Mehta, A., & Gal, A. (2005). Genotype and phenotype in Fabry disease: Analysis of the

- Fabry Outcome Survey. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, Supplement*, 94(447), 87–92. <https://doi.org/10.1080/08035320510031045>
- Schiffmann, R., Kopp, J. B., Austin, H. A., Balow, J. E., & Brady, R. O. (2001). Enzyme Replacement Therapy in Fabry Disease. *JAMA*, 285(21), 2743–2749.
- Scurry, B., Wellings, T., Goel, H., & Pluschke, A. (2016). Sporadic case of retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy/hereditary endotheliopathy retinopathy nephropathy stroke with novel TREX1 mutation. *Pathology*, 48, S81–S82. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2015.12.221>
- Sherry, S. T., Ward, M.-H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E. M., & Sirotkin, K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 29). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>.
- Singhal, S., Rich, P., & Markus, H. S. (2005). *The Spatial Distribution of MR Imaging Abnormalities in Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy and Their Relationship to Age and Clinical Features*.
- Søndergaard, C. B., Nielsen, J. E., Hansen, C. K., & Christensen, H. (2017). Hereditary cerebral small vessel disease and stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 155, 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2017.02.015>
- Sourander, P., & Walinder, J. (1977). Hereditary multi-infarct dementia. *European Neurology*, 27(4), 209–215. <https://doi.org/10.1159/000116158>
- Steiner, D. F., Thomas, M. F., Hu, J. K., Yang, Z., Babiarz, J. E., Allen, C. D. C., ... Ansel, K. M. (2011). MicroRNA-29 Regulates T-Box Transcription Factors and Interferon- γ Production in Helper T Cells. *Immunity*, 35(2), 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.009>
- Stojanov, D., Grozdanović, D., Petrović, S., Benedeto-Stojanov, D., Stefanović, I., Stojanović, N., & Ilić, D. N. (2014). *De novo mutation in the NOTCH3 gene causing CADASIL*.
- Takx, R. A. P., Zanen, P., Leiner, T., van der Graaf, Y., & de Jong, P. A. (2015). The interdependence between cardiovascular calcifications in different arterial beds and vascular risk factors in patients at high cardiovascular risk. *Atherosclerosis*, 238(1), 140–146. <https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2014.11.024>
- Tan, R. Y. Y., Traylor, M., Megy, K., Duarte, D., Deevi, V. V., Shamardina, O., ... Markus, H. S. (2019). *How common are single gene mutations as a cause for lacunar stroke? A targeted gene panel study*. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008544>
- Telman, G., Kouperberg, E., Sprecher, E., & Yarnitsky, D. (2008). Distribution of etiologies in patients above and below age 45 with first-ever ischemic stroke. *Acta Neurologica Scandinavica*, 117(5), 311–316. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2007.00953.x>
- Tibaek, M., Dehlendorff, C., Jørgensen, H. S., Forchhammer, H. B., Johnsen, S. P., & Kammersgaard, L. P. (2016). *Increasing Incidence of Hospitalization for Stroke and Transient Ischemic Attack in Young Adults: A Registry-Based Study*. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.003158>
- Tikka, S., Mykkinen, K., Ruchoux, M. M., Bergholm, R., Junna, M., Pyhnen, M., ... Kalimo, H. (2009). Congruence between NOTCH3 mutations and GOM in 131 CADASIL patients. *Brain*, 132(4), 933–

939. <https://doi.org/10.1093/brain/awn364>
- Tournier-Lasserre, E., Iba-Zizen, M. T., Romero, N., & Bousser, M. G. (1991). Autosomal dominant syndrome with strokelike episodes and leukoencephalopathy. *Stroke*, 22(10), 1297–1302. <https://doi.org/10.1161/01.STR.22.10.1297>
- Turner, T. N., Coe, B. P., Dickel, D. E., Hoekzema, K., Nelson, B. J., Zody, M. C., ... Eichler, E. E. (2017). Genomic Patterns of De Novo Mutation in Simplex Autism. *Cell*, 171(3), 710–722.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.047>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). *Primer3-new capabilities and interfaces*. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Vahedi, K., Kubis, N., Boukobza, M., Arnoult, M., Massin, P., Tournier-Lasserre, E., & Bousser, M.-G. (2007). *COL4A1 Mutation in a Patient With Sporadic, Recurrent Intracerebral Hemorrhage*. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.106.475194>
- Van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics : TIG*, 30(9), 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>
- Van Rooij, E., Sutherland, L. B., Thatcher, J. E., Dimaio, J. M., Haris Naseem, R., Marshall, W. S., ... Olson, E. N. (2008). *Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis*. Retrieved from www.pnas.org/cgi/content/full/
- Varona, J. F., Bermejo, F., Guerra, J. M., & Molina, J. A. (2004). Long-term prognosis of ischemic stroke in young adults. Study of 272 cases. *J Neurol*, 251, 1507–1514. <https://doi.org/10.1007/s00415-004-0583-0>
- Verdura, E., Hervé, D., Bergametti, F., Jacquet, C., Morvan, T., Prieto-Morin, C., ... Tournier-Lasserre, E. (2016). Disruption of a miR-29 binding site leading to COL4A1 upregulation causes pontine autosomal dominant microangiopathy with leukoencephalopathy. *Annals of Neurology*, 80(5), 741–753. <https://doi.org/10.1002/ana.24782>
- Verdura, E., Hervé, D., Scharrer, E., Del Mar Amador, M., Guyant-Maré, L., Philippi, A., ... Tournier-Lasserre, E. (2015). *Heterozygous HTRA1 mutations are associated with autosomal dominant cerebral small vessel disease*. <https://doi.org/10.1093/brain/awv155>
- Waje-Andreassen, U., Thomassen, L., Jusufovic, M., Power, K. N., Eide, G. E., Vedeler, C. A., & Naess, H. (2013). Ischaemic stroke at a young age is a serious event - final results of a population-based long-term follow-up in Western Norway. *European Journal of Neurology*, 20(5), 818–823. <https://doi.org/10.1111/ene.12073>
- Wang, T., Sharma, S. D., Fox, N., Rossor, M., Brown, M. J., & Sharma, P. (2000). Description of a simple test for CADASIL disease and determination of mutation frequencies in sporadic ischaemic stroke and dementia patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 69, 652–654. <https://doi.org/10.1136/jnnp.69.5.652>
- Wardlaw, J. M., Sandercock, P. A. G., Dennis, M. S., & Starr, J. (2003). Is breakdown of the blood-brain barrier responsible for lacunar stroke, leukoaraiosis, and dementia? *Stroke*, 34(3), 806–811. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000058480.77236.B3>

- Wei, L., Berman, Y., Castañ, E. M., Cadene, M., Beavis, R. C., Devi, L., & Levy, E. (1998). Instability of the Amyloidogenic Cystatin C Variant of Hereditary Cerebral Hemorrhage with Amyloidosis, Icelandic Type*. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 273). <https://doi.org/10.1074/jbc.273.19.11806>
- Whiffin, N., Minikel, E., Walsh, R., O'donnell-Luria, A. H., Karczewski, K., Ing, A. Y., ... Ware, J. S. (2017). *Using high-resolution variant frequencies to empower clinical genome interpretation*. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.26>
- Wolf, M. E., Sauer, • T, Alonso, • A, & Hennerici, • M G. (2011). *Comparison of the new ASCO classification with the TOAST classification in a population with acute ischemic stroke*. <https://doi.org/10.1007/s00415-011-6325-1>
- Wolfe, C. D. A. (2009). Incidence of stroke in Europe at the beginning of the 21st century. *Stroke*, 40(5), 1557–1563. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.535088>
- World Health Organization. (2018a). *Global Health Estimates*. Retrieved from http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/
- World Health Organization. (2018b). *Projections of mortality and causes of death, 2016 to 2060*. Retrieved from https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/
- Wozniak, M. A., Kittner, S. J., Tuhim, S., Cole, J. W., Stern, B., Dobbins, M., ... Desnick, R. J. (2009). *Frequency of Unrecognized Fabry Disease Among Young European-American and African-American Men With First Ischemic Stroke*. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.558320>
- Yamada, M. (2000). Cerebral amyloid angiopathy: An overview. *Neuropathology*, 20(1), 8–22. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1789.2000.00268.x>
- Yamamoto, Y., Craggs, L., Baumann, M., Kalimo, H., & Kalaria, R. N. (2011). Review: Molecular genetics and pathology of hereditary small vessel diseases of the brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 37(1), 94–113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2010.01147.x>
- Yang, G., Song, Y., Zhou, X., Deng, Y., Liu, T., Weng, G., ... Pan, S. (2015). MicroRNA-29c targets β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and has a neuroprotective role in vitro and in vivo. *Molecular Medicine Reports*, 12(2), 3081–3088. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3728>
- Yesilot Barlas, N., Putaala, J., Waje-Andreassen, U., Vassilopoulou, S., Nardi, K., Odier, C., ... Bahar, S. Z. (2013). *Etiology of first-ever ischaemic stroke in European young adults: the 15 cities young stroke study*. <https://doi.org/10.1111/ene.12228>
- Yohe, S., & Thyagarajan, B. (2017). Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 141(11), 1544–1557. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0501-RA>
- Zarate, Y. A., & Hopkin, R. J. (2008). Fabry's disease. *The Lancet*, 372(9647), 1427–1435. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61589-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61589-5)
- Zhao, Y.-Y., Duan, R.-N., Ji, L., Liu, Q.-J., & Yan, C.-Z. (2019). *Cervical Spinal Involvement in a Chinese Pedigree With Pontine Autosomal Dominant Microangiopathy and Leukoencephalopathy Caused by a 3' Untranslated Region Mutation of COL4A1 Gene*. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.024875>

Zhuang, F.-J., Chen, Y., He, W.-B., & Cai, Z.-Y. (2018). Prevalence of white matter hyperintensities increases with age. *Neural Regeneration Research*, 13(12), 2141. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.241465>

Publikationen

Roos, J., Müller, S., Giese, A., Appenzeller, S., Ringelstein, E. B., Fiehler, J., Berger, K., Rolfs, A., Hagel, C., & Kuhlenbäumer, G. (2023). Pontine autosomal dominant microangiopathy with leukoencephalopathy: Col4A1 gene variants in the original family and sporadic stroke. *Journal of Neurology*. <https://doi.org/10.1007/s00415-023-11590-9>

Poster

Roos J., Hagel C., Rolfs A., Giese A., Pendziwiat M., Kuhlenbäumer G. (2020). Untersuchung der miR-29 Bindestelle in der 3'-untranslatierten Region des COL4A1 Gens bei Patienten mit Infarkten im vertebrobasilären Stromgebiet und Leukenzephalopathie. 93. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 4.-7. November 2020.

Danksagung

Ganz besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. Gregor Kuhlenbäumer für die Überlassung dieses spannenden Themas, die ausgezeichnete und engagierte Betreuung und die stets große Hilfsbereitschaft während der Entstehung dieser Arbeit.

Ich danke der Arbeitsgruppe Neurogenetik des UKSH Kiel für die gute Zusammenarbeit und insbesondere möchte ich mich bei Manuela Pendziwiat bedanken, die mich mit der Arbeit im Labor vertraut machte und mir geduldig bei allen experimentellen Arbeiten mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für die Bereitstellung der DNA-Proben möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Arndt Rolfs von der Universität Rostock danken. Frau Dr. Ulrike Grittner von der Charité-Universitätsmedizin Berlin danke ich für das Überlassen der entsprechenden statistischen Daten. Für die wertvolle Unterstützung bei der histologischen Auswertung und die Bereitstellung der histologischen Bilder danke ich Herrn Dr. med. Thomas Arzberger von der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ich danke allen Patient*innen, die durch das Zurverfügungstellen ihrer DNA einen wichtigen Beitrag zur Erforschung genetischer Erkrankungen leisten.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freund*innen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Danke an Anna, Andrea und Sarah für die zahlreichen Stunden des gemeinsamen Doktorarbeit Schreibens und die inspirierenden und aufheiternden Diskussionen. Danke an Arne, der mir stets zuverlässig mit einem offenen Ohr zur Seite steht. Ganz besonders danke ich meinen Eltern für die wunderbare und unermüdliche Unterstützung bei allen meinen Vorhaben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Betreuers, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich keine anderen als die in der Arbeit aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat, weder ganz noch in Teilen.

Datum, Unterschrift