

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Monika Hrubá

Molekulárně genetická podstata onemocnění CADASIL

Molecular Genetic Basis of CADASIL Disease

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Hana Vlášková

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.05.2014

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Haně Vláškové za odborné vedení a cenné rady při zpracování této práce.

Abstrakt

Onemocnění CADASIL je autozomálně dominantně dědičné onemocnění s pozdním nástupem, jehož příčinou jsou mutace v genu *NOTCH3*. Tento gen patří do konzervované genové rodiny *notch*. Geny *notch* kódují transmembránové receptory, které se účastní Notch signální dráhy, čímž ovlivňují vývoj organismu. Onemocnění CADASIL se projevuje poškozením malých a středních arterií, nejvíce zasažené jsou mozkové artérie. První symptomy onemocnění se projevují ve středním věku a hlavními znaky jsou migrény s aurou, opakující se mrtvice, kognitivní poruchy a demence. Příčinou onemocnění jsou převážně missense mutace měnící počet konzervovaných cysteinových zbytků v EGF-like repetitcích proteinu Notch3. Tato práce je zaměřená na molekulárně genetickou podstatu onemocnění CADASIL, popisuje kauzální mutace a porovnává hypotézy o patogenním mechanismu mutací. Penetrance onemocnění není zatím objasněná, ale v této práci jsou shrnuty dosavadní poznatky o vztahu mezi genotypem a fenotypem, které by mohly přispět k jejímu objasnění. Průběh onemocnění se totiž liší jak mezi rodinami, tak i mezi příslušníky jedné rodiny. Je zdokumentován rozdíl v průběhu onemocnění mezi muži a ženami i vliv environmentálních faktorů. V práci jsou navíc popsány i nejčastější diagnostické techniky spolu s jejich senzitivitou a specifitou a jsou sepsány názory na optimalizaci diagnostických protokolů.

Klíčová slova: CADASIL, *NOTCH3*, EGF-like domény, mutační analýza, autozomálně dominantní dědičnost, *notch*

Abstract

CADASIL is a hereditary late-onset disease which is caused by a mutation in *NOTCH3* gene. This gene belongs to the *notch* gene family that is conserved among Metazoa. The *notch* genes code transmembrane receptors which play role in Notch signal pathway during organism development. CADASIL is characterized by the impairing of small and medium vessels, especially cerebral arteries. The first symptoms appear in the middle age and the main symptoms are migraines with aura, recurrent strokes, cognitive impairment and dementia. The causes of this disease are mostly missense mutations altering the number of conserved cysteine residues in EGF-like domains of Notch3 protein. This thesis is focused on molecular genetic basis of CADASIL disease, it describes causative mutations and compares hypothesis about pathogenic mechanism of mutations. The penetration of the disease is not clarified yet but the thesis summarizes all current findings about genotype-phenotype correlations which can help to elucidate it. The phenotype differs between families and also between members of the same family. There is described the difference between men and women and the environmental influence too. There are also characterized the most common diagnostic techniques with their sensitivity and specificity in this thesis. In addition, the opinions to optimize the diagnostic protocols are interpreted as well.

Keywords: CADASIL, *NOTCH3*, EGF-like domains, mutational analysis, autosomal dominant heredity

Seznam použitých zkratk:

ANK doména	ankyrin domain	ankyrinová doména
ADAM	A disintegrin and metalloprotease	disintegrin A a metaloproteáza
CADASIL	Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy	mozková autozomálně dědičná angiopatie se subkortikálními infarkty a leukoencefalopatií
cDNA	complementary DNA	komplementární DNA
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
DSL	Delta/Serrate/LAG-2	Delta/Serrate/LAG-2
EGF	epidermal growth factor	epidermální růstový faktor
E(spl)	Enhancer of Split	
GOM	granular osmiophilic material	granulární osmiofilní materiál
HERP	HES-Related Repressor Protein	represeor příbuzný proteinu HES
HES	hairy/Enhancer of split	
HGMD	The Human Gene Mutation Database	Databáze mutací v lidských genech
LNR	Lin12/Notch repetition	Lin12/Notch repetice
LOVD	Leiden Open Variation Database	Leidenská otevřená databáze variací
MMTV	mouse mammary tumor virus	myší virus nádoru mléčné žlázy
MRI	magnetic resonance imaging	magnetická rezonance
NADH	reduced nicotinamide adenin dinucleotide	redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man	databáze obsahující informace o všech známých mendelovskey dědičných onemocnění
PEST doména	domain rich in proline, glutamic acid, serine and threonine	doména bohatá na prolin, glutamovou kyselinu, serin a threonin
RAM	RBP/J κ association module	doména asociovaná s transkripčním faktorem RBP/J κ
RBP-Jκ	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region	protein vázající rekombinační signál pro oblast kappa J imunoglobulinu
TACE	tumor necrosis factor α converting enzyme	faktor nádorové nekrózy α konvertující enzym
TAD	transactivation domain	transaktivační doména
TIA	transient ischemic attack	tranzitorní ischemická ataka

Obsah

1 Úvod	1
2 Genová rodina <i>notch</i>	3
2.1 Obecná struktura receptorů Notch.....	3
2.2 Posttranslační štěpení proteinu Notch a následná signalizace.....	6
2.2.1 Posttranslační úpravy.....	6
2.2.2 Signalizace pomocí odštěpení intracelulární domény	6
2.3 Ligandy vázající se na protein Notch	7
2.3.1 Ligandy.....	7
2.4 Savčí geny <i>notch</i>	8
3 Gen <i>NOTCH3</i>	9
3.1 Vliv genu <i>NOTCH3</i> na vývoj a integritu cév	9
3.2 Mutace vedoucí k onemocnění CADASIL.....	10
3.2.1 Časté mutace.....	10
3.2.2 Vzácné mutace	12
3.2.4 Mutace zveřejněné v internetových databázích HGMD a LOVD.....	14
3.2.5 Patogenní efekt mutací	14
3.3 Agregace extracelulárních domén proteinu Notch3 a vznik ložisek granulárního osmiofilního materiálu.....	17
4 Fenotyp a diagnostika onemocnění	19
4.1 Fenotyp onemocnění	19
4.1.1 Rozdíly onemocnění v závislosti na pohlaví	20
4.1.2 Korelace genotyp – fenotyp.....	21
4.1.3 Vliv prostředí na průběh onemocnění	22
4.2 Diagnostika onemocnění	22
4.2.1 Magnetická rezonance	22
4.2.2 Elektronová mikroskopie vzorků z biopsie kůže.....	23
4.2.3 Imunohistochemie vzorků z biopsie kůže	24
4.2.4 Analýza vzorků z biopsie svalu a nervu.....	24
4.2.5 Genetická analýza a optimalizování diagnostických protokolů	25
4.2.6 Preimplantační a prenatalní genetická diagnostika	25
5 Závěr.....	26
6 Seznam použité literatury	28

1 Úvod

Název CADASIL je akronymem pro anglický název Cerebral Autosomal Dominant Arterio-pathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy, tedy v překladu pro mozkovou autozomálně dominantně dědičnou angiopatii se subkortikálními infarkty a leukoencefalopatií (Tournier-Lasserre et al., 1993). Název vystihuje hlavní charakteristiky tohoto onemocnění, tedy poškození cév spojené se subkortikálními infarkty a poškozením bílé hmoty mozku.

Tato nemoc byla poprvé popsána doktorem Van Bogaertem roku 1955 při studiu dvou sester nemocných tzv. „subkortikální encefalopatií Binswangerova typu s rychlým průběhem (Van Bogaert, 1955, cit. dle Ruchoux & Maurage, 1997). První symptomy onemocnění se objevily až ve středních letech a projevovalo se demencí, poruchami chůze, pseudobulbární obrnou (centrální poruchou polykání nebo vyslovování), záchvaty a fokálním neurologickým deficitem (při kterém existuje poškození v mozkovém centru pro určitou funkci, a tím dochází k patologickému projevu). Poté roku 1977 doktoři Sourander a Walinder u švédské rodiny a zároveň doktor Stevens u anglické rodiny popsali autozomálně dědičné neuropsychiatrické onemocnění s pozdním nástupem a progresivním průběhem (Sourander & Walinder, 1977; Stevens, Hewlett & Brownell, 1977). Zjistili, že dochází k poškození zejména malých artérií mozku. Postižení trpěli těžkou demencí, mozkovými příhodami a závažným progresivním poškozením mozku. Onemocnění se projevovalo u mužů i žen, trvalo okolo 10 let a končilo smrtí. Roku 1991 byly na základě analýzy širokého rodokmenu francouzské rodiny poprvé prokázány změny na mozku pomocí magnetické rezonance a počítačové tomografie (Tournier-Lasserre et al., 1991). Dnes používaný název CADASIL (OMIM #125310) získalo onemocnění roku 1993 od týmu vedeného doktorkou Tournier-Lasserre (Tournier-Lasserre et al., 1993).

Tento tým také provedl první mapování lokusu pro CADASIL pomocí vazebné studie u dvou nepříbuzných rodin. Poloha lokusu byla určena na 19. chromozóm mezi markery D19S221 a D19S222 bez známek heterogenity. Později byly provedeny další vazebné analýzy pro upřesnění lokace lokusu. Po vazebné analýze 15 nepříbuzných rodin byl lokus pro CADASIL určen na 2cM interval mezi markery D19S226 a D19S199 (Ducros et al., 1996). Nakonec byl lokus zmapován až na interval 1 cM ohraničený markery D19S253 a D19S929 (Joutel et al., 1996; Joutel & Corpechot, 1997). Velikost kritické oblasti byla určena na 800 kb. V této oblasti bylo identifikováno 12 nových genů včetně ortologu myšího genu *notch3* patřícího do genové rodiny *notch*. K potvrzení, že mutace právě v genu *NOTCH3* jsou zodpovědné za vznik onemocnění CADASIL, bylo použito metody jednovláknových konformačních polymorfismů. Byly hledány bodové mutace ve 14 exonech cDNA genu *NOTCH3* u pacientů s diagnostikovaným onemocněním CADASIL i u zdravých jedinců jako kontrol. Bylo nalezeno 11 konformačních variant v sedmi exonech. Deset z nich bylo pozorováno pouze u souboru pacientů. To vedlo k dalšímu zkoumání mutací tohoto genu. Byly identifikovány další bodové mutace. Výrazně převažovaly jednonukleotidové záměny ovlivňující počet cysteinových zbytků

v translatovaném proteinu. Tyto studie byly prvopočátkem využívání genetických vyšetření při podezření na onemocnění CADASIL.

Přesná prevalence onemocnění CADASIL není zatím známá, ale zdá se, že pacientů s tímto onemocněním není tak málo, jako by se podle povědomí veřejnosti o tomto onemocnění mohlo zdát. V roce 1996 měla laboratoř doktorky Joutelové (INSERM a Univerzita Paris Diderot, Francie) v evidenci přes 120 rodin (Joutel & Corpechot, 1997). Roku 2004 bylo onemocnění CADASIL identifikováno u více jak 500 rodin po celém světě (Kalara, Viitanen & Kalimo, 2004). Na západě Skotska (Razvi, 2005) byla k roku 2005 určena minimální prevalence 1,98/100 000 dospělých. Reálný výskyt nosičů mutace v genu *NOTCH3* vedoucí k onemocnění CADASIL je ale nejspíše vyšší. To může být zapříčiněno tím, že onemocnění CADASIL bylo popsáno teprve nedávno a je velmi často chybně diagnostikováno. Zjištěná prevalence v západním Skotsku může být ještě ovlivněna tím, že právě v této oblasti je vysoký výskyt běžných cerebrovaskulárních onemocnění a roztroušené sklerózy, proto je možné, že dochází k zaměnění diagnózy a i symptomatictí pacienti nejsou nahlášeni jako CADASIL pacienti. Kromě těchto důvodů přispívá k obtížnému určení prevalence také fakt, že dochází ke sporadickému výskytu de novo mutací vedoucích k onemocnění CADASIL (Joutel, 2000). Podle portálu orpha.net [online], [cit. 2014-05-06], zaměřeného na vzácná onemocnění, je celosvětová prevalence onemocnění CADASIL 1-9/1 000 000, v Evropě pak 1/50 000 – 1/25 000.

Cílem mé práce je shrnout a utřídit dosavadní poznatky o onemocnění CADASIL s důrazem na molekulárně genetickou podstatu tohoto onemocnění, a přispět tak ke zlepšení diagnostiky i k rozšíření povědomí o této nemoci.

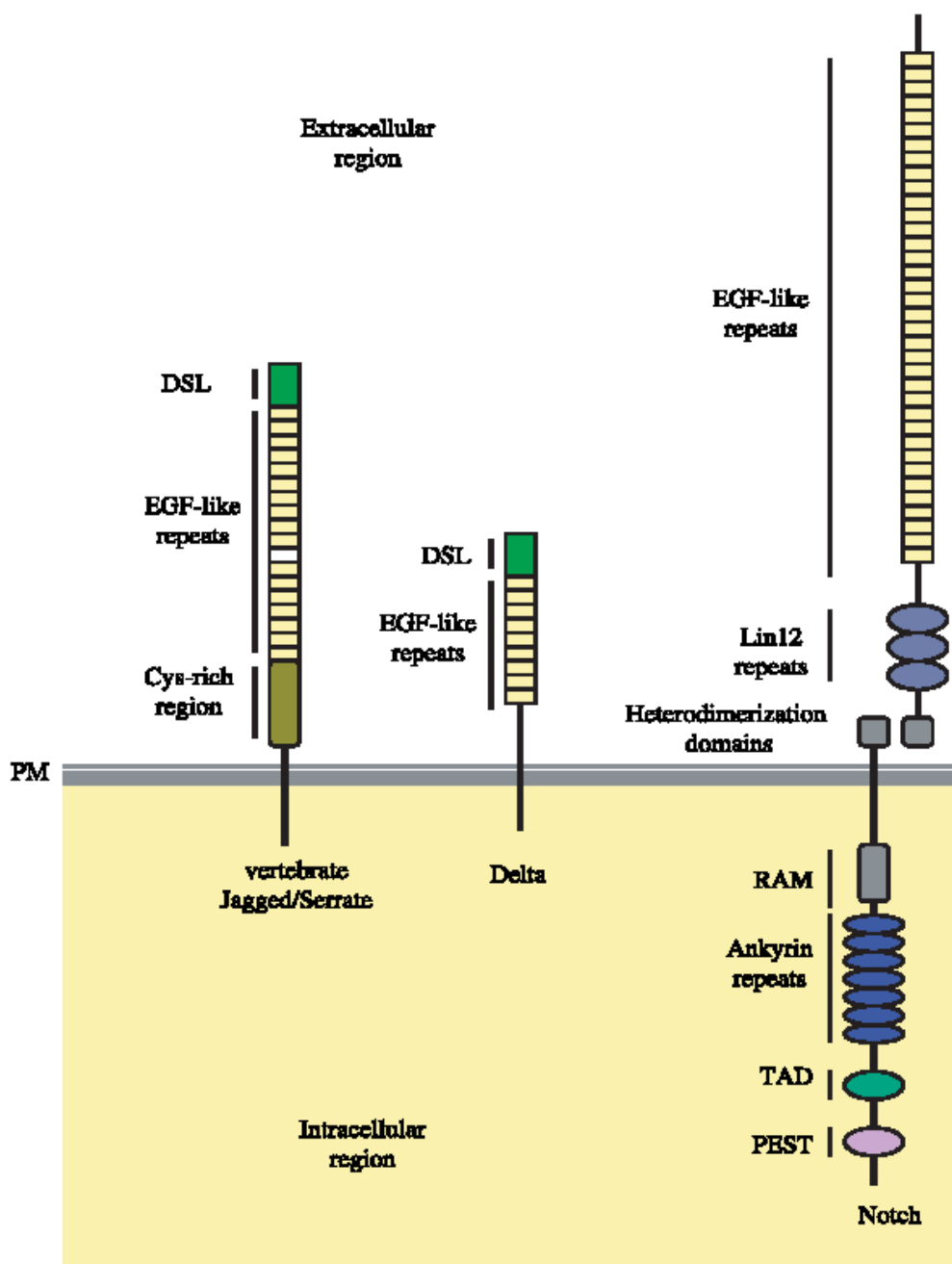
2 Genová rodina *notch*

2.1 Obecná struktura receptorů Notch

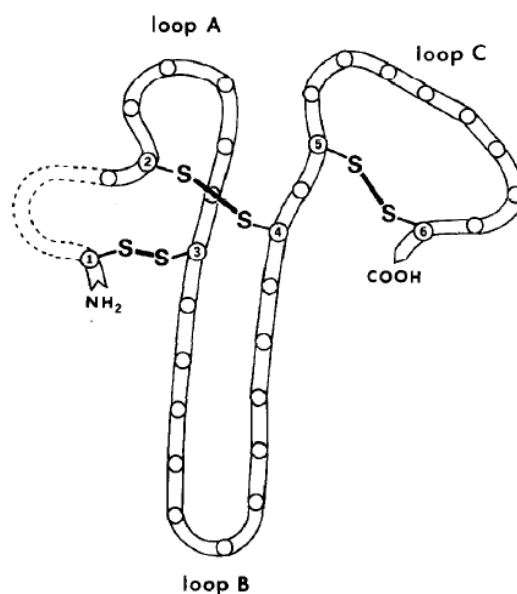
Gen kódující Notch receptor byl poprvé objeven a popsán roku 1919 u *Drosophily melanogaster* (Artavanis-Tsakonas, 1999, review). Notch-like proteiny byly dále identifikovány a popsány i u *Caenorhabditis elegans*, ježovek a mnoha obratlovců včetně člověka. Signalizace pomocí proteinů Notch je evolučně konzervovaným mechanismem, jehož funkcí u Metazoa je kontrolovat diferenciaci buněk prostřednictvím místních buněčných interakcí. U všech zvířecích modelů mutace v receptorech kódovaných genem *notch* způsobují vývojové abnormality a patologie. Signalizace přes receptor Notch je tedy důležitým mechanismem vývoje, řídí osud buněk, a tím vytváří celý organismus.

Gen *notch* objevený u *Drosophily* kóduje 300kDa transmembránový receptor, který jednou prochází buněčnou membránou (Zweifel & Barrick, 2001, review; Artavanis-Tsakonas, 1999, review; Barrick & Kopan, 2006, review; Kopan & Ilagan, 2009, review). Všechny objevené geny *notch* a jejich proteiny mají velmi podobnou konzervovanou strukturu (obr. č. 1).

Receptor je složen z extracelulární, transmembránové a intracelulární domény. Extracelulární doména obsahuje 29 - 36 tandemových repetitivních podobných epidermálnímu růstovému faktoru (EGF-like repetice). V každé EGF-like repetici se nacházejí velmi konzervované cysteiny tvořící vnitřní disulfidické můstky (Campbell & Bork, 1993, cit. dle Joutel, 1996) (obr. č. 2). EGF-like repetice se účastní interakce s ligandy receptoru Notch (Zweifel & Barrick, 2001, review; Artavanis-Tsakonas, 1999, review; Barrick & Kopan, 2006, review; Kopan & Ilagan, 2009, review). V extracelulární doméně se dále nachází i 3 na cysteiny bohaté repetice označované zkratkou LNR (Lin12/Notch repetice). Transmembránová neboli heterodimerizační doména nekovalentně spojuje vnější a vnitřní doménu receptoru do heterodimeru. V intracelulární doméně se vyskytuje 6 – 7 tandemových ankyrinových neboli cdc10 repetitivních, RAM, transaktivační a PEST doména a pouze u *Drosophily* doména bohatá na glutamin. Ankyrinové repetice a RAM doména jsou zásadní pro signalizaci. Transaktivační doména má funkci při vazbě dalších modulátorů signalizace a sousedí s PEST doménou, což je doména bohatá na aminokyseliny prolin, glutamin, serin a threonin a nese signál pro degradaci intracelulární domény receptoru Notch. Tím reguluje její stabilitu.



Obr. č. 1: Konzervovaná struktura receptoru Notch a jeho ligandů. Ligandy Delta a Jagged/Serrate se skládají z DSL oblasti, odpovědné za interakci s receptorem Notch, a z několika EGF-like repetice. Ligand Jagged/Serrate navíc obsahuje extracelulární oblast bohatou na cysteiny. Receptor Notch obsahuje EGF-like repetice, na cysteiny bohatou oblast označenou jako Lin12 repetice, heterodimerizační doménu zodpovědnou za vytvoření heterodimeru nekovalentním spojením extra- a intracelulární domény. Intracelulární doména se skládá z RAM domény, účastní se interakce s transkripčním faktorem RBP-J κ , ankyrinových repetice, transaktivační domény TAD a PEST domény. PM je označení plasmatické membrány. Převzato od Fiúza & Arias, 2007.



Obr. č. 2: Předpokládaná struktura jedné EGF-like repetice. Kolečka znázorňují jednotlivé aminokyselinové zbytky. Cysteinové zbytky jsou vyplněny čísly a mezi nimi jsou znázorněny 3 disulfidické můstky. Jednotlivé EGF-like repetice se mohou lišit v počtu aminokyselinových zbytků v B smyčce. Převzato od Appella et al., 1988.

Studie proteinu Notch *Drosophily* prováděná na principu delecí částí proteinu ujasnila funkci jednotlivých částí tohoto proteinu (Rebay, Fehon & Artavanis-Tsakonas, 1993). Studie prokázala, že delece celého extracelulárního úseku, který je zodpovědný za interakci mezi proteinem a ligandem, vede k aktivování intracelulární části proteinu Notch. Navíc bylo zjištěno, že velká delece extracelulární domény je nezbytná k aktivaci tohoto proteinu. Oba tyto výsledky vedou k tvrzení, že pro aktivaci proteinu je třeba oddělení (tedy *in vivo* odštěpení) extracelulární domény. Při delecích různých EGF-like repetice se ověřilo, že ke správné funkci proteinu Notch *in vivo* jsou potřeba všechny EGF-like repetice – buď pro vazbu ligandu nebo její regulaci či pro obě tyto funkce najednou. Při odstranění intracelulární sekvence však došlo ke ztrátě funkce proteinu. Tato delece se projevila jako dominantní negativní mutace. Z toho je tedy možné odvodit, že tato doména je nezbytná k funkci proteinu. Navíc se ukázalo, že ankyrinové repetice jsou zásadní pro funkci proteinu Notch uvnitř buňky. Tento výsledek podporuje i srovnání homologů genu *notch* – ankyrinové repetice jsou nejvíce konzervovanou oblastí intracelulární domény proteinu Notch.

Z výše uvedeného vyplývá, že struktury receptoru Notch fungují jako u většiny ostatních receptorů na povrchu buňky - intracelulární doména slouží pro přenos signálu a extracelulární doména váže ligand, popřípadě bez navázaného ligandu slouží jako inhibitor aktivity receptoru (Mumm & Kopan, 2000).

2.2 Posttranslační štěpení proteinu Notch a následná signalizace

2.2.1 Posttranslační úpravy

Na příkladu myšního proteinu Notch1 bude vysvětlen proces posttranslační úpravy proteinů Notch obratlovců. Ačkoliv se velikosti podjednotek i celého proteinu mezi různými proteiny Notch liší, princip a enzymy zůstávají stejné.

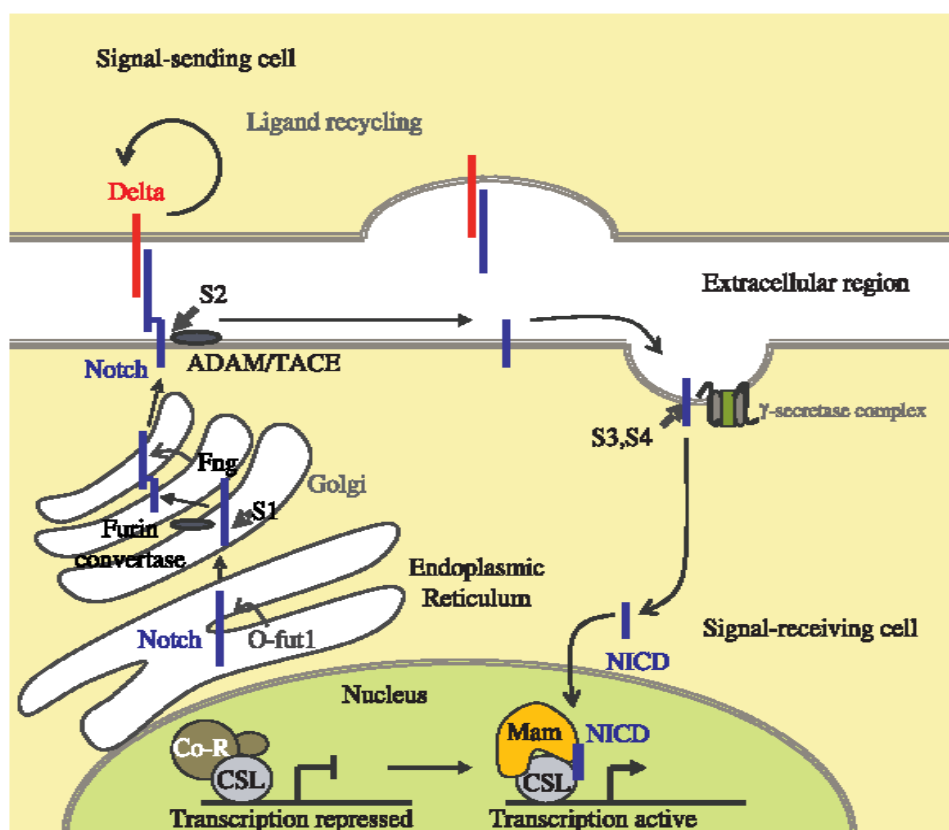
Receptor Notch1 vzniká jako prekurzorový protein o velikosti 300 kDa (Logeat et al., 1998). Na povrchu buňky se však receptor vyskytuje ve formě heterodimeru o velikosti podjednotek 120 kDa a 200 kDa. Prekurzor je konstitutivně štěpen v trans Golgi síti pomocí furinu podobné konvertázy. Toto štěpení je označováno zkratkou S1. Bez tohoto štěpení není receptor schopný dostat se na povrch buňky.

2.2.2 Signalizace pomocí odštěpení intracelulární domény

Receptor Notch přenáší signál z buněčného povrchu do jádra díky regulované intramembránové proteolýze, tedy díky regulovanému uvolnění intracelulární domény (obr. č. 3) (Brou et al., 2000).

Po navázání ligandu umístěného na povrchu sousední buňky se na receptoru odhalí extracelulární místo rozpoznávající metaloproteázu, naváže se disintegrin metaloproteáza TACE a dojde k extracelulárnímu štěpení označované zkratkou S2. Tím se oddělí extracelulární doména. Dále následuje ještě třetí štěpení nazývané γ -sekretáza-dependentní štěpení (Opherk et al., 2009, review; Fiúza & Arias, 2007, review). Toto štěpení v transmembránové doméně, označované zkratkou S3, uvolňuje intracelulární doménu. Ta poté putuje do jádra a tam reguluje genovou expresí tím, že interaguje s transkripčními faktory, například s transkripčním faktorem RBP-J κ . Některé studie navíc identifikovaly i S4 štěpení intracelulární domény probíhající působením γ -sekretázy a katalytické činidla presinilinu (Okochi et al., 2002; Chandu, Huppert & Kopan, 2006).

Komplex intracelulární domény a transkripčního faktoru RBP-J κ aktivuje expresi cílových genů Notch signalizace (Iso et al., 2003, review). Cílovými geny jsou u savců geny rodin HES a HERP a u *Drosophily* geny rodiny E(spl). Tyto geny fungují jako transkripční represory, a ovlivňují tak tkáňově specifické transkripční faktory.



Obr. č. 3: Signální dráha proteinu Notch. Štěpení S1 probíhá v trans Golgi síti furinu podobnou konvertázou. Po navázání ligandu (Delta) následuje štěpení S2 pomocí enzymu disintegrin metaloproteáza TACE. Poté dochází k γ -sekretáza-dependentnímu štěpení S3. Na obrázku je znázorněno i štěpení S4, na kterém by se měla podílet γ -sekretáza. Po těchto štěpení dojde k uvolnění intracelulární domény (NICD), ta putuje do jádra, kde ovlivňuje transkripční aktivitu různých genů. Převzato od Fiúza & Arias, 2007.

2.3 Ligandy vázající se na protein Notch

2.3.1 Ligandy

Ligandy, které se váží na receptor Notch a aktivují ho, patří do DSL rodiny proteinů (Fiúza & Arias, 2007, review). Název této rodiny je odvozen od názvů ligandů u bezobratlých – Delta, Serrate a LAG-2. Ligandy jsou strukturně podobné receptorům Notch – jsou to transmembránové molekuly a mají několik EGF-like repetič v extracelulárních doménách (obr. č. 1). Navíc obsahují DSL doménu, která je potřebná pro interakci s EGF-like repetičemi receptoru Notch. U *Drosophily* byl nalezen pouze jeden ligand Delta a jeden Serrate. U savců bylo však genů kódujících ligandy pro receptor Notch nalezeno více. Například u myši a člověka byly nalezeny 3 Delta-like proteiny (Delta1, 3 a 4) a dva homology ligandu Serrate (Jagged1 a 2). Jagged1 a Jagged2 jsou delší než Delta-like proteiny, protože obsahují více EGF-like repetič. Navíc Jagged1 a Jagged2 mají oblast bohatou na cysteiny.

2.4 Savčí geny *notch*

U savců byly identifikovány geny *notch1*, *notch2*, *notch3* a *notch4* (Weinmaster, 1997, review). Proteiny Notch1 a Notch2 obsahují 36 tandemově řazených EGF-like repetit, Notch3 a Notch 4 se skládají z 34 a 29 EGF-like repetit. Hlavním rozdílem mezi jednotlivými savčími proteiny Notch je počet aminokyselin mezi ankyrinovými repetitcemi a PEST doménou. To způsobuje odlišnosti ve velikosti intracelulární domény.

Gen *notch1* je exprimován v mnoha tkáních u embryí i dospělých savců (Swiatek et al., 1994; Conlon, Reaume & Rossant, 1995). Mimo jiné řídí počáteční diferenciaci buněk ze společného lymfoidního progenitoru buněk kostní dřeně a nejspíše má také svoji úlohu v pozdějších stádiích lymfoidní diferenciace (Pui et al., 1999). Předpokládá se, že tento gen má obdobnou úlohu i u lidí, jelikož při translokaci chromozomu v místě tohoto genu dochází k aktivaci T buněčné akutní lymfoblastické leukémie (Ellisen et al., 1991; Weng et al., 2004). Gen *notch2* se exprimuje v mozku a hladina exprese zůstává téměř stejná jak při embryonálním vývoji, tak i v dospělosti. Postnatálně se více exprimuje ve slezině. Vysoká exprese tohoto genu byla také popsána ve formující se i zralém choroidálním plexu. Gen *notch4* je evolučně nejvzdálenější člen genové rodiny *notch* (Uyttendaele, Marazzi & Wu, 1996). V embryonálním vývoji se u myši exprimuje pouze v endoteliálních buňkách (Gallahan & Callahan, 1997). Tato exprese přetrvává i u dospělých. U člověka gen *NOTCH4* je kromě endoteliálních buněk exprimován také v buňkách myokardu, plic, kosterní svaloviny, pankreatu, jater, ledvin a placenty (Li et al., 1998). Na rozdíl od ostatních lidských genů *NOTCH* bylo zjištěno, že gen *NOTCH4* není exprimován v mozku dospělého člověka.

3 Gen *NOTCH3*

Lidský gen *NOTCH3* leží na krátkém raménku 19. chromozomu. Obsahuje 33 exonů kódující protein složený z 2321 aminokyselin (Joutel et al., 1996). Protein obsahuje domény typické pro celou rodinu genů *notch*. Skládá se z 34 EGF-like repetice, 3 na cysteiny bohaté repetice a 6 tandemových ankyrinových repetice. Gen *NOTCH3* je u dospělého člověka exprimován převážně v buňkách hladké svaloviny stěny cév (Joutel et al., 2000), ale i v lymfocytech v periferní krvi a fibroblastech (Maio, Formichi & Radi, 2012), u dospělých myši byl transkript genu *notch3* navíc objeven i v thymocytech (Felli et al., 1999). Prekurzor lidského proteinu Notch3 má velikost okolo 280 kDa (Joutel et al., 2000). Po sestřihu v cévách vznikají fragmenty o velikosti 210 kDa (extracelulární doména) a 97 kDa (intracelulární doména). Mutace v tomto genu způsobují nejen onemocnění CADASIL, ale i velmi vzácné onemocnění nazvané dětská myofibromatóza (OMIM #615293) (Martignetti et al., 2013). Ačkoliv jde o vzácné onemocnění, je to nejčastější příčina vzniku fibromatózního tumoru u dětí. Je možná i spojitost mutací v genu *NOTCH3* s dalšími onemocněními – např. kolorektálním karcinomem (Smith et al., 2013).

3.1 Vliv genu *NOTCH3* na vývoj a integritu cév

Při experimentech na myších se zjistilo, že myší gen *notch3* je potřeba u dospělých myši k vytvoření strukturní a funkční integrity malých a středně velikých distálních a mozkových artérií (Domenga & Fardoux, 2004; Chantemèle, 2008). U čerstvě narozených myši nebyly pozorovány rozdíly mezi cévami myši s deletovaným genem *notch3* a myši divokého typu. To bylo zapříčiněno tím, že ihned po narození není vývoj cév ještě zcela dokončen. Velký rozdíl ale nastal 28. den po narození – artérie získávaly svoji finální strukturu. Tento proces byl u myši s deletovaným genem *notch3* těžce narušený. Mutované buňky hladké svaloviny malých a středně velikých distálních mozkových cév nevytvořily správný tvar, nezaujaly správnou orientaci a ani umístění ve střední vrstvě cévní stěny (tunica media) a okolo lumen. Navíc tyto buňky tvořily shluky, které nebyly správně orientované okolo lumen. Z této studie vyplývá, že postnatální maturace buněk hladké svaloviny malých a středně velikých distálních a mozkových cév, která dává cévám konečný tvar, je pod vlivem genu *notch3*. Naopak u velkých tepen, jako například krkavic, nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi myšmi divokého typu a myšmi s deletovaným genem *notch3*. Z toho bylo odvozeno, že nepřítomnost genu *notch3* selektivně zhoršuje funkci pouze malých a středních artérií.

Další zjištěnou změnou myších malých i středních artérií s deletovaným genem *notch3* byla změna charakteru těchto cév z arteriálního na venózní. Bylo to prokázáno jak histologickým vyšetřením s využitím arteriálních markerů, tak měřením myogenního tonu v cévách. Myogenní tonus je charakteristický pouze pro buňky hladké svaloviny artérií. U myši s deletovaným genem *notch3* byl pozorován snížený myogenní tonus v malých a středních distálních a mozkových artériích. Tudíž v nepřítomnosti genu *notch3* v hladké svalovině cév malých a středně velikých cév dochází ke ztrátě

arteriálního charakteru na strukturní i funkční úrovni. To potvrzuje i studie na embryích Dania průho- vaného (Lawson et al., 2001). I tato ryba exprimuje gen *notch3* a bylo prokázáno, že je u něj tento gen zodpovědný za diferenciaci cév v artérie a vény. Při inhibici Notch signální dráhy poklesla arteriální exprese genu *notch3* i arteriálního markeru *ephrin-B2*.

Následně byl zkoumán mechanismus, kterým dochází u myši k poklesu myogenního tonu v mutovaných cévách (Domenga & Fardoux, 2004; Chantemèle, 2008). Ukázalo se, že u myši s deletovaným genem *notch3* dochází k signifikantnímu poklesu aktivity proteinu RhoA, i když jeho množství v buňkách zůstává stejné jako u myši divokého typu. Potvrdilo se, že RhoA/Rho kinázová dráha, která je aktivovaná zvýšením krevního tlaku, je modulována proteinem Notch3. Toto tvrzení podporuje i hypotéza, že protein Notch3 je klíčovým receptorem v signální dráze přenosu myogenního tonu do kontrakce. To lze považovat za jeden z prvních důkazů, že gen *notch3* kontroluje prostřednictvím RhoA/Rho kinázové signální dráhy schopnost cév reagovat na mechanické faktory a změnu tlaku a proudu krve.

3.2 Mutace vedoucí k onemocnění CADASIL

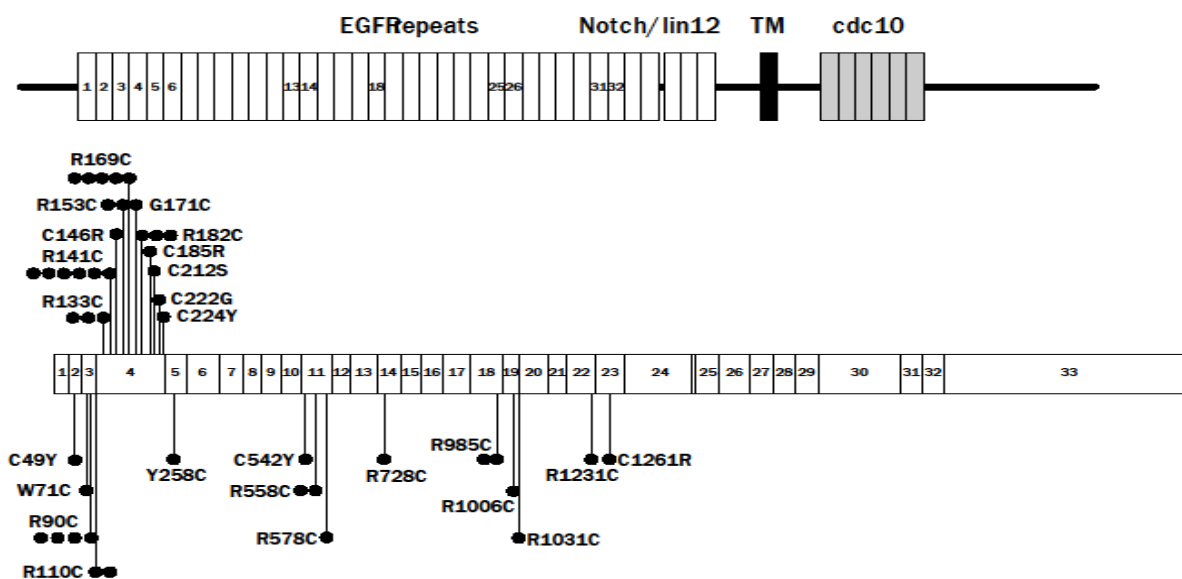
3.2.1 Časté mutace

V prvních studiích mutací lidského genu *NOTCH3* u 58 nepříbuzných pacientů s diagnostikovaným onemocněním CADASIL byly mutace hledány ve vybraných 14 exonech tohoto genu, jejichž sousedící intronové sekvence byly známé (Joutel et al., 1996). U 14 pacientů bylo obje- veno 10 missense mutací, které nebyly nalezeny u zdravých kontrol. 9 z těchto mutací bylo v EGF-like repetičích - 2 z nich pozměňovaly cysteinové zbytky, 6 dalších vedlo k nahrazení konzervovaného aminokyselinového zbytku jiným cysteinovým zbytkem a jedna nahradila vysoce konzervovaný glycin alaninem. Desátá mutace byla lokalizována ve vysoce konzervované oblasti *cdc10* repetič.

V souladu se studií doktorky Joutelové z roku 1996 jsou i výsledky její další studie z roku 1997 (Joutel, Vahedi & Corpechot, 1997). Skrínink celé kódující sekvence genu *NOTCH3* prokázal u 45 z 50 pacientů s diagnostikovaným onemocněním CADASIL heterozygotní mutace, při kterých došlo k velmi stereotypním záměnám v EGF-like repetičích (obr. č. 4). Buď to byly mutace vedoucí k záměně aminokyseliny cysteinovým zbytkem, nebo k výměně konzervovaného cysteinu jinou ami- nokyselinou. Navíc bylo objeveno, že 3 pacienti z těchto 45 měli kromě mutace měnící počet cysteinů ještě jednu missense mutaci měnící aminokyselinu v EGF-like repetičích nebo v ankyrinových repetičích. Dvě z nich segregovaly v příbuzenstvu pacienta s fenotypem onemocnění CADASIL, jedna ale ne, nejspíše tedy nebude mít vliv na fenotyp onemocnění CADASIL. Ani cysteinové záměny, ani tyto tři mutace nebyly nalezeny ve velkém souboru zdravých jedinců. U zbývajících pěti pacientů, u kte- rých nebyla nalezena mutace, mohlo dojít k selhání metody – nemusela být dostatečně senzitivní, nebo mohli mít mutaci v nekódující oblasti či mohlo dojít k přestavbám genu *NOTCH3*.

V této studii byla objevena oblast silného shlukování mutací v 5' kódující oblasti genu. 32 pacientů mělo mutaci v exonu 3 nebo 4, které kódují prvních pět EGF-like repetit. Při porovnání s ostatními lidskými geny *NOTCH* se ukázalo, že tato oblast genu je mnohem méně konzervovaná (Joutel, Vahedi & Corpechot, 1997; Donahue & Kosik, 2004). Těchto 5 EGF-like repetit se liší mezi ortology genu *notch3*. Nejvíce mutací bylo nalezeno v EGF-like repetitcích 3 a 4 (Joutel, Vahedi & Corpechot, 1997). Tyto EGF-like repetice byly proto označeny jako tzv. mutační hotspots, tedy místa častějšího výskytu mutací. I skrínink genu 120 pacientů prokázal, že nejčastějším místem mutace jsou EGF-like repetice 3 a 4 - 24,2 % mutací bylo nalezeno v repetici 3 a 32,5 % v repetici 4 (Peters & Opherk, 2005).

V další studii doktorky Joutelové bylo zjištěno, že EGF-like repetice 10-11 jsou potřebné pro navázání ligandu Jagged1 a následnou signalizaci indukovanou ligandem (Joutel et al. 2004). Byl připraven konstrukt genu *NOTCH3* podle divokého typu, ale s deletovanými EGF-like repeticemi 10 – 11. Z tohoto genu translatovaný protein byl správně sestřížen a vytvořil fragmenty o velikosti 210 a 97 kDa. Tyto fragmenty se dostaly na povrch buňky v počtu relativně stejném jako fragmenty nemutovaného genu. Ale mutované receptory nenašly ligand Jagged1. V těchto buňkách pak ani nedošlo k aktivaci transkripčního faktoru RBP/Jk.



Obr. č. 4: Schéma proteinu Notch3 a znázornění nalezených mutací. Protein Notch3 obsahuje 34 EGF-like repetit, tři Notch/Lin12 repetice, transmembránovou doménu (TM) a 6 cdc10 (ankyrinových) repetit. Spodní obrázek zobrazuje 33 exonů a umístění nalezených mutací. Opakování mutací je uvedeno více body. (C = cystein, G = glycin, R = arginin, S = serin, W = tryptofan, Y = tyrosin). Převzato od Joutel et al., 1997.

To, že EGF-like repetice 10-11 jsou potřeba pro navázání ligandu, bylo prokázáno i ve studii doktora Peterse (Peters, Opherk & Zacherle, 2004). Nejdříve byl, stejně jako ve studii doktorky Joutelové z roku 2004 (viz výše), proveden experiment s receptorem Notch3 s deletovanou oblastí EGF-like

repetic 10-11 a ligandem Jagged1. Dále byly otestovány 3 rozšířené mutace způsobující onemocnění CADASIL – jedna v EGF-like repetici 4, druhá v EGF-like repetici 5 a třetí v EGF-like repetici 11. Všechny tři mutované proteiny byly exprimované na povrch buňky v podobném počtu jako nemutovaný receptor, první dvě mutace vykazovaly ligandem indukovanou aktivaci podobnou jako u proteinu Notch3 divokého typu. Ale protein s mutací v EGF-like repetici 11 vůbec nevázal ligand Jagged1, a tím nedocházelo k aktivaci ligandem indukované transkripční aktivity RBP/Jκ. Z těchto dvou studií vyplývá, že EGF-like repetice 10 a 11 zastávají v lidském proteinu Notch3 roli domény vázající ligand.

Následně byly vytvořeny konstrukty s přirozeně se vyskytujícími mutacemi způsobujícími onemocnění CADASIL – dva konstrukty s různou mutací v EGF-like repeticích 2 a 5, které jsou určeny jako místa s vyšší pravděpodobností výskytu mutací, jedna v doméně vázající ligand, tedy v EGF-like repetici 10, a dvě v dalších EGF-like repeticích – 13 a 26 (Joutel, Monet & Domenga, 2004). Pouze mutace v EGF-like repeticích 10 a 13 vykazovaly signifikantní snížení v Jagged1-indukované aktivitě transkripčního faktoru RBP/Jκ. Ostatní mutace projevovaly normální aktivitu srovnatelnou s aktivitou proteinu divokého typu. Při bližším zkoumání proteinů s mutací v EGF-like repeticích 10 a 13 se ukázalo, že jsou správně sestřižené, jsou na buněčném povrchu, ale protein s mutací v EGF-like repetici 13 tam je přítomen v signifikantně menším množství. Při pokusech s navázáním ligandu Jagged1 receptor s touto mutací navázal ligand stejně jako receptor divokého typu, ale receptor s mutací v EGF-like repetici 10 ligand nenavázal.

3.2.2 Vzácné mutace

Kromě těchto mutací, které zastupují naprostou většinu mutací způsobující onemocnění CADASIL, bylo zveřejněno několik studií o vzácnějších mutacích. Například v exonu 24, který kóduje EGF-like repetici 33, byla objevena zatím jediná mutace (Valenti et al., 2011). Tato mutace p.C1315Y mění počet cysteinových zbytků, ale pacienti nevykazují zcela typické znaky onemocnění CADASIL. Neobjevila se u nich mrtvice ani migréna. Další zřídka se vyskytující mutace jsou mutace vznikající de novo. Poprvé byla taková mutace popsána roku 2000 (Joutel, 2000). Další takovou mutaci popsal doktor Pradotto (Pradotto et al., 2012). Pacientovi byla nalezena nová mutace p.R680C v genu *NOTCH3*, ačkoliv se v jeho rodině žádné neurologické choroby nevyskytovaly. Nutno poznamenat, že u tohoto pacienta byl i průběh onemocnění CADASIL velmi atypický. Onemocnění se projevilo až v šesté dekádě života pacienta a jako první projev bylo popsáno primární intracerebrální krvácení, které ale nepatří mezi typické znaky onemocnění CADASIL. Dalšímu pacientovi bylo diagnostikováno onemocnění CADASIL v 82 letech ačkoliv průměrný věk dožití tohoto onemocnění je okolo 60. roku (Pescini et al., 2008). Byla u něj objevena záměnná mutace p.C1131W v exonu 21, i když v jeho rodině nebyly dosud popsány žádné neurologické problémy. Tato mutace byla nalezena i u pacientova syna a byla to první objevená mutace ve 21. exonu.

Dále byla objevena i mutace typu delece v intronu 3 (c.341-26_24delAAC), která vedla k onemocnění CADASIL (Bianchi et al., 2013). Tato mutace byla nalezena i u 1 asymptomatického a dvou postižených příbuzných, ale chyběla u všech nepostižených rodinných příslušníků i 120 kontrolních zdravých jedinců. Mutace vede k nevystřížení intronu, jeho translaci a vytvoření 25 aminokyselin navíc včetně jednoho cysteinu. Jiné změny v kódující oblasti nebo v sestřihových místech nebyly u těchto pacientů nalezeny, tudíž autoři předpokládají, že se jedná o kauzální patogenní mutaci. Popsány byly i malé delece v kódující oblasti vedoucí ke ztrátě několika aminokyselin včetně jednoho cysteinového zbytku – p.D80_S84del a p.R153_C155del (Dichgans et al., 2000).

Byli popsáni i 2 pacienti s nonsense mutacemi, které vedou k vytvoření předčasného stop kodónu (Rutten et al., 2013). U prvního pacienta s nonsense mutací p.R103* se objevila jen část znaků typických pro CADASIL – pacient trpěl migrénami a aurou, na magnetické rezonanci bylo pozorováno několik infarktů a další neuropatie. Biopsie kůže, která je jednou z diagnostických metod, však byla negativní na změnu struktury cévní stěny a ložisek granulárního osmiofilního materiálu. U pacientových rodičů a sourozenců se nevyskytovaly žádné neurologické problémy. Jeden pacientův sourozenec podstoupil testování na tuto mutaci. Výsledek byl pozitivní, ale v padesáti letech byl muž stále bez jakýchkoliv problémů. Druhý pacient fenotypově odpovídal diagnóze onemocnění CADASIL. Při genetické analýze byla objevena jak mutace měnící počet cysteinů na jedné alele, tak i velká intragenová posunová delece exonů 3 – 16 na alele druhé. Pacient totiž zdědil první mutaci od matky a delecii od otce. Ačkoliv si otec stěžoval na psychiatrické problémy, netrpěl mrtvicemi ani demencí a jeho kožní biopsie byla negativní. Z těchto výsledků se dá předpokládat, že alely s předčasně vloženým stop kodónem nevedou k onemocnění CADASIL.

Kromě typických heterozygotních mutací bylo popsáno i několik pacientů homozygotních pro mutaci spojenou s onemocněním CADASIL. Prvního pacienta nesoucího mutaci p.R133C homozygotně postihla první mrtvice již ve věku 28 let, což je dříve než u heterozygotních pacientů nesoucích stejnou mutaci (Tuominen et al., 2001). I jeho další symptomy byly vážnější než u pacientů nesoucích stejnou mutaci heterozygotně. Avšak pacientův starší syn, který je nositelem stejné mutace ale pouze heterozygotně, měl velmi podobný průběh onemocnění. Proto z této studie nelze soudit, zda onemocnění probíhá u homozygotů v patogenní mutaci závažněji nebo ne. Další homozygotní pacientka byla nositelkou mutace p.R578C (Liem et al., 2008). U této pacientky byly projevy onemocnění v 65 letech pouze lehké a velmi podobné projevům jejího bratra se stejnou, ale heterozygotní mutací. Sice měla horší výsledky na magnetické rezonanci vůči svému bratru, ale v porovnání s ostatními pacienty jejího věku byly tyto výsledky brány jako mírnější.

Výše popsané mutace se vždy nacházely v exonech, které kódují extracelulární část proteinu. Avšak v roce 2008 byla nalezena mutace v exonu 25 p.L1515P, který nekóduje EGF-like repetice, ale vysoce konzervovanou oblast zajišťující vytvoření heterodimeru v transmembránové části proteinu, a tím vznik fungujícího receptoru (Fouillade et al., 2008). Mutace ale nemění počet cysteinů a okolo

pacientových cév nebyl nalezen granulární osmiofilní materiál ani akumulace proteinu Notch3, což jsou významné diagnostické znaky tohoto onemocnění. Navíc tato mutace aktivuje kanonickou signální dráhu receptoru Notch3, což u žádné jiné mutace nebylo nalezeno. I přes tyto zásadní odlišnosti, pacientka s touto mutací i její matka trpěly neurologickými problémy shodujícími se s projevy onemocnění CADASIL.

3.2.4 Mutace zveřejněné v internetových databázích HGMD a LOVD

Do dnešní doby bylo v databázi mutací HGMD [online], [cit. 2014-05-07] zveřejněno 249 potenciálně patogenních mutací genu *NOTCH3*. S onemocněním CADASIL je spojena většina z nich: 206 missense mutací, které mění počet cysteinových zbytků, 16 missense mutací, které jejich počet nemění, 2 sestřihové mutace, 7 malých delecí včetně jedné v nekódující oblasti, 3 malé inserce, 1 indel mutace (současně probíhající inserce a delece) a 3 velké delece, z nichž 2 jsou spojené s fenotypem onemocnění CADASIL a jedna způsobuje nejspíše nefunkčnost proteinu (delece exonů 3-16). Popsáno je i dalších 7 missense mutací, které nemění počet cysteinových zbytků a které se neprojevují typickým fenotypem onemocnění CADASIL. Pacientům s těmito mutacemi se tvoří léze bílé hmoty mozkové, ale další příznaky onemocnění chybí. Dále je popsána i 1 nonsense mutace, která pravděpodobně vede k vytvoření nefunkčního proteinu.

V databázi LOVD [online], [cit. 2014-05-07] jsou zaznamenávány patogenní mutace genu *NOTCH3* v exonech od 1. do 23. Dosud zde bylo zveřejněno 161 mutací. Z tohoto počtu je jich nejvíce v 4. exonu – 55 mutací. Další v pořadí je 3. exon s 16 mutacemi a 5. a 8. exon s 12 mutacemi. Mutace v 1., 16. nebo 17. exonu nebyly zatím v této databázi popsány.

3.2.5 Patogenní efekt mutací

Dosud není znám mechanismus patogenity mutací. Důvodem může být jak výskyt mnoha typů mutací nejen v EGF-like doménách, tak i rozličná penetrance onemocnění. Proto existuje více domněnek, jak tyto mutace způsobují onemocnění CADASIL.

Ačkoliv mají mutace převážně stereotypní charakter, na úrovni aktivity proteinu Notch3 se projevují různě. Ve studii doktorky Joutelové (Joutel, Monet & Domenga, 2004) měly různé mutace odlišný vliv na receptor, u některých dokonce nebyla pozorována žádná změna aktivity receptoru. Ačkoliv různé mutace mohou vést k abnormální aktivitě receptoru, nemusí být tato aktivita vždy detekovaná in vitro přístupy, které byly použity v této studii. Efekt některých mutací na aktivitu receptoru se může projevit jenom v přítomnosti daných modulátorů, které nemusely být exprimované v buňkách použitých v experimentu.

Patogenita mutací se ale také nemusí projevovat ovlivňováním aktivity receptoru, ale úplně jiným mechanismem, například hromaděním extracelulárních domén proteinu Notch3 okolo buněk hladké svaloviny cév (Opherck et al., 2009). Tomu nasvědčuje zvýšené množství agregátů extracelulár-

ních domén u pacientů s onemocněním CADASIL a agregace proteinů u několika dalších nemocí, například u Parkinsonovy choroby (Narhi et al., 1999).

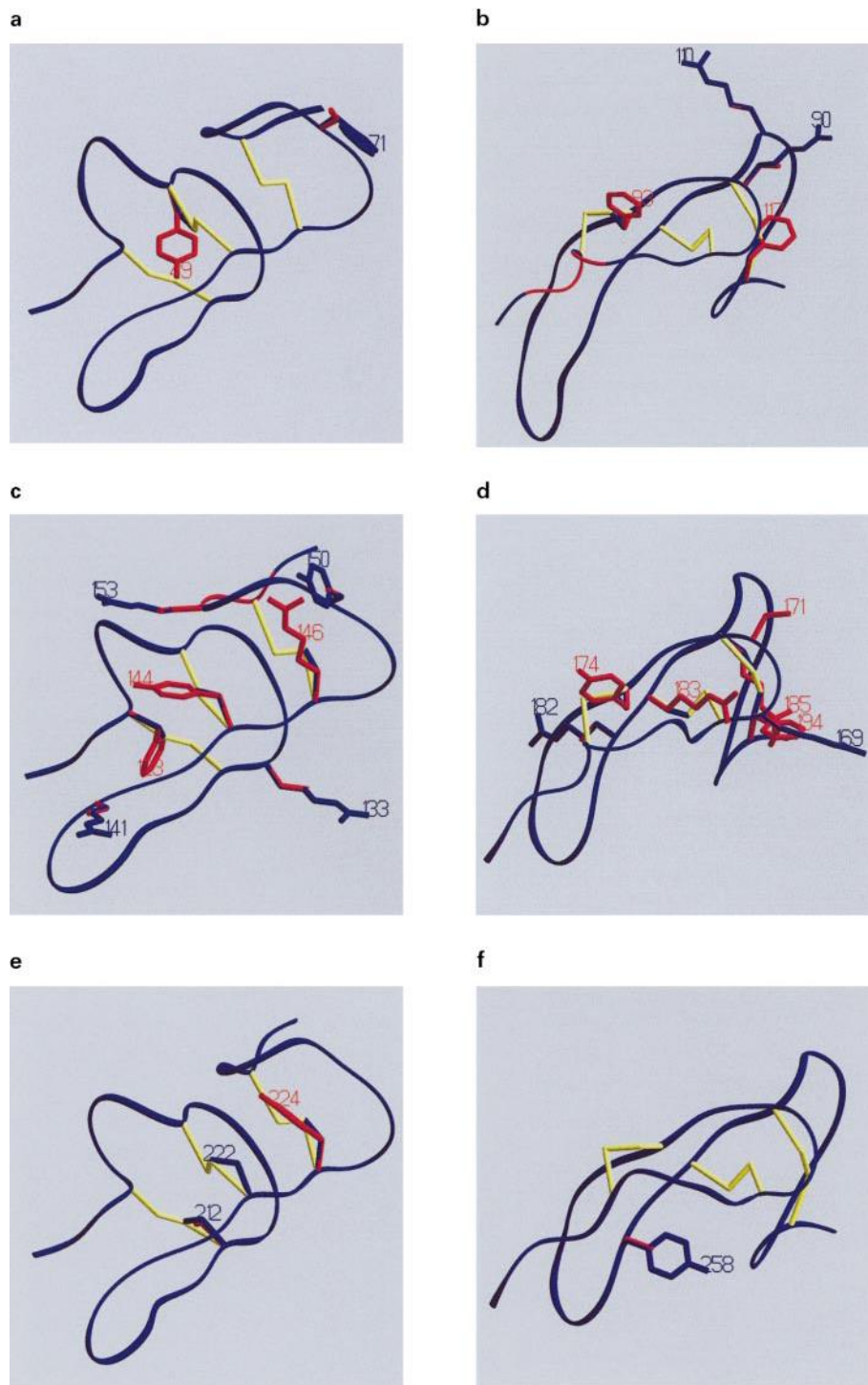
Doktor Peters zkoumal vliv některých mutací způsobujících onemocnění CADASIL na S1 štěpení proteinu Notch3 (Peters, Opherk & Zacherle, 2004). Poměry mezi 280kDa proteinem a rozštěpenými fragmenty receptoru (210 a 97 kDa) byly zvýšené v buňkách exprimujících mutovanou receptory. Navíc bylo u mutovaných receptorů Notch3 prokázáno zpoždění S1 štěpení. Po 9 hodinách inkubace se štěpícím enzymem byl protein divokého typu všechn rozštěpen. Ale většina mutovaných proteinů stále rozštěpená nebyla. Po 12 hodinách však všechny mutované receptory podstoupily S1 sestřih stejně jako nemutovaný receptor. I studie *in vitro* s využitím myšního proteinu Notch3 s mutací, která se vyskytuje často u lidí s onemocněním CADASIL, prokázal vliv testované mutace způsobující onemocnění CADASIL na S1 sestřih (Karlström et al., 2002). V buňce byl přítomen jak nesestřihovaný protein, tak sestřihované fragmenty. Tyto fragmenty se dostaly na povrch buňky, ale v menším počtu než v nemutovaných buňkách. I při analýze jiné časté mutace spojené s onemocněním CADASIL bylo zjištěno snížené množství menšího fragmentu po štěpení S1 (Haritunians et al., 2005). Mutace tedy může mít vliv na efektivitu tohoto štěpení.

Vzhledem k tomu, že nejvíce mutací vzniká v EGF-like repetičích 3 a 4, které patří mezi pět nejméně konzervovaných repetič, je pravděpodobnější, že mutace nezpůsobují ztrátu funkce proteinu, ale spíše získání nové funkce (Donahue & Kosik, 2004). Touto novou funkcí by mohl být jiný způsob sbalení proteinu vedoucí například ke zvýšené agregaci proteinu.

Jiné sbalení proteinu může být zapříčiněno chybějícím nebo přebývajícím cysteinovým zbytkem, který se podílí na tvorbě vnitřních disulfidických můstků (Dichgans et al., 2000). V proteinu divokého typu 6 cysteinových zbytků v každé EGF-like repetici tvoří 3 disulfidické můstky, které stabilizují substruktury repetice (obr. č. 2). Při lichém počtu cysteinových zbytků dojde k destabilizaci těchto substruktur, což může vést ke špatnému sbalení (obr. č. 5).

Další možností je to, že cysteiny v EGF-like repetičích se podílí na intermolekulárních propojeních s dalšími molekulami proteinu Notch3 nebo jinými proteiny obsahujícími cystein. Mutace ovlivňující počet cysteinů tedy může narušit tato propojení.

Hypotézu, že mutace způsobující onemocnění CADASIL hrají roli ve tvorbě disulfidických můstků, podporuje i další studie (Ungaro et al., 2009). Při mutační analýze velkého vzorku nemocných byly objeveny kromě mutací měnící počet cysteinů i mutace v těsné blízkosti cysteinu. Tyto mutace mohou způsobit vytvoření abnormálních disulfidických můstků a vést tak k nestabilitě proteinu a vazeb v molekule i mezi molekulami.



Obr. č. 5: 3D modely předpokládaných změn v řetězcích prvních šesti EGF-like repetit mutovaného proteinu Notch3 (a-f). Hlavní řetězec je značen modře (N-konec je vlevo), 6 cysteinových zbytků tvoří tři disulfidické můstky značené žlutě. Postranní řetězce divokého typu jsou značeny modře, mutované červeně. Červená linie v hlavním řetězci znázorňuje delecii. Znázorněné mutace: p.C49Y, p.R90C, p.C93F, p.W71C, p.R110C, p.C117F, p.C123F, p.R133C, p.R141C, p.C144S, p.C144Y, p.C146R, p.Y150C, p.R153C, p.R169C, p.G171C, p.C174Y, p.R182C, p.C183R, p.C183S, p.C185R, p.C194F, p.C212S, p.C222G, p.C224Y, p.Y258C, p.D80_S84del, p.R153_C155del. Obrázky byly vytvořené za použití programu SETOR. Převzato od Dichgans et al., 2000.

3.3 Agregace extracelulárních domén proteinu Notch3 a vznik ložisek granulárního osmiofilního materiálu

K homofilní interakci, tedy ke spojení extracelulárních domén stejného typu proteinu, dochází *in vitro* jak u divokého typu proteinu Notch3, tak i u téhož proteinu s mutacemi typickými pro onemocnění CADASIL (Opherk et al., 2009). Pokud se ale před inkubací buněk exprimujících tento protein přidá ireversibilní inhibitor zabraňující tvorbě disulfidických můstků, ke shlukování nedochází. Naopak při inkubaci s katalyzátorem tvorby disulfidických můstků se tvorba shluků zvýší. U konstrukcí s mutacemi spojenými s onemocněním CADASIL je prokázáno signifikantní zvýšení tvorby shluků extracelulárních domén proteinu Notch3 *in vitro*.

Shlukování extracelulárních domén proteinu Notch3 *in vivo* potvrdilo imunohistochemické vyšetření transgenních myši exprimujících lidský gen *NOTCH3* s mutací v EGF-like repetici 10 objevenou u pacientů s diagnostikovaným onemocněním CADASIL (Monet-Leprêtre, Bardot & Lemaire, 2009). Vyšetření s využitím monoklonální protilátky specifické k lidské extracelulární doméně proteinu Notch3 prokázalo existenci granulárních struktur okolo buněk hladké svaloviny mozkových artérií. Při použití elektronové mikroskopie byla u myši objevena ložiska granulárního osmiofilního materiálu v mozkových artériích. V lidských tkáních mozku s diagnostikovaným onemocněním CADASIL byly shluky extracelulárních domén proteinu Notch3 nalezeny v mozkových plenách a ve všech mozkových cévách - v buňkách hladké svaloviny cév (Joutel et al., 2000; Yamamoto & Craggs, 2013). Naopak monoklonální protilátky zaměřené proti intracelulárním strukturám proteinu neprokázaly žádný změněný signál oproti kontrolním vzorkům.

Shluky extracelulárních domén proteinu Notch3 se vyskytují pouze v přísně vymezené oblasti blízko ložisek granulárního osmiofilního materiálu (Joutel et al., 2000). Ale zdali jsou tyto shluky součástí GOM, není dosud objasněné. V jedné studii se protilátky proti proteinu Notch3 na GOM ne navázaly (Joutel et al., 2000), ale v jiných experimentech bylo popsáno, že se protilátky proti extracelulární doméně proteinu Notch hustě navázaly jak na povrch těchto shluků, tak i dovnitř (Ishiko et al., 2006; Yamamoto & Craggs, 2013). Všechny tyto studie se však shodují v tom, že protilátky proti intracelulární doméně proteinu se na tento materiál neváží.

Granulární osmiofilní materiál (GOM) se nachází na vnějším povrchu buněk hladké svaloviny malých cév v mozku a v hluboké vrstvě šikary u pacientů s diagnostikovaným onemocněním CADASIL (Ishiko et al., 2006). Nejvíce se vyskytuje právě v mozku (Yamamoto & Craggs, 2013). Obsahuje shluky jemných elektronově hustých granulárních částic o průměru 200 – 800 μm (Ishiko et al., 2006). Hustota označení protilátkami proti extracelulární doméně proteinu Notch3 je úměrná elektronové hustotě částic. GOM byl nalezen okolo artérií, ale okolí žil a kapilár bylo na výskyt tohoto materiálu negativní nebo pouze lehce pozitivní (Tikka, Mykkänen & Ruchoux, 2009).

GOM byl nalezen v biopsiích kůže všech testovaných 131 pacientů, u kterých byla nalezena patogenní mutace genu *NOTCH3*, a nebyl nalezen u kontrolních vzorků zdravých jedinců (Tikka,

Mykkänen & Ruchoux, 2009). U těchto vzorků nedošlo k navázání ani jednoho typu protilátek. I další studie (Brulin et al., 2002) potvrdila výskyt granulárního osmiofilního materiálu pouze u pacientů, kterým bylo diagnostikováno onemocnění CADASIL – u 20 kontrolních vzorků biopsie nebyla nalezena žádná ložiska granulárního osmiofilního materiálu, naproti tomu všech 126 cév v biopsiích pacientů s onemocněním CADASIL prokázalo degenerativní změny a GOM v extracelulárních oblastech blízko buněk hladké svaloviny.

Studie doktorky Lewandovské (Lewandovská et al. 2011) ukázala rozličné tvary ložisek granulárního osmiofilního materiálu. Největší hustota GOM byla pozorována v ložiskách blízko buněk hladké svaloviny cév nebo i v prohlubních buněčné membrány těchto buněk. Ložiska dál od těchto buněk se projevovала jako méně elektronově hustá a osmiofilní částičky v nich byly rozptýlené a někdy i sloučené s kolagenovými vlákny. Velký výskyt tohoto materiálu v prohlubních buněk hladké svaloviny i endoteliálních buněk cév potvrzuje i další studie (Markus et al., 2002). Ukázalo se, že množství GOM se liší mezi pacienty i mezi různými cévami bez ohledu na velikost cév.

Nedávné studie popisují výskyt GOM i v dalších tkáních – kromě kůže a svalů i v ledvinách a perikardu (Morrone et al., 2013).

4 Fenotyp a diagnostika onemocnění

4.1 Fenotyp onemocnění

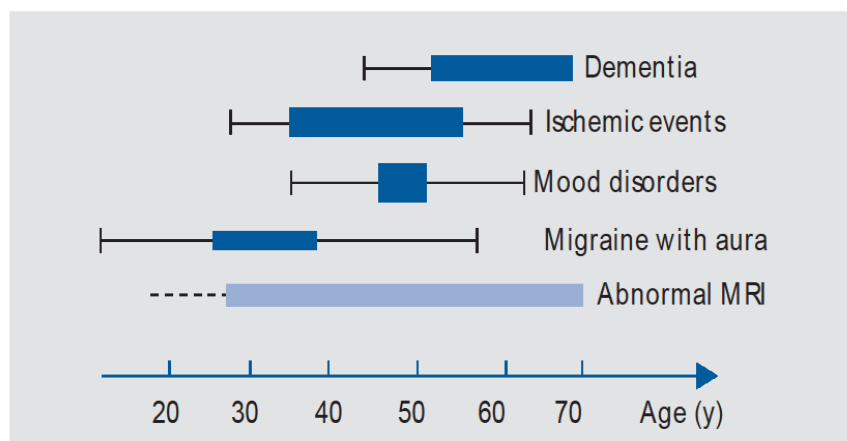
Na velkých souborech pacientů s onemocněním CADASIL bylo provedeno několik studií fenotypu (Markus et al., 2002; Desmond et al., 1999; Chabriat et al., 1995; Dichgans et al., 1998; Opherk et al., 2004; Gunda et al., 2012). Studie se zabývají převážně prvními a nejčastějšími symptomy a věkem pacientů, kdy se onemocnění projevilo. Dále je popisována délka života pacientů a doba od prvních příznaků po úmrtí. Několik studií zkoumá i rozdíl průběhu onemocnění u mužů a u žen. Toto onemocnění má velmi heterogenní průběh nejen mezi pacienty z různých rodin, ale i mezi příbuznými.

První symptomy se projevují ve třetí až čtvrté dekádě života. Nejčastěji to jsou migrény, většinou s aurou, nebo mrtvice či tranzitorní ischemické ataky (TIA). Pokud je prvním symptomem migréna, je věk nástupu spíše okolo 30. roku, naopak první mrtvice či TIA se objeví až okolo 40. roku. Méně časté počáteční symptomy bývají deprese, kognitivní poruchy či záchvaty.

V průběhu onemocnění dochází obvykle k opakujícím se mrtvicím a tranzitorním ischemickým atakám (obr. č. 4). U pacientů se projevují kognitivní poruchy vedoucí až k demenci. Toto zhoršování kognitivních funkcí bývá popisováno jako pomalé a postupné. Pacienti mají zhoršenou paměť a poruchy pozornosti, mnohdy se dostávají až do stavu apatie. Často u nich dochází k pseudobulbárnímu ochrnutí, které bývá spojené s poruchami nálad. Ty jsou velmi běžné a obvykle pouze přechodné. Váží se k tomu i patologické záchvaty smíchu nebo pláče, které také mívají pouze několikaměsíční trvání. Migrény se opakují a ve většině případů jsou doprovázeny aurou. Velká část pacientů pozoruje změny ve frekvenci migrén během roku, zvláště ve spojitosti s mrtvicemi. Výskyt migrén se zvyšuje několik měsíců před mrtvicí, po ní se frekvence opět snižuje, u některých dokonce migréna po první mrtvici vymizí. U značného množství pacientů se objevuje inkontinence. Několik pacientů trpí epileptickými záchvaty, hlavně tonicko-klonickými. Většina z těchto pacientů má diagnostikovanou demenci a prožitou alespoň jednu mrtvici. Velké množství pacientů s onemocněním CADASIL také trpí poruchami hybnosti a koordinace při chůzi. V průběhu onemocnění se stávají méně a méně pohybliví. Schopnost chůze a schopnost postarat se o sebe se zhoršuje úměrně věku. Většina pacientů nad 60 let není schopno chodit bez asistence a velká část z nich je upoutána na lůžko a vyžaduje neustálý dohled pečovatelské sestry.

Průměrný věk úmrtí se pohybuje okolo 60 let a průměrná doba od prvních symptomů po úmrtí se pohybuje v rozmezí od 10 do 25 let. Pacienti v posledních stádiích onemocnění často trpí ochrnutím poloviny těla či končetin, demencí, motorickou poruchou řeči většinou v kombinaci s poruchou polykání, mnoho z nich bývá upoutáno na lůžko a vyžaduje neustálou zdravotní péči.

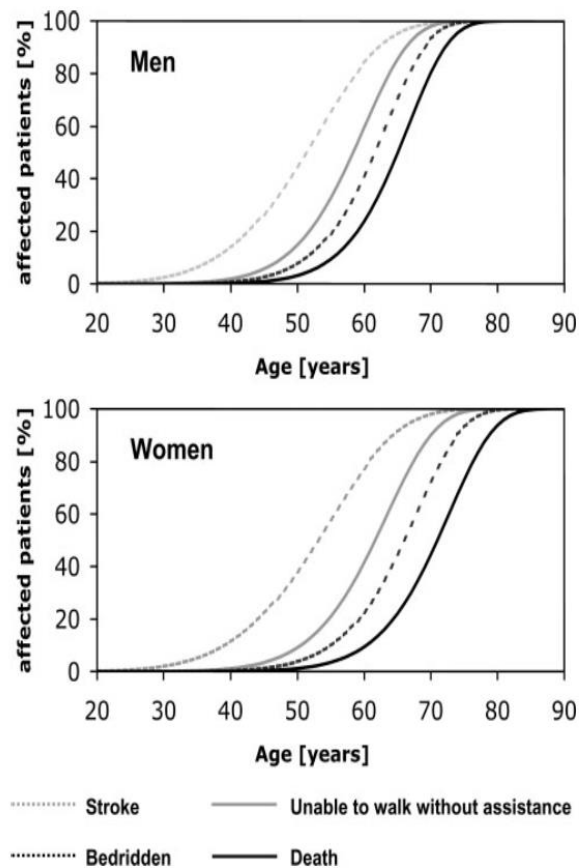
Současná léčba vychází právě z projevu pacientů, je tedy pouze symptomatická a v zásadě empirická (André, 2010, review).



Obr. č. 4: Obvyklé projevy onemocnění CADASIL v závislosti na věku pacientů, ve kterém dochází k jejich projevům. Odshora: demence, ischemické příhody, poruchy nálad, migréna s aurou a abnormální výsledky magnetické rezonance. Převzato od Chabriat & Bousser, 2007.

4.1.1 Rozdíly onemocnění v závislosti na pohlaví

Signifikantní rozdíly mezi muži a ženami byly prokázány jen v určitých projevech onemocnění (Opherk et al., 2004; Gunda et al., 2012). Výskyt migrény s aurou je u žen častější než u mužů, ale pouze u jedinců do 51. roku. Migrény se u žen navíc i projevují dříve. Do 51. roku je i frekvence mozkových příhod odlišná mezi pohlavími, ale právě u mužů je častější než u žen. Apatie je dvakrát častější u mužů nehlédě na věk. Dále se pacienti různého pohlaví liší v průměrném věku úmrtí i době, kdy se projeví neschopnost chodit bez asistence či uvázání na lůžko. Ke všem těmto projevům dochází u mužů o několik let dříve než u žen (obr. č. 5). Také demence byla u mužů častější a horší (Singhal et al., 2004). Rozdíly mezi pohlavími byly nalezeny i při magnetické rezonanci (Gunda et al., 2012). Mozková parenchymální frakce byla u mužů menší, což naznačuje vyšší mozkovou atrofií u mužů. Jiné rozdíly však nedosáhly signifikantních hodnot.



Obr. č. 5: Grafy znázorňující rozdíl nástupu cévních mozkových příhod, neschopnosti chodit bez asistence, upoutání na lůžko a smrti u mužů a žen ze souboru 411 pacientů s onemocněním CADASIL. Světlá přerušovaná čára – cévní mozková příhoda, světlá čára – neschopnost chodit bez asistence, tmavá přerušovaná čára – upoutání na lůžko, tmavá čára – smrt. Převzato od Opherk et al., 2004.

4.1.2 Korelace genotyp – fenotyp

Mezi 127 pacienty z 65 rodin bylo nalezeno 17 různých mutací, které všechny měnily počet cysteinů (Singhal et al., 2004). Ale signifikantní hodnoty nebylo dosaženo u žádného ze zkoumaných vztahů mezi pozicí mutace a výskytem mrtvice nebo TIA, migrénou, demencí, akutní encefalopatií, primární epilepsií nebo stupněm invalidity. Nebyla pozorována ani korelace mezi polohou mutace a změnami na mozku pozorovatelnými magnetickou rezonancí. Pouze pacienti s mutací v doméně vázající ligand vykazovali na výsledcích z MRI nesignifikantní zvýšení množství lézí v závislosti na věku. Tyto mutace v EGF-like repetičích 10-11 se projevovaly odlišně i v další studii (Monet-Leprêtre, Bardot & Lemaire, 2009). Pacienti s těmito mutacemi měli signifikantně odlišné výsledky neurologických vyšetření i hodnocení invalidity v porovnání s pacienty s mutacemi v EGF-like repetičích 2-5. Signifikantně se také lišili vyšším množstvím hyperintenzit bílé hmoty mozkové a nesignifikantně menším množstvím lakunárních lézí a mikrohemoragií. V jiné studii při porovnávání 8 nejčastějších mutací vůči ostatním mutacím byl pouze u dvou nalezen signifikantní rozdíl v mediánu let od prvních symptomů po smrt, ale u ostatních šesti nebyl nalezen žádný rozdíl (Opherk et al., 2004). U pacientů s první mutací v EGF-like repetici 4 byl signifikantně kratší mediánový věk první mrtvice, imobilizace

i smrti. Pacienti s druhou mutací, která byla v EGF-like repetici 2, měli signifikantně nižší mediánový věk smrti. Byl zkoumán i rozdíl ve fenotypu mezi mutacemi, při kterých dochází ke ztrátě cysteinu oproti těm, při kterých cystein vzniká. Nebyl však nalezen žádný signifikantní rozdíl v době první mrtvice, upoutání na lůžko či smrti.

Při porovnávání fenotypu mezi příslušníky různých rodin i mezi rodinami navzájem bylo zjištěno, že ischemické problémy se vyskytují ve všech testovaných rodinách (Dichgans et al., 1998). Věk pacienta v době první mozkové příhody se ale lišil jak mezi rodinami, tak i v individuálních rodinách. V 7 pokoleních jedné rodiny se tento věk lišil o více než 20 let. Migrény se vyskytovaly v 8 z 9 rodin, ve kterých bylo více jak 3 postižených. Opět se věk v době první migrény lišil mezi rodinami i mezi příbuznými. Rozsah postižení koreloval s věkem, ale lišil mezi rodinami i v rodinách. Ani v další studii nebyl nalezen žádný důkaz toho, že by se mezi příbuznými projevovala stejná mutace stejným způsobem (Singhal et al., 2004).

4.1.3 Vliv prostředí na průběh onemocnění

Při studii monozygotních dvojčat bylo objeveno, že ačkoliv sdílí stejné genetické pozadí včetně mutace v genu *NOTCH3* měnící počet cysteinů, je u nich průběh onemocnění CADASIL rozdílný (Mykkänen, Junna & Amberla, 2009). Průběh u dvojčete B byl těžší než u dvojčete A. První ischemická ataka se u něj projevila o 14 let dříve a i další symptomy i výsledky z neurozobrazovacích metod byly vážnější. Tento rozdíl může být způsoben buď epigenetickým rozdílem, nebo tím, že dvojče B byl kuřák a kratší dobu užíval statiny, což jsou léky, které se využívají k léčbě zvýšené hladiny určitých lipidů v krvi. Navíc oproti dvojčeti A měl menší fyzickou aktivitu během života.

Kromě věku je právě i kouření asociováno s vyšším výskytem mrtvice nebo TIA (Singhal et al., 2004). Dalším faktorem ovlivňujícím průběh onemocnění CADASIL může být homocystein, který koreluje s nástupem migrény.

4.2 Diagnostika onemocnění

Onemocnění CADASIL je autozomálně dominantně dědičné, proto diagnostika tohoto onemocnění vychází nejen z klinických příznaků typických pro onemocnění CADASIL, ale i z pozitivní rodinné anamnézy (Chabriat et al., 1995; Razvi et al., 2005). Alespoň u jednoho příbuzného prvního stupně by se měla projevit mrtvice nebo demence. Falešně negativní rodinná historie pak často vede k chybné diagnóze.

4.2.1 Magnetická rezonance

Hojně využívanou metodou neurozobrazování pro diagnostiku onemocnění CADASIL je magnetická rezonance (MRI), převážně T2 vážené obrazy. Bývají pozorovány mnohonásobné nebo rozptýlené hyperintenzity v bílé hmotě mozkové někdy s četnými malými subkortikálními a lakunárními infarkty, mikrohemoragií a s rozptýlenou leukoencefalopatií (Mayer, Straube & Bruening, 1999; Boom & Oberstein, 2003). Bývá pozorováno i zapojení anteriorního spánkového pólu a externí kapsu-

le (Markus et al., 2002). Hyposignály na T1 a hypersignály na T2 vážených obrazech se objevují v bílé hmotě a v bazálních gangliích (Chabriat et al., 1995). Tyto signály jsou symetrické a pozorovatelné hlavně v periventrikulární bílé hmotě a jejích lalocích a v bazálních gangliích a thalamu. Nebývají pozorovány žádné kortikální abnormality. Subkortikální léze na MRI nebo CT jsou často nalézány i u jedinců s mutací, u kterých se hlavní příznaky onemocnění ještě neprojeví. Byla pozorována i pozitivní vazba mezi věkem a zapojením externí kapsule, ale žádná spojitost mezi věkem a zapojením anteriorního spánkového pólu (Markus et al., 2002). Sensitivita MRI změn anteriorního spánkového laloku byla určena na 89 % a její specifita na 86 %. Při zkoumání změn externí kapsule byla sensitivita vyšší, tedy 93 %, a specifita naopak nižší – 45 %. Změny na mozku lze pozorovat již u presymptomatických pacientů (Fattapposta & Restuccia, 2004). Lze u nich najít malá hyperintenzivní ložiska v periventrikulární bílé hmotě mozkové na T2 vážených obrazech nebo tato hyperintenzivní ložiska spojená s malými bilaterálními hyperintenzivními oblastmi v subkortikální bílé hmotě taktéž na T2 vážených obrazech.

4.2.2 Elektronová mikroskopie vzorků z biopsie kůže

Elektronovou mikroskopií lze ve vzorcích z biopsie kůže hodnotit jak stav cév, tak výskyt granulárního osmiofilního materiálu. Postižení cévních stěn je úměrné progresi onemocnění (Brulin et al., 2002). Změny cévních stěn jsou zaznamenány již u velmi mladých (20 – 30 let) asymptomatických jedinců i u nejmladších pacientů se symptomy (31 – 39 let). Biopsie u pacientů s onemocněním CADASIL prokazují poškození stěn cév, degeneraci buněk hladké svaloviny cév, ztrátu těchto buněk i abnormality bazální laminy. GOM lze nalézt na vnější straně buněk, převážně v prohlubních na buňčném povrchu buněk hladké svaloviny cév. Endoteliální buňky také mění svůj vzhled (Brulin et al., 2002; Lackovic et al., 2008). Mají nepravidelný tvar s mnoha výběžky do subendoteliálního prostoru. Na koncích výběžků jsou často nahromaděna aktinová vlákna. Při progresi onemocnění lze pozorovat oddělení buněk hladké svaloviny cév a různé stupně jejich degenerace. Dochází k rozrušení architektury oblastí lokalizovaných mezi endotelem a buňkami hladké svaloviny.

V několika studiích bylo potvrzeno, že GOM se při analýze elektronovou mikroskopií vyskytuje u všech testovaných pacientů s mutací vedoucí k onemocnění CADASIL a nevyskytuje se u zdravých jedinců (Markus et al., 2002; Brulin et al., 2002; Tikka, Mykkänen & Ruchoux, 2009). V několika případech byla první biopsie u pacientů s onemocněním CADASIL negativní, protože ve vzorku nebyla nalezena reprezentativní artérie (Tikka, Mykkänen & Ruchoux, 2009). Při opakované biopsii byl už výsledek pozitivní. Největší množství ložisek granulárního osmiofilního materiálu lze nalézt u pacientů okolo 50 let. U nejstarších testovaných pacientů byly sice stěny arteriol tenké a špatně identifikovatelné, ale GOM byl stále přítomný. Pouze u některých starších pacientů byl tento materiál vzácný a téměř neidentifikovatelný.

U některých jedinců, kterým nebyla nalezena mutace způsobující onemocnění CADASIL, byly místo granulárního osmiofilního materiálu nalezeny buňčné úlomky mezi buňkami hladké sva-

loviny cév. Tyto úlomky mohou být zaměněny za GOM, a tak mohou vést k chybné diagnóze. Doktor Markus udává z testování 18 případů senzitivitu biopsie kůže 45%, ale specifitu 100% (Markus et al., 2002).

4.2.3 Imunohistochemie vzorků z biopsie kůže

Tým doktorů Joutelové provedl imunoznačení vzorků z kožní biopsie za účelem nalezení shluků extracelulárních domén proteinu Notch3 pomocí myších monoklonálních protilátek proti EGF-like repetitivním 17-21 u 39 pacientů, z nichž u 23 byla nalezena mutace způsobující onemocnění CADASIL analýzou všech 34 exonů, a u 16, kterým nebyla detekována kauzální mutace (Joutel et al., 2001). Jeden vzorek z 39 musel být vyřazen kvůli neprojevení imunoreaktivity vůči protilátce. K pozitivnímu nálezu došlo u 21 z 22 pacientů s onemocněním CADASIL a ostatní měli nálezy negativní. To určuje senzitivitu této metody na 96 % a specifitu na 100 %. Intenzita zbarvení vzorků se neměnila s věkem pacientů. Falešně negativní výsledek u jednoho pacienta s onemocněním CADASIL mohl být způsoben nedostatečným počtem arteriol ve vzorku. Při opakování tohoto experimentu jinou laboratoří byla snížena senzitivita metody, ale specifita zůstala velmi vysoká (Oberstein & Duinen, 2003). Opět došlo k falešně negativnímu určení výsledku, tentokrát u 2 pacientů.

4.2.4 Analýza vzorků z biopsie svalu a nervu

Ve studii doktora Schrödera byla provedena biopsie svalu a nervu sedmi jedinců s diagnostikovaným onemocněním CADASIL (Schröder et al., 2005).

Při biopsii surálního nervu (nervus suralis, senzitivní nerv v oblasti lýtky) 4 pacientů byly světelnou mikroskopií zjištěny různé neuropatie, které se mezi pacienty lišily. Všem pacientům se však s věkem snižovala hustota nervových vláken, zmenšovala se i oblast myelinového obalu surálního nervu. Častá byla atrofie axonu. Cévy na povrchu nervu vykazovaly značné deformace již při světelné mikroskopii. Měly ztenčenou stěnu. Při elektronové mikroskopii se objevila ložiska GOM na povrchu buněk hladké svaloviny cév, která se lišila jak v počtu, tak i ve velikosti. Bazální lamina endoteliálních buněk měla změněný tvar. Vnější bazální lamina arteriol byla dvojnásobná nebo i vícenásobná.

Při svalové biopsii, která byla provedena u tří pacientů, byly při světelné mikroskopii u všech tří pacientů pozorovány početné patologické změny. Byla objevena neurogenní svalová atrofie a kompenzační hypertrofní vlákna. Atrofovaná vlákna byla rozptýlena mezi vlákny normální velikosti, nekrotická svalová vlákna nebyla pozorována. NADH oxidativní reakce byla nepravidelná v mnoha vláknech, a kvůli tomu některá vlákna vykazovala laločnatý vzhled. Elektronová mikroskopie ukázala mnoho chronických změn včetně myofibrilárních a sarkotubulárních abnormalit. Na povrchu svalových buněk nebyl pozorován žádný GOM. Ale v okolí buněk hladké svaloviny cév byl tento materiál nalezen.

4.2.5 Genetická analýza a optimalizování diagnostických protokolů

Analýza všech 33 exonů genu *NOTCH3* je nejspolehlivější metodou potvrzení či vyvrácení podezření na onemocnění (Tang et al., 2009). Senzitivita této metody se pohybuje okolo 95 % a specifita 100 %. Presymptomatické genetické testování ale není příliš vyžadované ze strany rodinných příslušníků pacienta s diagnostikovaným onemocněním CADASIL (Reyes, Kurtz & Herve, 2012). Nejvíce o něj žádají ženy s vyšším vzděláním a rodinou.

Protože je kompletní genetická analýza všech 33 exonů časově náročná i finančně nákladná, většina studií doporučuje analýzu exonů, ve kterých se v dané populaci mutace vyskytují nejčastěji (Joutel et al., 2001; Peters & Opherk, 2005). Poté je pacientům, kteří vykazují symptomy onemocnění, ale v analyzovaných exonech nemají mutaci, doporučeno podstoupit biopsii kůže. Vzorek se vyšetří na výskyt GOM a v případě pozitivního nálezu se provede analýza dalších exonů nebo přímo kompletní skrínink genu. V práci doktorky Joutelové byla prováděna analýza exonů 3, 4, 11 a 18 a v práci doktorů Peterse a Opherka byly analyzovány exony 2 – 6. Další navrhovanou možností je skrínink exonu 4 a u pacientů s negativním výsledkem hledat změny na MRI, které jsou u tohoto onemocnění časté (Markus et al., 2002).

Pro klinickou praxi byla vytvořena i hodnotící stupnice onemocnění CADASIL sloužící jako nástroj pro výběr pacientů, kteří mají být podrobeni genetické analýze (Pescini et al., 2012). Stupnice zahrnuje několik typických symptomů onemocnění, kterým jsou přidělené body. Celkové maximum stupnice je 25 bodů. Pacienti s výsledkem minimálně 15 bodů jsou posláni na genetickou analýzu.

4.2.6 Preimplantační a prenatální genetická diagnostika

První preimplantační genetická diagnostika onemocnění CADASIL proběhla roku 2007 (Konialis, Hagnefelt & Kokkali, 2007). Bylo využito markerů z polymorfních krátkých tandemových repetič blízko genu *NOTCH3* a polymorfismu jednoho nukleotidu v exonu 4. Tyto markery slouží ke zvýšení informativnosti výsledků, odhalení náhodného vypadnutí alely a kontroly kontaminace. Vzorky ze 4 embryí podstoupily dvě kola polymerázové řetězové reakce. Po druhém kole a minisekvencování se ukázalo, že 1 embryo je postižené a ostatní 3 zdravé.

Prenatální genetickou diagnostiku lze provádět z choriových klků pro získání DNA plodu a periferní krve rodičů pro získání jejich DNA (Milunsky et al., 2005).

5 Závěr

Onemocnění CADASIL je autozomálně dominantně dědičné postižení cév, jehož příčinou jsou mutace v genu *NOTCH3*. První příznaky tohoto onemocnění se objevují okolo třicátých až čtyřicátých let života a nejčastějšími příznaky jsou migrény s aurou, opakující se mrtvice nebo tranzitorní ischemické ataky, kognitivní poruchy, demence, postižení řeči a chůze. Onemocnění je velmi progresivní a vede ke smrti přibližně v šesté dekádě života.

Gen *NOTCH3* patří do rodiny genů *notch*, která je konzervovaná napříč celou živočišnou říší. Tyto geny kódují transmembránové receptory, které se účastní Notch signální dráhy, čímž řídí diferenciaci buněk a vývoj organismu. U savců se vyskytují geny *notch1*, *notch2*, *notch3* a *notch4* a všechny tyto geny se podílejí na vývoji různých tkání těla. Gen *notch3* je potřeba k vytvoření funkční i strukturní integrity malých až středních distálních a mozkových artérií a reguluje prostřednictvím RhoA/Rho kinázové signální dráhy schopnost cév reagovat na mechanické faktory a změnu tlaku a proudu krve. Velké tepny ani žíly pravděpodobně neovlivňuje.

Doposud jsou mutace v genu *NOTCH3* u člověka spojené se dvěma onemocněními – dětskou fibromatózou a onemocněním CADASIL. Mutace způsobující CADASIL jsou nejčastěji jednonukleotidové missense mutace způsobující změnu počtu konzervovaných cysteinových zbytků v EGF-like repetičích proteinu Notch3. Místem nejčastějšího výskytu těchto mutací jsou EGF-like repetice 3 a 4. Je však popsáno mnoho dalších mutací lišících se od tohoto vzorce - mutace zaměňující jiné aminokyseliny než cysteiny, různé delece i dinukleotidové záměny, a dokonce i mutace v jiné části proteinu než jsou EGF-like repetice. Byly popsány i nonsense mutace, které ale pravděpodobně nevedou k projevům nemoci.

Mechanismus patogenity mutací není zatím znám a vzhledem k obrovské heterogenitě mutací bude velmi obtížné ho objasnit. Nejpravděpodobnější hypotézou je zatím to, že mutace způsobují narušení sbalení proteinu do sekundární a terciální struktury. Tomu nasvědčuje fakt, že nejvíce mutací spojených s onemocněním CADASIL mění počet cysteinových zbytků, které se podílejí na tvorbě intramolekulárních a intermolekulárních disulfidických můstků. Dalšími hypotézami je toxický efekt shluků extracelulárních domén proteinu Notch3 okolo buněk hladké svaloviny cév pacientů, ovlivnění štěpení proteinu Notch3 nebo narušená funkce receptoru Notch3.

Zvýšený výskyt shluků extracelulárních domén proteinu je spolu s výskytem GOM charakteristickým znakem onemocnění, který lze pozorovat elektronovou mikroskopií v okolí buněk hladké svaloviny cév. Přesné složení GOM však není známo. Několik studií zkoumalo, zda jsou shluky extracelulárních domén součástí GOM, ale jejich výsledky se liší. Protože se GOM vyskytuje pouze u pacientů s onemocněním CADASIL, jeho přítomnost je velmi důležitým diagnostickým znakem. Jeho výskyt se využívá i při optimalizaci diagnostického protokolu. Analýza všech exonů genu *NOTCH3* je finančně nákladná a časově náročná, a proto několik studií doporučuje provést nejdříve analýzu vy-

braných exonů a u pacientů, kterým nebyla patogenní mutace nalezena, provést biopsii kůže. Při pozitivním výsledku z biopsie, tedy nálezu GOM, je dalším krokem analýza zbývajících exonů.

Symptomy i průběh onemocnění se liší jak mezi rodinami, tak v jednotlivých rodinách. Ani u jednovaječných dvojčat neprobíhá onemocnění stejně. Pravděpodobně má tedy na průběh onemocnění vliv i prostředí. S tím souvisí fakt, že kouření je asociováno s vyšším výskytem mrtvice a zvýšená hladina homocysteinu s výskytem migrén.

Otázkami, které stále čekají na zodpovězení, jsou mechanismy patogenity mutací, penetrance onemocnění a její souvislost s typy a pozicí mutací, složení granulárního osmiofilního materiálu a přesná prevalence onemocnění. Zodpovězení těchto otázek by mohlo vést ke zlepšení diagnostiky a léčby onemocnění.

6 Seznam použité literatury

- André, C. (2010) CADASIL: pathogenesis, clinical and radiological findings and treatment, *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 68(November 2009), pp. 287–299.
- Appella, E., Weber, I. T. & Blasi, F. (1988) Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins., *FEBS letters*, 231(1), pp. 1–4.
- Artavanis-Tsakonas, S. (1999) Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development, *Science*, 284(5415), pp. 770–776.
- Barrick, D. & Kopan, R. (2006) The Notch transcription activation complex makes its move., *Cell*, 124(5), pp. 883–5.
- Bianchi, S., Dotti, M. T., Gallus, G. N., D'Eramo, C., Di Donato, I., Bernardi, L., Maletta, R., Puccio, G., Bruni, A. C. & Federico, A. (2013) First deep intronic mutation in the NOTCH3 gene in a family with late-onset CADASIL., *Neurobiology of aging*, Elsevier Ltd, 34(9), pp. 2234.e9–12.
- Boom, R. van den & Oberstein, S. L. (2003) Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy: MR Imaging Findings at Different Ages—3rd–6th Decades 1, *Radiology*, (2), pp. 683–690.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, a, Roux, P., Black, R. a & Israël, a (2000) A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE., *Molecular cell*, 5(2), pp. 207–16.
- Brulin, P., Godfraind, C., Leteurtre, E. & Ruchoux, M.-M. (2002) Morphometric analysis of ultrastructural vascular changes in CADASIL: analysis of 50 skin biopsy specimens and pathogenic implications., *Acta neuropathologica*, 104(3), pp. 241–8.
- *Campbell, I. D. & Bork, P. (1993) Epidermal growth factor-like modules, *Current Opinion in Structural Biology*, 3(3), pp. 385–392.
- Conlon, R. a, Reaume, a G. & Rossant, J. (1995) Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites., *Development (Cambridge, England)*, 121(5), pp. 1533–45.
- Desmond, D., Moroney, J., Lynch, T. & Chan, S. (1999) The natural history of CADASIL a pooled analysis of previously published cases, *Stroke*, 30(6), pp. 1230–1233.
- Dichgans, M., Ludwig, H., Müller-Höcker, J., Messerschmidt, a & Gasser, T. (2000) Small in-frame deletions and missense mutations in CADASIL: 3D models predict misfolding of Notch3 EGF-like repeat domains., *European journal of human genetics : EJHG*, 8(4), pp. 280–5.
- Dichgans, M., Mayer, M., Uttner, I., Brüning, R., Müller-Höcker, J., Rungger, G., Ebke, M., Klockgether, T. & Gasser, T. (1998) The phenotypic spectrum of CADASIL: clinical findings in 102 cases., *Annals of neurology*, 44(5), pp. 731–739.
- Domenga, V. & Fardoux, P. (2004) Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells, *Genes & Development*, 18(22), pp. 2730–2735.
- Donahue, C. P. & Kosik, K. S. (2004) Distribution pattern of Notch3 mutations suggests a gain-of-function mechanism for CADASIL, *Genomics*, 83(1), pp. 59–65.
- Ducros, A., Nagy, T., Alamowitch, S., Nibbio, A., Joutel, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Iba-Zizen, M. T., Julien, J., Davous, P., Goas, J. Y., Lyon-Caen, O., Dubois, B., Ducrocq, X., Salsa, F., Ragno, M., Burkhard, P., Bassetti, C., Hutchinson, M., Vérin, M., Viader, F., Chapon, F., Levasseur, M., Mas, J. L. & Delrieu, O. (1996) Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and

* sekundární zdroj

- leukoencephalopathy, genetic homogeneity, and mapping of the locus within a 2-cM interval., *American journal of human genetics*, 58(1), pp. 171–81.
- Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L. L., Reynolds, T. C., Smith, S. D. & Sklar, J. (1991) TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* Notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms, *Cell*, 66(4), pp. 649–661.
- Fattapposta, F. & Restuccia, R. (2004) Early diagnosis in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL): the role of MRI, *Functional neurology*, 19(4), pp. 239–42.
- Felli, M. P., Maroder, M., Mitsiadis, T. a, Campese, a F., Bellavia, D., Vacca, A., Mann, R. S., Frati, L., Lendahl, U., Gulino, A. & Screpanti, I. (1999) Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development., *International immunology*, 11(7), pp. 1017–25.
- Fiúza, U.-M. & Arias, A. M. (2007) Cell and molecular biology of Notch., *The Journal of endocrinology*, 194(3), pp. 459–74.
- Fouillade, C., Chabriat, H., Riant, F., Mine, M., Arnoud, M., Magy, L., Bousser, M. G., Tournier-Lasserre, E. & Joutel, A. (2008) Activating NOTCH3 mutation in a patient with small-vessel-disease of the brain., *Human mutation*, 29(3), p. 452.
- Gallahan, D. & Callahan, R. (1997) The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4)., *Oncogene*, 14(16), pp. 1883–90.
- Gunda, B., Hervé, D., Godin, O., Bruno, M. & Reyes, S. (2012) Effects of gender on the phenotype of CADASIL, *Stroke*, 43(1), pp. 137–41.
- Haritunians, T., Chow, T., Lange, R. P. J. De, De Lange, R. P. J., Nichols, J. T., Ghavimi, D., Dorrani, N., St Clair, D. M., Weinmaster, G. & Schanen, C. (2005) Functional analysis of a recurrent missense mutation in Notch3 in CADASIL., *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 76(9), pp. 1242–8.
- Chabriat, H. & Bousser, M. (2007) Neuropsychiatric manifestations in CADASIL, *Dialogues in clinical neuroscience*, 9(2), pp. 199–208.
- Chabriat, H., Vahedi, K., Iba-Zizen, M. T., Joutel, A., Nibbio, A., Nagy, T. G., Krebs, M. O., Julien, J., Dubois, B. & Ducrocq, X. (1995) Clinical spectrum of CADASIL: a study of 7 families. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy., *Lancet*, 346(8980), pp. 934–9.
- Chandu, D., Huppert, S. S. & Kopan, R. (2006) Analysis of transmembrane domain mutants is consistent with sequential cleavage of Notch by gamma-secretase., *Journal of neurochemistry*, 96(1), pp. 228–35.
- Chantemèle, E. De (2008) Notch3 is a major regulator of vascular tone in cerebral and tail resistance arteries, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(12), pp. 2216–2224.
- Ishiko, A., Shimizu, A., Nagata, E., Takahashi, K., Tabira, T. & Suzuki, N. (2006) Notch3 ectodomain is a major component of granular osmiophilic material (GOM) in CADASIL., *Acta neuropathologica*, 112(3), pp. 333–9.
- Iso, T., Kedes, L. & Hamamori, Y. (2003) HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway., *Journal of cellular physiology*, 194(3), pp. 237–55.
- Joutel, A. (2000) De Novo Mutation in the Notch3 Gene Causing CADASIL, *Annals of Neurology*, 47, pp. 388–391.
- Joutel, A., Andreux, F., Gaulis, S., Domenga, V., Cecillon, M., Battail, N., Piga, N., Chapon, F., Godfrain, C. & Tournier-Lasserre, E. (2000) The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients., *The Journal of clinical investigation*, 105(5), pp. 597–605.

- Joutel, A. & Corpechot, C. (1997) cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL), a mendelian condition causing stroke and vascular dementia, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 826, pp. 213–217.
- Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., Domenga, V., Cécillion, M., Marechal, E., Maciazek, J., Vayssiere, C., Cruaud, C., Cabanis, E. A., Ruchoux, M. M., Weissenbach, J., Bach, J. F., Bousser, M. G. & Tournier-Lasserre, E. (1996) Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia., *Nature*, Nature Publishing Group, 383(6602), pp. 707–10.
- Joutel, A., Favrole, P., Labauge, P. & Chabriat, H. (2001) Skin biopsy immunostaining with a Notch3 monoclonal antibody for CADASIL diagnosis, *The Lancet*, 358, pp. 2049–2051.
- Joutel, A., Monet, M. & Domenga, V. (2004) Pathogenic mutations associated with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy differently affect Jagged1, *The American journal of pathology*, 74(2), pp. 338–347.
- Joutel, A., Vahedi, K. & Corpechot, C. (1997) Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients, *The Lancet*, 350, pp. 1511–1515.
- Kalaria, R., Viitanen, M. & Kalimo, H. (2004) The pathogenesis of CADASIL: an update, *Journal of the neurological sciences*, 226(1-2), pp. 35–9.
- Karlström, H., Beatus, P., Dannaeus, K., Chapman, G., Lendahl, U. & Lundkvist, J. (2002) A CADASIL-mutated Notch 3 receptor exhibits impaired intracellular trafficking and maturation but normal ligand-induced signaling., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), pp. 17119–24.
- Konialis, C., Hagnefelt, B. & Kokkali, G. (2007) Pregnancy following preimplantation genetic diagnosis of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL), *Prenatal diagnosisdiagnosis*, 27(11), pp. 1079–1083.
- Kopan, R. & Ilagan, M. X. G. (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism., *Cell*, 137(2), pp. 216–33.
- Lackovic, V., Bajcetic, M., Sternic, N., Kostic, V., Zidverc, J., Pavlovic, A., Lackovic, M. & Kocica, M. (2008) Ultrastructural analysis of small blood vessels in skin biopsies in CADASIL, *Archives of Biological Sciences*, 60(4), pp. 573–580.
- Lawson, N. D., Scheer, N., Pham, V. N., Kim, C. H., Chitnis, a B., Campos-Ortega, J. a & Weinstein, B. M. (2001) Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development., *Development (Cambridge, England)*, 128(19), pp. 3675–83.
- Lewandowska, E., Dziewulska, D., Parys, M. & Pasennik, E. (2011) Ultrastructure of granular osmiophilic material deposits (GOM) in arterioles of CADASIL patients., *Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences*, 49(3), pp. 174–80.
- Li, L., Huang, G. M., Banta, a B., Deng, Y., Smith, T., Dong, P., Friedman, C., Chen, L., Trask, B. J., Spies, T., Rowen, L. & Hood, L. (1998) Cloning, characterization, and the complete 56.8-kilobase DNA sequence of the human NOTCH4 gene., *Genomics*, 51(1), pp. 45–58.
- Liem, M. K., Lesnik Oberstein, S. a J., Vollebregt, M. J., Middelkoop, H. a M., van der Grond, J. & Helderma-van den Enden, A. T. J. M. (2008) Homozygosity for a NOTCH3 mutation in a 65-year-old CADASIL patient with mild symptoms: a family report., *Journal of neurology*, 255(12), pp. 1978–80.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G. & Israël, a (1998) The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), pp. 8108–12.

- Maio, G. Di, Formichi, P. & Radi, E. (2012) Human peripheral blood lymphocytes and fibroblasts as Notch3 expression models, *Journal of cellular physiology*, 227(May 2011), pp. 1771–75.
- Markus, H. S., Martin, R. J., Simpson, M. A., Dong, Y. B., Ali, N., Crosby, A. H. & Powell, J. F. (2002) Diagnostic strategies in CADASIL, *Neurology*, 59(8), pp. 1134–1138.
- Martignetti, J. a, Tian, L., Li, D., Ramirez, M. C. M., Camacho-Vanegas, O., Camacho, S. C., Guo, Y., Zand, D. J., Bernstein, A. M., Masur, S. K., Kim, C. E., Otieno, F. G., Hou, C., Abdel-Magid, N., Tweddale, B., Metry, D., Fournet, J.-C., Papp, E., McPherson, E. W., Zabel, C., Vaksman, G., Morisot, C., Keating, B., Sleiman, P. M., Cleveland, J. a, Everman, D. B., Zackai, E. & Hakonarson, H. (2013) Mutations in PDGFRB cause autosomal-dominant infantile myofibromatosis., *American journal of human genetics*, The American Society of Human Genetics, 92(6), pp. 1001–7.
- Mayer, M., Straube, A. & Bruening, R. (1999) Muscle and skin biopsies are a sensitive diagnostic tool in the diagnosis of CADASIL, *Journal of neurology*, 246(7), pp. 526–532.
- Milunsky, a, Konialis, C., Shim, S. H., Maher, T. a, Spengos, K., Ito, M. & Pangalos, C. (2005) The prenatal diagnosis of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) by mutation analysis., *Prenatal diagnosis*, 25(11), pp. 1057–8.
- Monet-Leprêtre, M., Bardot, B. & Lemaire, B. (2009) Distinct phenotypic and functional features of CADASIL mutations in the Notch3 ligand binding domain, *Brain*, 132(Pt 6), pp. 1601–12.
- Morroni, M., Marzioni, D., Ragno, M., Di Bella, P., Cartechini, E., Pianese, L., Lorenzi, T., Castellucci, M. & Scarpelli, M. (2013) Role of electron microscopy in the diagnosis of cadasil syndrome: a study of 32 patients., *PloS one*, 8(6), p. e65482.
- Mumm, J. S. & Kopan, R. (2000) Notch signaling: from the outside in., *Developmental biology*, 228(2), pp. 151–65.
- Mykkänen, K., Junna, M. & Amberla, K. (2009) Different clinical phenotypes in monozygotic CADASIL twins with a novel NOTCH3 mutation, *Stroke*, 40(6), pp. 2215–2218.
- Narhi, L., Wood, S. J., Steavenson, S., Jiang, Y., Wu, G. M., Anafi, D., Kaufman, S. A., Martin, F., Sitney, K., Denis, P., Louis, J.-C., Wypych, J., Biere, A. L. & Citron, M. (1999) Both Familial Parkinson's Disease Mutations Accelerate {alpha}-Synuclein Aggregation, *J. Biol. Chem.*, 274(14), pp. 9843–9846.
- Oberstein, S. & Duinen, S. van (2003) Evaluation of diagnostic NOTCH3 immunostaining in CADASIL, *Acta neuropathologica*, 106(2), pp. 107–11.
- Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tanii, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M. & Haass, C. (2002) Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1., *The EMBO journal*, 21(20), pp. 5408–16.
- Opherk, C., Duering, M., Peters, N., Karpinska, A., Rosner, S., Schneider, E., Bader, B., Giese, A. & Dichgans, M. (2009) CADASIL mutations enhance spontaneous multimerization of NOTCH3., *Human molecular genetics*, 18(15), pp. 2761–2767.
- Opherk, C., Peters, N., Herzog, J., Luedtke, R. & Dichgans, M. (2004) Long-term prognosis and causes of death in CADASIL: a retrospective study in 411 patients, *Brain*, 127(Pt 11), pp. 2533–2539.
- Pescini, F., Bianchi, S., Salvadori, E., Poggese, A., Dotti, M. T., Federico, A., Inzitari, D. & Pantoni, L. (2008) A pathogenic mutation on exon 21 of the NOTCH3 gene causing CADASIL in an octogenarian paucisymptomatic patient., *Journal of the neurological sciences*, 267(1-2), pp. 170–3.
- Pescini, F., Nannucci, S., Bertaccini, B., Salvadori, E., Bianchi, S., Ragno, M., Sarti, C., Valenti, R., Zicari, E., Moretti, M., Chiti, S., Stromillo, M. L., De Stefano, N., Dotti, M. T., Federico, A., Inzitari, D. & Pantoni, L. (2012) The Cerebral Autosomal-Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) Scale: a screening tool to select patients for NOTCH3 gene analysis., *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 43(11), pp. 2871–6.

- Peters, N. & Opherk, C. (2005) Spectrum of Mutations in Biopsy-Proven CADASIL, *Archives of Neurology*, 62(7), pp. 1091–1094.
- Peters, N., Opherk, C. & Zacherle, S. (2004) CADASIL-associated Notch3 mutations have differential effects both on ligand binding and ligand-induced Notch3 receptor signaling through RBP-Jk, *Experimental Cell Research*, 299(2), pp. 454–64.
- Pradotto, L., Orsi, L., Daniele, D., Caroppo, P., Lauro, D., Milesi, A., Sellitti, L. & Mauro, A. (2012) A new NOTCH3 mutation presenting as primary intracerebral haemorrhage., *Journal of the neurological sciences*, Elsevier B.V., 315(1-2), pp. 143–5.
- Pui, J. C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F. G., Bakkour, S., Lee, J. Y., Kadesch, T., Hardy, R. R., Aster, J. C. & Pear, W. S. (1999) Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination., *Immunity*, 11(3), pp. 299–308.
- Razvi, S. S. M. (2005) The prevalence of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy (CADASIL) in the west of Scotland, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 76(5), pp. 739–741.
- Razvi, S. S. M., Davidson, R., Bone, I. & Muir, K. W. (2005) Is inadequate family history a barrier to diagnosis in CADASIL?, *Acta neurologica Scandinavica*, 112(5), pp. 323–6.
- Rebay, I., Fehon, R. G. & Artavanis-Tsakonas, S. (1993) Specific truncations of Drosophila Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor., *Cell*, 74(2), pp. 319–29.
- Reyes, S., Kurtz, A. & Herve, D. (2012) Presymptomatic genetic testing in CADASIL, *Journal of neurology*, 259(10), pp. 2131–6.
- Rutten, J. W., Boon, E. M. J., Liem, M. K., Dauwerse, J. G., Pont, M. J., Vollebregt, E., Maat-Kievit, A. J., Ginjaar, H. B., Lakeman, P., van Duinen, S. G., Terwindt, G. M. & Lesnik Oberstein, S. a J. (2013) Hypomorphic NOTCH3 alleles do not cause CADASIL in humans., *Human mutation*, 34(11), pp. 1486–9.
- Schröder, J. M., Züchner, S., Dichgans, M., Nagy, Z. & Molnar, M. J. (2005) Peripheral nerve and skeletal muscle involvement in CADASIL., *Acta neuropathologica*, 110(6), pp. 587–99.
- Singhal, S., Bevan, S., Barrick, T., Rich, P. & Markus, H. S. (2004) The influence of genetic and cardiovascular risk factors on the CADASIL phenotype., *Brain : a journal of neurology*, 127(Pt 9), pp. 2031–8.
- Smith, C. G., Naven, M., Harris, R., Colley, J., West, H., Li, N., Liu, Y., Adams, R., Maughan, T. S., Nichols, L., Kaplan, R., Wagner, M. J., McLeod, H. L. & Cheadle, J. P. (2013) Exome resequencing identifies potential tumor-suppressor genes that predispose to colorectal cancer., *Human mutation*, 34(7), pp. 1026–34.
- Sourander, P. & Walinder, J. (1977) Hereditary multi-infarct dementia, *Acta neuropathologica*, 254, pp. 247–254.
- Stevens, D., Hewlett, R. . & Brownell, B. (1977) Chronic Familial Vasculopathy, *The Lancet*, 309(8026), pp. 1364–1365.
- Swiatek, P. J., Lindsell, C. E., del Amo, F. F., Weinmaster, G. & Gridley, T. (1994) Notch1 is essential for postimplantation development in mice., *Genes & Development*, 8(6), pp. 707–719.
- Tang, S.-C., Jeng, J.-S., Lee, M.-J. & Yip, P.-K. (2009) Notch signaling and CADASIL., *Acta neurologica Taiwanica*, 18(2), pp. 81–90.
- Tikka, S., Mykkänen, K. & Ruchoux, M. (2009) Congruence between NOTCH3 mutations and GOM in 131 CADASIL patients, *Brain*, 132(Pt 4), pp. 933–939.
- Tournier-Lasserre, E., Iba-Zizen, M. T., Romero, N. & Bousser, M. G. (1991) Autosomal dominant syndrome with strokelike episodes and leucoencephalopathy, *Stroke*, 22(10), pp. 1297–1302.

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

Tuominen, S., Juvonen, V., Amberla, K., Jolma, T., Rinne, J. O., Tuisku, S., Kurki, T., Marttila, R., Poyhonen, M., Savontaus, M.-L., Viitanen, M. & Kalimo, H. (2001) Phenotype of a Homozygous CADASIL Patient in Comparison to 9 Age-Matched Heterozygous Patients With the Same R133C Notch3 Mutation, *Stroke*, 32(8), pp. 1767–1774.

Ungaro, C., Mazzei, R., Conforti, F. L., Sprovieri, T., Servillo, P., Liguori, M., Citrigno, L., Gabriele, a L., Magariello, a, Patitucci, a, Muglia, M. & Quattrone, a (2009) CADASIL: extended polymorphisms and mutational analysis of the NOTCH3 gene., *Journal of neuroscience research*, 87(5), pp. 1162–7.

Uyttendaele, H., Marazzi, G. & Wu, G. (1996) Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene, *Development (Cambridge, England)*, 122(7), pp. 2251–2259.

Valenti, R., Bianchi, S., Pescini, F., D'Eramo, C., Inzitari, D., Dotti, M. T. & Pantoni, L. (2011) First report of a pathogenic mutation on exon 24 of the NOTCH3 gene in a CADASIL family., *Journal of neurology*, 258(9), pp. 1632–6.

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

Weinmaster, G. (1997) The ins and outs of notch signaling., *Molecular and cellular neurosciences*, 9(2), pp. 91–102.

Weng, A. P., Ferrando, A. a, Lee, W., Morris, J. P., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S. C., Look, a T. & Aster, J. C. (2004) Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia., *Science (New York, N.Y.)*, 306(5694), pp. 269–71.

Yamamoto, Y. & Craggs, L. (2013) Brain microvascular accumulation and distribution of the NOTCH3 ectodomain and granular osmiophilic material in CADASIL, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 72(5), p. 416.

Zweifel, M. E. & Barrick, D. (2001) Studies of the ankyrin repeats of the Drosophila melanogaster Notch receptor. 1. Solution conformational and hydrodynamic properties., *Biochemistry*, 40(48), pp. 14344–56.

internetové zdroje:

Databáze HGMD. [online]. [cit. 2014-05-07].

Dostupné z: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/all.php>

Databáze LOVD. [online]. [cit. 2014-05-07].

Dostupné z: http://chromium.liacs.nl/LOVD2/variants.php?action=search_unique&select_db=NOTCH3/

Databáze OMIM: CADASIL. [online], [cit. 2014-05-06].

Dostupné z: <http://www.omim.org/125310/>

Databáze OMIM: Dětská myofibromatóza. [online], [cit. 2014-05-06].

Dostupné z: <http://www.omim.org/entry/615293/>

Orphanet: CADASIL. [online], [cit. 2014-05-06].

Dostupné z: http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=EN&Expert=136/

* sekundární zdroj