

**Klinik:** Neurologie  
Florian von Pein  
Dr. med.

## **Analyse des COL3A1-Gens in Patienten mit spontaner Dissektion zervikaler Arterien**

Geboren am 29.10.1975 in Heidelberg  
Reifeprüfung am 27.6.1995 in Heidelberg  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1997 bis WS 2003/2004  
Physikum am 24.3.1999 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Schwetzingen  
Staatsexamen am 26.04.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Neurologie  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. T. Brandt

Spontane, zervikale Dissektionen sind Einrisse in die Wand der hirnversorgenden Arterien, die bei 60-80% der Patienten zu Schlaganfällen führen. Erst in den letzten Jahren wurde durch die verbesserte Diagnostik (MRT, Ultraschall) deutlich, wie häufig Dissektionen auftreten. So sind gerade bei jungen Patienten Schlaganfälle oft durch eine Dissektion verursacht. Obwohl Dissektionen dadurch eine große klinische und volkswirtschaftliche Bedeutung aufweisen, ist deren Pathogenese noch unklar.

Die bei der Mehrzahl der Dissektionspatienten unlängst nachgewiesenen ultrastrukturellen Bindegewebsanomalien lassen einen strukturellen Defekt in der extrazellulären Matrix vermuten. Da Kollagen 3 ein wesentlicher Stabilitätsfaktor der Arterienwand darstellt, wurde in dieser Arbeit das COL3A1-Gen bei Dissektionspatienten untersucht. Es codiert für die  $\alpha 1$ -Kette des Kollagen Typ III und es ist nachgewiesen, dass Mutationen in diesem Gen beim vaskulären Ehlers-Danlos Syndrom (Typ IV) das Risiko, an einer Dissektion zu erkranken, erhöhen.

Ziel dieser Arbeit war es durch die Untersuchung der Verteilung polymorpher Bereiche im Gebiet des COL3A1-Gen sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen, herauszufinden, ob eine Assoziation zwischen bestimmten Allelen der Polymorphismen und dem Auftreten von Dissektionen besteht.

Eine früh in dieser Arbeit entdeckte Deletion in der 3'UTR des COL3A1-Gens trat zwar gehäuft in der Patientengruppe auf, war aber nicht signifikant assoziiert ( $p=0,17$ ).

Der G/A Austausch der Position 38751 und die Polymorphismen im Intron 24 und Intron 25 des COL3A1-Gens wurden in der Vergangenheit mit unterschiedlichen Ergebnissen für Assoziationsstudien benutzt, was für uns von besonderem Interesse war.

Es musste so der G/A Polymorphismus der Position 38751 erstmals lokalisiert und charakterisiert werden, da in den bisherigen Studien nur mit radioaktiver Markierung gearbeitet wurde. Die Restriktionsschnittstelle wurde auf einen bis dahin unbekanntem Sequenzbereich 4000 BP hinter dem COL3A1-Gen gefunden und es gelang die Verteilung des Polymorphismus im großen Umfang mit Hilfe der PCR und der Agarose-Gelelektrophorese zu ermitteln.

Der Intron 25-Polymorphismus konnte mit Hilfe der Kapillarelektrophorese auf den ABI Prism 310 Genetic Analyser untersucht werden. Diese sehr genaue Meßmethode wurde von uns genutzt, um erstmalig ein Verfahren zu entwickeln, mit dem nicht nur die 3 Allele im

Intron 25 gemessen werden konnten, sondern mit dem gleichen zuvor geschnittenen PCR-Fragment wurden zusätzlich die 6 Allele des VNTR-Polymorphismus im Intron 24 ermittelt. Dies ermöglichte bei dem Vergleich der beiden Fragmentlängen festzustellen, welches Allelpaar (Intron 24 und 25) auf dem jeweiligen homologen Chromosom lag. Dadurch konnte man die Allele miteinander kombiniert erfassen und erreichte mit  $3 \times 6 = 18$  Allelen eine deutlich höhere Aussagekraft.

So ergab erst die gekoppelte Analyse, dass ein Allel (267-4) fast signifikant mit dem Auftreten von Dissektionen assoziiert ( $p = 0,055$ ) ist.

Bekräftigt wurde diese Vermutung als sich herausstellte, dass das Auftreten des 267-4 Allels bei den Patienten meistens mit dem Auftreten des A-Allels gekoppelt war. Der dahinter vermutete Haplotyp 267-4, A-Allel, + (keine Deletion) trat signifikant häufiger in der Patientengruppe auf ( $p < 0,05$ ).

Das gekoppelte Auftreten der Allele 267-4, A-Allel, + wies daraufhin, dass eine Mutation im COL3A1-Gen oder dem daneben liegenden COL5A2-Gen Ursache für die ultrastrukturelle Bindegewebsanomalie sein könnte. Das Ergebnis berechtigte nun zu einer umfassenden Suche nach möglichen Mutationen in diesem Bereich.

Sequenziert wurden die Promoterregion, das C- bzw. N-Peptid Ende und das 3' Ende des COL3A1-Gens, da die Suche nach Mutationen im zentralen translatierten Bereich dieses Gens bei Patienten mit Dissektionen in früheren Untersuchungen erfolglos war. In der von uns durchgeführten Sequenzierung wurde jedoch keine Mutation gefunden, die diese Bindegewebsanomalie erklären würde. Nach Abschluss der Arbeit modifizierte sich mit der Hereinnahme von 10 weiteren Patienten die Assoziation dahingehend, dass die Assoziation der Allelkombination schwächer wurde und stattdessen die Deletion signifikant häufiger in der Patientengruppe auftrat. Nach diesem Ergebnis erscheint es nun nicht mehr sinnvoll eine zeitaufwendige Sequenzierung des Gens durchzuführen, stattdessen sollte mit Hilfe einer Linkage Analyse in einer großen erkrankten Familie die Suche nach der Mutation fortgesetzt werden oder bei Dissektionspatienten das Kollagen auf Proteinebene untersucht werden. Diese Methoden könnten in naher Zukunft dazu führen, dass die Ursache für die bei Dissektionspatienten nachgewiesene Bindegewebsanomalie gefunden wird und damit die Erforschung der Pathogenese von Dissektionen auf der molekularen Ebene einen bedeutenden Schritt vorwärts kommt.