

3. Ergebnisse

3.1. L1 CAM

Mutationen des L1 Gens können zu schwerwiegenden, neurologischen Krankheitsbildern führen, die unter der Bezeichnung CRASH-Syndrom zusammengefasst werden (Fransen et al. 1995). Zur Aufklärung molekularer Mechanismen, die zu dieser Erbkrankheit führen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zur Zelloberflächenexpression verschiedener humanpathogener L1 Mutanten durchgeführt. Darüber hinaus wurde ein Zellkulturmodell zur Untersuchung des L1-vermittelten Neuritenwachstums durch neuronale Überexpression verschiedener L1-Mutanten entwickelt. Abbildung 3 zeigt ein Domänenmodell von L1, sowie die Domänenzugehörigkeit der untersuchten Mutanten.

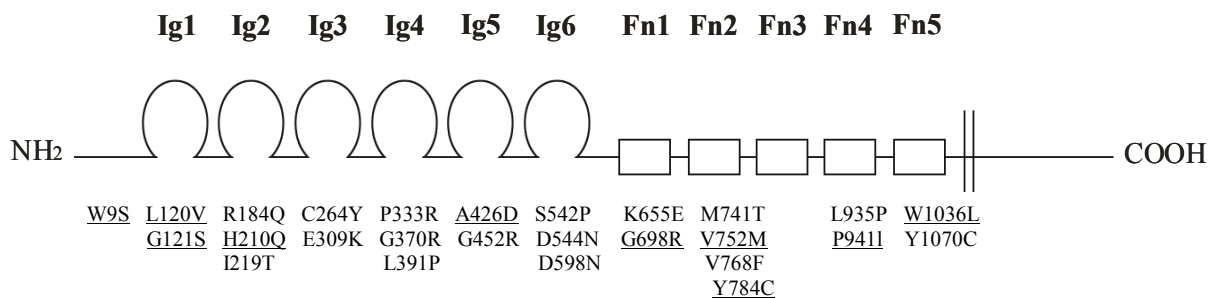


Abbildung 3 : Darstellung der Domänenzugehörigkeit der untersuchten L1-Mutanten. Aufgelistet sind alle L1-Mutanten deren Zelloberflächenexpression untersucht wurde. Solche die im Zellkulturmodell auf ihren Einfluss auf das Neuritenwachstum analysiert wurden sind unterstrichen. Die Anordnung der L1-Mutanten erfolgte gemäß ihrer Domänenzugehörigkeit. Ig-ähnliche Domänen sind durch Schleifen, FNIII-ähnliche Domänen sind durch Rechtecke dargestellt (Ig = Immunglobulin-ähnliche Domäne; Fn = Fibronectin III-ähnliche Domäne).

3.1.1. Analyse der Oberflächenexpression pathologischer L1-Mutanten

Verschiedene *missense*-Mutationen des L1-Gens betreffen Abschnitte, die eine Schlüsselposition bei der korrekten Faltung einzelner Domänen einnehmen (Bateman et al. 1996). Veränderungen dieser strukturell wichtigen Aminosäurereste können sich auf vielfältige Weise auf die Funktion eines Proteins auswirken. Dazu zählen die Destabilisierung des Proteins, Veränderungen spezifischer Liganden-Bindungsstellen, sowie eine Beeinträchtigung der intrazellulären Prozessierung, die zu einer verminderten Oberflächenexpression führen kann (De Angelis et al., 2002).

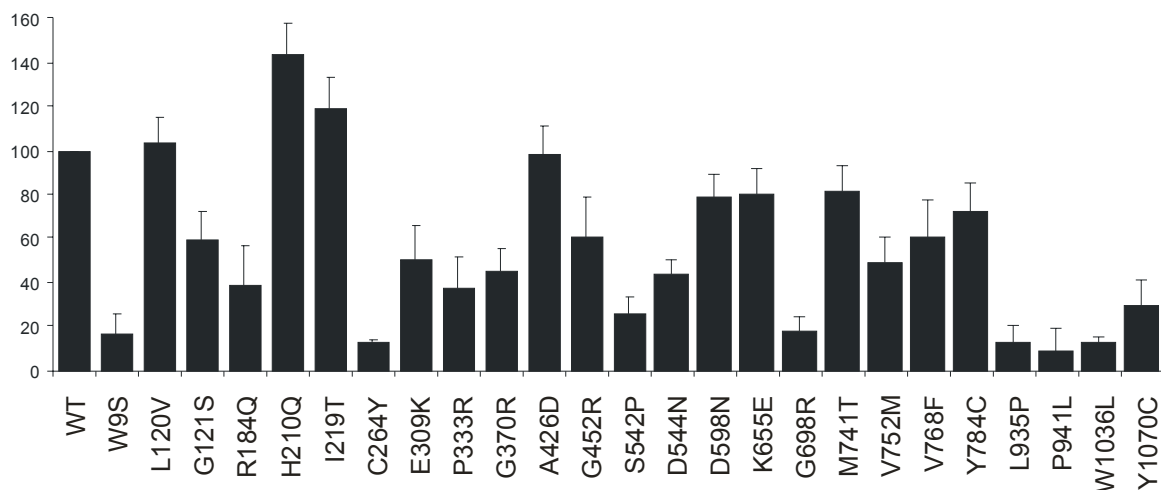
In der vorliegenden Arbeit wurden 25 verschiedene humanpathogene L1 Mutanten hinsichtlich ihrer Zelloberflächenexpression in CHO Zellen untersucht. Hierzu wurden die CHO Zellen mit cDNA-Konstrukten transfiziert, die für humanpathogene *missense*-Mutationen des L1-Proteins kodieren (De Angelis et al. 2002). Als Reporter gen wurde das Plasmid pEGFP kotransfiziert, was eine Identifikation transfizierter Zellen erlaubte. Mit Ausnahme der mutierten Aminosäure entspricht dabei die translatierte Proteinsequenz der L1-Mutanten über die gesamte Länge dem Wildtyp-L1. Die CHO Zellen wurden nach der Transfektion für 24 h kultiviert und das an der Oberfläche exprimierte humane L1-Protein mit polyklonalen Antikörpern gegen L1 und fluoreszierenden sekundären Antikörpern detektiert. Anschließend wurde die Oberflächenexpression der L1-Mutanten mit einer digitalisierten Messmethode quantifiziert. Als interne Kontrolle wurde bei diesem Experiment die L1-Mutante W9S verwendet. Diese Mutation liegt innerhalb des Signalpeptids von L1, einem Abschnitt, der die Bindung des Komplexes von mRNA und Ribosomen an das endoplasmatische Reticulum (ER) vermittelt. Für diese Mutante wurde zuvor eine besonders niedrige Oberflächenexpression in COS-7 Zellen beschrieben (De Angelis et al., 1999).

Das Balkendiagramm in Abbildung 4A zeigt die durchschnittliche Oberflächenexpression der untersuchten L1-Mutanten. Dabei zeigt sich im Vergleich zur Oberflächenexpression von L1-WT eine hohe Variabilität der ermittelten Werte für die verschiedenen L1-Mutanten. So weisen die Mutanten H210Q und I219T eine erhöhte Expression an der Zelloberfläche auf, während L120V und A426D eine dem Wildtyp vergleichbare Oberflächenexpression zeigen. Alle anderen Mutationen bewirken eine reduzierte Oberflächenexpression, die im Falle der Mutanten C264Y, L935P und W1036L nur 12% bzw. für P941L nur 9 % des Wertes für L1-WT erreicht.

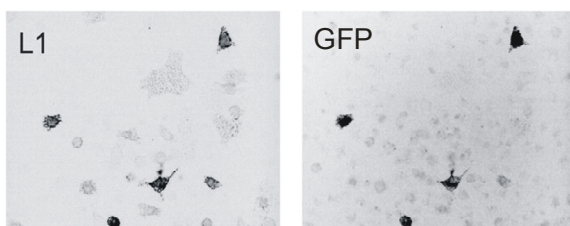
Die Abbildungen 4B-E zeigen exemplarisch Immunfluoreszenzaufnahmen analysierter CHO Zellen, die entweder eine stark reduzierte, erhöhte oder moderat reduzierte Oberflächenexpression von L1 nach Überexpression in CHO Zellen zeigen.

Die Oberflächenexpression von L1-WT wird in Abbildung 4B dargestellt. Es wird deutlich, dass jede Zelle gleichzeitig L1-WT und EGFP exprimiert. Dagegen weisen CHO Zellen, die mit der für W9S kodierenden cDNA transfiziert wurden, eine kaum detektierbare Oberflächenexpression auf (Abb. 4C). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass diese Signalpeptidmutante von L1 eine stark reduzierte Oberflächenexpression in COS-7 Zellen aufweist (De Angelis et al., 1999). Im Vergleich zum Wildtyp wird für CHO Zellen, die H210Q exprimieren, eine erhöhte Oberflächenexpression ermittelt (Abb. 4D). Die Mutation E309K ist ein Beispiel für eine Mutation, die eine moderate Verringerung der Oberflächenexpression von L1 bewirkt (Abb. 4E).

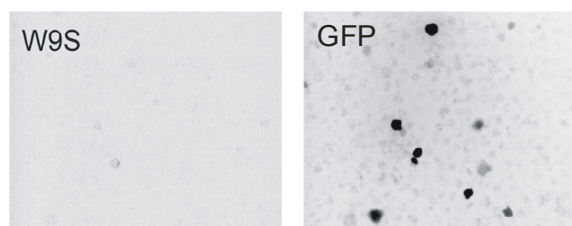
A



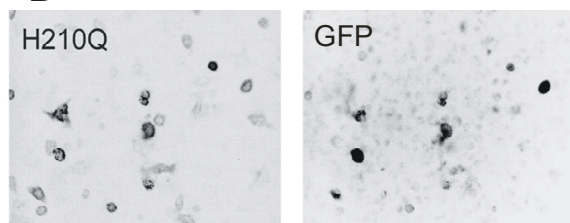
B



C



D



E

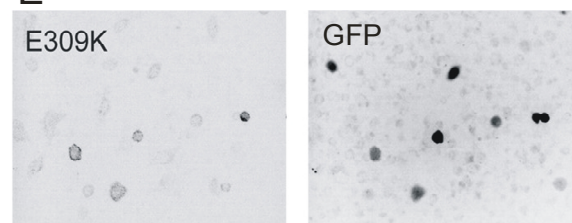


Abbildung 4 : Zelloberflächenexpression verschiedener L1-Mutanten in CHO Zellen. A) Balkendiagramm der relativen Oberflächenexpression der L1-Mutanten im Vergleich zu L1-WT. Dargestellt sind Durchschnittswerte und der Standardfehler (SEM), die von drei bis acht unabhängigen Experimenten ermittelt wurden. B) – E) Fluoreszenzaufnahmen von CHO Zellen die L1-WT (B), die Signalpeptidmutante W9S (C), H210Q (D) und E309K (E) exprimieren. Das an der Zelloberfläche exprimierte L1 wurde mit polyklonalen Antikörpern detektiert, während transfizierte Zellen durch ihre EGFP-Expression identifiziert wurden. In jedem Experiment wurde die Zelloberflächenexpression von mindestens 300 Zellen ermittelt.

Berücksichtigt man die Einteilung der L1-Mutanten in solche, die eine Veränderung der Domänenstruktur durch Mutation strukturell wichtiger Aminosäurereste bewirken (Gruppe A) und in jene, die Aminosäurereste betreffen, die an der Oberfläche des Proteins exponiert sind (Gruppe B), zeigt sich folgendes Bild: Alle Mutationen der Gruppe A weisen eine Oberflächenexpression von weniger als 75 % der Wildtyp-Expression auf. Die Werte variieren von 12 bis 72%. Dagegen weisen lediglich vier der elf untersuchten L1-Mutanten der Gruppe B eine Oberflächenexpression von weniger als 75 % auf. Die Mutanten L120V, H210Q und I219T zeigen sogar eine erhöhte Oberflächenexpression im Vergleich zu L1-WT auf. Diese Beobachtungen werden in der folgenden Tabelle 1 zusammengefasst.

Gruppe A		Gruppe B	
G121S	59 (13,5)	L120V	103 (12,1)
R184Q	39 (17,2)	H210Q	144 (14,1)
C264Y	12 (2,4)	I219T	119 (13,9)
P333R	37 (13,9)	E309K	50 (15,5)
G370R	45 (10,5)	A426D	98 (13,9)
G452R	61 (17,5)	D544N	44 (6,5)
S542P	26 (7,6)	D598N	79 (10,2)
G698R	18 (6,3)	K655E	80 (11,6)
V752M	49 (11,1)	M741T	81 (12,0)
V768F	61 (16,9)	P941L	9 (10,3)
Y784C	72 (13,4)	Y1070C	29 (11,9)
L935P	12 (8,5)		
W1036L	12 (3,0)		

Tabelle 1: Zelloberflächenexpression von L1-Mutanten in CHO Zellen. Zusammenfassung der ermittelten Werte für die relative Oberflächenexpression der L1-Mutanten. Unter Gruppe A werden Mutationen eingeordnet, für die Auswirkungen auf die Domänenstruktur vorhergesagt wurden. Unter Gruppe B werden Mutationen eingeordnet, für die eine Beeinflussung der Oberflächeneigenschaften einzelner Domänen vermutet wird. Diese können z.B. zur Veränderung der Affinität zu bestimmten Liganden führen. Es sind jeweils die Bezeichnungen der Mutanten, die prozentuale durchschnittliche Oberflächenexpression im Vergleich zu L1-WT und der Standardfehler (SEM) angegeben.

Diese Ergebnisse bezüglich der Oberflächenexpression der untersuchten L1-Mutanten lassen zwei Schlussfolgerungen zu:

1) Bestimmte Mutationen des L1-Gens führen zu einer reduzierten Oberflächenexpression von L1 in CHO Zellen. Dies bietet einen Erklärungsansatz für die neurologischen Krankheitsbildern bei Trägern dieser Mutationen.

2) Mutante L1-Proteine, die eine dem L1-WT entsprechende oder verstärkte Oberflächenexpression aufweisen, führen durch Mechanismen zur Ausbildung des CRASH-Syndroms, die nicht auf eine reduzierte Oberflächenexpression zurückzuführen sind. Diese Mutanten weisen vermutlich ein eingeschränktes homo- und/oder heterophiles Bindungsverhalten aus, das zu neurologischen Schädigungen führt.

Um die Auswirkungen von Mutationen des L1-Gens auf Neuronen zu untersuchen wurde ein Zellkulturmodell entwickelt, das weitere Erkenntnisse bezüglich des homophil vermittelten Neuritenwachstums erbringen sollte.

3.1.2. Entwicklung eines Zellkulturmodells zur Funktionsanalyse pathologischer L1 Mutanten

Aufgrund der besonderen Bedeutung von L1 während der Entwicklung des Nervensystems und insbesondere beim Auswachsen von Axonen, wurden die Auswirkungen humanpathogener L1-Mutationen auf das Neuritenwachstum embryonaler Neurone untersucht. Hierzu wurden E7 Tektum-Neuronen aus dem Huhn mit verschiedenen L1-Mutanten transfiziert und deren Neuritenlängen nach einer Kultivierungsdauer von 20 h gemessen (Abb. 5A). Als Auswuchssubstrat wurde das L1-Hühnerhomolog NgCAM verwendet, welches aus dem adulten Hühnerhirn durch Affinitätschromatographie isoliert wurde (Abb. 5B). Aufgrund der Konservierung funktionell wichtiger Bereiche zwischen NgCAM und L1 CAM sind diese beiden Moleküle in der Lage zu interagieren. Diese homophile Interaktion führt zu einem verstärkten Längenwachstum von Neuriten (Lemmon et al., 1989). Zur Bestimmung der Konzentration von NgCAM, die zu einer signifikanten Steigerung des Neuritenwachstums im Vergleich zu Poly-L-Lysin (PLL) führt, wurden verschiedene Konzentrationen von NgCAM als Substrat für embryonale E7 Tektum-

Neuronen angeboten, die mit cDNAs für L1-WT und EGFP ko-transfiziert wurden (Abb. 5A). Dabei ist bereits eine Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ NgCAM ausreichend, um eine signifikante Steigerung des Neuritenwachstums im Vergleich zu PLL zu bewirken (Abb. 5C + D).

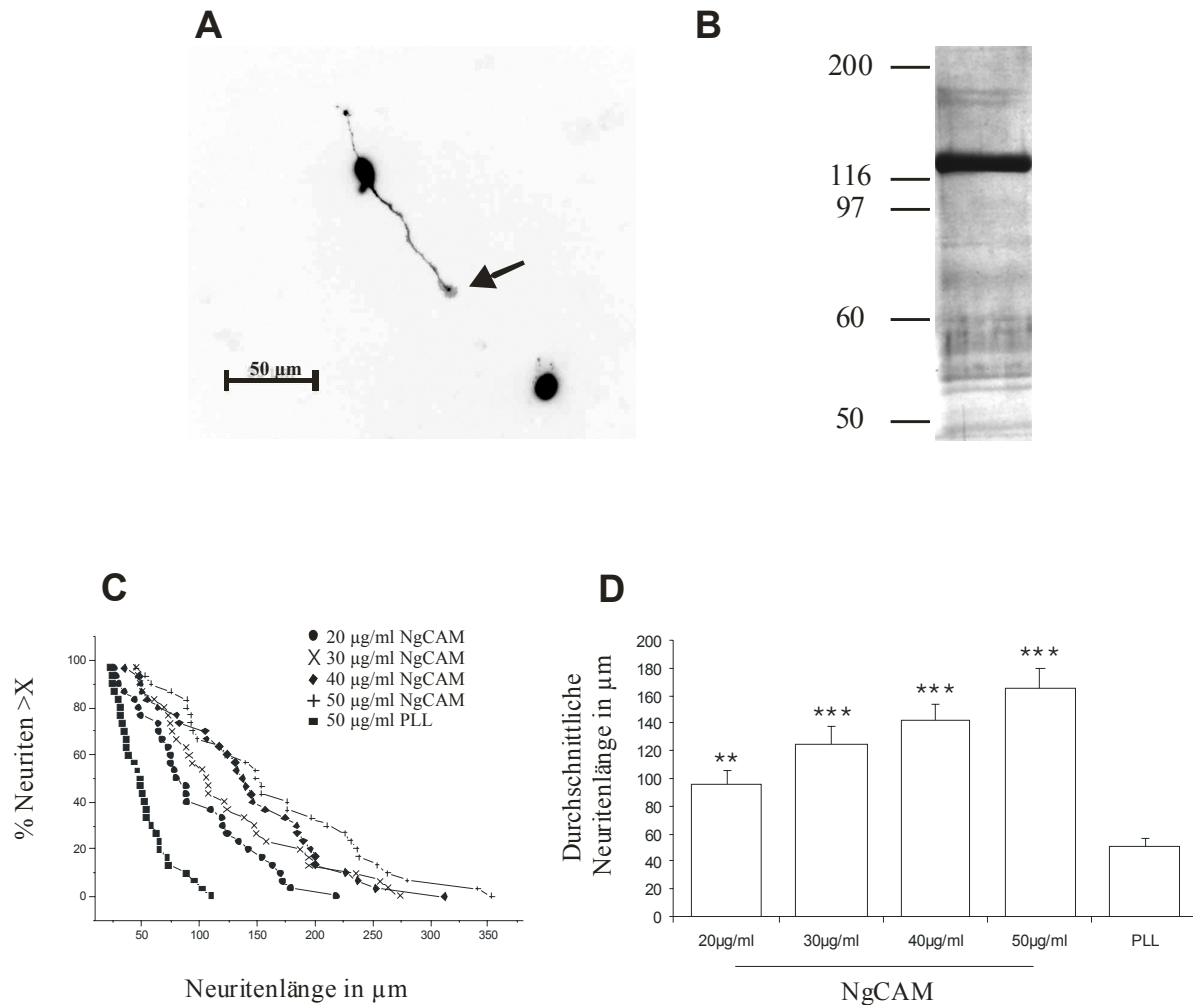


Abbildung 5: Entwicklung eines Zellkulturmodells zur Analyse des homophilen, L1-vermittelten Neuritenwachstums A) Beispiel für ein Neuron, das mit cDNAs für L1-WT und EGFP transfiziert wurde. Dargestellt ist die EGFP-Fluoreszenz eines transfizierten Neurons. Das Signal ist im Zellsoma, in den Neuriten und im Wachstumskegel auswachsender Neuriten sichtbar (Pfeil). B) NgCAM, das zu L1 homologe Protein im Huhn wurde über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Zur Überprüfung der aufgereinigten Fraktion wurde sie über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend einer Silbernitratfärbung unterzogen. Es wurde ein Protein von 140 kD isoliert, was der erwarteten Größe von NgCAM entspricht. Bei etwa 180 kD ist ein für NgCAM charakteristisches Bandenduplett sichtbar. Das NgCAM wurde photometrisch vermessen und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. C) Verteilungskurve zur Darstellung der Neuritenlänge von E7 Tektum-Neuronen in Abhängigkeit der Konzentration des angebotenen affinitätsgereinigtem NgCAMs. Der Prozentsatz der gemessenen Neuriten einer gegebenen Länge (vertikale Achse) wurde gegen die Neuritenlänge (horizontale Achse) aufgetragen. Als Kontrolle wurde der Neuritenauswuchs auf 50 $\mu\text{g/ml}$ PLL gemessen. D) Das Balkendiagramm stellt die durchschnittliche Neuritenlänge \pm Standardfehler (SEM) dar. Die statistische

Auswertung wurde mit dem Mann-Whitney U Test durchgeführt (* $p = < 0,05$; ** $p = < 0,005$; *** $p = < 0,0001$).

3.1.3. NgCAM induziert als angebotenes Substrat das Neuritenwachstum L1 - transfizierter embryonaler Tektum-Neuronen

Das affinitätsgereinigte NgCAM wurde als Substrat für den Neuritenwachstumsversuch in einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Diese Konzentration wurde als ausreichend angesehen, da bereits 20 $\mu\text{g/ml}$ eine signifikante Steigerung des Neuritenwachstums bewirken (Abb. 5C + D). Zur Kontrolle, ob das beobachtete Neuritenwachstum tatsächlich über eine Wechselwirkung von dem angebotenen Substrat und dem überexprimiertem L1 vermittelt wird, wurde der Neuritenauswuchs von Neuronen untersucht, die gleichzeitig das Reportergen EGFP und L1-WT bzw. nur EGFP exprimierten. Durch diesen Versuch sollte sichergestellt werden, dass das Neuritenwachstum vorrangig durch die Überexpression von L1 vermittelt wird und nicht durch endogenes NgCAM welches ebenfalls ein homophil vermitteltes Neuritenwachstum mit dem verwendeten Substrat bewirkt. Die Abbildung 6A zeigt die durchschnittliche Neuritenlänge der EGFP- (58,19 $\mu\text{m} \pm \text{SEM } 4,1$) und EGFP + L1-WT- (85,44 $\mu\text{m} \pm \text{SEM } 5,4$) exprimierenden Neuronen. In Abbildung 6B wurde eine kumulative Verteilungskurve der gemessenen Neuritenlängen abgebildet.

Die durchschnittliche Neuritenlänge von Neuronen, die mit EGFP transfiziert wurden beträgt 68,11 % des Wertes, der für das Neuritenwachstum von Neuronen mit L1-WT + EGFP ermittelt wurde. Damit ergibt sich eine Steigerung des L1-induzierten Neuritenwachstums um 31,89 %. Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass die Überexpression von humanen L1 in transfizierten Neuronen des Huhns eine signifikante Steigerung des Neuritenwachstums bewirkt, die deutlich über der von endogenem NgCAM liegt.

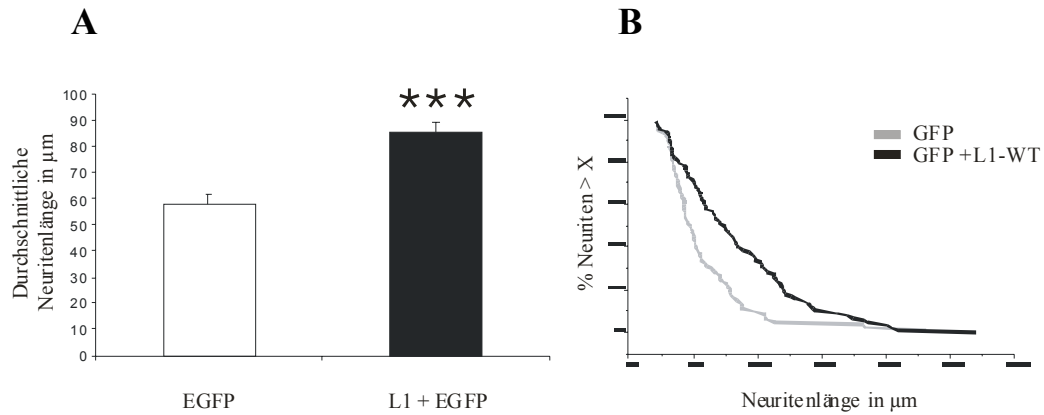


Abbildung 6: Analyse der Stimulierung des Neuritenwachstums durch überexprimiertes humanes L1.

A) Darstellung der durchschnittlichen Neuritenlänge von E7 Tektum-Neuronen, die mit cDNAs für EGFP bzw. EGFP + L1-WT transfiziert wurden. Neuronen, die das Reportergen GFP überexprimieren weisen eine deutlich geringere Neuritenlänge auf als Neuronen, die GFP und gleichzeitig humanes L1 überexprimieren. Die statistische Auswertung wurde mit dem Mann-Whitney U durchgeführt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$). B) Kumulative Verteilungskurve der gemessenen Neuritenlängen. Der Prozentsatz der gemessenen Neuriten einer gegebenen Länge (vertikale Achse) wurde gegen die Neuritenlänge (horizontale Achse) aufgetragen.

Zur weiteren Charakterisierung des Assays wurden als nächstes zwei L1-Konstrukte getestet, für die eine reduzierte Funktion des homophil-vermittelten Neuritenauswuchs erwartet wurde.

3.1.4. Die Signalpeptid-Mutante W9S und die nicht-neuronale L1-Isoform Δ E2 bewirken ein vermindertes Neuritenwachstum transfizierter Neurone

Als zusätzliche interne Kontrollen wurden Neuronen mit den cDNAs für W9S und Δ E2 transfiziert. W9S ist eine Mutation innerhalb des Signalpeptids, die den Transport der mRNA zum endoplasmatischen Reticulum (ER) beeinträchtigt und dadurch zu einer stark reduzierten Oberflächenexpression von L1 in CHO und COS-7 Zellen führt (De Angelis et al., 1999; 2002). Mit Δ E2 wird eine alternativ gespleißte nicht-neuronale L1-Isoform bezeichnet, die auf Schwann- Zellen und Leukozyten exprimiert wird. Dieser nicht-neuronalen Isoform fehlt das Exon 2 welches für eine Peptidsequenz von 6 Aminosäuren kodiert (YEGHHV). Δ E2-Fc Fusionsproteine binden mit geringer Effizienz an L1-WT und zeigen eine geringe Fähigkeit zur Stimulation des Neuritenwachstums. Gleichzeitig weist Δ E2 nach Transfektion in Körnerzellen des Cerebellums eine dem L1-WT vergleichbare Oberflächenexpression auf (De Angelis et al., 2001; Jacob et al., 2002). Aus diesen Gründen stellt die Transfektion von W9S und Δ E2 eine geeignete interne Kontrolle dar, die ein reduziertes Längenwachstum der Neuriten in diesem Assay bewirken sollte.

Tatsächlich weisen Neuronen die mit W9S bzw. Δ E2 transfiziert wurden eine reduzierte Neuritenlänge im Vergleich zu Neuronen auf, die mit L1-WT transfiziert wurden. Die Graphen in Abbildung 7 verdeutlichen diese Unterschiede durch die Darstellung der kumulativen Verteilung der gemessenen Neuritenlängen. In der Tabelle 2 wird die relative, durchschnittliche Neuritenlänge im Vergleich zu L1-WT in Prozent dargestellt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass dieser Assay geeignet ist, durch homophile L1-Interaktion vermitteltes Neuritenwachstum zu analysieren. Allerdings erreichen Neuronen, die W9S exprimieren, eine im Vergleich zu L1-WT relativ hohe durchschnittliche Neuritenlänge (82,21 %). Vergleicht man diesen Wert mit der Neuritenlänge der Neuronen, die ausschließlich EGFP exprimieren (s. Abb. 6A), zeigt sich für W9S eine verstärkte Stimulation des Neuritenwachstums. Dies lässt vermuten, dass die Oberflächenexpression von W9S in Neuronen nicht vollständig verhindert wird. Das Ergebnis für Δ E2 erweitert die Resultate der angesprochenen Studien. Es zeigt zum ersten mal, dass eine neuronale Überexpression dieser Spleißvariante Auswirkungen auf das Neuritenwachstum hat.

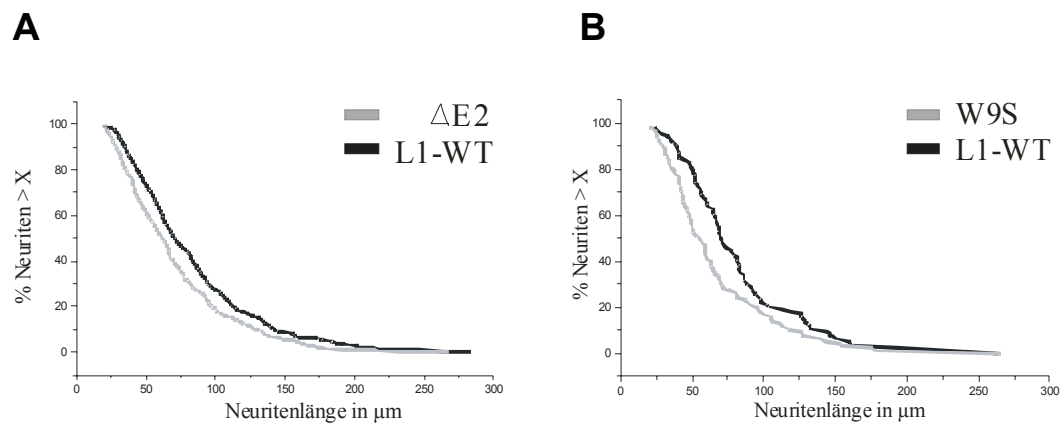


Abbildung 7: Vergleich der kumulativen Verteilung der Neuritenlängen von Neuronen, die W9S bzw. L1-WT (A) und $\Delta E2$ bzw. L1-WT (B) exprimieren. Die Ergebnisse werden durch kumulative Verteilungskurven dargestellt. Der Prozentsatz der gemessenen Neuriten einer gegebenen Länge (vertikale Achse) wurde gegen die Neuritenlänge (horizontale Achse) aufgetragen.

L1-WT	$\Delta E2$	W9S
100%	85,17***	82,21***
SEM	(2,12)	(2,34)
n	376	400
p	< 0,0001	< 0,0001

Tabelle 2: Darstellung der zu L1-WT relativen durchschnittlichen Neuritenlänge von Neuronen die $\Delta E2$ bzw. W9S exprimieren. Der Standardfehler (SEM) ist in Klammern angegeben. n entspricht der Anzahl gemessener Neuriten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U Test (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0001$).

3.1.5. Untersuchungen zur Induktion des Neuritenauswuchs durch L1-Mutanten der Gruppe A

Als nächstes wurden humanpathogene L1-Mutationen der Gruppe A untersucht. Hierbei handelt es sich um Mutationen, die Schlüsselpositionen bei der Aufrechterhaltung der Domänenstruktur betreffen.

Für G121S und Y784C konnten keine signifikanten Unterschiede der induzierten Neuritenlänge im Vergleich zu L1-WT festgestellt werden (Abb. 8A + D). Die L1-Mutanten G698R und V752M wiesen eine leichte Reduzierung der durchschnittlichen Neuritenlänge auf (Abb. 8B + C). Ein hoch signifikanter Unterschied der durchschnittlichen Neuritenlänge wurde bei der Mutante W1036L festgestellt (Abb. 8E). Die durchschnittliche Neuritenlänge erreicht bei dieser Mutante lediglich 77,92 % im Vergleich zu L1-WT. Die kumulative Verteilung der Neuritenlängen der L1-Mutanten G121S, G698R, V752M, Y784C und

W1036L im Vergleich zu L1-WT wird in der Abbildung 8 dargestellt. Die Tabelle 3 gibt eine Zusammenfassung über die durchschnittlichen Neuritenlängen, deren Signifikanz, sowie der Anzahl der gemessenen Neuriten.

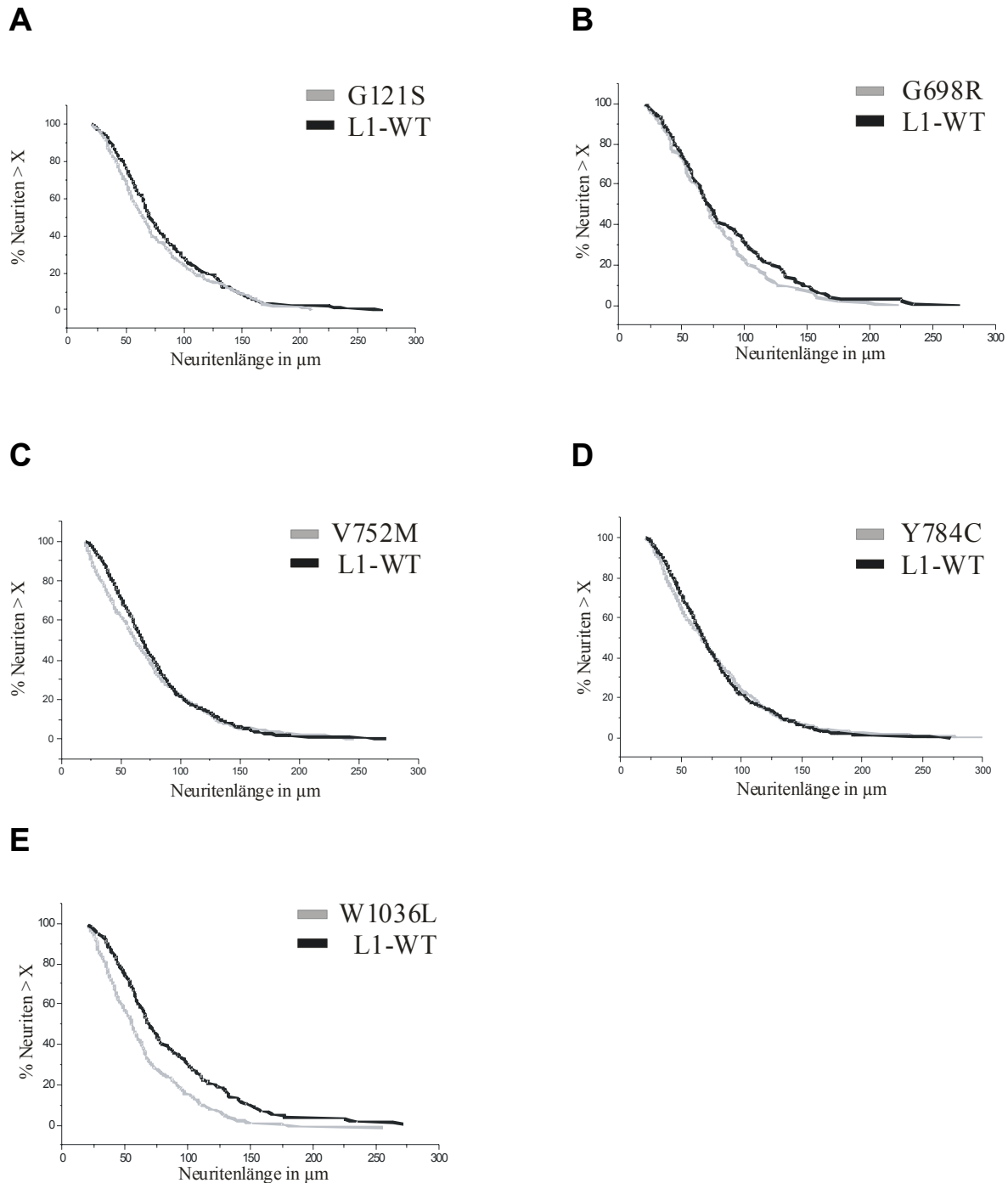


Abbildung 8: A) – E) Kumulative Verteilungskurven von L1-Mutanten der Gruppe A im Vergleich zu L1-WT. Der Prozentsatz der gemessenen Neuriten einer gegebenen Länge (vertikale Achse) wurde gegen die Neuritenlänge (horizontale Achse) aufgetragen.

L1-WT	G121S	G698R	V752M	Y784C	W1036L
100%	92,2 %	88,59 % *	95,52 % *	99,76 %	77,09 % ***
SEM	(2,75)	(2,28)	(2,57)	(2,33)	(2,29)
n	246	276	310	403	254
p	0,0738	0,0141	0,0140	0,4213	< 0,0001

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse für Mutanten der Gruppe A. Die ermittelten Werte für die durchschnittliche Neuritenlänge transfizierter Neuronen wurde im Vergleich zu L1-WT in Prozent angegeben. Die Signifikanz der ermittelten Unterschiede wurde mit dem Mann-Whitney U Test berechnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$). Der Standardfehler wird in Klammern angegeben (SEM). n entspricht der Anzahl der gemessenen Neuriten.

3.1.6. Untersuchungen zur Induktion des Neuritenauswuchs durch L1-Mutanten der Gruppe B

Die Mutationen der Gruppe B betreffen Aminosäurereste, die an der Oberfläche des L1-Proteins exponiert sind. Daher geht man bei humanpathogenen Mutationen dieser Art davon aus, dass sie die Ligandenbindung beeinflussen. Es wurden vier verschiedene L1-Mutanten untersucht. Es folgt die Darstellung der Ergebnisse durch kumulative Verteilungskurven, die das Neuritenwachstum der L1-Mutanten im Vergleich zu L1-WT darstellt. Dabei zeigen alle Mutanten eine statistisch signifikant verminderte Stimulation des Neuritenwachstums im Vergleich zu L1-WT. In der Tabelle 4 werden die ermittelten Werte zusammengefasst.

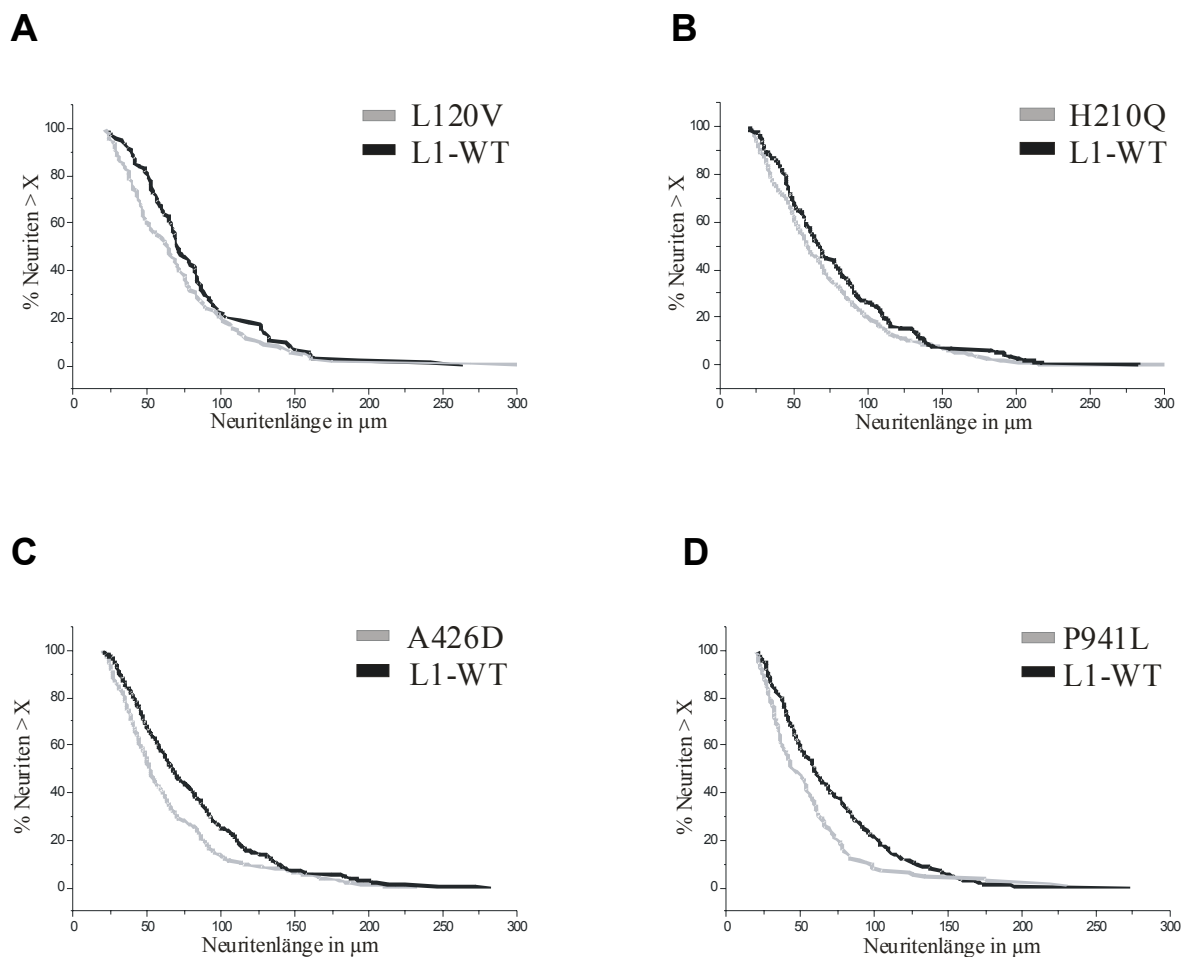


Abbildung 9: Kumulative Verteilung von L1-Mutanten der Gruppe B im Vergleich zu L1-WT. Die Verteilung der Neuritenlängen von Neuronen die L1-Mutanten exprimieren, wird durch eine graue Kurve dargestellt, die Verteilung der Neuritenlängen von L1-WT exprimierenden Neuronen in schwarz. Die Neuritenlänge (vertikale Achse) wurde gegen die Anzahl der gemessenen Neuriten aufgetragen (horizontale Achse).

L1-WT	L120V	H210Q	A426D	P941L
100%	89,73 *	89,42 *	81,77 ***	80,07 ***
SEM	(1,86)	(2,58)	(2,5)	(2,26)
n	445	294	272	272
p	0,021	0,0117	< 0,0001	< 0,0001

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse für Mutanten der Gruppe A. Die ermittelten Werte für die durchschnittliche Neuritenlänge transfizierter Neuronen wurde im Vergleich zu L1-WT in Prozent angegeben. Die Signifikanz der ermittelten Unterschiede wurde mit dem Mann-Whitney U Test berechnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$). Der Standardfehler wird in Klammern angegeben (SEM). n entspricht der Anzahl der gemessenen Neuriten.

Die Untersuchungen zur Stimulation des Neuritenwachstums durch L1-Mutanten führten im wesentlichen zu folgenden Beobachtungen:

1) In der Gruppe A bewirkt die Mutante W1036L eine hoch signifikante Verminderung des Neuritenauswuchs im Vergleich zu L1-WT. Eine moderate Reduzierung der Stimulation des Neuritenwachstums transfizierter Neurone wurde für die L1-Mutanten G698R und V752M festgestellt. Die Expression der Mutanten G121S und Y784C in Neuronen führt zu keinem verminderten Neuritenwachstum.

2) Alle untersuchten L1-Mutanten der Gruppe B induzieren einen signifikant reduzierten Neuritenauswuchs im Vergleich zu L1-WT. Die Mutanten A426D und P941L haben einen hoch signifikant negativen Effekt auf das Neuritenwachstum, während die Mutanten L120V und H210Q eine moderate Verminderung der durchschnittlichen Neuritenlänge bewirken.

Es gelang für acht der zehn untersuchten humanpathogenen L1-Mutanten, eine Auswirkung auf das Auswuchsverhalten von Neuronen *in vitro* zu demonstrieren. Das Balkendiagramm in Abbildung 10 zeigt ein Zusammenfassung aller ermittelten Werte für die durchschnittliche Neuritenlänge von Neuronen, die mit verschiedenen L1-Mutanten, sowie den internen Kontrollen transfiziert wurden.

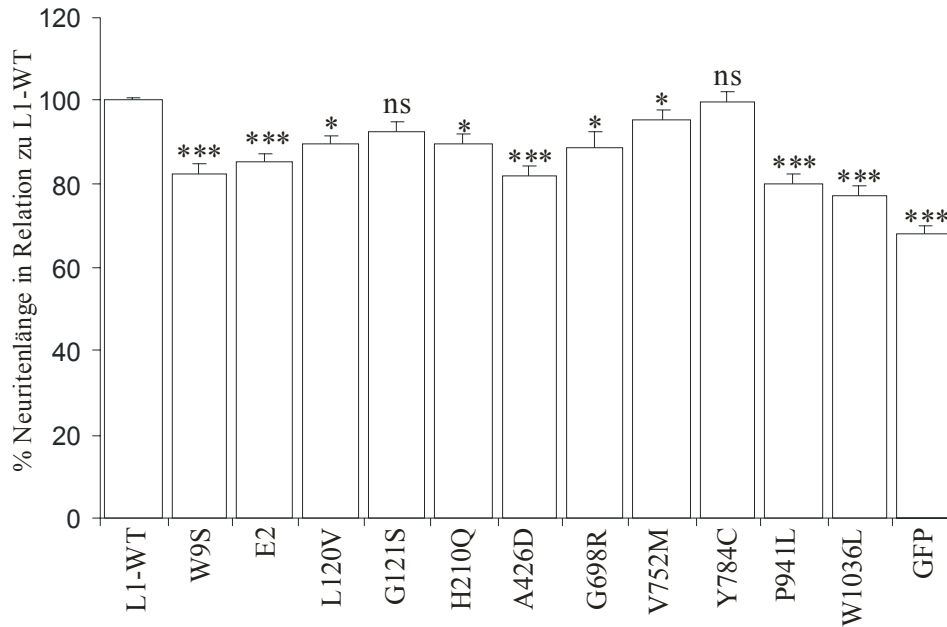


Abbildung 10: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen relativen Neuritenlänge untersuchter L1-Mutanten im Vergleich zu L1-WT. Es wurden zehn humanpathogene Mutationen des L1-Gens durch Überexpression in primären Tektum-Neuronen des Huhns untersucht. Zusätzlich sind die Werte für L1-WT und für GFP alleine, welches als Reporter gen kotransfiziert wurde angegeben. Als interne Kontrollen diente die Signalpeptid-Mutation W9S und die nicht neuronale L1-Isoform Δ E2. Die statistische Auswertung wurde mit dem Mann-Whitney U durchgeführt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$). Die Standardabweichung (SEM) wird über die Fehlerbalken dargestellt.