

## 4. Diskussion

### 4.1. L1 CAM

Bisher wurden über 140 verschiedene L1-Mutationen bei Patienten gefunden, die Symptome des CRASH-Syndroms aufweisen (<http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/l1/>). Viele dieser Mutationen führen zu einer Verschiebung des Leserasters oder zu einem vorzeitigen Transkriptionsabbruch, was in beiden Fällen zu einer Abwesenheit von L1 auf der Zelloberfläche führt. Etwa ein Drittel aller beschriebenen L1-Mutationen sind *missense* Mutationen. Durch welche Mechanismen diese Mutationen zur Ausbildung des CRASH-Syndroms führen ist weitgehend unbekannt.

In diesem Teil der Arbeit wurde die Zelloberflächenexpression von 25 humanpathogenen *missense*-Mutanten des L1-Zelladhäsionsmoleküls untersucht, die sich über 10 von 11 extrazellulären Domänen verteilen. Die Ergebnisse zeigen, dass L1-Mutanten zu unterschiedlichem Maße auf der Zelloberfläche von CHO Zellen exprimiert werden. Darauf hin wurde eine Auswahl dieser Mutanten bezüglich ihrer Auswirkungen auf das Neuritenwachstum *in vitro* analysiert. Dabei wurden exemplarisch Mutanten untersucht, die eine starke, moderate oder keine Reduzierung der Zelloberflächenexpression in CHO Zellen aufwiesen. Hier wiesen solche Mutanten, für die eine besonders niedrige Oberflächenexpression in CHO-Zellen ermittelt wurde, ein vermindertes Neuritenwachstum im Vergleich zum Wildtyp-L1 auf.

#### 4.1.1. Oberflächenexpression von L1-Mutanten in CHO Zellen

Zur Untersuchung der Oberflächenexpression wurden verschiedene L1-Mutanten in CHO Zellen exprimiert. Eine zuvor veröffentlichte, theoretische Studie zur Abschätzung der Domänenstruktur von L1, teilt die L1-Mutationen in zwei Gruppen ein. Die Gruppe A umfasst Mutationen, die zu einer Konformationsänderung bzw. zu einer Denaturierung einzelner Domänen führen, Mutationen der Gruppe B verändern deren Oberflächeneigenschaften. (Bateman et al., 1996).

Im allgemeinen geht man davon aus, dass verschiedene Kontrollmechanismen dazu beitragen, dass fehlgefaltete Proteine entweder nach deren Translation im ER zurückgehalten werden oder aus anderen Zellkompartimenten ins ER zurück transportiert werden (Aridor et al., 1999). Schließlich erfolgt die Eliminierung durch Proteasomen, falls die hierfür bestimmten Proteine durch Ubiquinierung markiert wurden. Das L1-Protein wird, wie alle

Mitglieder der IgSF-Familie durch Glykosylierungen der extrazellulären Domänen posttranslational modifiziert. Diese Modifikationen werden sequentiell im ER und im Golgi-Apparat durchgeführt. Diverse Untersuchungen belegen die Bedeutung der Glykosylierung für den intrazellulären Transport zur Zelloberfläche, der Proteinstabilität, sowie für die Ligandenbindung der extrazellulären Domänen von Oberflächenproteinen (Carchon et al., 1999; Jaeken et al., 1991).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen für alle Mutationen der Gruppe A eine verminderte Oberflächenexpression (s. Abb. 4). Dabei variiert die Expression der einzelnen L1-Mutanten an der Zelloberfläche mit Werten zwischen 12 % und 72 % im Vergleich zur Wildtyp-Expression. Offensichtlich führen die Mutationen zu einer partiellen Retention des mutanten Proteins in zytoplasmatischen Zellkompartimenten. Dies wird belegt durch die Studie von De Angelis und Kollegen, die auch Teile der vorliegenden Arbeit enthält. Hier zeigte sich, dass 10 von 14 Mutanten der Gruppe A im ER lokalisierten, während vier der Mutanten eher im Zytoplasma und an der Oberflächen nachgewiesen wurden (De Angelis et al., 2002). Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen unterstützen diese Beobachtungen. Eine Analyse der Oberflächenexpression der L1-Mutanten R184Q und D544N in Astrozyten und Neuronen weist darauf hin, dass diese das ER nach erfolgter N-Glykosylierung verlassen, jedoch keine weitere Modifikation der Glykosylierung im Golgi-Apparat erfolgt. Dies führt zu einer reduzierten Expression an der Oberfläche der untersuchten Zellen. Es erfolgt allerdings keine Degradierung dieser Proteine durch Proteasomen (Moulding et al., 2000). Eine andere Arbeit untersuchte drei Mutationen der Domäne Ig2 (I179S, R184W, Y194C) und eine der Domäne Ig3 (C264Y). Die Mutanten R184W und C264Y wiesen ein unvollständiges Glykosylierungsmuster und eine stark reduzierte Oberflächenexpression in NIH-3T3 Zellen auf. Die beiden anderen waren vollständig glykosyliert und wurden wie das Wildtyp-L1 an der Zelloberfläche exprimiert (Michelson et al., 2002). Für die in diesen Studien untersuchten Mutanten C264Y und D598N wurde auch in der vorliegenden Arbeit eine reduzierte Oberflächenexpression ermittelt, die 12 bzw. 79 % der Wildtyp-Expression erreichte.

Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass L1-Mutanten an verschiedenen Kontrollpunkten der intrazellulären Prozessierung zu unterschiedlichem Maße zurückgehalten werden, und dadurch eine physiologische Zelloberflächenexpression verhindert wird. Dabei könnte die Art und Position der Mutation das Gleichgewicht zwischen der Zelloberflächenexpression und der Retention in zytoplasmatischen Kompartimenten bestimmen.

Mutationen der Gruppe B verändern die Oberflächeneigenschaften der betroffenen Domänen. Die Analyse der Zelloberflächenexpression ergab, dass 7 von 11 Mutanten der Gruppe B eine Expression von 9 – 81 % der Wildtyp-Expression an der Zelloberfläche aufwiesen. Die Mutanten P941L und Y1070C zeigen mit 9 % bzw. 29 % Oberflächenexpression die niedrigsten Werte. Diese Reduzierung wird nicht durch proteosomalen Abbau, sondern durch eine teilweise Retention im ER und im Zytoplasma bewirkt (De Angelis et al., 1999). Wahrscheinlich wirken sich diese Mutationen, in ähnlicher Weise auf die intrazelluläre Prozessierung aus, wie es für Mutanten der Gruppe A vermutet wird. Dagegen wurden die Mutanten L120V, H210Q, I219T und A426D entweder genauso wie L1-WT oder sogar stärker auf der Zelloberfläche exprimiert. Die Lokalisation in COS-7 Zellen entsprach dabei in allen Fällen der Wildtyp-Verteilung (De Angelis et al., 1999). Träger dieser Mutationen entwickeln ein abgemildertes Krankheitsbild, das nach diesen Ergebnissen nicht auf eine unzureichende Präsenz von L1 während der Entwicklung des ZNS zurückzuführen ist. Vielmehr muss für diese Mutationen eine Beeinträchtigung der Ligandenbindung postuliert werden.

#### **4.1.2. Etablierung eines Zellkulturmodells zur Analyse der Auswirkungen humanpathogener L1-Mutanten auf das Neuritenwachstum**

In diesem Teil der Arbeit untersuchte ich die Auswirkungen von neun humanpathogenen *missense*-Mutationen auf das Neuritenwachstum primärer Neuronen. Zu diesem Zweck wurden Neuronen aus dem optischen Tektum von E7 Hühnerhirn dissoziiert und mit cDNAs transfiziert, die für mutante L1-Proteine kodieren. Den transfizierten Neuronen wurde affinitätsgereinigtes NgCAM als Substrat für das Neuritenwachstum angeboten. NgCAM ist das zu L1 orthologe Protein im Huhn und es wurde gezeigt, dass diese beiden Proteine über homophile Interaktion das Wachstum von Neuriten fördern (Lemmon et al., 1989).

Die biologische Aktivität des isolierten NgCAMs wurde gegenüber tektalen Neuronen getestet. Hierfür wurden Neuronen mit cDNAs für humanes L1 und EGFP kotransfiziert und deren Neuritenlängen ermittelt. Es zeigte sich, dass alle L1-positiven Zellen EGFP exprimierten und *vice versa*. Die Auswertung dieses Versuchs ergab eine Steigerung des Neuritenwachstums transfizierter Neuronen in Abhängigkeit der Konzentration von NgCAM, was dessen biologische Aktivität bewies (s. Abb. 5).

Da tektale Neuronen eine endogene NgCAM Expression aufweisen, wurde als nächstes untersucht, ob die Überexpression von humanen L1 in diesen Zellen eine signifikante Steigerung des Neuritenwachstums bewirken kann (s. Abb. 6) Zu diesem Zweck wurden Neuronen mit humanen L1 und EGFP kotransfiziert. Als Kontrolle erfolgte die Transfektion ausschließlich mit EGFP. Hierbei zeigte sich, dass Neuronen, die nur EGFP exprimierten eine durchschnittliche Neuritenlänge aufwiesen, die 68,11 % der Neuritenlängen von Neuronen entsprach, die L1 und EGFP exprimierten. Dieses Neuritenwachstum wird als Resultat der homophilen Interaktion von endogenen NgCAM mit dem Substrat angesehen. Dies bedeutet, dass die Überexpression von humanen L1 in tektalen Neuronen eine Steigerung des Neuritenwachstums von 31,89 % bewirkt. Eine weitere Beobachtung ergab, dass die Expression von EGFP geeignet ist die Morphologie der auswachsenden Neuriten einschließlich der Wachstumskegel darzustellen. Aus diesem Grund wurde in den zukünftigen Experimenten eine immunzytologische Detektion von humanen L1 nur noch zu Kontrollzwecken durchgeführt. Dieses Vorgehen verhinderte auch, dass sich Zellen während der Waschschriffe der immunzytologischen Detektion ablösen, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen könnte, da die untersuchten L1-Mutanten unterschiedliche Adhäsionseigenschaften zum Substrat aufweisen könnten.

Zur weiteren Charakterisierung dieses Zellkultursystems wurden zunächst zwei cDNA-Konstrukte transfiziert, für die eine Auswirkung auf das Neuritenwachstum angenommen wurde (s. Abb. 7). Dabei handelte es sich um das Plasmid pcDNA- $\Delta$ E2, das für eine nicht-neuronale Isoform von L1 kodiert, für die eine reduzierte Fähigkeit zur homophilen Interaktion berichtet wurde (De Angelis et al., 2001), sowie um das Plasmid pcDNA-W9S das für die L1-Signalpeptidmutante W9S kodiert, für die eine stark reduzierte Oberflächenexpression in COS-7 Zellen gezeigt wurde (De Angelis et al. 1999). Die Transfektion der Konstrukte führte in beiden Fällen zu einem hoch signifikant negativen Effekt auf das Neuritenwachstum im Vergleich zu L1-WT.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die entwickelte Methode geeignet ist, um die Auswirkungen der neuronalen Überexpression von humanen L1 in tektalen Hühnerneuronen auf das Neuritenwachstum zu untersuchen.

### 4.1.3. Auswirkungen der Überexpression von L1-Mutanten der Gruppe A auf das Neuritenwachstum tektaler Neurone

Von den fünf untersuchten L1-Mutanten der Gruppe A wurden für die Mutanten G121S und Y784C keine signifikanten Unterschiede der induzierten Neuritenlänge im Vergleich zu L1-WT festgestellt. Die L1-Mutanten G698R und V752M weisen eine leichte Verringerung der durchschnittlichen Neuritenlänge auf. Ein hoch signifikanter Unterschied der durchschnittlichen Neuritenlänge wird bei der Mutante W1036L festgestellt (s. Abb. 8).

Für die Mutanten G121S und Y784C konnten in diesem Testsystem keine signifikante Wirkung festgestellt werden. Aufgrund der Untersuchungen hinsichtlich deren subzellulären Lokalisation in COS-7 Zellen, sowie deren homo- und heterophilen Bindungseigenschaften an TAX-1 bzw. L1-konjugierten fluoreszierenden Kügelchen, überraschen diese Ergebnisse. Beide Mutanten weisen eine Retention im ER von COS-7 Zellen, sowie eine reduzierte Fähigkeit zur homo- und heterophilen Bindung auf (De Angelis et al., 1999; 2002). Aufgrund der vorhergesagten Auswirkungen auf die Domänenstruktur, sowie einer dadurch bedingten Verminderung der Oberflächenexpression sollte man einen stärkeren Effekt auf das Neuritenwachstum vermuten. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass bereits eine gewisse Mindestmenge von L1 an der Zelloberfläche dazu ausreicht, ein Neuritenwachstum zu unterstützen. Berücksichtigt man die Ergebnisse der Oberflächenexpression von L1-Mutanten der Gruppe A in CHO Zellen zeigt sich, dass die Mutanten G121S und Y784C, die im Vergleich zu L1-WT keine Unterschiede im Neuritenwachstum bewirkten, eine Oberflächenexpression von 59 bzw. 72 % im Vergleich zu L1-WT aufweisen. Dagegen wird eine schwach signifikante Verminderung der Neuritenlänge durch G698R und V752M bewirkt, die eine Oberflächenexpression von 18 bzw. 49% erreichen. Ein hoch signifikanter Effekt auf die Neuritenlänge zeigt die Mutante W1036L, die mit 12 % im Vergleich zu L1-WT, die geringste Oberflächenexpression der in Gruppe A eingeordneten Mutanten in CHO Zellen aufweist.

Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass in dem untersuchten System ein bestimmter Schwellenwert von L1 auf der Zelloberfläche erreicht werden muss, um eine dem L1-Wildtyp entsprechende Stimulation des Neuritenwachstums zu gewährleisten. Dieser Schwellenwert müsste demnach bei einer Expression von mehr als 49 % der Wildtyp-Expression liegen, da dieser Wert bei der Mutante V752M zu einer signifikanten Veränderung der Neuritenlänge führt. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass diese Mindestmenge auch von der Art der Mutation abhängt. Diese Interpretation der Ergebnisse setzt allerdings voraus, dass die

Oberflächenexpression in CHO Zellen auf neuronale Zellen übertragen werden kann. Für eine Übertragbarkeit der Daten spricht, dass die L1-Mutanten R184W und D598N nach Adenovirus-vermittelter Infektion eine reduzierte Expression in granulären Cerebellumneuronen aufweisen (Moulding et al., 2000). Dieser Effekt wird auch in der vorliegenden Arbeit für die Zelloberflächenexpression in CHO Zellen beobachtet.

#### **4.1.4. Auswirkungen der Überexpression von L1-Mutanten der Gruppe B auf das Neuritenwachstum tektaler Neurone**

Dieser Teil der Arbeit untersuchte die Auswirkungen von L1-Mutanten auf das Neuritenwachstum, für die eine Veränderung der Oberflächeneigenschaften betroffener Domänen postuliert wurde. Diese Veränderungen können zu einer Beeinflussung der Bindungsaktivität an homo- und heterophile Liganden bewirken (Bateman et al., 1996).

Alle vier untersuchten Mutanten wiesen im Vergleich zu L1-WT eine reduzierte durchschnittliche Neuritenlänge auf (s. Abb. 9). Dabei muss aufgrund der experimentellen Anordnung davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Unterschiede auf eine verminderte Fähigkeit zur homophilen Interaktion zurückzuführen sind. Versuche zur homophilen Bindung bestätigen diese Vermutung für die Mutanten H210Q und A426D deren Fähigkeit zur homophilen Bindung erheblich reduziert ist. Eine moderate bzw. leichte Reduktion wird für die Mutante P941L beobachtet, während L120V keine Veränderung gegenüber dem Wildtyp aufweist (De Angelis et al., 1999). Die Ergebnisse bezüglich der Zelloberflächenexpression zeigen für die Mutanten eine hohe Variabilität im Vergleich zu L1-WT. Für die Mutante P941L, die mit 9 % die geringste Oberflächenexpression aufweist, kann nicht unterschieden werden, ob die verminderte Stimulation des Neuritenwachstums durch ein eingeschränktes homophiles Bindungsverhalten, die fehlende Oberflächenexpression oder einer Kombination dieser beiden Faktoren hervorgerufen wird. Dagegen muss für die Mutanten L120V und A426D unter Berücksichtigung der Zelloberflächenexpression eine direkte Auswirkung auf das homophile Bindungsverhalten mit dem angebotenen Substrat angenommen werden. Das gleiche gilt für die Mutante H210Q, die eine erhöhte Zelloberflächenexpression in CHO Zellen aufweist. Die homophile Interaktion in *trans* zwischen in den in Neuronen exprimierten L1-Mutanten und dem als Substrat angebotenen NgCAM wird demnach in Abhängigkeit der untersuchten Mutante zu unterschiedlichem Maße beeinflusst. Diese Interaktion könnte allerdings durch endogene Expression von L1-

Liganden in den untersuchten Neuronen beeinflusst werden. Hier ist in erster Linie NgCAM zu nennen, das vermutlich neben einer *trans*-Interaktion mit L1, in *cis* Homomultimere ausbilden kann (Siletti et al., 2000). Jedoch zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Überexpression von L1-WT den endogenen Effekt von NgCAM auf das Neuritenwachstum weit übertrifft. Die homophile Interaktion von NgCAM kann auch durch *cis*-Wechselwirkungen mit Axonin-1 modifiziert werden (Fitzli et al., 2000). Weitere Moleküle, die als L1-Liganden in der *cis*-Ebene beschrieben wurden sind Neuropilin-1, NCAM, CD9, CD24 und bFGFR (Castellani et al., 2002; Kadmon et al., 1990; Schmidt et al., 1996; Kadmon et al., 1995; Williams et al., 1994). Es ist jedoch fraglich, ob diese Moleküle signifikant mit dem homophil vermittelten Neuritenwachstum der überexprimierten L1-Mutanten mit NgCAM interferieren.

Letztlich führen die zwei unabhängigen Analysen über die Oberflächenexpression und die Stimulation des Neuritenwachstums zu folgenden Beobachtungen:

- 1) Mutanten, die in CHO Zellen eine stark reduzierte Zelloberflächenexpression aufweisen, sind nach Überexpression in Neuronen am wenigsten in der Lage ein homophil-vermitteltes Neuritenwachstum zu unterstützen.
- 2) Mutanten der Gruppe A, die eine moderate Zelloberflächenexpression von > 50% aufweisen, bewirken keine signifikante Unterschiede des Neuritenwachstums.
- 3) Mutationen der Gruppe B, die einen moderaten Effekt auf das Neuritenwachstum haben und gleichzeitig eine dem Wildtyp entsprechende Zelloberflächenexpression aufweisen, beeinflussen die homophile Wechselwirkung von L1.
- 4) Mutationen der Gruppe A, die einen moderaten Effekt auf das Neuritenwachstum haben unterschreiten einen bestimmten Schwellenwert für L1 an der Zelloberfläche und bewirken dadurch eine Verminderung des Neuritenwachstums.

Abschließend möchte ich einige Punkte erläutern, die die vorliegenden Ergebnisse in der Zukunft ergänzen könnten. Die gemeinsame Betrachtung der Ergebnisse für die Zelloberflächenexpression und des Neuritenwachstums führen zu schlüssigen Aussagen über funktionelle Konsequenzen verschiedener L1-Mutationen. Es wäre allerdings besser die Zelloberflächenexpression der L1-Mutanten direkt auf Neuronen zu untersuchen. Zu diesem Zweck und zur Analyse des Neuritenwachstums würden Neuronen von L1-defizienten Mäusen das beste System darstellen. Als Substrat könnte man das jeweilige rekombinante, mutante L1-Fc Protein anbieten. Dieser Versuchsaufbau würde die Situation der am CRASH-

Syndrom leidenden Menschen *in vitro* am besten simulieren. Eine weitere *in vivo* Variante wäre, für jede L1-Mutation eine transgene Maus zu generieren, wie es bereits für eine L1-Mutation durchgeführt wurde (Rünker et al., 2003). Die Aussicht auf derart verbesserte Modelle zur Untersuchung humanpathogener L1-Mutanten sollten den großen Aufwand zur Etablierung solcher Systeme rechtfertigen.