

# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Direktorin: Prof. Dr. med. Ania C. Muntau

## **Mutationen des *L1CAM*-Gens und deren Einfluss auf die phänotypische Ausprägung der L1-Spektrumkrankheiten**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Judith Elisabeth Gal  
aus Szeged / Ungarn

Hamburg 2015

**Angenommen von der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 22.12.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:**

**Prof. Dr. René Santer**

**Prüfungsausschuss, Gutachter:**

**Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp**

*Meinen Eltern in tiefer Dankbarkeit gewidmet*

*Hálásan köszönöm szüleimnek az önzetlen támogatást*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>Arbeitshypothese und Fragestellung</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1 Der kongenitale Hydrocephalus.....	5
1.2 Der X-chromosomale Hydrocephalus .....	5
1.3 Das <i>L1CAM</i> -Gen .....	6
1.4 Das L1-Protein.....	7
1.5 Die L1-Spektrumkrankheiten (X-chromosomale Erkrankungen verursacht durch Mutationen im <i>L1CAM</i> -Gen) .....	8
1.6 Mutationen menschlicher Gene und ihre Folgen .....	9
1.7 Häufigkeit der <i>L1CAM</i> -Mutationen.....	10
1.8 Genotyp-Phänotyp-Korrelation .....	11
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
2.1 Datengewinnung.....	12
2.1.1 Stammdaten.....	12
2.1.2 Phänotyp.....	13
2.1.3 Genotyp .....	13
2.2 Ausarbeitung eines Punktesystems zur quantitativen Charakterisierung des Phänotyps.....	14
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>15</b>
3.1 Mutationstypen des <i>L1CAM</i> -Gens.....	15
3.2 Verteilung der Mutationen im <i>L1CAM</i> -Gen .....	18
3.3 Ausarbeitung eines Scoring-Systems zur Klassifizierung des Phänotyps .....	24
3.4 Genotyp/ Phänotyp Zusammenhang .....	27
3.4.1 Korrelation zwischen dem Schweregrad des Phänotyps und den Mutationstypen .....	28

3.4.2 Korrelation zwischen dem Schweregrad des Phänotyps und den Mutationstypen/ Veränderungen der L1-Domäne.....	29
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>32</b>
4.1 Klassifizierung des Phänotyps.....	34
4.2 Genotyp/ Phänotyp Zusammenhang .....	39
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>44</b>
<b>6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>46</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>48</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>49</b>
<b>9. Danksagung .....</b>	<b>53</b>
<b>10. Lebenslauf.....</b>	<b>55</b>
<b>11. Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>56</b>

### Arbeitshypothese und Fragestellung

Sequenzvarianten im X-chromosomal lokalisierten *L1CAM* (L1 neural cell adhesion molecule)-Gen sind ursächlich für die sogenannten L1-Spektrumerkrankungen. Das *L1CAM*-Gen kodiert das L1-Protein, welches sich u.a. aus einem Signalpeptid, sechs Ig (Immunglobulin-like)-Domänen, fünf Fn (fibronectin type III)-Domänen, einer transmembranären Domäne und einer intrazellulären Domäne zusammensetzt. Patienten mit einer *L1CAM*-bedingten Erkrankung können ganz verschiedene klinische Krankheitsmanifestationen zeigen, wie z.B. Hydrocephalus mit oder ohne Aquädukt-Stenose, das MASA (mental retardation, aphasia, shuffling gait, adducted thumbs)-Syndrom, spastische Paraplegie, Agenesie des Corpus callosum und geistige Minderbegabung. Dem X-chromosomal erblich entsprechend zeigen nur männliche Patienten das Vollbild der Erkrankung, die Überträgerinnen sind – bis auf ganz wenige Ausnahmen – merkmalsfrei. Infolge der frühen Sterblichkeit, meist bedingt durch die Schwere der Symptome und die auch heute noch geringen Therapiemöglichkeiten, ist die reproduktive Fitness der Patienten praktisch null. Dies bedeutet, dass es sich hier um eine genetisch letale Erkrankung handelt. Somit findet man bei L1-Spektrumerkrankungen eine Neumutationsrate von 33 %, was wiederum eine ausgeprägte Vielfalt an Mutationen („private Mutationen“) bedingt. Bereits Fransen et al. (1996) haben einen Zusammenhang zwischen dem Genotyp und dem daraus resultierenden Phänotyp beschrieben. Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die bisherige Literatur kritisch darzustellen und durch die Analyse von zum Teil noch nicht publizierten Daten einen weiteren Beitrag zum Verständnis des Zusammenhanges zwischen *L1CAM*-Mutationen als Genotyp und der Ausprägung der L1-Erkrankung als Phänotyp zu leisten.

Wie bereits oben erwähnt, tragen die meisten Patienten unterschiedliche („private“) Veränderungen des *L1CAM*-Gens, eine typische Folge der hohen Neumutationsrate. Um Korrelationen zwischen Genotyp und Phänotyp analysieren zu können, braucht man somit ein großes Kollektiv an Patienten. Wir vergleichen die klinischen Befunde von 105 im DNA-Labor des Instituts für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, molekulargenetisch untersuchten, miteinander nicht verwandten Patienten mit *L1CAM*-Mutationen. Aufgrund der Kombination o.a. typischer Symptome entwickeln wir ein Score-System zu einer groben quantitativen Einteilung der Phänotypen.

## Arbeitshypothese und Fragestellung

---

Bei der Klassifikation der Mutationen wählten wir einen Ansatz, der die funktionelle Gemeinsamkeit der einzelnen Mutationen widerspiegelt. Als einen ersten Schritt teilen wir die Mutationen in zwei Gruppen ein: Diejenigen, die ein klassisches oder funktionelles Null-Allel definieren (Mutationen mit Leserasterverschiebung wie z.B. Deletion oder Duplikation, Nonsense- und Splice-Site-Mutationen) und solche, die einen Aminosäuren-Austausch hervorrufen (Missense-Mutationen).

Anschließend werden wir die einzelnen Phänotypmerkmale mit den dazugehörigen funktionellen Mutationsgruppen in Verbindung bringen. Wir wollen auch untersuchen, ob phänotypische Merkmale mit bestimmten Mutationstypen korrelieren, die Veränderungen in einzelnen Domänen des L1-Proteins hervorrufen.

# 1. Einleitung

## 1.1 Der kongenitale Hydrocephalus

Der kongenitale Hydrocephalus ist in der Regel Folge einer Zirkulationsstörung des Liquors. Er ist mit einer Inzidenz von 1:2000 bei lebend geborenen Jungen eine häufige Fehlbildung (Chi et al. 2005), welche in der Regel mit schweren gesundheitlichen Schäden einhergeht (zur Übersicht siehe Schrander-Stumpel und Fryns 1998). Mit Hilfe neuester bildgebender Untersuchungsmethoden mit mittlerweile sehr hoher Sensitivität können heutzutage etwa 60 % der Hydrocephali pränatal diagnostiziert werden. Das Symptom des Hydrocephalus – genetisch wie auch nicht genetisch bedingt - kommt bei einer Vielzahl von Erkrankungen vor. Passagestörungen z.B. infolge einer Corpus callosum-Agenesie oder Aquäduktstenose führen ebenso wie Störungen in der Resorption z.B. durch entzündliche Prozesse oder fetale Hirnblutung zur Ausbildung eines Hydrocephalus. Was die monogenen Formen betrifft, sind autosomal-rezessive und X-chromosomal erbliche Formen die häufigsten.

## 1.2 Der X-chromosomale Hydrocephalus

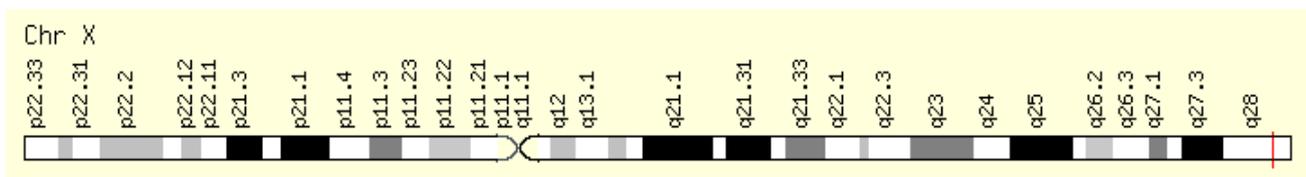
1949 beschrieben Bickers und Adams (1949) erstmalig den X-chromosomal erblichen Hydrocephalus. Nachfolgende Studien zeigten, dass es sich bei bis zu 25 % der Fälle von angeborenem Hydrocephalus bei männlichen Individuen um eine X-chromosomale Erkrankung handelt (Burton 1979, Halliday et al. 1986, Willems et al. 1987).

Bis zum heutigen Tage wurden beim X-chromosomal erblichen Hydrocephalus ausschließlich Mutationen im *L1CAM*-Gen festgestellt (zur Übersicht siehe Vos und de Walle 2011). Ein zweites Gen, dessen Mutation ebenfalls einen X-chromosomal erblichen Hydrocephalus bedingt, wurde bis jetzt nicht identifiziert.

## 1. Einleitung

### 1.3 Das *L1CAM*-Gen

Das *L1CAM*-Gen kodiert für das neuronale Zell-Adhäsionsprotein L1. Es ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms in der Bande Xq28 lokalisiert (Abb. 1) (Kallunki et al. 1997). Das Gen erstreckt sich über 16 Kilobasen (kb) und umfasst 28 kodierende Exons sowie ein nicht kodierendes Exon in dem 5'-untranslatierten Bereich 10 kb vor dem Exon 1. Die kodierende Sequenz wurde 1991 kloniert (Hlavin und Lemmon 1991). Der wesentliche Anteil des neuronalen Transkripts umfasst 3825 Basenpaare (Bp). Exon 2 des *L1CAM*-Gens wird einzig und alleine im neuronalen Gewebe exprimiert. Die Tatsachen, dass Patienten mit Mutationen in Exon 2 geistig minderbegabt sind sowie einen shuntversorgungspflichtigen Hydrozephalus haben können, lassen den Rückschluss darauf zu, dass Mutationen im Exon 2 des *L1CAM*-Gens pathologische Veränderungen in der Gehirnentwicklung bedingen (Finckh et al. 2000).



**Abbildung 1:** Das menschliche X-Chromosom und die chromosomale Lokalisation des *L1CAM*-Gens (aus GeneCards® The Human Gene Compendium (Quelle: Internet, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=L1CAM>, 11.07.2015, 23.00h)).

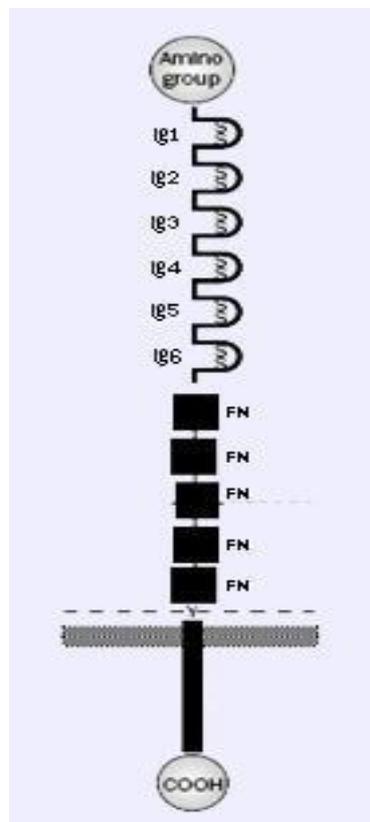
Da es sich bei den *L1CAM*-assoziierten Krankheiten in der Regel um ein schweres Leiden handelt und die Patienten früh sterben, kommt es formalgenetisch gesehen in 1/3 der Fälle zu einem Verlust der Mutation aus dem Genpool. Da L1-Spektrumkrankheiten jedoch weiterhin mit einer anscheinend unveränderten Inzidenz unter den männlichen Neugeborenen vorkommen, muss es im Sinne des Mutations-Selektions-Gleichgewichts in ebenso 1/3 der Fälle zu einer Neumutation kommen. Yamasaki et al. (2011) bestätigen diese Annahme anhand ihrer Daten. Bei 56 untersuchten, nicht verwandten, betroffenen Familien wurden 51 verschiedene Mutationen in dem *L1CAM*-Gen gefunden. Nur die Hälfte dieser 56 Familien hatte eine positive Familienanamnese, die anderen waren sporadische Fälle. Entsprechend kann man in 33 % der Fälle von einer Neumutation ausgehen. Ähnliche Zahlen werden in der Literatur immer wieder veröffentlicht (siehe z.B. Finckh et al. 2000). Typische

## 1. Einleitung

Folge einer solchen Situation ist, dass sich unterschiedlichste Typen der Mutationen ergeben können. Das wiederum heißt, jede Familie besitzt ihre „eigene“ und sozusagen „private“ Mutation mit entsprechend unterschiedlicher (phänotypischer) Ausprägung - unter anderem dem Hydrocephalus.

### 1.4 Das L1-Protein

L1 ist ein transmembranäres Glycoprotein, welches zur Proteinfamilie der Immunglobuline gehört und aus 1275 Aminosäuren besteht mit einer ungefähren Molekülmasse von 200 kDa. Das Signalpeptid wird von Exon 1 und 2 kodiert. Exons 3 bis 14 codieren die Immunglobulin-ähnlichen extrazellulären Domänen, Exon 15 bis 24 die Fibronectin-III-ähnlichen extrazellulären Domänen, Exon 25 die transmembranäre Domäne und Exons 26 bis 28 den intrazellulären C-Terminalen Anteil (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Domäne des L1-Proteins; Ig, Immunglobulin like Domäne; FN, Fibronectin like Domäne (Fogel et al. 2003 und Maretzky et al. 2005).

## 1. Einleitung

---

Hauptvorkommen des L1-Proteins ist in Axonen und den Schwann'schen Zellen des Nervensystems. Das L1-Protein spielt eine wesentliche Rolle in der Entwicklung und Funktion sowohl des zentralen als auch peripheren Nervensystems (Rathjen und Schachner 1984) und insbesondere in der kindlichen Gehirnentwicklung. Als transmembranäres Protein ist es während der neuronalen Entwicklung für die Vernetzung von Zellen untereinander ebenso wie für die Signalübertragung innerhalb einer Zelle verantwortlich. Letztendlich sind diese Prozesse maßgeblich für das Lernen und die Gedächtnisfunktion des heranwachsenden Gehirns.

Neben dem typischen, genetisch bedingten Hydrocephalus besteht zudem die klassische Ventrikelerweiterung wie sie auch bei alkoholbedingter L1-Synthesestörung nachgewiesen wurde (Ramanathan et al. 1996). Das L1-Protein findet sich auch im Urogenitaltrakt, in renalen Zellen, im Gastrointestinaltrakt sowie im hämatopoetischen System (Jouet et al. 1995, Kadmon und Altevogt 1997). Gelegentlich lässt es sich zudem bei verschiedenen Tumorarten nachweisen, u.a. Colon-Karzinom, Ovarial-Karzinom, Pankreas-Karzinom sowie dem malignen Melanom. Insbesondere wird es hier als prognostisches Merkmal benutzt (Fogel et al. 2003, Kaifi et al. 2007, Raveh et al. 2009).

### 1.5 Die L1-Spektrumkrankheiten (X-chromosomale Erkrankungen verursacht durch Mutationen im *L1CAM*-Gen)

1992 beschrieben Rosenthal et al. (1992) als Erste eine Mutation im menschlichen *L1CAM*-Gen als Ursache einer schweren Erkrankung gekennzeichnet durch einen angeborenen Hydrocephalus und mentale Minderbegabung. Kommt es zu Mutationen im *L1CAM*-Gen, führen diese zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen. Zusammengefasst werden alle sich ausprägenden Symptome unter dem Begriff des „L1-Syndroms“ (Schrander-Stumpel und Vos 1993). Die Symptomenkomplexe erhielten auch den Begriff L1-assoziierte Erkrankung (Fransen et al. 1997). L1-Spektrumkrankheiten wurden früher als CRASH-Syndrom benannt. Dieses Acronym für Corpus-callosum Hypoplasie, mentale Minderbegabung, adduzierter Daumen, Spastik und Hydrocephalus (Corpus callosum-Hypoplasia, Retardation, Adducted Thumbs, Spastic Paraparesis, Hydrocephalus) wird heute nicht mehr benutzt.

## 1. Einleitung

---

Die Ausprägung und Kombination der klinischen Merkmale variieren bei den L1-Spektrumkrankheiten stark. X-chromosomaler Hydrozephalus (HSAS), das MASA-Syndrom (Mental Retardation, Aphasia, Shuffling Gait, Adducted Thumbs), die X-chromosomal erbliche, kombinierte spastische Paraplegie Typ 1 (SP1) sowie eine X-chromosomal erbliche Agenesie des Corpus callosum sind allelische Erkrankungen, die durch Mutationen im *L1CAM*-Gen verursacht werden können.

Während ein Zusammenhang zwischen der *L1CAM*-mutationsbedingten Ausbildung eines Hydrozephalus und den daraus resultierenden Folgen wie Corpus callosum-Agenesie, mentale Minderbegabung, spastische Paraparese und Tod, ersichtlich ist, stellten Yamasaki et al. (1997) auch einen Zusammenhang zum adduzierten Daumen fest. In ihren Studien formulierten sie die These, dass der bei L1-Spektrumkrankheiten häufig vorhandene adduzierte Daumen aus einem Verlust der Innervation der Extensor pollicis longus Sehne resultiere und eben nicht aus einem Funktionsverlust der spinalen Motorneuronzelle. Die Tatsache, dass in ihrer Studie nahezu alle Patienten mit Mutationen in der intrazellulären Domäne einen adduzierten Daumen hatten, ließ sie vermuten, dass er seine Ursache entweder begründet durch einen Funktionsverlust durch Mutation der intrazellulären Domäne oder durch eine sich auswirkende Veränderung von Signalfunktionen in der intrazellulären Domäne des L1-Proteins habe.

### 1.6 Mutationen menschlicher Gene und ihre Folgen

Ein Gen ist ein nach Funktion und Struktur definierbarer Teil der genetischen Information. Mutationen sind im Allgemeinen permanente Veränderungen der DNA. Bei den Mutationstypen kann man Punktmutationen, die nur einzelne Basen betreffen, und Blockmutationen, die zwei oder mehr Basen ändern, unterscheiden.

DNA enthält Purin und Pyrimidin als Nukleotidbasen. Zwei Purinarten kommen vor: Adenin (A) und Guanin (G). Ebenso gibt es zwei Arten von Pyrimidinen: Thymin (T) und Cytosin (C). Zu den o.g. Punktmutationen gehören z.B. die Substitutionen. Im Falle einer Substitution von Basen aus der gleichen biochemischen Familie (Pyrimidin gegen Pyrimidin oder Purin gegen Purin) spricht man von Transition (TS), wohingegen ein Austausch von Basen der gegensätzlichen Familie (Pyrimidin gegen Purin oder umgekehrt) als Transversion (TV)

## 1. Einleitung

---

bezeichnet wird. Substitutionen sind mit einem Anteil von 2/3 die häufigsten Mutationen des menschlichen Genoms (HGMD-Datenbank). Ca. 25 % der Mutationen sind dagegen sogenannte Frame-Shift-Mutationen, bei denen es zu einer Verschiebung des Leserasters bedingt durch z.B. eine Deletion (Verlust von DNA-Sequenzen) oder Duplikation (hinzugefügte Sequenzen) kommt.

Unterschiedliche Mutationstypen führen zu unterschiedlichen Veränderungen des daraus resultierenden Proteins. Sequenzvarianten innerhalb des kodierenden Bereiches können somit zu „Sense-Mutationen“ mit Einbau der gleichen Aminosäure, „Missense-Mutationen“ mit Einbau einer „fremden“ Aminosäure oder gar „Nonsense-Mutationen“ (Stopp-Codon) mit Abbruch der Proteinsynthese führen. Dabei müssen Missense-Mutationen nicht zwangsläufig zu einem völligen Funktionsverlust des entsprechenden Proteins führen.

Bei fast allen Eukaryontengen wechseln sich innerhalb der Gene kodierende Sequenzen (Exons) und nicht kodierende Sequenzen (Introns) ab. Bevor also die Information der mRNA umgesetzt werden kann, müssen die nicht kodierenden Intronsequenzen entfernt werden. Dieses geschieht durch den Vorgang des „Splicing“. Für den Ablauf des Splicings sind bestimmte Sequenzmotive in den Übergangsbereichen zwischen Exon und Intron notwendig. Von einer „Splice-Site-Mutation“ oder kurz Splice-Mutation spricht man, wenn diese Sequenzmotive verändert sind und somit der Splicevorgang gestört wird. Splice-Mutationen können zu einer fehlerhaften mRNA-Synthese führen.

### 1.7 Häufigkeit der *L1CAM*-Mutationen

Krankheitsursächliche Veränderungen im X-chromosomalen *L1CAM*-Gen kommen mit einer Häufigkeit von 1:1000 bis 1:3000 bei männlichen Neugeborenen vor (Halliday et al. 1986). Es wurden seit der Erstbeschreibung (Rosenthal et al. 1992) nahezu 200 verschiedene Mutationen beschrieben (zur Übersicht siehe Vos et al. 2011 und die *L1CAM* Datenbank). In einigen Studien wurde bereits die statistische Verteilung der verschiedenen *L1CAM*-Mutationstypen analysiert. Dabei zeigte sich ein signifikanter Überschuss an Missense-Mutationen (38 % Missense, 13 % Nonsense, 23 % Deletion, 4 % Duplikation, 22 % Splice-Site-Mutationen) (Weller und Gartner 2001).

### 1.8 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Ein in der Familie segregierendes, charakteristisches Merkmal wird als Phänotyp bezeichnet. Dies können ein DNA-Marker, eine Krankheit, eine Proteinvariante o.ä. sein. Im Rahmen dieser Arbeit steht der Begriff Phänotyp für spezielle Krankheitssymptome wie Hydrocephalus, geistige Minderbegabung, psychomotorische Entwicklungsretardierung, adduzierter Daumen etc.. Die diesen Symptomkomplexen zugrunde liegende genomische Veränderung im Sinne einer Mutation wird als Genotyp bezeichnet. Zu beachten ist hierbei, dass unterschiedliche Mutationstypen für unterschiedliche Symptome oder Ausprägungen verantwortlich sein können.

In einigen wenigen Arbeiten wurden bereits Zusammenhänge zwischen bestimmtem *L1CAM*-Mutationstyp und der Schwere des Krankheitsbildes beschrieben.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Datengewinnung

#### 2.1.1 Stammdaten

Männliche Patienten mit klinischen Symptomen wie Hydrocephalus, MASA-Syndrom, spastischer Paraplegie, Corpus callosum-Agenesie und/ oder geistiger Minderbegabung sowie einer Mutation im *L1CAM*-Gen wurden in diese retrospektive Studie aufgenommen. Zur Ermittlung und Erhebung der hier verwandten Daten dienten die Patientenakten aus dem Diagnostischen Labor des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf im Zeitraum von 1997 – 2013. Insgesamt wurden 194 aus Blut isolierte DNA-Proben molekulargenetisch untersucht: 105 betroffene männliche Patienten sowie zusätzlich die Proben dazugehöriger Mütter (86), in zwei Fällen Frauen aus Familien ohne verfügbaren Indexpatienten und in einem Fall eine Großmutter. Das Untersuchungsmaterial wurde dem Institut für Humangenetik von klinisch tätigen Kollegen zur Verfügung gestellt sobald entweder die Verdachtsdiagnose aufgrund des typischen klinischen Bildes oder eine positive Familienanamnese im Sinne einer familiären Disposition bestanden.

Alle Akten beinhalteten experimentelle Einzelheiten der im Institut durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen mit genauer Dokumentation des Mutationstyps sowie dem Mutationsort. Alle weiteren hier verwendeten Parameter wie Patienten-ID, Geburtsdatum oder Schwangerschaftswoche des Abortes, sowie der Mutationsnachweis in weiteren Generationen, Alter, Geschlecht sowie die wichtigen klinischen Symptome wurden je nach Dokumentationslage erfasst. Fehlende Informationen wurden entsprechend gekennzeichnet, führten jedoch nicht zwangsläufig zum Ausschluss aus dem untersuchten Kollektiv.

Die Aufarbeitung der Patientendaten erfolgte unter Beachtung des Hamburgischen Krankenhausgesetzes (HmbKHG) vom 17. April 1991, Zweiter Abschnitt: Patientendatenschutz, §12.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.1.2 Phänotyp

Insgesamt flossen in die phänotypische Datenerhebung - soweit aus den vorhandenen Unterlagen ersichtlich - ein:

- Bildmorphologisch darstellbarer Hydrozephalus mit Angabe des Feststellungszeitpunktes (pränatal mittels Sonographie, postnatal klinisch und bildmorphologisch)
- Bildmorphologisch diagnostizierte Aquäduktstenose
- notwendige Shuntversorgung mit Angabe des Zeitpunktes
- Spastische Paraparese mit Ausmaß des Schweregrades (Grad 1-3)
- kognitive Defizite mit Ausmaß der Schwere (Grad 1-3)
- adduzierter Daumen
- Zeitpunkt des Todes.

### 2.1.3 Genotyp

Die meisten Patienten aus unserem Kollektiv von 105 männlichen Betroffenen trugen unterschiedliche („private“) Mutationen des *L1CAM*-Gens. Die molekulargenetische Untersuchung wurde von Mitarbeitern des DNA-Labors des Instituts für Humangenetik durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden gegen die in den Datenbanken verfügbare Referenzsequenz (NM\_000425) abgeglichen. Die Auswertung und der Abgleich mit der Referenzsequenz erfolgte über das Programm „Sequence Pilot“ (JSI medical systems GmbH).

Anhand Fachliteratur und entsprechender Datenbanken (NCBI, HGMD, ENSEMBL etc.) wurde die Pathogenität der bei den Patienten identifizierten Sequenzveränderungen geprüft. War eine Mutation noch nicht beschrieben oder hinsichtlich ihrer Pathogenität nicht eindeutig zuzuordnen, bediente man sich computergestützter Vorhersageprogramme (z.B. PolyPhen2, Panther, Mutation Taster, BDGP, NetGene2). Abschließend erfolgte eine Segregationsanalyse bei relevanten Familienmitgliedern des Betroffenen.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.2 Ausarbeitung eines Punktesystems zur quantitativen Charakterisierung des Phänotyps.

In unsere Bewertung flossen die Symptome Tod, Hydrocephalus und notwendige Shuntversorgung ein. Folgende Zuordnung wurde getroffen: Intrauteriner Tod 6 Punkte, Tod bis zum 3. Lebensjahr 3 Punkte und Patienten älter als 3 Jahre 0 Punkte. Der bereits intrauterin mittels Ultraschall diagnostizierte Hydrocephalus wurden mit 4 Punkten dokumentiert und der postnatal entdeckte oder entwickelte Hydrocephalus mit 0 Punkten. Die notwendige Shuntversorgung bis zum 3. Lebensjahr wurde mit 3 Punkten dokumentiert, eine Shuntversorgung nach dem vollendeten 3. Lebensjahr mit 0 Punkten. Insgesamt wurden maximal 13 Punkte vergeben. In unserem Kollektiv war 10 die maximale Punktzahl, die sich aus den oben genannten Kriterien ergeben hatte.

Nachdem die Score-Punkte aller Patienten vorlagen, wurden diejenigen, mit einer Punktzahl von 0 in die Gruppe der durchschnittlich erkrankten, diejenigen mit den Punkten 1-7 in die Gruppe der mäßig schwer erkrankten und Patienten mit einer Punktzahl von 8-10 in die besonders schwer erkrankten eingeteilt.

Explizit nicht in das Punkte-System aufgenommen sind die erhobenen Daten zur geistigen Minderbegabung (=mentale Retardierung MR), spastischen Paraparese (SP), Aquäduktstenose (As) sowie zum adduzierten Daumen (AT). Zum einen sind diese Symptome nicht spezifisch für das *L1CAM*-Syndrom, zum anderen lagen sie hier in nicht ausreichender Anzahl in der Dokumentation vor.

### 3. Ergebnisse

Ziel der hier vorgelegten Arbeit ist es, einen möglichen Zusammenhang zwischen Art der genetischen Veränderungen (Mutationen) und klinischen Symptomen bei einer Kohorte von 105 Patienten mit *L1CAM*-assoziiertem X-chromosomalem Hydrocephalus festzustellen. Sämtliche Mutationen werden dabei unter dem Begriff des „Genotyps“, das sich ergebende klinische Bild der hier untersuchten Erkrankung als „Phänotyp“ bezeichnet. Die Darstellung der Ergebnisse gliedert sich in vier Teile:

- 3.1 Mutationstypen des *L1CAM*-Gens
- 3.2 Verteilung der Mutationen im *L1CAM*-Gen
- 3.3 Ausarbeitung eines Scoring-Systems zur Klassifizierung des Phänotyps
- 3.4 Genotyp/ Phänotyp Zusammenhang.

#### 3.1 Mutationstypen des *L1CAM*-Gens

Zunächst überprüften wir die Typen der Sequenzvarianten im Allgemeinen und die Frage, ob es unter den Patienten mit *L1CAM*-Syndrom bestimmte vorherrschende *L1CAM*-Mutationen oder Mutationstypen im Speziellen gibt. Abbildung 3 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse. Die Genotypen der insgesamt 105 männlichen Patienten waren in fünf verschiedene Mutationstypen zu unterteilen. Ein überdurchschnittlich häufig vorkommender Mutationstyp war nicht zu erkennen. Neun Mal fanden wir allerdings die gleiche Mutation bei zwei oder mehr Patienten, die nicht offensichtlich miteinander verwandt waren (Tabelle 1). Bei allen Substitutionen handelte es sich um Transitionen.

### 3. Ergebnisse

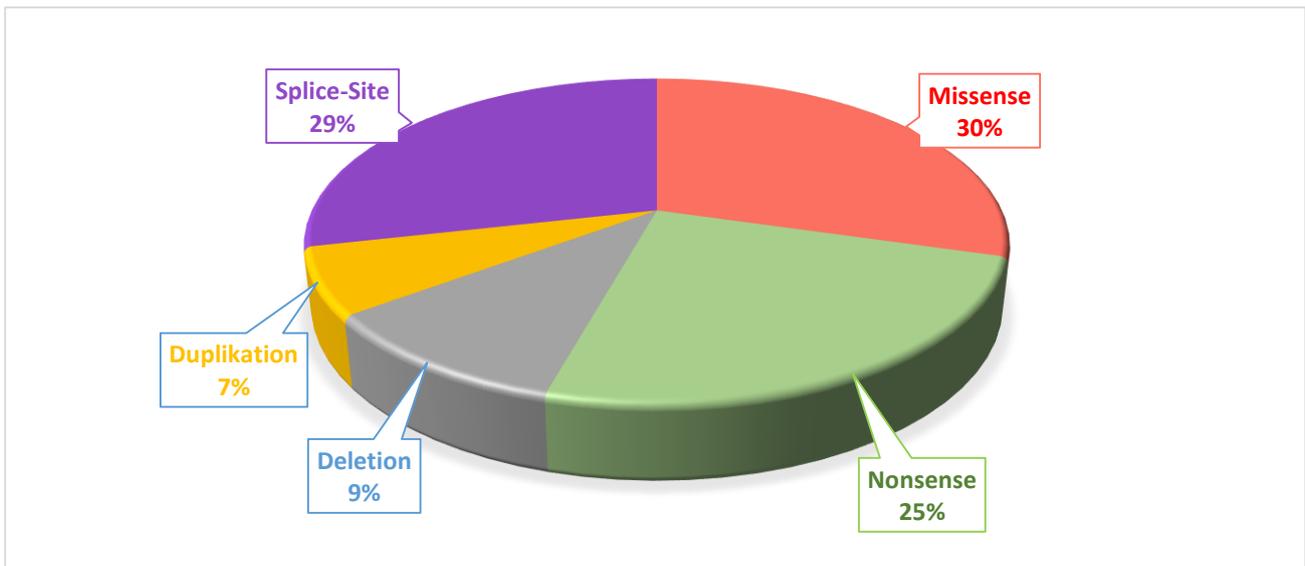
**Tabelle 1:** Wahrscheinlich rekurrente Mutationen (Pat.=Patient, B=Base).

Intron	Pat ID	Mutation	Position	Urspr. B	Neue B	Codons
5	XHC 394	Splice	c.523 +12	C	T	
	XHC 656	Splice	c.523 +12	C	T	
24	XHC 304	Dup	c.3323 -17		Dup G	
	XHC 305	Dup	c.3323 -17		Dup G	
Exon	Pat ID	Mutation	Position	Urspr. B	Neue B	Codons
6	XHC 405	Miss	c.551	G	A	CGG-CAG
	XHC 469	Miss	c.551	G	A	CGG-CAG
12	XHC 528	Non	c.1453	C	T	CGA-TGA
	XHC 561	Non	c.1453	C	T	CGA-TGA
13	XHC 139	Non	c.1672	C	T	CGA-TGA
	XHC 499	Non	c.1672	C	T	CGA-TGA
	XHC 614	Non	c.1672	C	T	CGA-TGA
18	XHC 320	Non	c.2228	G	A	TGG-TAG
	XHC 343	Non	c.2228	G	A	TGG-TAG
20	XHC 293	Non	c.2701	C	T	CGA-TGA
	XHC 417	Non	c.2701	C	T	CGA-TGA
	XHC 726	Non	c.2701	C	T	CGA-TGA
22	XHC 363	Dup	c.2880		G	
	XHC 401	Dup	c.2880		G	
26	XHC 105	Non	c.3496	C	T	CGA-TGA
	XHC 540	Non	c.3496	C	T	CGA-TGA

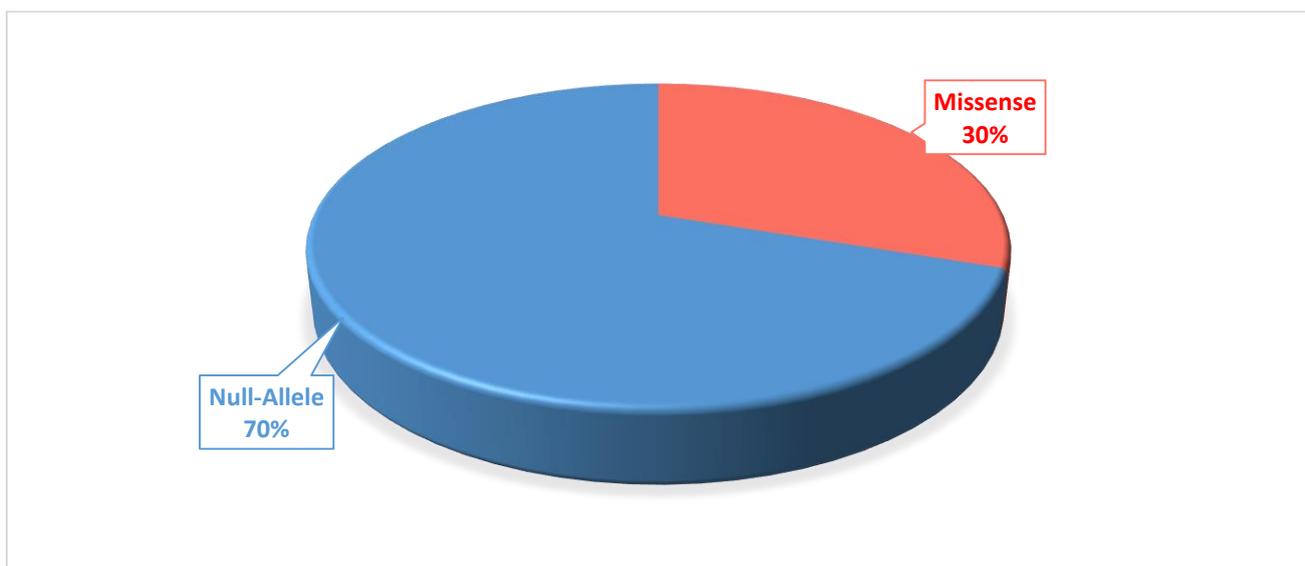
Die Missense-Mutationen hatten mit 31 Patienten (29 %) und 30 verschiedenen Mutationen den größten Anteil; gefolgt von den Splice-Site-Mutationen mit 30 Patienten (29 %) und 29 unterschiedlichen Mutationen. In der Gruppe der Nonsense-Mutationen waren 26 Patienten (25 %) mit 19 verschiedenen Mutationen, in der Gruppe der Deletionen 11 (10 %) und 11 verschiedene Mutationen und die kleinste Gruppe war die Duplikation mit 7 Patienten (7 %)

### 3. Ergebnisse

mit 5 verschiedenen Mutationen. Diese Daten stimmen sehr gut mit denen aus der Literatur überein (siehe 1.7). Die Daten zeigten eine annähernd 1:1:1-Verteilung des Mutationsspektrums hinsichtlich Missense-Mutationen (30 %), Null-Allele (42 %) und Splice-Site-Mutationen (29 %). Mutationen, die Null-Allele oder funktionelle Null-Allele bedingen (Nonsense, Deletion, Duplikation und Splice-Site), stellten etwa 2/3 der pathologischen Sequenzveränderungen dar (Abbildung 4).



**Abbildung 3:** Häufigkeit einzelner Mutationstypen in unserem Kollektiv (n=105).

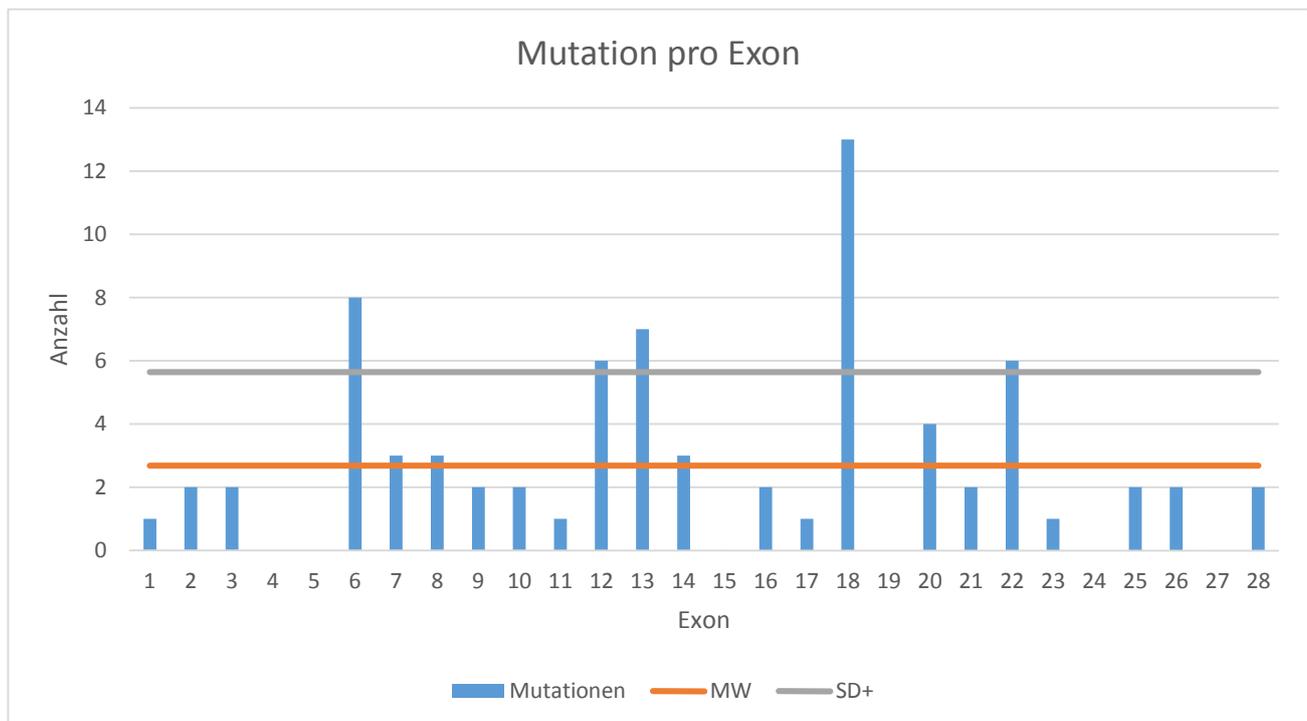


**Abbildung 4:** Mutationstypen Null-Allel-Mutationen vs. Missense-Mutationen.

### 3. Ergebnisse

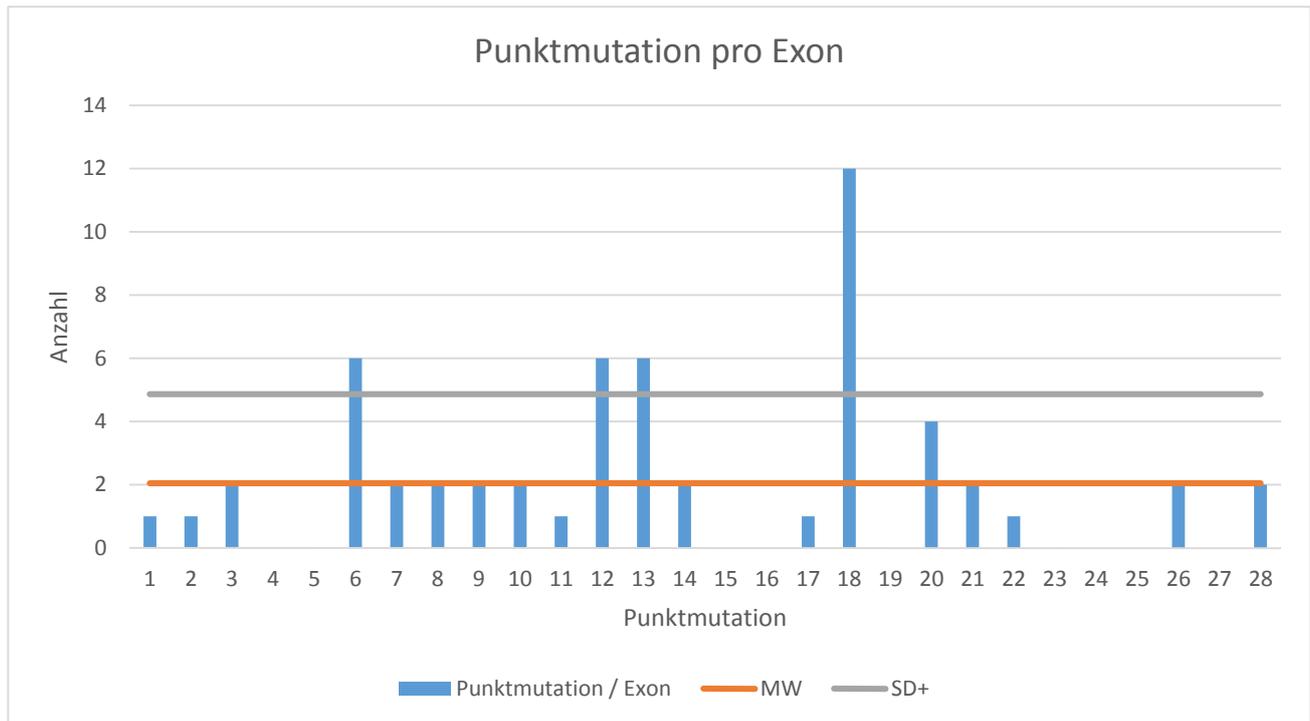
#### 3.2 Verteilung der Mutationen im *L1CAM*-Gen

Als einen nächsten Schritt gingen wir der Frage nach, ob es exonische Bereiche des *L1CAM*-Gens gibt, die besonders häufig Mutationen aufweisen. Abbildung 5 zeigt die zusammenfassende Darstellung bezüglich der hier erfassten 75 Mutationen in den Exons (Punktmutationen und Rearrangements; aber ohne Splice-Site-Mutationen in Introns und inkl. aller Patienten mit den sieben rekurrenten exonischen Mutationen). Die durchschnittliche Anzahl der Mutationen pro Exon beträgt 2,68. In sechs Exons (4, 5, 15, 19, 24 und 27) fanden sich in der untersuchten Kohorte keine Mutationen. Besonders häufig war das Exon 18 von den hier berücksichtigten Mutationen betroffen.



**Abbildung 5:** Exonische Verteilung aller Mutationen mit Mittelwert (MW, orange) und Standardabweichung (SD+, grau) bei den 105 untersuchten Patienten.

### 3. Ergebnisse



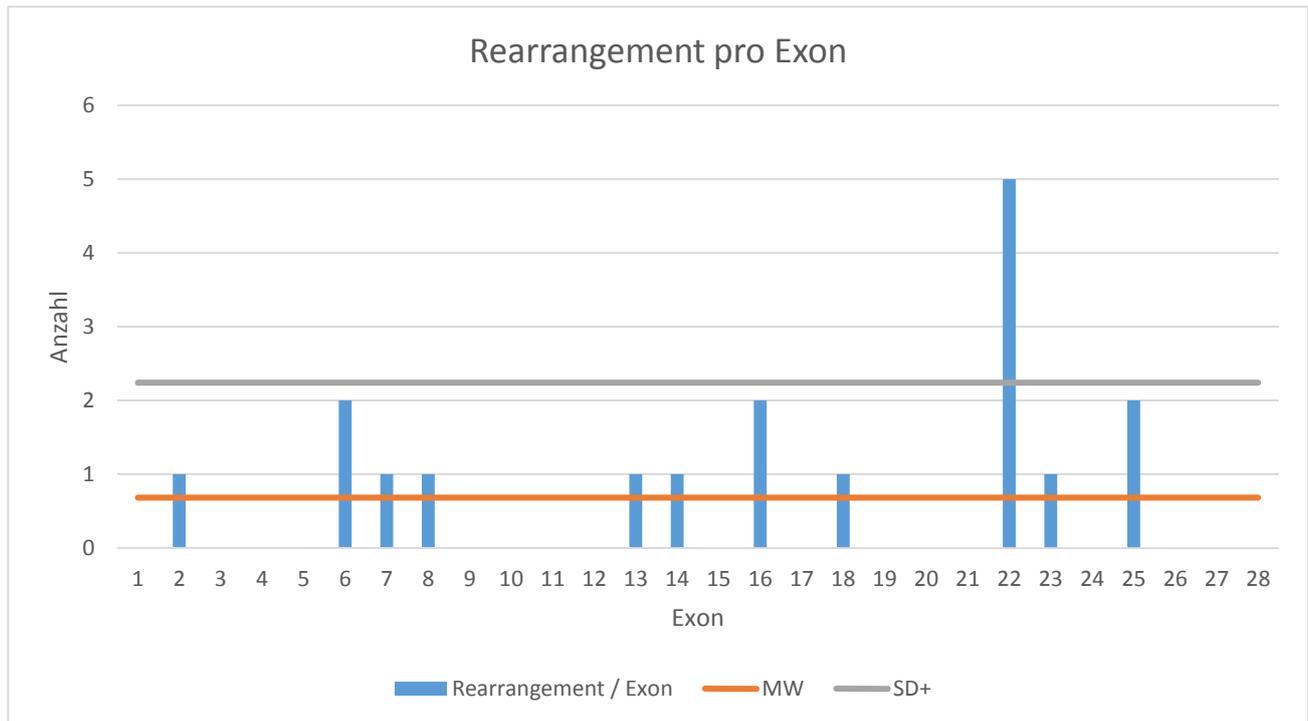
**Abbildung 6:** Verteilung exonischer Punktmutationen (PM) mit Mittelwert (MW, orange) und Standardabweichung (SD+, grau).

Es stellte sich dann die Frage, ob im Vorkommen von Punktmutationen vs. Rearrangements Unterschiede zu finden sind. Aus diesem Grunde überprüften wir die Verteilung der Punktmutationen und Rearrangements getrennt.

In Abbildung 6 sind die Gesamtzahl und Verteilung von exonischen Punktmutationen dargestellt. 53 % aller Punktmutationen machten die Punktmutationen in vier Exons (6, 12, 13 und 18) aus. Demgegenüber wurden in neun Exons (4, 5, 15, 16, 19, 23, 24, 25 und 27) keine Punktmutationen in der untersuchten Kohorte gefunden.

Wenn man die Ergebnisse mit denen der Abbildung 5 vergleicht, kommt man zu dem Schluss, dass der Anteil der Punktmutationen bezogen auf die Gesamtzahl der Mutationen in einem Exon (22) gering und in drei Exons nicht vorhanden (16, 23, 25) ist.

### 3. Ergebnisse

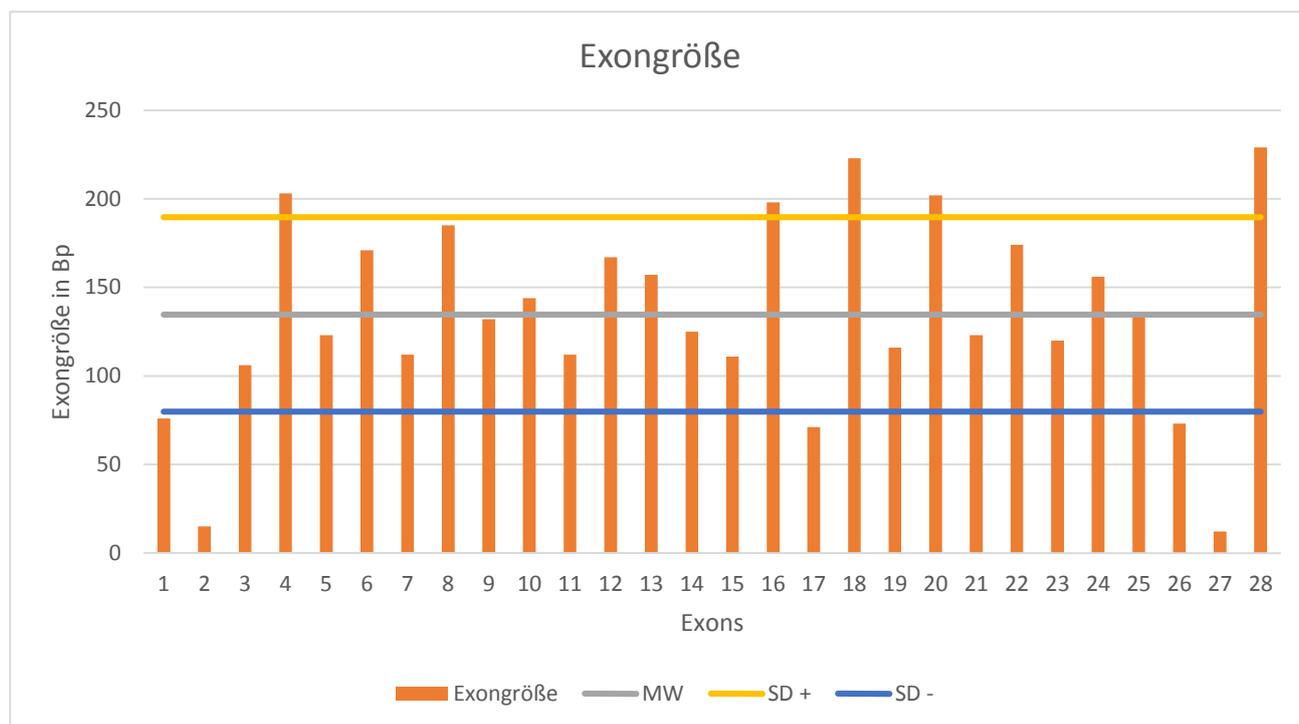


**Abbildung 7:** Anzahl der Rearrangements pro Exon mit Mittelwert (MW, orange) und Standardabweichung (SD+, grau).

Abbildung 7 zeigt die Anzahl und Verteilung der Rearrangements in den einzelnen Exons. Wenn man die absoluten Zahlen betrachtet, sticht Exon 22 mit einem Mutationsanteil von deutlich über +1 Standardabweichung hervor. Bemerkenswerterweise fanden wir in diesem Exon nur eine Punktmutation.

Bei den Abbildungen 5, 6 und 7 werden zum einen die Zahl aller Mutationen und zum anderen die von Punktmutationen beziehungsweise Rearrangements jeweils bezogen pro Exon wiedergegeben. Diese Darstellung berücksichtigt nicht die Größe der einzelnen Exons und dadurch die relative Häufigkeit mutierter Nukleotide (mutiertes Nukleotid pro 100 Basenpaare).

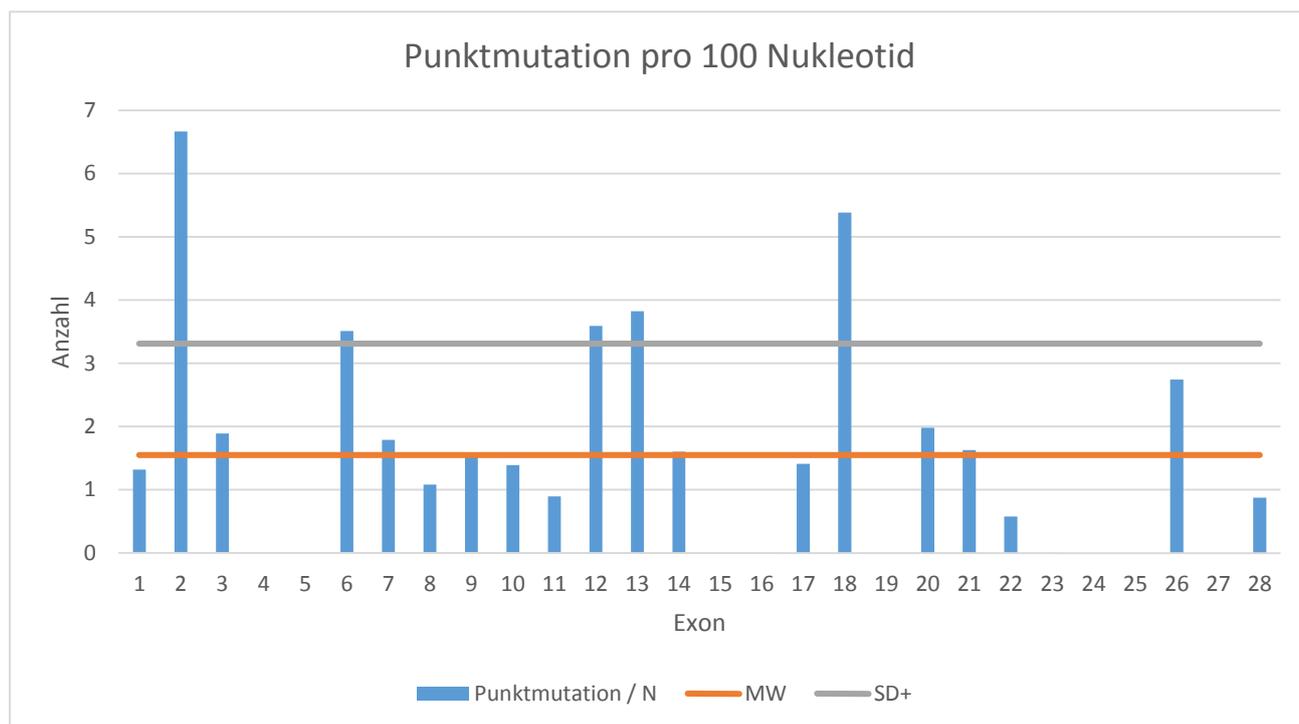
### 3. Ergebnisse



**Abbildung 8:** Darstellung der Größen (Bp=Basenpaare) der 28 Exons des *L1CAM*-Gens mit Mittelwert (MW, grau) und +/- Standardabweichung (SD +/-, gelb, blau).

Hierzu verglichen wir die Größen der einzelnen Exons. Die kodierenden Anteile des Gens *L1CAM* sind mit einer Durchschnittsgröße von 134 Nukleotiden (Bp) auf 28 kodierende Exons verteilt. Es gibt zwei sehr kleine Exons (2 und 27) mit jeweils 15 Bp und 12 Bp und 5 größere (4, 16, 18, 20 und 28) um etwas mehr als 200 Bp (Abb.8).

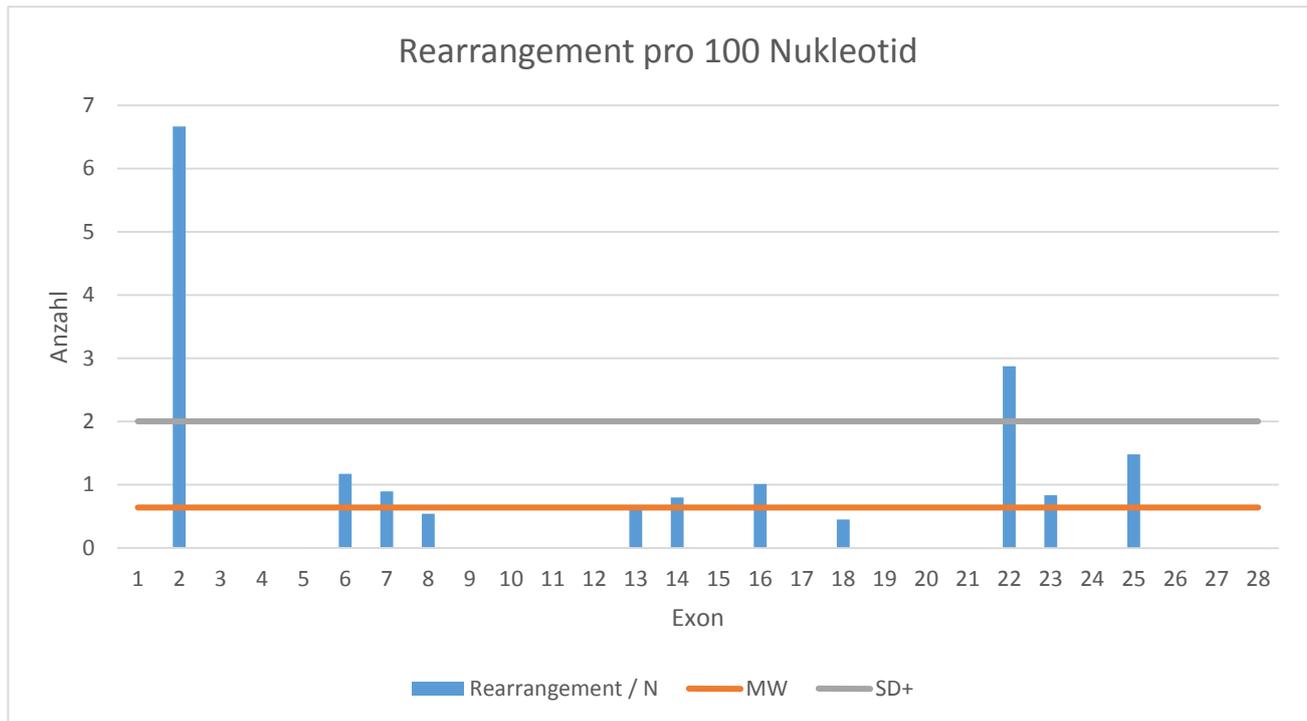
### 3. Ergebnisse



**Abbildung 9:** Darstellung der exonischen Punktmutationen pro 100 Nukleotide (N) mit Mittelwert (MW, orange) und Standardabweichung (SD+, grau) im untersuchten Kollektiv.

Die Darstellung in Abbildung 9 zeigt jetzt die relative Häufigkeit mutierter Nukleotide (mutiertes Nukleotid pro 100 Basenpaare bei Punktmutationen) und so einen Zusammenhang, der besser mit den biologischen Verhältnissen korreliert. Nun wurde deutlich, dass insbesondere Exons 2, 6, 12, 13 und 18 in Bezug auf die jeweilige Größe relativ häufig (über +1 SD) Punktmutationen aufweisen. Angesichts der kleinen Größe des Exon 2 (15 Bp) ist es fraglich, ob das durch biologische Eigenschaften oder per Zufall bedingt ist.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 10:** Graphische Darstellung des relativen Anteils der Rearrangements pro 100 Nucleotide (N) im untersuchten Kollektiv mit Mittelwert (MW, orange) und Standardabweichung (SD+, grau).

Wenn man die Verteilung der Rearrangements pro 100 Nucleotide betrachtet (Abb. 10), sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Exons gering. Es ist bemerkenswert, dass Exon 2 eine so hohe Häufigkeit von Rearrangements beinhaltet. Angesichts der kleinen Größe des Exons (15 Bp) ist es auch hier fraglich, ob das durch biologische Eigenschaften oder per Zufall bedingt ist.

### 3.3 Ausarbeitung eines Scoring-Systems zur Klassifizierung des Phänotyps

Der Begriff Phänotyp erfasst in unserer Studie den allgemeinen Schweregrad der Krankheitsausprägung. Dabei kamen die Symptome Hydrocephalus (HC), geistige Minderbegabung (MR), spastische Paraparese (SP), Aquäduktstenose (AS), Shuntversorgungspflichtigkeit (Sh), adduzierter Daumen (AT) sowie Tod (T) am häufigsten vor. In der Genotyp-Phänotyp-Analyse beschränkten wir uns auf die Symptome Hydrocephalus mit Zeitpunktangabe, Shuntversorgungspflichtigkeit und Tod, jeweils auch mit Zeitpunktangabe.

Für eine Vergleichbarkeit der für die einzelnen Patienten erhobenen Symptome war eine Art quantitativer Erfassung notwendig. Hierzu arbeiteten wir ein Score-System aus, in dem wir den einzelnen Symptomen Punktwerte zuordneten.

Bei der Score-Bewertung wurden 100 Patienten berücksichtigt, da bei fünf Patienten keine Angaben zu den von uns geforderten Symptomen vorhanden waren. Bei der Ausarbeitung des Score-Systems haben wir eine semi-quantitative Bewertung der verschiedenen Symptome durchgeführt (Tabelle 2). Als ein Zeichen eines besonders schweren Krankheitsverlaufes haben wir den intrauterinen Tod mit hohem Score-Wert (6 Punkte) bewertet. Ein Versterben vor dem 3. Lebensjahr definierten wir als mäßig schwer (3 Punkte). Die Tatsache, dass ein Patient älter als 3 Jahre wurde, unabhängig davon, wann und ob er später verstarb, betrachteten wir als durchschnittlichen Phänotyp (0 Punkte).

Der Zeitpunkt der klinischen Feststellung eines Hydrocephalus ist sicherlich von vielen Faktoren abhängig (Familienanamnese, Expertise des Untersuchers, Leistungsfähigkeit des bildgebenden Gerätes). Aus diesem Grund haben wir hier lediglich den bereits intrauterin diagnostizierten Hydrocephalus als ein Zeichen eines besonders schweren Phänotyps (4 Punkte) gewertet.

Ebenfalls ungleichmäßig haben wir den Zeitpunkt der notwendigen Shuntversorgung gewichtet. Dabei wurde eine Versorgung vor dem 3. Lebensjahr als besonders schwere Form und somit mit 3 Punkten gewertet, während die Versorgung nach dem 3. Lebensjahr als Zeichen einer Zwischenstufe zwischen durchschnittlich und mäßig schwerer Form mit 1 Punkt gewertet wurde (Tabelle 2).

### 3. Ergebnisse

---

**Tabelle 2:** Punktwerte von Symptomen (HC = Hydrocephalus, Lbj. = Lebensjahr).

Symptome	Punkte
<b>TOD</b>	
Intrauterin	6
Überleben < 3. Lbj.	3
Versterben > 3. Lbj.	0
<b>HC DIAGNOSE</b>	
intrauterin	4
<b>SHUNTVERSORGUNG</b>	
Versorgung < 3. Lbj.	3
Versorgung > 3. Lbj.	1

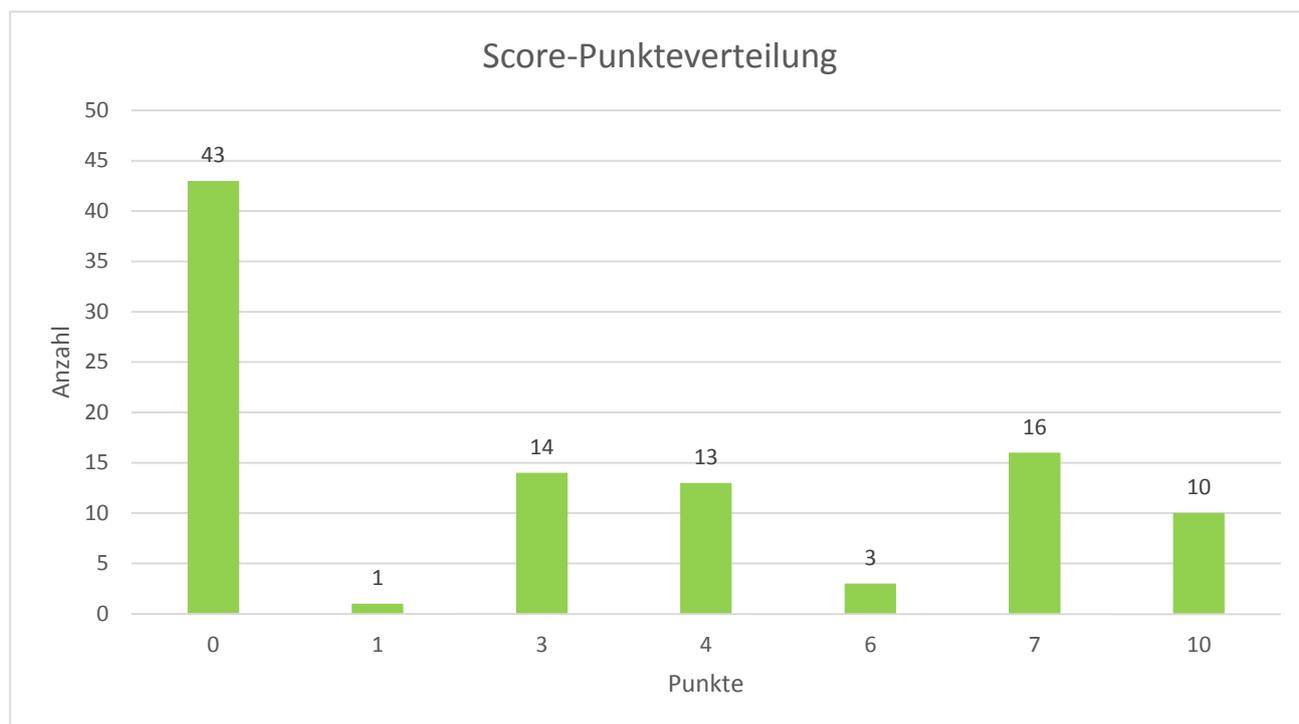
### 3. Ergebnisse

Alle Punkte eines männlichen Betroffenen wurden addiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 und Abbildung 11 gezeigt. In der Betrachtung zeichneten sich daraus – zugegebener Maßen willkürlich gewählte - drei Gruppen ab (Abb. 11): Die Gruppe der Patienten mit null Score-Punkten, die mit drei bis sieben Score-Punkten und die mit zehn Score-Punkten. In Anbetracht des deutlichen Unterschiedes von jeweils drei Score-Punkten zwischen den benachbarten drei Gruppen gingen wir davon aus, dass diese Verteilung biologischen Verhältnissen entspricht. Unter der Annahme, dass sich aus den drei nun präsentierenden Gruppen drei Schweregrade herleiten ließen, nahmen wir eine Einteilung der einzelnen Gruppen in durchschnittlich schwere, mäßig schwere und besonders schwere Krankheitsausprägung vor. Wir haben auch die Punktwerte für die einzelnen Gruppen (0; 1-7; 10) bestimmt. Entsprechend den Literaturangaben war dabei der Anteil von Splice-Site-Mutationen, die an und für sich in der Regel funktionelle Null-Allele bedingen, hoch. In unserer Kohorte waren 20 Patienten aus der Gruppe der Splice-Site-Mutationen mit mäßig schwerem und einer mit schwerstem Phänotyp.

**Tabelle 3:** Punkteverteilung mit Angaben der Mutationstypen.

Punkte Gesamt	Anzahl	Missense	Null-Allel	Nonsense	Deletion	Duplikation	Splice-Site
0	43	14	29	15	3	3	8
1	1	0	1	0	0	0	1
3	14	4	10	3	1	0	6
4	13	3	10	0	2	1	7
6	3	1	2	0	0	0	2
7	16	5	11	5	2	0	4
10	10	3	7	2	1	3	1
<b>Summe</b>	100	30	70	25	9	7	29

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 11:** Gesamtpunkte aller Patienten bei den Symptomen Hydrozephalus, Shuntversorgung und Tod mit Zeitpunktsangabe.

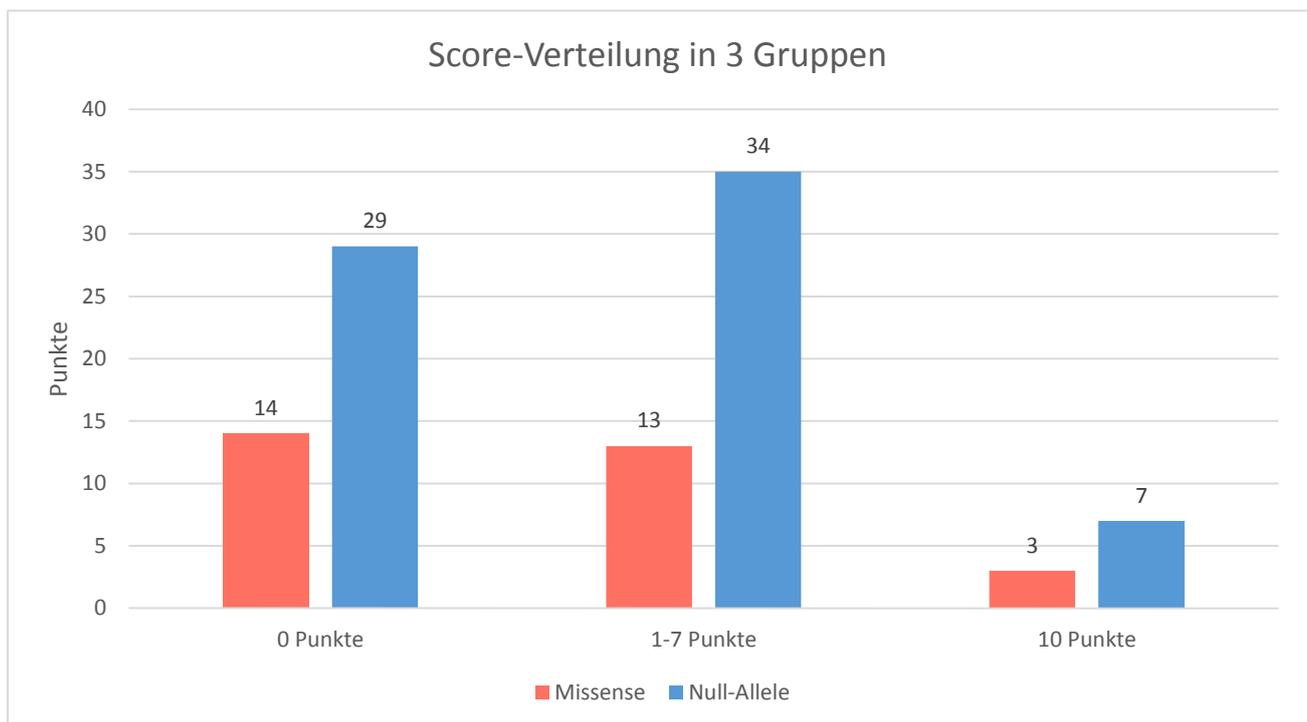
#### 3.4 Genotyp/ Phänotyp Zusammenhang

Wie bereits unter 1.7 erwähnt, verursachen Nonsense-Mutationen einen vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese während Missense-Mutationen eine Funktionseinschränkung infolge eines Aminosäureaustausches bedingen. Dabei müssen Missense-Mutationen nicht zwangsläufig zu einem vollständigen Funktionsverlust des entsprechenden Proteins führen. Bei Frame-Shift-Mutationen (bedingt durch eine Deletion oder Duplikation) oder Splice-Site-Mutation kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters und zu einem vorzeitigen Stopp-Codon. Somit haben alle Varianten außer der Missense-Mutation ein Null-Allel oder funktionelles Null-Allel zur Folge.

### 3. Ergebnisse

#### 3.4.1 Korrelation zwischen dem Schweregrad des Phänotyps und den Mutationstypen

Wir teilten die Mutationen nach Missense-Mutationen und Null-Allel-Mutationen ein. Dieser Überlegung lag die Annahme zugrunde, dass Null-Allele ein vollständiges Fehlen der Funktion des Genproduktes oder ein Fehlen des Proteins bedingen, während Missense-Mutationen unter Umständen eine gewisse Restfunktion noch erlauben können (Abb. 12).



**Abbildung 12:** Scoreverteilung Phänotyp unterteilt in Missense und Null-Allele in 3 Gruppen.

Ein erster grober Vergleich des Zusammenhanges zwischen dem Mutationstyp und dem Phänotyp ist in Abbildung 12 dargestellt. Die in der Literatur beschriebene 1:2-Verteilung trifft auch auf unsere Daten zu (30 Missense-Mutationen und 70 Null-Allele). In der genauen Betrachtung zeigte sich, dass die Häufigkeit von Missense-Mutationen verglichen mit den Null-Allel-Mutationen in den drei Gruppen ähnlich ist: 14/29, das heißt 48 % bei der Patientengruppe mit 0 Punkten, 13/34, das heißt 37 % bei den Patienten mit 1-7 Punkten und 3/7, das heißt 42 % bei den Patienten mit 10 Punkten. Demnach unterstützen diese Daten

### 3. Ergebnisse

---

nicht die Annahme, dass der Schweregrad der Erkrankung von dem Typ der Mutation abhängig ist.

#### 3.4.2 Korrelation zwischen dem Schweregrad des Phänotyps und den Mutationstypen/Veränderungen der L1-Domäne

In Anlehnung an neuere Arbeiten, die den Zusammenhang zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp untersucht haben, gingen wir der Frage nach, ob das komplexe genotypische Merkmal Mutationstyp und die Lokalisation der daraus resultierenden molekularen Veränderung im L1-Protein die individuelle Krankheitsausprägung besser erklärt als der jeweilige Parameter alleine. In der einschlägigen Literatur wird beschrieben, dass Null-Allel-Mutationen, insbesondere wenn sie die extrazelluläre Domäne betreffen, schwerste phänotypische Ausprägungen verursachen. Auch wir kommen zum gleichen Ergebnis (Tabelle 4). Wir unterteilten dabei die Exons in Gruppen, welche bestimmte Domänen des Proteins kodieren: Wie in Kapitel 1 beschrieben, kodieren Exon 1 und 2 das Signalpeptid, Exons 3-24 die extrazelluläre Domäne, Exon 25 die transmembranäre Domäne und Exon 26-28 die intrazelluläre Domäne. Wie ersichtlich machten schwere phänotypische Patienten mit Null-Allel-Mutationen (ohne Splice-Site-Mutationen) die extrazelluläre Domäne betreffend einen etwas größeren Anteil der Kohorte aus (n=7 und 6 mit Punkten 7 und 10) als Patienten mit Missense-Mutationen die gleiche Domäne und Krankheitsausprägung betreffend (n=3 und 5 mit Punkten 7 und 10) (Tabelle 4). Diese positive Interaktion bezogen auf Mutationstyp/Null-Allel-Mutationen und Proteinveränderung auf der einen Seite und der Phänotyp auf der anderen Seite war nicht durchgehend. Patienten mit Null-Allel-Mutationen die transmembranäre Domäne betreffend zeigten wie auch Patienten die intrazelluläre Domäne betreffend sogar nur gewöhnlich schwere Phänotypen.

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 4:** Score-Punkteverteilung: Missense (M)-Mutation und Null-Allel Mutationen (N) nach Exongruppen (Domänen) (Miss=Missense, Ex=Exon, Nons=Nonsense, Del=Deletion, Dup=Duplikation, Splice=Splice-Site, o=ohne, blau=extrazelluläre Domäne (Ex 3-24), grün=transmembranäre Domäne (Ex 25), orange=intrazelluläre Domäne (Ex 26-28)).

Punkte	Anzahl	Miss	M-Ex 1 u 2	M-Ex 3-24	M-Ex 25	M-Ex 26-28	Nons	Del	Dup	Splice	Rest to Miss	N-Ex 1 u 2	N-Ex 3-24	N-Ex 25	N-Ex 26-28
0	43	14	0	12	0	2	15	3	3	8	29	2	16	1	2
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
3	14	4	1	3	0	0	3	1	0	6	10	0	4	0	0
4	14	3	0	3	0	0	0	2	1	7	10	0	3	0	0
6	3	1	0	1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0
7	17	5	0	5	0	0	5	2	0	4	10	0	7	0	0
10	10	3	0	3	0	0	2	1	3	1	7	0	6	0	0

Es stellte sich dann die Frage, wie man die Beobachtung erklärt, dass einige Missense-Mutationen, wie Null-Allele, einen (besonders) schweren Phänotyp verursachen, wenn sie eine Veränderung in der extrazellulären Domäne bedingen. Unsere Recherche hat ergeben, dass unter diesen neun Missense-Mutationen sechs evolutionär konservierte Aminosäuren sind und funktionelle Bedeutung haben (sog. 'key residues' (Bateman et al. 1996)) (Tabelle 5). Zum einen handelt es sich um den Austausch von Cysteinen, die bei der dreidimensionalen Faltung des L1-Proteins durch die Ausbildung von Disulfid-Brücken eine besonders wichtige Rolle spielen. Zum anderen wird in zwei Fällen ein Leucin durch ein Prolin ersetzt. Die Aminosäure Prolin hält die Proteinstruktur in einer starren Konfiguration und stört die Ausbildung von regelmäßigen Sekundärstrukturen des Proteins wie Alpha-Helices oder Beta-Faltblättern und wird daher als „Helix-Brecher“ bezeichnet.

### 3. Ergebnisse

---

**Tabelle 5:** Aminosäuren mit Schlüsselfunktionen.

Pat-ID	Mutation*	Key Position	Score Punkte
XHC 532	p.Cys57Tyr	+	7
XHC 469	p.Arg184Gln	+	7
XHC 381	p.Leu227Pro	+	10
XHC 494	p.Leu446Pro	+	7
XHC 154	p.Cys497Tyr	+	7
XHC 539	p.Ala541Asp	+	10
XHC 302	p.Asp516Asn	-	7
XHC 522	p.Glu799Gln	-	10

\* Die erstgenannte Aminosäure zeigt eine Schlüsselfunktion und wird bedingt durch die entsprechende Mutation durch die zweitgenannte Aminosäure ersetzt.

### 4. Diskussion

Unsere Studie untersuchte den Zusammenhang zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp bei 105 Patienten mit verschiedenen *L1CAM*-Mutationen. Vergleichbare Analysen gibt es bereits in der Literatur, wobei die Anzahl der von den Autoren untersuchten Patienten etwas geringer war als die in dieser Studie, denn der wesentliche Teil der Patientendaten wurde aus der Fachliteratur entnommen oder nicht durch die Autoren selbst erhoben. Daten aus Fragebögen oder aus Fallbeschreibungen in der Fachliteratur können lückenhaft sein. Es bleibt immer offen, ob die Fragen adäquat beantwortet wurden. Gleichzeitig beschränken sich die Daten auf die Antworten aus dem vorher erstellten Fragenkatalog und erlauben somit keine weitere Analyse und Erweiterung der Fragestellung. Entsprechend kann man immer von einer - wenn auch geringen - Fehlerhaftigkeit ausgehen, weshalb bei der Verwertung solcher Quellen gewisse methodische Schwächen berücksichtigt werden müssen. Die hier vorgestellte Studie zeigt demgegenüber den großen Vorteil, dass sämtliche molekulargenetischen Daten der Patienten aus einem Labor stammen. Durch den engen Kontakt mit den Einsendern bestand zusätzlich die Möglichkeit fehlende klinische Angaben, soweit notwendig, nachzufordern.

Bei der Analyse des Zusammenhanges zwischen Genotyp und Phänotyp im Falle des *L1CAM*-bedingten Hydrocephalus gibt es zwei grundsätzliche Schwierigkeiten. Zum einen sind die Phänotyp-Merkmale nicht quantitativ messbar. Der erste Schritt unserer Analyse war deswegen die Ausarbeitung einer semi-quantitativen Erfassung der Phänotypen. In den letzten 20 Jahren sind sechs Arbeiten mit einer vergleichbaren Fragestellung im Sinne einer Quantifizierung des Patientenphänotyps bei *L1CAM*-Spektrumkrankheiten publiziert worden. Die wesentlichen Merkmale dieser Untersuchungen haben wir in Tabelle 6 zusammengefasst und stellen sie auch im Text kurz dar.

## 4. Diskussion

**Tabelle 6:** Phänotypmerkmale in den verschiedenen Studien.

Symptome \ Autoren	Fransen 1997	Yamasaki 1997	Michaelis 1998	Finckh 2000	Weller 2001	Vos 2009	Gal 2015
Intrauteriner HC	-	-	-	+	-	-	+
postnataler HC	+	+	+	+	+	+	+
Aquäduktstenose	-	-	-	-	-	+	-
Corpus callosum- Agenesie	-	-	-	+	+	+	-
Agenesie cortico- spinaler Trakt	-	-	-	-	+	-	-
Shuntversorgung	+	-	-	+	-	-	+
Spastische Paraparese	-	-	-	+	+	+	-
Überlebensalter	+	+	+	+	-	+	+
Adduzierter Daumen	-	+	+	+	+	+	-
Minderbegabung	-	+	-	+	+	+	-
Aphasie	-	-	-	-	-	+	-
Hirschsprung Komplex	-	-	-	-	+	-	-

Die zweite Schwierigkeit betrifft die große allelische genetische Heterogenität auf der Ebene der krankheitsursächlichen Genveränderungen, so dass praktisch alle Patienten ihre eigene „private“ Mutation tragen. Zunächst überprüften wir deshalb die Verteilung der Sequenzvarianten im Allgemeinen und die Frage, ob es unter den Patienten mit *L1CAM*-Spektrumkrankheiten bestimmte vorherrschende *L1CAM*-Mutationstypen oder Mutationen im Speziellen gibt. Aufgrund der bisherigen Daten aus der Literatur war dieses nicht zu erwarten, konnte jedoch auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass im untersuchten Patientengut neun rekurrente Mutationen gefunden wurden (siehe Tab. 1), spricht auch dafür, dass im *L1CAM*-Gen Sequenzmotive vorkommen, welche die Entstehung von Mutationen begünstigen.

## 4. Diskussion

---

Unsere Analyse deckte keine Mutations-Hot-Spots oder vorherrschende Mutationstypen auf. Die Ergebnisse brachten jedoch praktische Überlegungen bezüglich der DNA-Diagnostik mit sich: Es empfiehlt, sich mit der Analyse von vier Exons (6, 12, 13 und 18) anzufangen, die etwa 47 % aller Mutationen enthalten.

### 4.1 Klassifizierung des Phänotyps

Die von Fransen et al. (1997) vorgenommene semi-quantitative Schweregradbeurteilung des Phänotyps bei insgesamt 147 Patienten ist mit der von uns verwendeten vergleichbar:

#### 1. *Schwerer Phänotyp* bei:

- Versterben des Patienten vor dem 2. Lebensjahr oder
- postnataler Macrocephalie (OFC (occipitofrontal head circumference) > 97 Perzentile) oder
- einer notwendigen, frühzeitigen Shuntversorgung.

Unser Vergleich berücksichtigte zusätzlich pränatal gefundene Auffälligkeiten: Ein frühzeitig intrauterin diagnostizierter Hydrocephalus ließ für uns auf eine besonders schwere Form schließen.

#### 2. *Mittelschwerer Phänotyp* bei:

- Überleben des 2. Lebensjahres ohne die Notwendigkeit einer Shuntversorgung oder
- nachgewiesenem Hydrocephalus.

Als ein Zeichen eines besonders schweren Krankheitsverlaufes dokumentierten wir den intrauterinen Tod mit hohem Score-Wert (6 Punkte). Ein Versterben vor dem 3. Lebensjahr definierten wir als mäßig schweren Phänotyp (3 Punkte). Die Tatsache, dass ein Patient älter als 3 Jahre wurde, unabhängig davon, wann und ob er später verstarb, betrachteten wir als durchschnittlichen Phänotyp (0 Punkte).

## 4. Diskussion

---

Das Symptom „nachgewiesener Hydrocephalus“ bedarf einer besonderen Diskussion. Der Nachweis eines gering ausgeprägten Hydrocephalus kann, bedingt durch die unterschiedliche persönliche Expertise des Untersuchers, als variabel und deswegen als schwer standardisierbar bezeichnet werden.

Der Zeitpunkt der klinischen Feststellung eines Hydrocephalus ist sicherlich von vielen Faktoren abhängig (Familienanamnese, Expertise des Untersuchers, Leistungsfähigkeit des bildgebenden Gerätes). Aus diesem Grund haben wir lediglich den bereits intrauterin diagnostizierten Hydrocephalus als ein Zeichen eines besonders schweren Phänotyps (4 Punkte) gewertet. Ebenfalls ungleichmäßig gewichteten wir den Zeitpunkt der notwendigen Shuntversorgung. Dabei wurde eine Versorgung vor dem 3. Lebensjahr als besonders schwere Form und somit mit 3 Punkten gewertet, während die Versorgung nach dem 3. Lebensjahr als Zeichen einer Zwischenstufe zwischen durchschnittlich und mäßig schwerer Form mit 1 Punkt gewertet wurde.

Unter der Annahme, dass die Corpus callosum-Agenesie ein Resultat eines stark ausgeprägten Hydrocephalus durch massive Druckbelastung ist, wurde sie von Fransen et al. (1997) als ein sekundäres und nicht unabhängiges Merkmal betrachtet und entsprechend auf die Einbeziehung dieses Symptoms verzichtet. Als zu gering quantifizierbar definierten Fransen et al. (1997) den adduzierten Daumen und die spastische Paraplegie.

Wohl wissend, dass die Intelligenzminderung im Gegensatz zu allen anderen Symptomen als einziges immer mit dem Vorhandensein einer krankheitsursächlichen *L1CAM*-Mutation assoziiert ist, haben Fransen et al. (1997), wie auch wir, das Symptom „Minderbegabung“ oder „IQ“ nicht als Scoring-Parameter mit einbezogen. Störungen, die sich als Minderbegabung manifestieren, können in allen Phasen der Hirnentwicklung auftreten. Strukturelle Hirnstörungen wie auch exogene Noxen führen zu unterschiedlich ausgeprägter Verminderung der geistigen Leistungsfähigkeit. Somit ist der Grad der IQ-Minderung nicht spezifisch für den *L1CAM*-Genotyp.

## 4. Diskussion

---

Nach Fransen et al. (1997) haben Yamasaki et al. (1997) eine zweite Methode der Bestimmung des Schweregrades des Krankheitsbildes vorgestellt. Dabei wählten sie bei insgesamt 132 Betroffenen vier Symptome aus:

- Hydrocephalus
- Minderbegabung
- Überlebensalter und
- adduzierter Daumen.

Als erstes wurde eine Klassifizierung des Phänotyps in 2 Gruppen (schwer und moderat) vorgenommen.

### *Schwerer Phänotyp:*

- Shuntversorgungspflichtiger Hydrocephalus oder
- intrauterin diagnostizierter Hydrocephalus oder
- fortschreitender Hydrocephalus oder
- Vorhandensein einer Aquäduktstenose oder
- geistige Minderbegabung mit IQ unter 50 % oder
- Versterben vor dem 1. Lebensjahr.

### *Moderater Phänotyp:*

- bildmorphologischer Nachweis eines Hydrocephalus ohne Shuntnotwendigkeit oder
- geistige Minderbegabung mit IQ über 50 %.

Die Einteilung des Hydrocephalus wurde bei Yamasaki et al. (1997) insbesondere auf der Grundlage erhobener Daten bildgebender Verfahren (CT und MRT) bestimmt. Während der Vergleich der Befunde bildgebender Verfahren sicherlich eine gut objektivierbare, quantitative Aussage erlaubte, konnten wir diese Parameter in unserer Studie nicht berücksichtigen, da entsprechend detaillierte Angaben bei der großen Mehrheit unserer Patienten fehlten.

Die Intelligenzminderung teilten Yamasaki et al. (1997) mit IQ unter 50 % als Zeichen eines schweren oder mit IQ über 50 % als das eines moderaten Phänotypen ein. Wie bereits oben

## 4. Diskussion

---

erwähnt, ist der IQ durch eine große Anzahl von genetischen wie auch nicht genetischen Faktoren beeinflusst. Zudem sind die Methoden zur Bestimmung des IQ auch heute noch sehr vielfältig und entsprechend schwer vergleichbar.

Gleiches gilt für Störungen der motorischen Entwicklung. Auch hier kann eine Vielzahl von Gründen sowohl bereits in der frühen intrauterinen Entwicklung wie auch perinatal z.B. durch Sauerstoffmangel Auswirkungen auf die Motorik haben. Somit sind die soeben diskutierten Symptome (HC-Ausprägung, IQ, motorische Störung) eher nicht spezifisch für das *L1CAM*-Syndrom. Bei zudem nicht ausreichender Anzahl in unserer Dokumentation wurden sie deshalb nicht in unsere Bewertung mit einbezogen.

Den allgemeinen Zustand der Patienten definierten Yamasaki et al. (1997) in Korrelation mit dem Überleben. Dabei war für sie ein Tod vor dem 1. Lebensjahr (*in utero* eingeschlossen) mit einem schweren Phänotypen gleichgesetzt. Diese Bestimmung erschien uns als zu rigide. Ferner muss man berücksichtigen, dass durch die heutige, wesentlich verbesserte intensivmedizinische Betreuung im Vergleich zu der damaligen Zeit mehr der Schwer- und Schwerstbetroffenen bis zum 3. Lebensjahr oder gar darüber hinaus überleben.

Auch erhielt bei Yamasaki et al. (1997) der adduzierte Daumen eine Berücksichtigung. Der adduzierte Daumen kommt bei Patienten mit L1-Spektrum-Erkrankungen immer wieder vor, ist aber nicht *L1CAM*-spezifisch. Vielmehr ist dieses Symptom ein allgemeines Zeichen für Spastik. Es wird darauf hingewiesen, dass sich der in den ersten Tagen bis Wochen bildende adduzierte Daumen ein isoliertes Symptom wie auch ein Teil eines Symptomkomplexes sein kann. Er ist beschrieben bei jungen Patienten mit schwerer cerebraler Kortextstörung und kann durch eine Vielzahl möglicher Ursachen bedingt sein: Hydrozephalus, perinatale Asphyxie, intrakranielle Blutungen und in Kombination mit neuromuskulären wie auch metabolischen Erkrankungen. Verhagen et al. (2013) haben geschätzt, dass nur 6 % bis 25 % der Patienten mit einer *L1CAM*-Mutation einen adduzierten Daumen aufweisen (Verhagen et al. 2013). Obwohl Yamasaki et al. (1997) den adduzierten Daumen als ein häufiges Symptom in ihre Studie mit eingeschlossen haben, verwiesen sie darauf, dass die endgültige Klärung der Ursache noch nicht erfolgt ist. Somit kann der adduzierte Daumen als weiterhin zu diskutierendes und entsprechend nicht spezifisches Symptom angesehen werden. Deshalb schlossen wir den adduzierten Daumen als kein alleinstehendes Merkmal in unserer Einteilung aus.

## 4. Diskussion

---

Bei den von Michaelis et al. (1998) benutzten phänotypischen Einteilungen bei insgesamt 71 zusammengeschlossenen Patienten zogen die Autoren die folgend aufgelisteten Phänotypmerkmale mit ein:

Hydrocephalus mit Unterteilung in:

*schwer:*

- mit Aquäduktstenose oder
- mit Notwendigkeit einer Shuntversorgung oder
- Diagnosestellung des Hydrocephalus *in utero* oder
- voranschreitender Hydrocephalus

*moderat:*

- Erweiterung der Hirnkammern ohne Macrocephalus oder
- nicht shuntversorgungspflichtiger Hydrocephalus.

Ferner bekamen das Vorhandensein oder das Fehlen des adduzierten Daumens sowie ein Überleben nach dem 1. Lebensjahr eine Beachtung.

Vos et al. (2009) stellten in ihrer Übersichtsarbeit ebenfalls eine semi-quantitative Bestimmung des Phänotyps bei 72 Patienten vor. Dabei gründeten sie ihre Einteilung auf einen komplexen Phänotyp mit Symptomen wie Versterben vor dem 1. Lebensjahr, Hydrocephalus, adduzierter Daumen, Aquäduktstenose, Corpus callosum-Agenesie oder -Dysgenese, mentale Minderbegabung, Aphasie und spastische Paraplegie. Mehrere der ausgewählten Symptome kommen bei Patienten mit *L1CAM*-Spektrumerkrankung vor, wenn auch sie dafür nicht spezifisch sind. Die Kombination der Symptome erlaubte allerdings eine anfängliche, symptombezogene Unterscheidung zwischen Patienten mit einer *L1CAM*-Spektrumerkrankungen und denen, die am ehesten eine andere genetische oder nicht genetische Ursache des Hydrocephalus hatten. Dies wird beeindruckender Weise durch die Tatsache gezeigt, dass unter den Patienten, die eine Kombination aus positiver Familienanamnese und dem Vorhandensein von drei oder mehr der aufgelisteten Symptomen hatten, 85 % in der nachfolgenden molekulargenetischen Analyse eine *L1CAM*-Mutation aufwiesen. Unter den Patienten mit drei oder mehr Symptomen fand sich in 66 %

## 4. Diskussion

---

der Fälle eine *L1CAM*-Mutation. Unter denjenigen, die zwei oder weniger Symptome zeigten, wurde nur bei 16 % eine *L1CAM*-Mutation gefunden.

Weller und Gärtner (2001) verglichen in ihrer Übersichtsarbeit die Mutationen des *L1CAM*-Gens von 143 Patienten mit den dazu gehörigen Phänotypen. Soweit vorhanden, nahmen sie die Symptome Hydrocephalus, spastische Paraplegie, mentale Minderbegabung, adduzierter Daumen, Corpus callosum-Agenesie, Agenesie des corticospinalen Traktes und Hirschprung-Komplex mit in die Bewertung.

### 4.2 Genotyp/ Phänotyp Zusammenhang

Yamasaki et al. (1997) wiesen bereits 1997 darauf hin, dass die biologischen Folgen der *L1CAM*-Mutationen bereits in mehreren Studien untersucht worden seien. Jedoch stellten sie auch fest, dass eine Korrelation zwischen Mutationstyp und der Schwere der phänotypischen Ausprägung noch nicht ausreichend nachgewiesen wurde. Basierend auf dem Wissen, dass das L1-Protein sowohl Zellsignalfunktionen als auch adhäsive Funktionen besitzt, formulierten Yamasaki et al. (1997) die Hypothese, dass Mutationen mit Null-Allelen komplexere phänotypische Ausprägungen bedingen als nur der Austausch einzelner Aminosäuren.

Nachdem eine semi-quantitative Beurteilung des Phänotyps mit Hilfe der verschiedenen Score-Systeme möglich war, konnten die einzelnen Autoren den Genotyp mit dem Phänotyp vergleichen. Die wesentlichen Merkmale dieser Untersuchungen haben wir in Tabelle 7 zusammengefasst und stellen sie auch im Text kurz vor.

## 4. Diskussion

**Tabelle 7:** Vergleich der Domänen.

Mutationstyp \ Autoren	Exons	Fransen 1997	Yamasaki 1997	Weller 2001	Michaelis 1998	Vos 2011
<b>Intrazellulär</b>	26-28					
Missense		+	+	+		+
Null-Allel		+	+	+		
<b>Transmembranär</b>	25					
Missense						+
<b>Extrazellulär</b>	3-24					
Missense	3-14 (Ig) 15-24 (Fn)	+	++	+	Ig+ Fn+++	+
Missense- Schlüsselpos.		++		++	+++	
Null-Allel		+++	+++	+++		+++

Fransen et al. stellten 1997 einen ersten Zusammenhang zwischen dem *L1CAM*-Mutationstyp in Verbindung mit der dadurch veränderten Domäne des L1-Proteins auf der einen Seite und der Schwere der Krankheitsausprägung auf der anderen Seite fest. Die Autoren unterschieden vier ausgewählte Konstellationen (als Klasse benannt).

Die Klasse 1 umfasst Null-Allel- oder funktionelle Null-Allel-Mutationen von Exon 3-24, die für die extrazelluläre Domäne des Proteins kodieren. Diese Mutationen hatten in der Regel die Wirkung wie ein frühzeitiger Abbruch der Translation oder das Fehlen der Expression, z.B. durch eine Deletion. Bezüglich des Phänotyps waren in dieser Klasse schwerste Krankheitsausprägungen zu finden.

Die Klasse 2 beinhaltet Missense-Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch in der extrazellulären Domäne führten. Wenn die Mutation dabei eine (während der Evolution stark konservierte) Aminosäure mit „Schlüsselfunktion“ betraf, führte dies eher zu einem schweren Phänotyp als ein Austausch einer evolutionär nicht konservierten Aminosäure zum Beispiel auf der Oberfläche des Proteins.

In Klasse 3 wurden alle Mutationen zusammengefasst, die eine Veränderung des L1-Proteins in der intrazellulären Domäne bedingten. Die fünf Patienten mit solchen Mutationen zeigten keinen schweren Phänotyp. Dieser Mutationstyp führte in deren Kollektiv eher zu einer

## 4. Diskussion

---

durchschnittlichen Ausprägung oder gar einer milden Form. Die Autoren erklärten diese Beobachtung mit der Annahme, dass trotz der veränderten intrazellulären Proteinstruktur eine Verankerung des L1-Proteins an der Zellmembran noch immer möglich war und dass die Strukturen in der extrazellulären wie auch in der transmembranären Domäne unbeschädigt sind, somit ihre Funktionen beibehalten können.

Klasse-4-Mutationen waren diejenigen, welche bedingt durch ein gestörtes Splicing der pre-mRNA zu einer Veränderung der extrazellulären Domäne führten. Auch in diesen Fällen fand sich überdurchschnittlich häufig eine schwerste Krankheitsausprägung.

Fransen et al. (1998) zeigten einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp. Ihre Beobachtung bestätigt die bereits vorgebrachte Annahme, dass wesentliche physiologische Funktionen des L1-Proteins mit den extrazellulären Proteinanteilen assoziiert werden müssen (Hortsch et al. 1995). Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, dass ein Verlust an Bindungsfähigkeit des L1-Proteins für Liganden wie Axonin 1, Phospacane, Integrin oder das L1-Protein selbst überdurchschnittlich schwere Phänotypen bedingt. Sie führten diesen Zusammenhang auf eine wesentliche Funktion der L1-Bindungsfähigkeit beim axonalen Wachstum zurück.

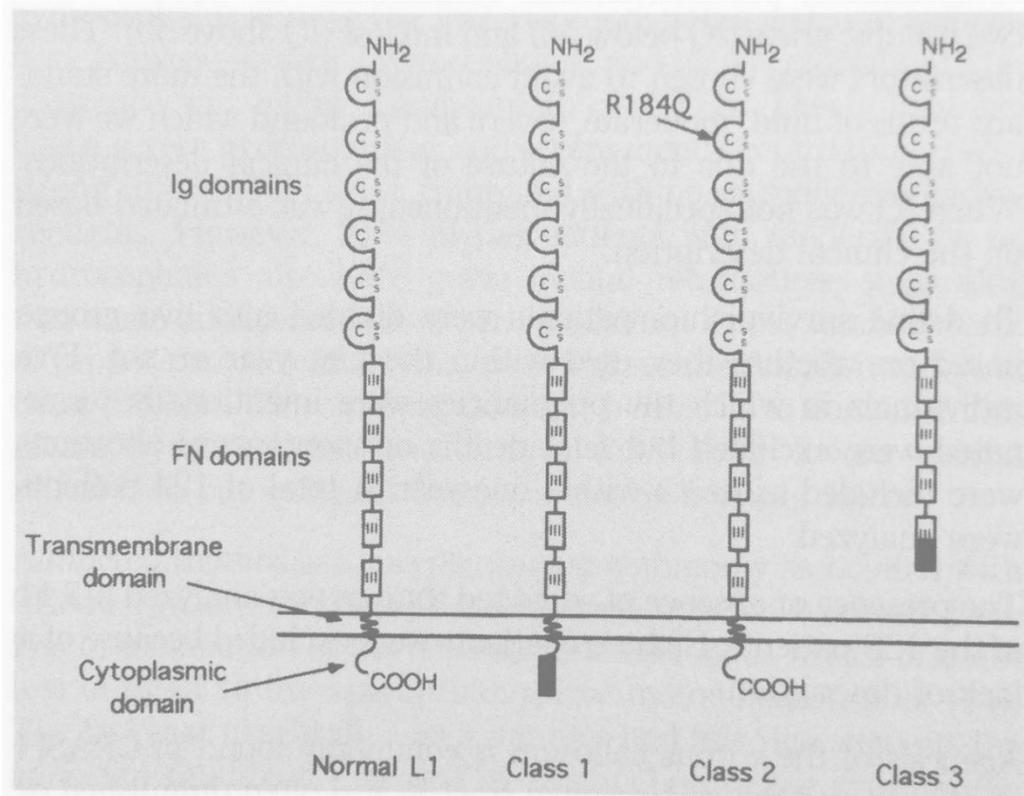
Für die verschiedenen Mutationstypen wählten Yamasaki et al. (1997) drei Klassen in Anlehnung an die erwartete Veränderung der Proteinstruktur.

Klasse 1 beinhaltete Mutationen, welche Veränderungen in der intrazellulären Domäne des L1-Proteins verursachten.

In Klasse 2 fielen Missense-Mutationen in der extrazellulären Domäne, während Klasse 3 Nonsense-Mutationen oder Frame-Shifts beinhaltete, welche zu einem frühzeitigen Stopp-Codon und somit einem Abbruch der Translation innerhalb der extrazellulären Domäne führten.

Es zeigte sich eine klare Korrelation. In absteigender Reihenfolge fanden sie dabei schwere Krankheitsausprägung überdurchschnittlich häufig in Klasse 3, gefolgt von Klasse 2 und abschließend Klasse 1. Dabei waren die Ausprägungen hinsichtlich Hydrocephalus und mentaler Minderbegabung deutlicher als hinsichtlich Überleben und Vorhandensein des adduzierten Daumens.

## 4. Diskussion



**Abbildung 13:** Bildliche Darstellung der Folgen der verschiedenen Mutationstypen (Klassen 1-3). (Aus Yamasaki et al. (1997)).

Weller und Gärtner (2001) stellten fest, dass trunkierende Mutationen mit der Folge eines Abbruchs der Proteinsynthese in der extrazellulären Domäne des L1-Proteins schwerste Veränderungen hervorriefen. Bei Mutationen, welche die intrazelluläre Domäne des Proteins betrafen, sahen die Autoren einen mildereren Phänotyp. Auch Weller und Gärtner (2001) führten dies auf die putativen molekularen Konsequenzen der einzelnen Mutationen zurück, indem die extrazelluläre Funktion wie auch die Zelladhäsionsfunktion des Proteins uneingeschränkt bleiben. Missense-Varianten in der extrazellulären Domäne konnten mit einem schweren oder aber mit weniger schweren Phänotyp einhergehen. Dies könnte davon abhängig sein, ob eine Restfunktion des Proteins erhalten blieb.

Michaelis et al. (1998) widmeten sich ebenfalls den Auswirkungen von Missense-Mutationen in der extrazellulären Domäne. Dabei schenken die Autoren denjenigen Mutationen ein besonderes Augenmerk, welche zu Veränderungen von Aminosäuren mit physiologisch wichtigen Funktionen (Schlüsselpositionen; key amino acid) oder welche jeweils zum

## 4. Diskussion

---

Aminosäurenaustausch in der extrazellulären Ig-like Domäne oder der Fibronectin-like Domäne führten. Dabei zeigten sich signifikant schwerere Krankheitsausprägungen in allen drei erhobenen Symptomgruppen (Hydrocephalus, adduzierter Daumen und Versterben im 1. Lebensjahr) bei Mutationen, die zu Veränderungen von Aminosäuren mit Schlüsselfunktionen im Protein führten. Weiterhin wurde ersichtlich, dass Mutationen in der Fibronectin-like Domäne eher zu einer Ausprägung eines Hydrocephalus führten als Mutationen mit Veränderung in der Ig-like Domäne. Kein signifikanter Unterschied bestand hingegen für die Merkmale adduzierter Daumen und Versterben im 1. Jahr.

Auch Vos et al. (2009) haben einen Vergleich zwischen Genotyp und Phänotyp erstellt: Hier zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang in der Hinsicht, dass Patienten mit einer trunkierenden Mutation (frühzeitiger Abbruch der Proteinsynthese) eher vor dem 3. Lebensjahr verstarben als diejenigen mit einer Missense-Mutation. Bei den übrigen Symptomen konnten die Autoren keinen signifikanten Zusammenhang feststellen. Auch Weller und Gärtner (2001) machten eine ähnliche Beobachtung: Betroffene mit trunkierenden Mutation starben oft vor dem 3. Lebensjahr (52 %) im Gegensatz zu Betroffenen mit Missense-Mutation (8 %).

In der Literatur wurde wiederholt beschrieben, dass ein Abbruch der Proteinsynthese in der extrazellulären Domäne die schwerste Form der Erkrankung bewirkt. Bemerkenswerter Weise haben Finckh et al. (2000) in einer Studie mit 46 Patienten mit *L1CAM*-Mutationen Beobachtungen gemacht, die diese Aussage relativieren. Trunkierende extrazelluläre Mutationen (p.W276\* oder p.Q440\*) führten bei einem Patienten zum frühen Versterben, während zwei andere Patienten zum Untersuchungszeitpunkt 10 bzw. 14 Jahre alt waren. Daraus resultierte für Finckh et al. die Schlussfolgerung, dass nicht nur L1 die Ausprägung der Erkrankung bestimmt, sondern auch andere Faktoren.

Unsere Ergebnisse stimmen mit denen der Fachliteratur sehr gut überein. Wir konnten zeigen, dass Null-Allel-Mutationen, insbesondere wenn sie die extrazelluläre Domäne betreffen, schwerste phänotypische Ausprägungen verursachen. Patienten mit Null-Allel-Mutationen die Transmembrandomäne betreffend wie auch die intrazelluläre Domäne betreffend sogar nur gewöhnlich schwere Phänotypen.

### 5. Zusammenfassung

Der kongenitale Hydrocephalus kommt bei einer Vielzahl von Erkrankungen vor. Unter den monogenen Formen sind autosomal-rezessive und X-chromosomale Vererbungen die häufigsten. Bei bis zu 25 % der männlichen Individuen mit angeborenem Hydrocephalus sind Mutationen im X-chromosomalen *L1CAM*-Gen krankheitsursächlich. *L1CAM* kodiert das L1-Protein, welches ein Signalpeptid, sechs Immunglobulin-like-Domänen, fünf Fibronectin type III-Domänen, eine transmembranäre Domäne und eine intrazelluläre Domäne enthält. L1 spielt eine wesentliche Rolle in der Entwicklung und Funktion sowohl des zentralen als auch peripheren Nervensystems und insbesondere in der kindlichen Gehirnentwicklung. Patienten mit einer *L1CAM*-bedingten Erkrankung können ganz verschiedene klinische Krankheitsmanifestationen zeigen, wie z.B. Hydrocephalus mit oder ohne Aquädukt-Stenose, das MASA-Syndrom, spastische Paraplegie, Agenesie des Corpus callosum und geistige Minderbegabung (L1-Spektrumkrankheiten).

Zusammenhänge zwischen bestimmten *L1CAM*-Mutationstypen und der Schwere des Krankheitsbildes wurden in der Literatur bereits beschrieben. Zielsetzung der vorgelegten Arbeit war es, die bisherige Literatur kritisch darzustellen und durch die Analyse von zum Teil noch nicht publizierten Daten einen weiteren Beitrag zum Verständnis dieses Zusammenhanges zu leisten.

Von den insgesamt 105 in dieser Analyse eingeschlossenen männlichen Patienten mit Hydrocephalus trugen 31 eine Missense-Mutation, 30 eine Splice-Site-Mutation, 26 eine Nonsense-Mutation, 11 eine Deletion und 7 eine Duplikation.

Bei der Analyse des Zusammenhanges zwischen Genotyp und Phänotyp gibt es im Falle des *L1CAM*-bedingten Hydrocephalus zwei grundsätzliche Schwierigkeiten: Zum einen sind die Phänotyp-Merkmale nicht quantitativ messbar, weshalb wir für eine Vergleichbarkeit der erhobenen phänotypischen Patientenmerkmale einen semiquantitativen Punktwert-Score ausgearbeitet haben. In der Gesamtschau zeichneten sich dabei drei Gruppen ab, deren Phänotyp wir als durchschnittlich schwer, mäßig schwer und besonders schwer betrachteten. Zum anderen zeichnet sich das *L1CAM*-Gen durch eine große allelische Heterogenität aus, so dass praktisch alle Patienten ihre eigene „private“ Mutation tragen. Bei der Klassifikation der Mutationen wählten wir deshalb einen Ansatz, der die funktionelle Gemeinsamkeit der einzelnen Mutationen widerspiegelt: Wir unterschieden ein klassisches oder funktionelles

## 5. Zusammenfassung

---

Null-Allel (Leserasterverschiebungen, Splice-Site- und Nonsense-Mutationen) von Missense-Mutationen (Austausch einzelner Aminosäuren).

Übereinstimmend mit der Literatur fanden wir, dass das komplexe Genotypmerkmal Mutationstyp und die Lokalisation der daraus resultierenden molekularen Veränderung im L1-Protein die individuelle Krankheitsausprägung besser erklärt als der jeweilige Parameter alleine. Unsere Analyse deckte zwar keine Mutations-Hot-Spots oder vorherrschende Mutationstypen auf, ergab aber Hinweise auf rekurrente Sequenzvarianten. So fanden wir neun Mal bei zwei oder mehr Patienten, die nicht offensichtlich miteinander verwandt waren, jeweils die gleiche Mutation.

Durch das verbesserte Verständnis der Genotyp-Phänotyp-Korrelation können genauere Abschätzungen des zu erwartenden Krankheitsverlaufes und neue wissenschaftliche Erkenntnisse bei Patienten mit L1-Spektrumkrankheiten erreicht werden. Bei Patienten mit Verdacht auf L1-Spektrumkrankheiten tragen nicht zuletzt unsere Ergebnisse zu einer Verbesserung der praktischen Diagnostik durch gezielte Untersuchung von Exonen mit überdurchschnittlich hohem Anteil von Mutationen bei.

## 6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1: Das menschliche X-Chromosom und die chromosomale Lokalisation des L1CAM-Gens (aus GeneCards® The Human Gene Compendium (Quelle: Internet, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=L1CAM>, 11.07.2015, 23.00h)).
- Abbildung 2: Domäne des L1-Proteins; Ig, Immunoglobulin like Domäne; FN, Fibronectin like Domäne (Fogel et al. 2003 und Maretzky et al. 2005).
- Abbildung 3: Häufigkeit einzelner Mutationstypen in unserem Kollektiv (n=105).
- Abbildung 4: Mutationstypen Null-Allel-Mutationen vs. Missense-Mutationen.
- Abbildung 5: Exonische Verteilung aller Mutationen mit Mittelwert (MW, orange) und Standardabweichung (SD+, grau) bei den 105 untersuchten Patienten.
- Abbildung 6: Verteilung exonischer Punktmutationen (PM) mit Mittelwert (MW, orange) und Standardabweichung (SD+, grau).
- Abbildung 7: Anzahl der Rearrangements pro Exon mit Mittelwert (MW, orange) und Standardabweichung (SD+, grau).
- Abbildung 8: Darstellung der Größen (Bp=Basenpaare) der 28 Exons des *L1CAM*-Gens mit Mittelwert (MW, grau) und +/- Standardabweichung (SD +/-, gelb, blau).
- Abbildung 9: Darstellung der exonischen Punktmutationen pro 100 Nukleotide (N) mit Mittelwert (MW, orange) und Standardabweichung (SD+, grau) im untersuchten Kollektiv.
- Abbildung 10: Graphische Darstellung des relativen Anteils der Rearrangements pro 100 Nukleotide (N) im untersuchten Kollektiv mit Mittelwert (MW, orange) und Standardabweichung (SD+, grau).

Abbildung 11: Gesamtpunkte aller Patienten bei den Symptomen Hydrocephalus, Shuntversorgung und Tod mit Zeitpunktsangabe.

Abbildung 12: Scoreverteilung Phänotyp unterteilt in Missense und Null-Allele in 3 Gruppen.

Abbildung 13: Bildliche Darstellung der Folgen der verschiedenen Mutationstypen (Klassen 1-3). (Aus Yamasaki et al. (1997)).

Tabelle 1: Wahrscheinlich rekurrente Mutationen (Pat.=Patient, B=Base).

Tabelle 2: Punktwerte von Symptomen (HC = Hydrocephalus, Lbj. = Lebensjahr).

Tabelle 3: Punkteverteilung mit Angaben der Mutationstypen.

Tabelle 4: Score-Punkteverteilung: Missense (M)-Mutation und Null-Allel Mutationen (N) nach Exongruppen (Domänen) (Miss=Missense, Ex=Exon, Nons=Nonsense, Del=Deletion, Dup=Duplikation, Splice=Splice-Site, o=ohne, blau=extrazelluläre Domäne (Ex 3-24), grün=transmembranäre Domäne (Ex 25), orange=intrazelluläre Domäne (Ex 26-28)).

Tabelle 5: Aminosäuren mit Schlüsselfunktionen.

Tabelle 6: Phänotypmerkmale in den verschiedenen Studien.

Tabelle 7: Vergleich der Domänen.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

L1CAM	L1 neural cell adhesion molecule
Ig	Immunglobulin
Fn	Fibronectin
MASA	Mental Retardation, Aphasia, Shuffling Gait, Adducted Thumbs
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
CRASH	Corpus callosum-Hypoplasia, Retardation (mentale Minderbegabung), Adducted Thumbs, Spastic Paraparesis, Hydrocephalus
HSAS	Hydrocephalus due to Stenosis of the aqueduct of Sylvius
SP1	spastische Paraplegie Typ 1
A	Adenin
G	Guanin
T	Thymin
C	Cytosin
TS	Transition
TV	Transversion
HC	Hydrocephalus
MR	Mentale/ geistige Minderbegabung
As	Aquäduktstenose
AT	Adducted Thumb = adduzierter Daumen
Sh	Shuntversorgungspflichtigkeit
T	Tod
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger RNA
AS	Aminosäure

## 8. Literaturverzeichnis

- Bateman A, Jouet M, MacFarlane J, Du JS, Kenwrick S, Chothia C (1996) "Outline structure of the human L1 cell adhesion molecule and the sites where mutations cause neurological disorders". *EMBO* 15(22): 6050-6059.
- Bickers DS and Adams RD (1949) "Hereditary stenosis of the Aquädukt of Sylvius as a cause of congenital hydrocephalus". *Brain* 72(Pt. 2): 246-262.
- Burton BK (1979) "Recurrence risks for congenital hydrocephalus". *Clin Genet* 16(1): 47-53.
- Chi JH, Heather JF, Fullerton J, Gupta N (2005) "Time trends and demographics of deaths from congenital hydrocephalus in children in the United States: National Center for Health Statistics data, 1979 to 1998". *J Neurosurg* 103(2 Suppl): 113-118.
- Finckh U, Schroder J, Ressler B, Veske A, Gal A (2000) "Spectrum and detection rate of L1CAM mutations in isolated and familial cases with clinically suspected L1-disease". *Am J Med Genet* 92(1): 40-46.
- Fogel M, Gutwein P, Mechttersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Smirnov A, Edler L, Ben-Arie A, Huszar M, Altevoigt P (2003) "L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas". *Lancet* 362(9387): 869-875.
- Fransen E, Van Camp G, D'Hooge R, Vits L, Willems PJ (1998) "Genotype-phenotype correlation in L1 associated diseases". *J Med Genet* 35(5): 399-404.
- Fransen E, Van Camp G, Vits L, Willems PJ (1997) "L1-associated diseases: clinical geneticists divide, molecular geneticists unite". *Hum Mol Genet* 6(10): 1625-1632.
- Fransen E, Vits L, Van Camp G, Willems PJ (1996) "The clinical spectrum of mutations in L1, a neuronal cell adhesion molecule". *Am J Med Genet* 64(1): 73-77.

- Halliday J, Chow CW, Wallace D, Danks DM (1986) „X-linked hydrocephalus: a survey of a 20 year period in Victoria, Australia“. J Med Genet 23: 23-31.
- Hlavin ML und Lemmon V (1991) "Molecular structure and functional testing of human L1CAM: an interspecies comparison". Genomics 11(2): 416-423.
- Hortsch M, Wang YM, Marikar Y, Bieber AJ (1995) "The cytoplasmic domain of the Drosophila cell adhesion molecule neuroglian is not essential for its homophilic adhesive properties in S2 cells". J Biol Chem 270(32): 18809-18817.
- Jouet M, Moncla A, Paterson J, Mckeown C, Fryer A, Carpenter N, Holmberg E, Wadelius C, Kenwrick S (1995) "New domains of neural cell-adhesion molecule L1 implicated in X-linked hydrocephalus and MASA syndrome". Am J Hum Genet 56(6): 1304-1314.
- Kadmon G und P Altevogt (1997) "The cell adhesion molecule L1: species- and cell-type-dependent multiple binding mechanisms". Differentiation 61(3): 143-150.
- Kaifi JT, Reichelt U, Quaas A, Schurr PG, Wachowiak R, Yekebas EF, Strate T, Schneider C, Pantel K, Schachner M, Sauter G, Izbicki JR (2007) "L1 is associated with micrometastatic spread and poor outcome in colorectal cancer". Mod Pathol 20(11): 1183-1190.
- Kallunki P, Edelman GM, Jones FS (1997) "Tissue-specific expression of the L1 cell adhesion molecule is modulated by the neural restrictive silencer element". J Cell Biol 138(6): 1343-1354.
- Maretzky T, Schulte M, Ludwig A, Rose-John S, Blobel C, Hartmann D, Altevogt P, Saftig P, Reiss K (2005) „L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/ gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth“. Moll Cell Biol 25(20): 9040-9053.

- Michaelis RC, Du YZ, Schwartz CE (1998) "The site of a missense mutation in the extracellular Ig or FN domains of L1CAM influences infant mortality and the severity of X linked hydrocephalus". *J Med Genet* 35(11): 901-904.
- Ramanathan R, Wilkemeyer MF, Mittal B, Perides G, Charness ME (1996) "Alcohol inhibits cell-cell adhesion mediated by human L1". *J Cell Biol* 133(2): 381-390.
- Rathjen FG and Schachner M (1984) "Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion". *Embo J* 3(1): 1-10.
- Raveh S, Gavert N, Ben-Zeév A (2009) "L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in invasive tumors". *Cancer Lett* 282(2): 137-145.
- Rosenthal A, Jouet M, Kenwrick S (1992) "Aberrant splicing of neural cell adhesion molecule L1 mRNA in a family with X-linked hydrocephalus". *Nat Genet* 2(2): 107-112.
- Schrander-Stumpel C und Vos YJ (1993) "L1 Syndrome". In: *GeneReviews®* [Internet]. Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K (editors) Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. 2004 Apr 28 [updated 2015 Mar 5].
- Schrander-Stumpel CT, Fryns JP (1998). „Congenital hydrocephalus: nosology and guidelines for clinical practice: a genetic diagnostic approach“. *Eur J Pediatr* 157: 355-62.
- Verhagen JM, Schrander-Stumpel CT, Blezer MM, Weber JW, Schrander JJ, Rubio-Gozalbo ME, Bakker JA, Stegmann AP, Vos YJ, Frints SG (2013) "Adducted thumbs: a clinical clue to genetic diagnosis". *Eur J Med Genet* 56(3): 153-158.

Vos YJ, de Walle HE, Bos KK, Stegeman JA, Ten Berge AM, Bruining M, van Maarle MC, Elting MW, den Hollander NS, Hamel B, Fortuna AM, Sunde LE, Stolte-Dijkstra I, Schrader-Stumpel CT, Hofstra RM (2010) "Genotype-phenotype correlations in L1 syndrome: a guide for genetic counselling and mutation analysis". *J Med Genet* 47(3): 169-175.

Weller S and Gartner J (2001) "Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): Mutations in the L1CAM gene". *Hum Mutat* 18(1): 1-12.

Willems PJ, Brouwer OF, Dijkstra I, Wilmink J (1987) "X-linked hydrocephalus". *Am J Med Genet* 27(4): 921-928.

Yamasaki M, Nonaka M, Suzumori N, Nakamura H, Fujita H, Namba A, Kamei Y, Yamada T, Pooh RK, Tanemura M, Sudo N, Nagasaka M, Yoshioka E, Shofuda T, Kanemura Y (2011) "Prenatal molecular diagnosis of a severe type of L1 syndrome (X-linked hydrocephalus)". *J Neurosurg Pediatr* 8(4): 411-416.

Yamasaki M, Thompson P, Lemmon V (1997) "CRASH syndrome: mutations in L1CAM correlate with severity of the disease". *Neuropediatrics* 28(3): 175-178.

Internet-Datenbank: Aus GeneCards® The Human Gene Compendium (Quelle: Internet, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=L1CAM>, 11.07.2015,23.00h).

## 9. Danksagung

Diese Arbeit wurde an der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. René Santer in Zusammenarbeit mit dem Institut für Humangenetik unter der damaligen Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Andreas Gal durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. med. R. Santer danke ich für die Überlassung des interessanten Themas. In besonderem Maße möchte ich ihm für die gute Betreuung und die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung aller Schritte meiner Doktorarbeit danken. Das Gelingen dieser Arbeit ist mit seinem steten Interesse am Fortgang der Arbeit und mit vielen Ratschlägen zur Lösung aufgetretener Probleme, sowie mit der kritischen Durchsicht meiner Arbeit eng verknüpft.

Herrn Prof. Dr. med. A. Gal, dem emeritierten Leiter des Institutes für Humangenetik, danke ich für die Möglichkeit, die molekulargenetisch erhobenen Daten aus seinem Labor in der vorliegenden Arbeit verwendet haben zu dürfen.

Auch möchte ich Frau Ulrike Orth meinen Dank aussprechen. Sie war immer bereit, einen Teil ihrer wertvollen Zeit mir und meiner Arbeit zu widmen und hat somit mir insbesondere die labortechnischen Grundlagen näher gebracht.

Bei allen Institutsmitgliedern möchte ich mich bedanken für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die stetige Möglichkeit der Recherchen in ihren Räumen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Thomas Wiese, der mir unermüdlich mit Rat und vor allem Tat bei allen (computer-) technischen Problemen zur Seite stand. Er war immer bereit, seine eng bemessene und wertvolle Zeit für das gemeinsam ins Auge gefasste Ziel zu opfern. Sein Engagement und seine Anteilnahme an Erfolgen wie Misserfolgen waren eine unerschöpfliche Motivationsquelle. Diese besondere Unterstützung wird mir in bester Erinnerung bleiben.

Ein Dankeschön möchte ich auch meinem Kollegen Hr. PD Dr. med. FT Beil aussprechen, der in unvergleichlich wie unvergesslich angenehmer Art mit konstruktiver Kritik und angemessenem Nachdruck die Endphase meiner Arbeit begleitet hat und letztendlich mir somit die Abgabe ermöglichten. Auch wenn Wege sich trennen, Erinnerungen bleiben.

Meine tiefe Dankbarkeit gilt meiner „Schwester“ Kerstin A. Madaler. Unserer grenzenlosen Verbundenheit verdanke ich all die Kraft, die in "guten wie in schlechten Zeiten" für noch so vieles mehr als diese Arbeit notwendig war.

Diese Dissertation ist meinen Eltern und meinen Brüdern Zoltán und Andreas gewidmet, die mich immer unterstützt und voller Liebe begleitet haben.

## 10. Lebenslauf

Name: Gal  
Vorname: Judith Elisabeth  
Geburtsdatum: 02.03.1979  
Geburtsort: Szeged in Ungarn  
Adresse: Gertigstr. 1, 22303 Hamburg

Studium: 1998-1999 Studium der Humanmedizin Universität Halle/ Saale  
1999-2005 Studium der Humanmedizin Universität zu Lübeck

Approbation: Mai 2005, Ärztekammer Schleswig-Holstein

Beruflicher Werdegang: 2006-2009 Weiterbildungsassistentin in der Klinik für Orthopädie, Unfallchirurgie und Handchirurgie in der Asklepios Klinik St. Georg, Chefarzt Prof. Dr. med. Ch. Eggers, Hamburg

2009-2014 Weiterbildungsassistentin in der Klinik für Orthopädie, Unfallchirurgie und Handchirurgie, Kath. Marienkrankenhaus, Hamburg, Chefarzt Dr. med. R. Feil

2012 Erlangung des Facharztes Orthopädie und Unfallchirurgie

2014-2015 Standortärztin Personenschadenmanagement Generali Versicherung Deutschland

seit 2015 Stellvertretende Ärztliche Leitung, Zentrum für Notfallmedizin, Agaplesion Diakonieklinikum Rotenburg/Wümme

Hamburg, 28.12.2015 Judith Elisabeth Gal

## 11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg, 28.12.2015      Judith Elisabeth Gal