

**Genexpressions-Profil einer dysmyelinisierenden
Doppel *knock out*-Mausmutante (mbp^{-/-} plp^{-/-})
und
Rescue-Versuch des normalen Phänotyps**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Carsten Poggel
aus Werl

2000

Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel
Prof. Dr. U. I. Flügge

Tag der mündlichen Prüfung:

19.7.2000

Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel danke ich für die interessante Themenstellung, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und die großzügige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. U. I. Flügge danke ich für die Übernahme des Coreferates.

Weiterhin möchte ich mich bedanken

beim ZMMK-ServiceLabor unter Leitung von Dr. Markus Macht für die Durchführung der Sequenzierungen.

bei den Mitarbeitern der Firma MEMOREC Stoffel GmbH für die hervorragende Kooperation, insbesondere Herrn Dr. Andreas Bosio, Herrn Dr. Marcus Conrad und Herrn Dr. Kay Hofmann.

bei Herrn Dr. Patrick Tunggal, Herrn Dipl.Chem. Lennart von Hoch, Herrn Dr. Thomas Uschkureit, Herrn Dr. Olaf Spörkel, Herrn Dr. Michael Nix, Herrn Dipl.Biol. Markus Zumbansen, Herrn Dr. Jens Stracke und Herrn Dipl.Biol. Stefan Meinzinger für die gute Zusammenarbeit und ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre.

bei Frau Barbara Blöck, Frau Britta Jenke und Frau Erika Binczek für die exzellente technische Unterstützung.

bei Prof. Kathy Sweadner, Prof. Julia George, Prof. William Ball und Dipl.Chem. Harald Hambrock für die Zurverfügungstellung der Antikörper.

Für Anne und meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	
1.1	Nervenleitung und Myelin	1
1.2	Myelinstruktur	2
1.3	Zusammensetzung des Myelins	3
1.4	Gliogenese	10
2.	Bestimmung der Genexpression	12
3.	Transgene Mausmodelle	15
II.	Aufgabenstellung	16
III.	Ergebnisse	17
1.	Untersuchung zur Genexpression der <i>mbp</i>^{-/-} <i>plp</i>^{-/-} Doppelmutante	17
1.1	<i>Serial analysis of gene expression</i> (SAGE)-Methode und Auswertung der SAGE-Daten	17
1.2	Überprüfung der Genregulationen durch <i>Northern Blot</i> -Analyse	29
1.2.1	Vergleich der Genexpression des Wildtyps mit der Doppelmutante	29
1.2.2	Vergleich der Einzelmutanten	37
1.2.3	Zeitliches Expressionsmuster	40
1.3	Überprüfung der Genregulationen durch die <i>Mikro-Array</i> -Technik	45
1.4	Quantitative Untersuchung der Myelinproteine mittels <i>Western Blot</i> -Analyse	48
1.5	Immunhistochemische Untersuchungen	56
2.	<i>Rescue</i> der Doppelmutante mittels Mikroinjektion	61
2.1	Klonierung des ersten <i>Rescue</i> -Konstruktes	61
2.2	Analyse der transgenen Mäuse	63
2.3	Klonierung des zweiten <i>Rescue</i> -Konstruktes	66
2.4	Analyse der transgenen Mäuse	68
IV.	Zusammenfassung der Ergebnisse	73
V.	Diskussion	74
1.	Untersuchungen zur Genexpression	74
2.	<i>Rescue</i> der Doppelmutante	86
VI.	Methoden	88
VII.	Anhang	95
VIII.	Literatur	111

Zelle bilden können (Abb. 2b). Die Schwannzellen im PNS hingegen umhüllen nur ein Axon (Abb. 2c, d). Beide Zelltypen produzieren lipidreiche Membranfortsätze, die sich spiralförmig in konzentrischen Lagen um das Axon winden. Durch Auspressen des Zytoplasmas werden die zytoplasmatischen Seiten eng aneinander gelagert und zu kompakten Lamellen zusammengedrückt. Sie erscheinen im Elektronenmikroskop als dunkle, elektronenreiche Bande, der sogenannten *major dense line* (MDL). Auch die extrazellulären Seiten der Plasmamembran treten in engen Kontakt und sind elektronenmikroskopisch als *intraperiod dense line* (IDL) erkennbar. Der Abstand zwischen jeweils zwei elektronendichten Bereichen im kompakten Myelin beträgt 15-17nm. Die Myelinschicht weist bei großen Axonen bis zu 100 Lamellen auf.

Das myelinisierte Axon läßt sich in nodale, paranodale und internodale Bereiche unterteilen (Abb. 2a). Im ca. 1mm langen Internodium ist das Axon von einer kompakten Myelinschicht umgeben. Lediglich das Mesaxon, die innerste Schicht, enthält wenig Zytoplasma. Zudem durchziehen longitudinale und laterale Kanäle in Folge von Aufweitungen der *major dense line* die kompakten Schichten. Zusätzlich sorgen vor allem im PNS Querkanäle (Schmidt-Lantermann-Einkerbungen) für Kontaktstellen zwischen dem Soma des Oligodendrozyten und dem inneren Mesaxon.

Im paranodalen Bereich enden die Myelinlamellen in Form von hintereinander gelegten Schleifen, die mit Zytoplasma gefüllt sind. Jede dieser Schleifen ist ca. 0,2µm breit und hat im Gegensatz zum Internodium engen Kontakt zum Axolemma, dem das Axon umgebenden extrazellulären Bereich [Livingston 1973].

Der nodale Bereich zwischen den Paranodien, auch Ranvier'scher Schnürring genannt, ist ungefähr 2µm breit und im ZNS von Astrozyten umgeben [Raine 1984]. In den peripheren Nerven stülpen sich Mikrovilli aus den Schwannzellen [Robertson 1959], die mit den extrazellulären Matrix-Proteinen im Axolemma interagieren können. Die Basallamina der Schwannzellen trennt im Gegensatz zu den Oligodendrozyten das Perinodium vom endoneuralen Bereich ab.

1.3 Zusammensetzung des Myelins

1.3.1 Lipide

Lipide aggregieren in wässriger Umgebung zu thermodynamisch stabilen Doppelschichten, bei denen sich die hydrophoben Seitenketten gegenüberstehen und die polaren Kopfgruppen nach außen mit den Wassermolekülen wechselwirken. Die Myelinschicht hat mit 70% den höchsten Lipidgehalt aller Membranen im Organismus. Durch langkettige Fettsäuren erreicht die Membran eine Breite, die mit ca. 5nm doppelt so dick ist wie von anderen subzellulären Kompartimenten. Außergewöhnlich hoch ist der Anteil an Cholesterin (45%) und ungesättigten Fettsäuren, die für eine niedrige Schmelztemperatur und deshalb hohe Fluidität in der Doppelschicht sorgen [De Vries 1974]. Proteine und Lipide können sich leicht in transversaler Richtung in der Ebene bewegen und gewährleisten eine flexible, plastische Struktur. Die Lipide sind in der Myelinmembran asymmetrisch angeordnet: Galaktocerebroside (19%), Galaktosulfatide (3%) sowie das Sphingomyelin (6%) weisen primär zur extrazellulären Seite; hingegen befinden sich die anderen Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin (13%), Phosphatidylcholin (9%), Phosphatidylserin (4%) und Phosphatidylinositol (0,5%) auf der intrazellulären Seite [De Ville 1992]. Die negativ geladenen Sulfatide bzw. Phosphatidylserine und -inositole ermöglichen durch Ausbildung einer polyanionischen Membranoberfläche eine Interaktion mit Proteinen und Lipiden auf der extrazellulären bzw. intrazellulären Seite [Stoffel 1990]. Der hohe Anteil der oben genannten Galaktolipide (22%) ist ebenso ungewöhnlich wie die Konzentration an Plasmalogenderivaten (11%), die hauptsächlich vom Phosphatidylethanolamin-Typ abstammen.

Da Cerebroside und Sulfatide eine weit über der Körpertemperatur liegende Phasenumwandlungstemperatur besitzen [Haas 1995], werden Glykolipid-reiche Inseln innerhalb der Membran (*rafts*) postuliert, die mit Proteinen assoziieren [Stoffel 1997, Rietveld 1998].

1.3.2 Proteine

Zu den Hauptkomponenten des Myelins im ZNS zählen die Proteolipid Proteine (PLP und DM20, 50%) und die basischen Myelin Proteine (MBP's, 30-40%) [Lees 1984]. Weitere geringere Bestandteile sind das Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG), das Oligodendrozyten/Myelin-assoziierte Glykoprotein (OMGP), das basische Myelin/Oligodendrozyten Protein (MOBP), das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG), die 2'3'-Cyclonukleotid-3'-phosphodiesterase (CNPase), das Connexin 32 (Cx32) und das Oligodendrozyten-spezifische Protein (OSP).

Im PNS ist das Protein P0 mit 50-60% die Hauptkomponente. Die MBP's machen dagegen nur 5-15% aus und die Proteolipid Proteine fehlen fast vollständig. Spezifisch für das PNS ist neben P0 das Periphere Myelin Protein (PMP22/Gas3). MAG, CNP und Cx32 treten dagegen in beiden Strukturen auf.

Basische Myelinproteine

Der MBP-Genlocus in der Maus bildet eine Transkriptionseinheit von 105kb mit zwei Transkriptionsstartpunkten [Campagnoni, 1993a]. Vom ersten werden die Golli-MBP's abgelesen, die mengenmäßig eine untergeordnete Rolle spielen. Es wurden Transkripte von 5,1 und 2,6kb Länge nachgewiesen, bei denen drei zusätzliche Exons in das eigentliche MBP-Produkt gespleißt werden und die vom Immunsystem (Thymus, Milz, B-Zellen, Makrophagen) und dem Nervensystem (fötales Rückenmark, axonale und dendritische Prozesse) exprimiert werden [Campagnoni 1993b, Landry 1996]. Die Hauptprodukte werden in der hinteren Transkriptionseinheit durch weitere sieben Exons synthetisiert. Durch alternatives Spleißen von Exon II, V oder VI treten beim Menschen drei und bei Nagetieren mindestens fünf Isoformen auf [de Ferra 1985, Kamholz 1986, Newman 1987, Takahashi 1985]. Die Expression beginnt bei Mäusen am zweiten postnatalen Tag und erreicht ihr Maximum in der Hauptmyelinisierungsphase (16.-20. Tag) [Campagnoni 1978, Carson 1983]. Für die mRNA wurde sowohl eine Transport- als auch eine Lokalisationssequenz nachgewiesen [Ainger 1993]. So werden die Proteine erst an freien Ribosomen in der myelinisierenden Peripherie des Oligodendrozyten translatiert [Carson 1997]. Die Hauptfunktion der MBP's besteht in der kompakten Zusammenlagerung der zytosolischen Oberfläche der Myelinschicht [Omlin 1982]. Aufgrund des hohen Anteils an basischen Aminosäuren (ca. 25%) treten die Proteine mit sauren hydrophilen Kopfgruppen der Myelinlipide in ionische Wechselwirkung, was zur Adhäsion der zytoplasmatischen Seiten unter Kompaktierung führt [Menz 1992]. Zudem wurde für die Exon II enthaltenden Isoformen von 17 und 21,5kd ein Kerntransport beobachtet [Pedraza 1997, Alliquant 1991], während die anderen (14kd und 18,5kd) an der Plasmamembran lokalisiert sind [Staugaitis 1990]. Weiterhin wird für die 18,5kd-Isoform eine Beteiligung bei der Clathrin-Polymerisation vermutet [Prasad 1995]. Die MBP's durchlaufen vielzählige, posttranslationale Veränderungen in Form von Phosphorylierung des Threonin 98 [Cheifetz 1985], Methylierung des Arginin 107 [Young 1987, Kim 1997], ADP-Ribosylierung [Boulias 1990, Yamamori 1994], Deamidierung und Deimidierung [Boggs 1997].

Der Defekt der *shiverer*-Mausmutante besteht in der Deletion der Exons III-VII des Gens [Molineaux 1986, Roach 1985]. Zwar wird dort vom Promoter ein Transkript gestartet, allerdings wird dieses schnell degradiert und nicht translatiert [Roach 1983, 1985]. Es wurde lediglich im PNS eines der schwach exprimierten Golli-Isoformen nachgewiesen [Landry 1997]. Aufgrund der MBP-Defizienz ist das ZNS stark hypomyelinisiert [Rosenbluth 1980]. Die Mäuse entwickeln nach ein paar Tagen einen Tremor und sterben nach 3-4 Monaten an

Krämpfen [Chernoff 1981]. Im PNS hingegen ist das Myelin morphologisch unverändert [Kirschner 1980]. Es wurde lediglich eine Verdopplung der Schmidt-Lantermann-Einkerbungen gefunden [Gould 1995]. Möglicherweise kompensiert P0 das Fehlen des MBP's im PNS, da deren Funktionen überlappen. Durch Integration eines kompletten MBP-Gens in das *shiverer*-Genom mittels Mikroinjektion wurde teilweise eine Korrektur des mutierten Phänotyps und eine Wiederkehr der *major dense line* im Myelin erreicht [Readhead 1987]. Derselbe Effekt wurde beobachtet, wenn ein Minigen für die 14kd-Isoform eingeschleust wurde [Kimura 1989]. Eine weitere Möglichkeit zur Regeneration der Krankheit bietet die Transplantation von neuronalen Stammzellen [Yandava 1999].

Proteolipid Protein

Drei Jahrzehnte nach der Entdeckung der Proteolipide [Folch 1951] gelang die Ermittlung der Proteinsequenz [Stoffel 1982, 1983] und die Klonierung des Gens [Stoffel 1984, Schaich 1986]. Das PLP-Gen umfaßt sieben Exons, die sich innerhalb eines 17 kb großen Abschnitts auf dem X-Chromosom befinden [Diehl 1986, Willard 1985]. Ungewöhnlich ist die Größe des ersten Introns (8,8kb), das sich in Zellkultur als Regulator der Expression erwiesen hat [Wight 1997]. Die Expression des PLP korreliert gut mit der Myelinisierungsphase. Es existieren mehrere Transkripte (1,6kb, 2,4kb und 3,2kb), die von drei Polyadenylierungsstellen im nichttranslatierten Exon VII herrühren [Milner 1985, Gardinier 1986]. Neben den vollständigen PLP-Transkripten existieren noch die verkürzten Formen, denen die letzten 105bp des Exon III fehlen [Nave 1985, 1987]. Das daraus resultierende Protein DM20 (26kD) ist wie das PLP (30kD) ein sehr hydrophobes, integrales Membranprotein mit vier Transmembrandomänen [Popot 1991, Weimbs 1992]. Die Hydrophobizität ist in dem hohen Anteil apolarer Aminosäuren (60%) und der Acylierung der sechs zytoplasmatischen Cysteine begründet. Bei der DM20-Isoform ist der zytoplasmatische Loop verkürzt. Das Protein ist somit noch hydrophober als PLP und enthält zwei acylierte Cysteine weniger.

Das Proteolipid Protein stellt die wesentliche Strukturkomponente des Myelins im ZNS dar. Seinem Isoprotein, dem DM20 wird eine Rolle bei der Differenzierung der Gliazellen zugewiesen, da im Myelin verstärkt das PLP, in unreifen Oligodendrozyten mehr das DM20 exprimiert wird [Kronquist 1987, Gardinier 1988]. Die DM20-Isoform wurde in geringeren Mengen auch in der Embryonalentwicklung [Timsit 1995] und den olfaktorischen Nerven [Dickinson 1997], außerhalb des ZNS im Thymus [Pribyl 1996], im Herzen [Campagnoni 1992] und im PNS [Ikenaka 1992] nachgewiesen.

Außerdem wurde ein weiteres Exon 1.1 am Anfang des ersten Introns gefunden, das einen alternativen Translationsstart enthält und vor die beiden Isoformen eine 12 Aminosäuren lange Signalsequenz setzt [Bongarzone 1999]. Diese sorgt für ein Auftreten der Proteine sr (*soma restricted*)-PLP/DM20 im Soma von Oligodendrozyten und Neuronen.

Eine weitere mögliche Funktion des PLP ist die Bildung eines Ionenkanals [Lees 1992]. Nach Inkorporation von Proteolipidpräparationen in Liposomen wurden ionophore Eigenschaften beobachtet [Reguiero 1996], die Ionenleitfähigkeit ist von Spannung und Proteinkonzentration, nicht jedoch von der Art der Ionen abhängig [Ting-Beall 1979]. Zudem bindet PLP den spezifischen Inhibitor des Protonenkanals von ATPasen, Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) [Lin 1982]. Die Ionenkanaltheorie wird ebenfalls durch Homologien zu den kanalbildenden Abschnitten des nikotinischen Acetylcholinrezeptors und des Glutamaterezeptors unterstützt [Kitagawa 1993]. Der Kombination von adhäsiven Eigenschaften und Ionenkanalfähigkeit entspringt das Modell, daß durch das PLP die Membranoberflächen im Myelin miteinander gekoppelt werden und eine Pore durch die gesamte Myelinmembran zustande kommt [Doyle 1993]. Weiterhin zeigen palmitoylierte Bereiche des PLP Homologien zu G-Proteingekoppelten Transmembranrezeptoren wie Rhodopsin und dem β 1-adrenergen Rezeptor [Bizzozero 1990].

Eine Analyse des phylogenetischen Stammbaums ergab eine hohe Konservierung des Proteins nicht nur bei Säugetieren, sondern auch bei entfernten Spezies wie Frosch und Huhn [Schließ 1991]. In Haien und Rochen wurden DM20-ähnliche Proteine (DM α , β und γ), allerdings ein Fehlen von PLP-Analoga beschrieben [Yoshida 1996]. Jene Proteine weisen eine Homologie zu den neuronalen Glykoproteinen M6A und M6B auf, die sich an der Oberfläche von Neuronen befinden [Yan 1993].

Spekulationen über die evolutionäre Entwicklung der Proteolipid Protein-Genfamilie beinhalten die Existenz eines gemeinsamen Vorläuferproteins, das beim Landgang um die PLP-spezifische Sequenz erweitert wurde. Diese Form ersetzt im ZNS das Protein P0, das Hauptprotein im PNS [Waeneldt 1990].

Aufschlüsse über die Funktion des PLP lieferten Mausmutanten, bei denen das Gen in Folge des Einbaus einer Neomycin-Kassette durch homologe Rekombination funktionsunfähig gemacht wurde. Während das *gene targeting* Experiment zuerst durch die Insertion der Kassette in Intron III durchgeführt wurde [Boison 1994], gelang dies später durch Austausch des ersten Exons gegen die Kassette [Klugmann 1997]. Im ersten Fall führt die Insertion in Intron III zu einem fehlenden Spleißen dieses Introns [Boison 1994]. Zudem bewirkt das Überlesen des Polyadenylierungssignals der Neomycin-Kassette die Bildung einer RNA in *antisense*-Orientierung, die mit der PLP-mRNA hybridisiert und abgebaut wird [Uschkureit 2000]. Die Folge ist eine starke Abnahme des PLP-Transkripts. Daß die übrig gebliebenen Transkripte noch zu einem *missense*-Protein translatiert werden, ist unwahrscheinlich, denn die Insertion der neo-Kassette in umgekehrter Orientierung führt aufgrund des Spleißdefekts zwar zu einer 50%igen Abnahme des Transkripts [Uschkureit 2000], jedoch nicht zu den morphologischen Veränderungen der PLP-Mutanten [Rosenbluth 1996, Boison 1995]. Diese zeigt wegen der PLP-Defizienz zwar ein äußerlich normales Erscheinungsbild, aber elektronenmikroskopische Aufnahmen demonstrieren das Fehlen der *intaperiod dense line*. Weitere Folgen sind Hypomyelinisierung und verminderte Reizleitung [Gutierrez 1995]. Die morphologischen Veränderungen der zweiten PLP-Mutanten (Klugmann) sind nicht so stark ausgeprägt, aber ähnlich.

Weiterhin existieren beim Menschen in Form der Pelizaeus-Merzbacher Krankheit und der milderen Form der Spastischen Paraplegia 2 sowie im Tierreich bei der *jimpy*-, *jimpy*^{*msd*}-, *rumpshaker*-Maus, der *md* (*myelin deficient*)-Ratte und dem *shaking pup*-Hund einige PLP-Mutationen, die je nach Mutation unterschiedlich starke Phänotypen haben. Bei der *jimpy*-Maus führt eine Mutation im vierten Intron zu einem Spleißdefekt [Nave 1987]. Aus diesen resultiert ein Herausschneiden des fünften Exons und somit ein *missense*-Protein in Folge einer Leserasterverschiebung. Die Mäuse weisen als neurologische Symptome Zittern, Krämpfe, Wachstumsretardierung und frühzeitiges Versterben (4-5 Wochen) auf. Im ZNS findet im Gegensatz zum PNS fast keine Myelinbildung statt. Zudem wird ein früher Tod der Oligodendrozyten beobachtet. Die *jimpy*^{*msd*}-Mutante, die auf einem Aminosäureaustausch (Valin gegen Alanin) basiert, weist einen ähnlichen Phänotyp auf [Gencic 1990]. Bei der *md* (*myelin deficient*)-Ratte kommt es zu einem Austausch (Threonin gegen Prolin) in einer Transmembrandomäne, die zu einer verminderten Myelinbildung und einer Aufweitung des ER in den stark reduziert vorkommenden Oligodendrozyten führt [Boison 1989]. Im *shaking pup*-Hund führt der Austausch eines Histidins durch Prolin in der extrazytosolischen Domäne zu *jimpy*-Symptomen [Nadon 1990]. Eine abgemilderte Form in der *rumpshaker*-Maus zeugt von einer Transition im vierten Exon (Isoleucin gegen Threonin) [Schneider 1992]. Hier ist trotz Hypomyelinisierung die Oligodendrozytenentwicklung nicht beeinträchtigt und die Lebensspanne nicht verkürzt [Griffiths 1990]. Auch im Menschen kommt es je nach Mutation bzw. Deletion zu Heterogenitäten im Phänotyp [Hudson 1989, Weimbs 1990, Otterbach 1993, Hodes 1999]. *In vitro* wurde gezeigt, daß DM20 für die Lokalisation von PLP in der Plasmamembran essentiell ist [Sinoway 1994]. Mutierte Formen des PLP akkumulieren im ER und werden abgebaut, die des DM20 erreichen die Plasmamembran [Gow 1994].

Weitere im Labor gezüchtete Mausmutanten weisen eine Hypomyelinisierung infolge von PLP-Überexpression auf [Kagawa 1994, Readhead 1994, Johnson 1995]. Dabei steigt die Ausbildung des Phänotyps mit der Zahl der integrierten Kopien, so daß möglicherweise ein überschrittener Schwellenwert einen toxischen Effekt auslöst (*gene dosage effect*) [Griffiths 1998a]. Desweiteren ist eine Kompensation der *jimpy*-Mutante durch eingebaute PLP-Transgene nicht möglich [Nadon 1994, Schneider 1995]. Die Deletion des PLP-spezifischen Bereiches kann dagegen durch Hochregulierung der DM20-Form ausgeglichen werden [Uschkureit 2000]. Einziger Phänotyp ist eine im Elektronenmikroskop sichtbare Neurodegeneration. Ein später Untergang von Axonen wurde in PLP-defizienten Mäusen gefunden [Griffiths 1998b]. Zudem wurde eine Neurodegeneration im PNS von MAG- [Fruttiger 1995] und PMP22- [Adlkofer 1995] defizienten Mäusen mit fortschreitendem Alter nachgewiesen.

Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG)

MAG, das im ZNS und PNS in geringen Mengen (1%) vorhanden ist, gehört zu den Polysialinsäure-haltigen Proteinen der Immunglobulinsuperfamilie mit signifikanter Homologie zum Neuralen Zelladhäsionsmolekül (N-CAM). Durch alternatives Spleißen entstehen zwei hochglykosylierte Formen, die sich im zytosolischen C-Terminus unterscheiden und deren molare Massen deglykosyliert 67kD (S-MAG) und 72kD (L-MAG) betragen [Lai 1987, Tropak 1988]. Dabei wird L-MAG hauptsächlich während der frühen Myelinisierungsphase des ZNS und S-MAG im adulten Stadium exprimiert [Inuzuka 1991, Pedraza 1991]. Die L-MAG-Isoform wird durch Phosphorylierung modifiziert [Afar 1990, Jaramillo 1994]. MAG ist zunächst an der Oberfläche von Oligodendrozyten sichtbar, die gerade ein Axon umwickeln [Bartsch 1989, Trapp 1989]. Daher wird dem Protein eine wichtige Funktion beim Beginn der Myelinisierung und der Ausbildung des Axon-Glia-Kontaktes eingeräumt [Arquint 1987, Trapp 1990]. Später ist es in periaxonalen und paranodalen Regionen lokalisiert [Martini 1986]. MAG-defiziente Mäuse haben einen milden Phänotyp, weisen jedoch leichte ultrastrukturelle Veränderungen auf [Li 1994, Montag 1994]. Im ZNS ist der periaxonale Ring verkleinert, mit Zytoplasma gefüllte Kanäle sind vermehrt und die Axone sind teilweise doppelt umwickelt [Bartsch 1995]. Im PNS sieht das Myelin unverändert aus, jedoch degenerieren myelinisierte Axone mit fortschreitendem Alter [Fruttiger 1995]. Letzteres wird nicht bei L-MAG-Mutanten gefunden, somit ist S-MAG für den Erhalt des Myelins im PNS essentiell [Fujita 1998].

2',3'-Cyclonukleotid-3'-phosphodiesterase (CNP)

Das CNP ist sowohl im zentralen Myelin (4%) als auch im peripheren Myelin vertreten. Durch alternatives Spleißen des Gens entstehen CNP I (46kD) und CNP II (48kD), das sich von erstem durch einen 20 Aminosäuren längeren N-Terminus unterscheidet [Kurihara 1990]. CNP taucht nicht im kompakten Myelin auf, sondern innerhalb seiner zytoplasmatischen Kanäle [Trapp 1988, Brunner 1989]. Ansonsten ist das Protein im Zellkörper und vor allem in den Ausläufern des Oligodendrozyten lokalisiert. CNP ist ein sehr früher Marker der Oligodendrozytenreifung, doch seine Funktion ist unbekannt, da das Substrat für seine enzymatische Aktivität fehlt. Eine sechsfache Überexpression von CNP in transgenen Mäusen hat unnatürliche Membranausstülpungen des Oligodendrozyten zur Folge. In 50% der Fälle wird die Bildung der MDL durch Einlagerungen von CNP statt MBP verhindert [Yin 1997]. Posttranslationale Modifikationen von CNP sind Phosphorylierung [Bradbury 1984], Isoprenylierung [Braun 1991] und Carboxylmethylierung [Cox 1994].

Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)

MOG ist ein ZNS-spezifisches hochglykosyliertes Protein (26/28kD), das während der späten Myelinisierungsphase exprimiert wird [Solly 1996] und 0,05% des Myelins ausmacht. Es

gehört zur Immunglobulinsuperfamilie und besitzt eine Transmembrandomäne, eine membranassoziierte Domäne und ein L2/HNK-1-Epitop, das für Adhäsionsmoleküle typisch ist [della Gaspera 1998]. Das Protein zeigt eine Tendenz zur Dimerisierung und ist an der Oligodendrozytenoberfläche [Scolding 1989] und in der äußeren Lamelle des Myelins [Brunner 1989] lokalisiert. Das Gen befindet sich in der *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Region [Pham-Dinh 1993]. Aufgrund seiner Fähigkeit, eine starke Autoimmunantwort auszulösen, ist es ein ideales Tiermodell (EAE) für demyelinisierende Erkrankungen wie der Multiple Sklerose [Bernard 1997]. Eine weitere Funktion des MOG beinhaltet möglicherweise die Regulation der Microtubuli-Stabilität [Dyer 1994].

Oligodendrozyten/Myelin-assoziiertes Glykoprotein (OMGP)

Das OMGP wird von Oligodendrozyten und Neuronen exprimiert und kommt nur in geringen Mengen im Myelin des ZNS vor [Habib 1998]. Das stark glykosylierte Protein mit einer Masse von 120kD ist über ein Glykophospholipid in der äußeren Membran verankert [Mikol 1988]. Weiterhin enthält OMGP ein HNK-1-Epitop [Mikol 1990]. Das Gen befindet sich in einem Intron des Neurofibromatose TypI-Gens [Viskochil 1991]. Seine Expression korreliert gut mit der Myelinisierungsphase.

Myelin-assoziiertes basisches Myelinprotein (MOBP)

MOBP ist ein ZNS-spezifisches Protein und hat strukturelle Ähnlichkeiten zu MBP [Yamamoto 1994]. Durch alternatives Spleißen entstehen fünf Transkripte, deren temporäre Expression mit den MBP-Transkripten einhergeht. Auch die Lokalisation der Translationsprodukte (12kD, 20kD und 25kD) in der *major dense line* des kompakten Myelins ist entsprechend. MOBP-defiziente Mäuse zeigen jedoch eine kompakte Myelinstruktur. Nur die radiale Komponente [Peters 1961], die an der IDL des Myelins im ZNS eine *tight junction*-ähnliche Verbindung aufbaut, ist verändert [Yamamoto 1999].

Oligodendrozyten-spezifisches Protein (OSP)

OSP ist ein hydrophobes Protein mit vier Transmembrandomänen und einer Masse von 22kD [Bronstein 1996], das Ähnlichkeiten mit dem PMP22 aufweist, aber im Gegensatz zu diesem im ZNS-Myelin (7%) vorkommt [Bronstein 1997]. Es wird in die Familie der Claudine eingeordnet, die *tight junctions* bilden [Morita 1999]. Bei OSP-defizienten Mäusen fehlen *tight junctions* im Myelin, was zu einem Verlust der radialen Komponente führt. Sein Defekt in Sertolizellen der Testes hat eine Sterilität der Männchen zur Folge [Gow 1999].

P0

Das Protein P0 ist die Hauptstrukturkomponente des peripheren Myelins. Es ist ein integrales Glykoprotein mit einer Masse von 30kD und ein Mitglied der Immunglobulinfamilie [Lemke 1985]. Durch homophile Interaktionen sorgt es für das Entstehen der *intraperiod dense line* [Filbin 1990]; heterophile Wechselwirkungen des zytoplasmatischen, basischen Teils mit negativ geladenen Phospholipiden führen zur Bildung der *major dense line* im PNS-Myelin [Ding 1994]. Das Fehlen von P0 führt zu Hypomyelinisierung, Aufweitung der IDL und Degeneration der myelinisierten peripheren Axone [Giese 1992]. Durch Kompensation des MBP ist die *major dense line* vorhanden [Martini 1995].

Peripheres Myelin Protein 22 (PMP22)

PMP22 ist ein hauptsächlich im PNS exprimiertes, hydrophobes Molekül mit vier Transmembrandomänen und einer Masse von 22kD. Strukturell ähnelt es einem Ionenkanal, enthält aber auch das charakteristische HNK-1-Epitop der neuralen Zellerkennungsmoleküle [Hammer 1993, Snipes 1992]. Erhöhte mRNA-Dosen reduzieren die Proliferation von Schwanzzellen [Zoidl 1995]. PMP22-defiziente Mäuse zeigen erst eine Hypermyelinisierung,

das Myelin ist jedoch nicht stabil und wird abgebaut [Adlkofer 1995]. PMP22-Überexpression resultiert in einer Hypomyelinisierung und ebenfalls in Degeneration des peripheren Myelins. Weitere natürliche Mutationen des Gens führen in der Maus (*Trembler*) und dem Menschen (Charcot-Marie-Tooth-Krankheit CMT1A) zu peripheren Neuropathien [Suter 1995].

Connexin 32 (Cx32)

Wie PLP und PMP22 ist Cx32 ein hydrophobes Protein mit vier Transmembrandomänen. Es ist im Organismus weit verbreitet [Spray 1995] und hat erst durch Diagnose von Neuropathien aufgrund menschlicher Mutationen (CMTX) das Interesse der Myelinforscher geweckt [Bergoffen 1993]. Im PNS wird das Protein in Schmidt-Lantermann-Einkerbungen und paranodalen Bereichen des Myelins gefunden, weiter ist es im ZNS, Leber und Dünndarm vorhanden [Spray 1995]. Cx32-defiziente Mäuse entwickeln mit fortschreitendem Alter (vier Monate) Degenerationen des PNS und eine Vergrößerung des periaxonalen Spalts [Nelles 1996]. Abnormalitäten im ZNS wurden nicht festgestellt.

UDP-Ceramidgalaktosyltransferase (CGT)

Galaktocerebroside und Sulfatide haben eine essentielle Bedeutung in der Myelinmembran [Stoffel 1997]. CGT übernimmt im ER bei deren Synthese den wichtigsten Schritt, die Übertragung eines aktivierten Galaktoserestes (UDP-Galaktose) an das Ceramid. CGT-defiziente Mäuse weisen vom 10. postnatalen Tag an einen Körpertremor, eine sich steigende Paralyse der Hinterbeine und eine kurze Lebensspanne auf [Bosio 1996, Coetzee 1996]. Anstatt der Galaktocerebroside werden Glucocerebroside und deren hydroxylierte Form in den Mutanten synthetisiert. Das Myelin im ZNS und PNS erscheint zwar kompakt und mit normaler Periodizität, jedoch weisen die paranodalen Schleifen teilweise vom Axolemma weg und die internodalen Bereiche sind nicht korrekt ausgebildet.

1.4 Gliogenese

Bei den meisten Säugetieren beginnt die Myelinisierung zwischen der späten embryonalen und der frühen postnatalen Phase, bei Maus und Ratte um den 10. postnatalen Tag bis zum 30. Tag. Im Menschen setzt die Markscheidensynthese im 6. Schwangerschaftsmonat ein und dauert bis zum Ende des 2. Lebensjahres [Yakovlev 1967].

Schwanzzellen, die peripheres Myelin produzieren, entwickeln sich aus Neuralleisten-Stammzellen [Stemple 1992], wohingegen Oligodendrozyten ihren Ursprung in multipotenten neuralen Stammzellen des Neuralrohrs nehmen. Diese teilen sich zunächst symmetrisch im Neuroepithel, später findet eine asymmetrische Teilung in proliferierende und differenzierende Tochterzellen statt [Huttner 1997], die von *notch1* propagiert wird [Chenn 1995]. Vom 10.-16. embryonalen Tag (Maus) an entwickeln sich neurale Stammzellen in der ventrikularen Zone hauptsächlich zu Neuronen, ab dem 17. Tag generieren sie in der subventrikularen Zone vornehmlich zu Gliazellen. Dabei ist das *sonic hedgehog protein* (shh) ein induktives Signal für die Entwicklung des embryonalen Rückenmarks. Vom Notochord sezerniert induziert es seine eigene Expression in der Bodenplatte und trägt zu seiner Differenzierung bei [Edlund 1999]. Bei Mausmutanten ohne Notochord und Bodenplatte werden keine Motorneuronen und Oligodendrozyten generiert.

Im entwickelnden Nervensystem wird die Differenzierung der Zelle zuerst von extrinsischen, dann von intrinsischen Faktoren signalisiert. Ein grobes Schema über das komplexe Zusammenspiel gibt Abb. 4.

Frühe neurale Stammzellen (NSC) in der ventrikularen Zone proliferieren durch Stimuli von FGF2 und entwickeln sich zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten [Davis 1994, Weiss 1996]. Diese multipotenten NSC's können zu jedem Zeitpunkt aus dem Hirn isoliert

werden. Sie exprimieren Nestin, das bei der Zelldifferenzierung herunterreguliert wird. [Weiss 1996, McKay 1997]. Eine Differenzierung in Astrozyten wird durch das *bone morphogenetic protein* (BMP2/4) und den *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) erreicht [Gross 1996, Rajan 1998]. FGF2 und das Thyroidhormon T3 bevorzugen eine Differenzierung von NSC's in Oligodendrozyten [Ben Hur 1998, Williams 1997, Qian 1997, Johe 1996].

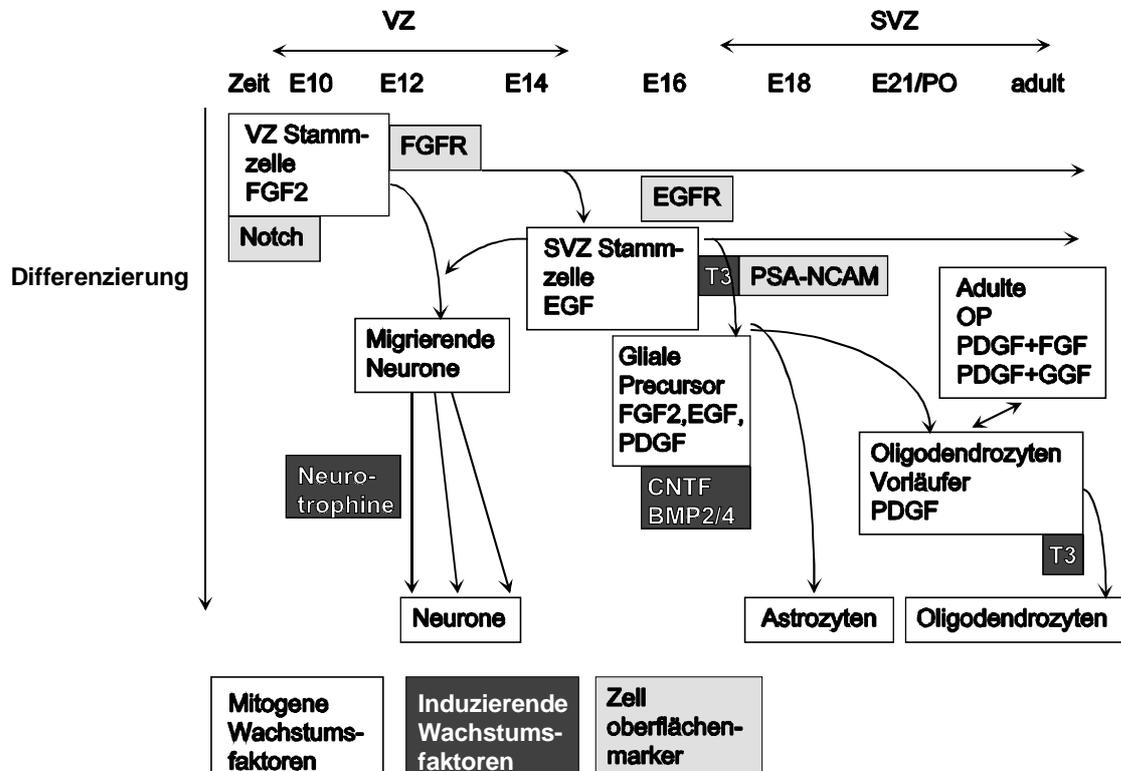


Abb. 4: Differenzierung von Neuralen Stammzellen in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten [Rogister 1999].

FGF2: *Basic Fibroblast Growth Factor*, EGF: *Epidermal Growth Factor*, GGF: *Glial Growth Factor*, PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*, CNTF: *Ciliary Neurotrophic Factor*, T3: *Thyroid Hormone*, BMP: *Bone Morphogenic Protein*.

Oligodendrozyten Progenitorzellen (OP oder O2A) sind die Vorläufer der Oligodendrozyten, die sich aus dem optischen Nerv und anderen Bereichen des ZNS isolieren lassen [Raff 1989]. Sie sind bipolare, migrierende Zellen, die spezifische Ganglioside, Chondroitinsulfat Proteoglycan NG2 und den *platelet-derived growth factor*-Rezeptor alpha (PDGFR α) exprimieren [Nishiyama 1996]. Der Rezeptor signalisiert den Vorläuferzellen Mitose und Migration als Antwort auf PDGF, das von Neuronen und Astrozyten sezerniert wird [Raff 1989, Sasahara 1992]. In PDGF- α -/- Mäusen ist die Zahl der PDGF-R α positiven OP herabgesetzt, nicht jedoch in PDGF- β -/- Mäusen [Fruttiger, 1999]. Die Folge ist Oligodendrozytentod und Hypomyelinisierung. PDGF- α überexprimierende Mäuse haben eine verstärkte OP-Teilung [Calver, 1998]. Überschüssige Oligodendrozyten werden durch programmierten Zelltod eliminiert. Überlebensfaktoren wie der *Insulin Growth Factor* IGF-1 erhöht als positiver Regulator das Überleben und die Differenzierung von Neuronen und Oligodendrozyten [Barres 1992, Raff 1993]. Ebenfalls mitogen wirkt der *Basic Fibroblast Growth Factor* (FGF2) [Milner 1996, Simpson 1999], der PDGF-R α in OP hochreguliert und ihre Differenzierung in Oligodendrozyten blockiert [McKinnon 1990, Bogler 1990]. Bei der weiteren Reifung werden OP multipolar, synthetisieren Sulfatide und Glykolipide, die von A2B5- und O4-Antikörpern erkannt werden.

Da ausdifferenzierte Oligodendrozyten nicht mehr teilungsfähig sind, enthält das adulte ZNS einen Pool an OP, die sich langsamer teilen und wandern als neonatale [Noble 1992]. Diese differenzieren durch Stimulation mit Insulin oder durch Präsenz von Neuronen [Dubois-Dalcq 1987]. Außerdem lassen sie sich durch PDGF/FGF2 oder PDGF/GGF2 bei erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentrationen in die neonatale Form transformieren [Shi 1998].

Als intrinsische Faktoren kontrollieren drei Typen von Transkriptionsfaktoren die OP-Entwicklung. Ein Zinkfinger-DNA-bindendes Protein Myelin *transcription factor 1* (MyT1) wird sowohl von OP als auch von sich differenzierenden Neuronen synthetisiert [Armstrong 1995, Kim 1997]. Zum zweiten Typ gehören POU-Domänen Transkriptionsfaktoren wie SCIP/Oct6 und Brn-1/Brn-2 [Schreiber 1997], die zusammen mit Sox DNA-bindenden Proteinen 10 und 11 [Kuhlbrodt 1998] von OP exprimiert werden. Schwanzzellen von SCIP -/- Mausmutanten exprimieren nur die frühen Myelinmarker und verbleiben zunächst in einem Promyelin-Stadium [Jaegle 1996]. Nach einer zeitlichen Verzögerung differenzieren sie weiter und produzieren Myelin. Zur dritten Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die für die Oligodendrozytenreife wichtig sind, werden die *Cyclin-dependant* Kinase-Inhibitoren p27Kip1 und p21Kip1 gezählt. Die Vorläuferzellen durchlaufen eine bestimmte Zahl von Zellteilungen, bevor sie aus dem Zellzyklus austreten und differenzieren [Raff 1989, Barres 1994]. Dabei wird p27 bei jeder Teilung akkumuliert [Durand 1997]. Ohne PDGF ist diese Akkumulation sogar noch verstärkt und Differenzierung ist die Folge [Edlund 1999]. In p27 -/- Mausmutanten gehen OP durch mehr Zellzyklen, bevor sie differenzieren [Durand 1998]. Eine Anreicherung von p27 wird zudem durch Glutamat oder einer Depolarisierung der Zelle erreicht [Ghiani 1999].

Molekulare Interaktionen zwischen Oligodendrozyten und Axonen spielen eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Markscheidenbildung. Wenn die elektrische Aktivität von Axonen durch den Na⁺-Kanal-Blocker Tetrodotoxin unterdrückt wird, so ist die Myelinisierung *in vivo* und *in vitro* unterdrückt [Demerens 1996]. Umgekehrt ist die normale Expression von MAG [Yin 1998] und PLP [Griffiths 1998] von Oligodendrozyten für die Funktion von Axonen und deren Überleben erforderlich. Zudem sekretieren prämyelinisierende Oligodendrozyten ein Protein, daß zu einer Clusterung von Na⁺-Kanälen in Axonen führt [Kaplan 1997]. Galaktosyltransferase defiziente Mausmutanten, die keine Cerebroside und Sulfatide synthetisieren, weisen Abnormalitäten im nodalen und paranodalen Bereich des Axons auf [Bosio 1998, Dupree 1998].

Beim frühen Axon-Oligodendrozyten-Kontakt ist *Jagged1* in der axonalen Membran ein Ligand für den *Notch1*-Rezeptor der Oligodendrozyten und kann deren Differenzierung unterbinden [Wang 1998]. Weiterhin regulieren axonale Neurotransmitter wie Glutamat die Funktion von Oligodendrozyten [Gallo 1996] und deren Zahl [Knutson 1997, Yuan 1998]. Als weitere Signalmoleküle werden Adhäsionsmoleküle (MAG, NCAM120, F3) und extrazelluläre Matrixbestandteile diskutiert. Zwar wurden Gene gefunden, deren Produkte durch Bindung an Myelogene oder deren Promotor das Myelinisierungsprogramm kontrollieren [Hudson 1999, Awatramani 1997], allerdings ist noch kein „Mastergen“ bekannt, das den Prozeß in Gang setzt.

2. Bestimmung der Genexpression

Die Entschlüsselung der genomischen Sequenz aller Spezies bis hin zum Genom des Menschen ist zu einem erreichbaren Ziel geworden. Diese Analyse ist allerdings nur der erste Schritt zur Aufschlüsselung der genetischen Komplexität. Die zweite Ebene ist die Bestimmung der zeitlich und lokal begrenzten Expression der Gene. Unterschiedlich exprimierte Gentranskripte sind wertvolle Indikatoren für den Ursprung und pathologischen Verlauf von Krankheiten sowie körpereigene Kompensationsmechanismen, den Krankheitszustand zu verbessern.

In den letzten Jahren wurden Techniken entwickelt, die eine verlässliche und automatisierbare Bewertung der Genexpression zulassen. All diese Techniken basieren auf Mechanismen, die mRNA-Transkriptzahl in einem Gewebe oder einer Zellprobe zu messen. *cDNA-substraction* oder *differential display* sind nützliche Werkzeuge für Genvergleiche [Hedrick 1984, Liang 1992], jedoch zeigen sie nur ein Teil des Gesamtbildes und geben keinen Hinweis auf die Häufigkeit eines Gentranskripts. Das *expressed sequence tag* (EST)-Projekt ist eine wertvolle Quelle für neu entdeckte Gene [Adams 1991, 1992], aber wie bei *Northern Blot*-Analyse, *RNAse-protection* und Reverse Transkriptase (RT)-PCR-Technik ist nur eine begrenzte Anzahl von Genen gleichzeitig analysierbar [Alwine 1977, Zinn 1983, Veres 1987]. Die SAGE (*serial analysis of gene expression*)-Technik hingegen erlaubt eine schnelle und detaillierte Analyse von Tausenden Transkripten [Velculescu 1995].

Die Methode basiert auf zwei Prinzipien: Zum einen ist nur eine kurze Nukleotidsequenz aus der 3'-Region der mRNA für die Identifikation des Gens erforderlich. Eine Sequenz von neun Basenpaaren ermöglicht die Unterscheidung von 262.144 (4^9) Transkripten. Das ist mehr als die Anzahl aller im Genom vorhandenen Gene. Zum zweiten erlaubt die Aneinanderreihung der kurzen Sequenzen eine effiziente automatisierte Analyse mittels Sequenzierung. Ein nicht zu unterschätzender Vorteil dieser Technik ist die Bestimmung der Leserichtung der Gene. Werden zwei in der Ableserichtung entgegengesetzte Transkripte eines Gens gestartet, so läßt sich dies nur mit der SAGE-Technik feststellen.

Abb. 5 stellt die Prinzipien der Analyse der mRNA-Expression mit der SAGE-Methode dar. Mit biotinylierten Primern wird aus polyA-RNA doppelsträngige cDNA synthetisiert. Die cDNA wird mit einem 4bp erkennendem Restriktionsenzym (*anchoring enzyme*) verdaut, die statistisch alle 256bp schneiden. Das 3'-Ende der cDNA wird durch Bindung an Streptavidin *beads* isoliert. Die Probe wird in zwei Hälften unterteilt und das cDNA-Ende mit jeweils einem *Linker* (1 bzw. 2) ligiert, der eine Erkennungstelle für ein TypIIS-Restriktionsenzym (*tagging enzyme*) besitzt. Dieses schneidet bis zu 20bp versetzt von der asymmetrischen Erkennungsstelle. Dadurch entsteht eine an dem Linker gebundene kurze Sequenz (*Tag*), die für jedes Gen einzigartig ist. Um größere Mengen an Material zu gewinnen, werden die *Linker1-Tags* nach Auffüllen der überstehenden Enden mit den *Linker2-Tags* ligiert (*Linker-ditag*). Die Ligationsprodukte werden mit Linker-spezifischen Primern (1 bzw. 2) amplifiziert. Danach wird der nicht mehr gebrauchte Linker durch einen weiteren enzymatischen Verdau mit dem *anchoring enzyme* freigesetzt. Die isolierten *Ditags* werden durch Ligation aneinandergereiht (*Concatemere*), in einen Vektor kloniert und in Zellen transfiziert. Aus den Zellen werden die *Concatemere* über PCR amplifiziert und schließlich sequenziert.

Eine weitere vielversprechende Methode ist die *Mikro-Array*- oder *Chip*-Technik. Hier werden ganze Genbibliotheken auf einen Chip gebracht. Die Gene auf dem Chip werden mit Fluoreszenz-markierter cDNA, die aus der mRNA der zu untersuchenden Gewebeprobe generiert wurde, hybridisiert. Durch Vergleiche von gesundem mit krankem Material können alle interessanten Gene in einem Versuch anhand der Fluoreszenzunterschiede detektiert werden. Dabei ist allerdings die Kenntnis der Klone in der Genbibliothek erforderlich. Eine ideale Analysemethode ist die Kombination der SAGE- und der *Mikro-Array*-Technik. Die SAGE-Methode liefert neue oder bekannte Gene, die bei einer Erkrankung eine Rolle spielen können. Diese werden auf einen Chip projiziert, mit dem sich nun Proben von individuellen Kandidaten messen lassen.

3. Transgene Mausmodelle

Die Entwicklung von transgenen Mausmodellen durch die Integration einer exogenen DNA-Sequenz in die Keimbahn hat in den letzten 15 Jahren das Gebiet der molekularen Biologie revolutioniert. Durch transgene Techniken ist es möglich, zusätzliche Gene in das Erbgut einzuschleusen, Mutationen in ein bestehendes Gen einzuführen oder dieses ganz auszuschalten. Auf diese Weise ist eine exakte funktionelle Analyse von Proteinen *in vivo* möglich. Desweiteren können Mechanismen zur Expression und Regulation von Genen erforscht und Tiermodelle für menschliche Erkrankungen entwickelt werden. Hierzu wurden drei verschiedene Techniken zur Generierung transgener Mausmutanten entwickelt:

Die erste Variante besteht in der Mikroinjektion der DNA in den Zellkern von befruchteten, ungeteilten Eizellen [Gordon 1983, Hogan 1986]. Bei dieser Methode wird eine Lösung, die das Transgen enthält, mittels fein ausgezogener Glaskapillaren in den männlichen Vorkern der Eizelle injiziert. Die über Nacht geteilten Zweizellstadien werden in den Eileiter von scheinsschwangeren Leihmuttertieren (Foster) reimplantiert. Statistisch enthält etwa jeder achte Nachkommen das übertragene Transgen, dessen Einbau durch heterologe Rekombination anhand der *Southern Blot*-Technik überprüft wird. Die Integration dieses DNA-Segments ins Genom geschieht zufällig und oft in Clustern von mehreren Kopien hintereinander. Dabei ist der Einbau in einen zufälligen Genlocus problematisch, da das Ablesen eines endogenen Gens gestört sein kann [Keller 1990, Gordon 1990].

Eine alternative Methode zur Erzeugung transgener Tiere ist der retrovirale Transfer [Stewart 1987, van der Putten 1985]. Hierbei werden Embryonen mit retroviralen Vektoren infiziert, die die Verpackung und Einschleusung des Transgens in das Genom erlauben, selbst jedoch keinerlei pathogene Eigenschaften der Retroviren mehr aufweisen. Wie bei der Mikroinjektion kann die Lokalisation der Insertion nicht beeinflusst werden. Die einfache Durchführung und hohe Effizienz der Methode macht sie jedoch zu einem beliebten Instrument bei der somatischen Gentherapie.

Im Vergleich zu den ersten beiden Fällen bietet die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen den Vorteil, gezielte und gerichtete Veränderungen von Genen vorzunehmen [Robertson 1987, 1991]. Im Gegensatz zu den oben genannten Genadditionen werden hierbei endogene Gensequenzen in einem homologen Rekombinationsereignis durch die Sequenzen des Transgens ausgetauscht. Endogene Gene können somit ausgeschaltet (*knock out*) oder mutiert werden, was eine genaue Analyse deren Funktion ermöglicht. Dem Vorteil der exakten Lokalisation steht eine komplexere Durchführung gegenüber. Die Voraussetzung ist die Kultivierung totipotenter embryonaler Stammzellen (ES-Zellen), die aus der inneren Zellmasse von Blastozysten stammen und nicht differenzieren dürfen. In diesen Zellen wird mit Hilfe homologer Rekombination ein gewünschter Genabschnitt durch das Transgen eines entsprechenden Konstruktes ausgetauscht. Da dieses Ereignis recht selten ist, sorgen Selektionsmarker für eine Anreicherung der homologen Rekombinationen. Dazu gehören das Herpes simplex Virus Thymidin Kinase Gen (TK-box), das die Zellen gegenüber Gancyclovir empfindlich macht und Zellen mit heterologen Rekombinationen absterben läßt, und das Neomycinphosphorylase-Gen (neo-box), das die rekombinierten Zellen resistent gegen G418 macht. Durch Injektion der ES-Zellen in Blastozysten können die rekombinierten Zellen in die Keimbahn transmittieren und vererbt werden. Dieser Vorgang hat ebenfalls eine niedrige Frequenz.

II. Aufgabenstellung

Basisches Myelinprotein (MBP) und Proteolipid Protein (PLP) sind die beiden Hauptstrukturkomponenten des Myelins im ZNS. Bei der früher in diesem Laboratorium generierten *plp*^{-/-} Maus [Boison 1994] führt das Fehlen des Proteins zu einem Verlust der Adhäsion und einer Aufweitung der *intraperiod dense line*. In der natürlichen Mauslinie *shiverer* ist das MBP deletiert. Die Folge sind Hypomyelinisierung und eine kurze Lebensspanne. Aus der Kreuzung von *shiverer*-Maus und *plp*^{-/-} Maus resultierte die *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante. Diese entwickelt zwar einen ähnlichen neurologischen Phänotyp wie die *shiverer*-Maus (Zittern und Krämpfe), jedoch kommt es zur Bildung von sogenanntem Pseudo-Myelin und einer normalen Lebensspanne.

Diese Doppelmutante, die den völligen Verlust der beiden wichtigsten Myelinkomponenten aufweist, bietet ein ideales Modell zur Untersuchung von neurologischen Krankheiten.

In der vorliegenden Arbeit sollte die unterschiedliche Expression von Genen während der Myelinisierung analysiert werden. Mittels der *serial analysis of gene expression* (SAGE)-Methode sollte ein Vergleich der Transkripte der Doppelmutante mit denen des Wildtyps erstellt werden. Die unterschiedliche Expression von in der SAGE-Methode markanten Genen sollte durch weitere Methoden (*Northern Blot*-, *Mikro-Array*- und *Western Blot*-Analyse) verifiziert werden.

Da ein Fehlen des MBP und ein Überschuss des PLP zu Hypomyelinisierung und neurologischen Symptomen führt, stellt sich die Frage, ob eine äquimolare Stöchiometrie der beiden Gene für eine intakte Myelinstruktur essentiell ist. Aus dieser Fragestellung resultierte die zweite Aufgabe. Durch Mikroinjektion sollte eine gleichzeitige MBP- und PLP-Expression in transgenen Mäusen generiert und durch diese Gentherapie die Wiederherstellung des myelinisierenden Phänotyps in der *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Maus (Doppelmutante) erreicht werden.

III. Ergebnisse

1. Untersuchung der Genexpression in der *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante

1.1 *Serial analysis of gene expression (SAGE)*-Methode und Auswertung der Daten

Die SAGE-Methode stellt die Grundlage für die Untersuchung der Genexpression in der MBP/PLP-defizienten Maus dar. Sie hat den Vorteil, eine Aussage über alle im untersuchten Gewebe exprimierten Gene zu machen. Durch einen Vergleich der Häufigkeit der Gene (*Tags*) in der Doppelmutante und im Wildtyp wurde versucht, im Hinblick auf die Myelinisierung wichtige Regulationen bzw. Kompensationen zu untersuchen. Daher wurde als Ausgangspunkt mRNA aus dem Hirn von Mäusen im Alter von 20 Tagen, dem Maximum der Myelinisierungsphase, gewählt. Bei der Auswahl der Mäuse wurde auf das exakte Alter, Geschlecht und Gewicht geachtet. Experimente wurden immer parallel durchgeführt, um Artefakte zu vermeiden. Als Wildtypkontrolle wurden C57/Bl6-Mäuse ausgesucht, die dem Hintergrund der Doppelmutante am nächsten kommen (C57/Bl6-C3H/HeJ). Von jeweils drei männlichen Tieren wurde mRNA präpariert, die mit biotinylierten Oligo-dT-Primern revers transkribiert wurde. Die resultierende cDNA wurde mit *Nla*III verdaut, das als sogenanntes *anchoring enzyme* benutzt wurde. Das endständige cDNA-Fragment eines jeden Gens wurde aufgrund der Biotinylierung mittels magnetischer Streptavidin-Kügelchen von den restlichen Fragmenten abgetrennt. Der Ansatz wurde in zwei Hälften geteilt und mit den Linkern 1 und 2 ligiert. Die Linker wurden generiert, indem die Primer 1A mit 1B bzw. 2A mit 2B *annealed* wurden. Die A-Primer wurden zuvor am 5'-Ende phosphoryliert, um eine Ligation zu ermöglichen. Die erfolgreiche Phosphorylierung wurde durch einen Selbstligationstest der Linker bestätigt.

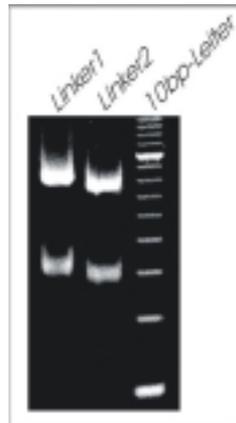


Abb. 6: Selbstligation der Linker:

Die obere Bande bei 80bp zeigt die selbstligierten Linker, die untere Bande bei 40bp die unligierten Linker, die stärkste Bande der 100bp-Leiter entspricht der 100bp-Bande.

Die Linker enthielten die Erkennungssequenz für das TypIIS-Restriktionsenzym *Bsm*FI. Dieses Enzym schneidet 14bp 3'-wärts versetzt von seiner Erkennungsstelle GGGAC, in geringem Maße auch 13bp von ihr entfernt. Nach Restriktion der cDNA-Fragmente in den zwei Ansätzen mit *Bsm*FI wurden die Enden mit Klenow aufgefüllt. Die Linker enthielten an ihren 3'-Enden nun jeweils die Basen CATG und weitere 11bp (selten 10bp), die den sogenannten *Tag* beinhalten, der für jedes Gen spezifisch ist. Der folgende Schritt diente dazu, genügend Material für eine weitere Analyse herzustellen. Die *Linker1-Tags* aus dem ersten Ansatz wurden mit den *Linker2-Tags* aus dem zweiten Ansatz an den *Tag*-Enden ligiert und das gewünschte Ligationsprodukt wurde mittels PCR vermehrt. Bei der Ligation durften die *Linker-Tags* nicht an den Linker-Enden ligieren. Das wurde vermieden, indem die Linker

5'-überhängende Enden und einen aminomodifizierten Terminus am Gegenstrang besaßen. Die Amplifikation des Ligationsproduktes (Linker1-*Ditag*-Linker2) wurde mit den Primern 1 und 2 durchgeführt, die für die Linker1 bzw. Linker2 spezifisch sind. Anstatt der Taq-Polymerase, die statistisch Lesefehler in die Sequenz einfügt und somit falsche *Tags* produziert, wurde auf die Elongase zurückgegriffen, die solche Fehler vermeidet. Die entstandenen PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 7).

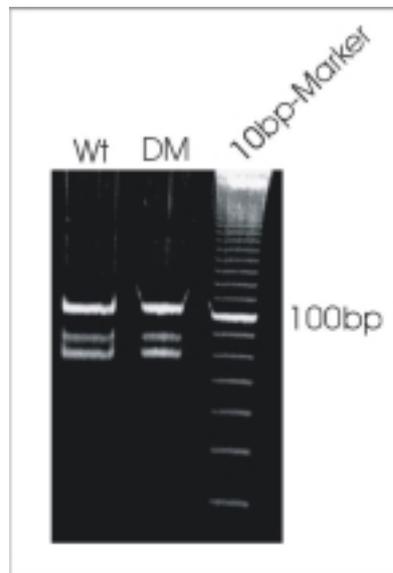


Abb. 7: PCR zur Amplifikation der Linker-*Ditags*:
Das gewünschte Amplifikationsprodukt läuft bei 102bp, weitere Nebenbanden sind bei 80-90bp zu erkennen.

Als Hauptprodukt wurde eine 102bp-Bande amplifiziert, die das gewünschte Produkt darstellte. Weiterhin wies das Gel zwei weitere Nebenbanden zwischen 80 und 90bp als übliche, unerwünschte Nebenprodukte auf. Nach der Amplifikation waren die Linker nicht mehr nötig und wurden nach der Isolation der 102bp-Hauptbande die *Ditags* von den Linkern durch einen weiteren *NlaIII*-Verdau abgetrennt.

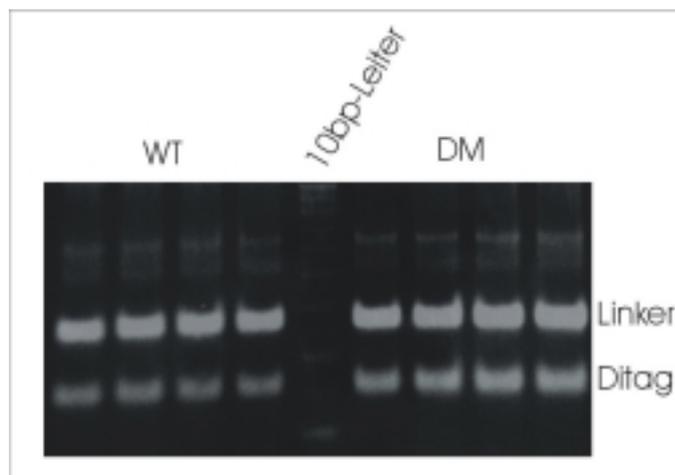


Abb. 8: Auftrennung der *Ditags* mittels Polyacrylamidgelelektrophorese:
Spuren 1-4: Wildtyp, Spur 5: 10bp-Leiter, Spuren 6-9: Doppelmutante.
Die Banden bei 40bp und 24-26bp zeigen die Linker bzw. die *Ditags*.

Die verdaute Probe wurde wiederum gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel zeigte eine Doppelbande bei 40bp und eine Bande bei 24-26bp, die den beiden Linkern bzw. den *Ditags* entsprach. Letztere wurden aus dem Gel isoliert.

Die *Ditags* wurden im nächsten Schritt zu Concatemeren ligiert. Hierbei entsteht in Konkurrenz zu den wachsenden Fragmenten eine Ringschlußbildung bei den Concatemeren. Daher wurde im Ligationsansatz die Konzentration der *Ditags* möglichst hoch und die Ligationszeit kurz gehalten. Die Concatemere wurden über Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Die Bereiche von 400-800bp und 800bp-4kb wurden ausgeschnitten und die DNA aus den Banden isoliert.



Abb. 9: Auftrennung der Concatemere mittels Polyacrylamidgelelektrophorese:
Spur 1: Wildtyp-Concatemere, Spur 2: Doppelmutante-Concatemere, Spur 3: 100bp-Leiter.

Die Concatemere wurden in die *Nla*III-kompatible *Sph*I-Schnittstelle des pZero-Vektors inkloniert. Dieser enthält *ccdB*, ein bakterielles Toxin, das vom *LacZ*-Promoter gestartet wird. Bei erfolgreicher Ligation wird das Toxin nicht produziert. Alle Zellen, die Plasmide ohne *Insert* enthalten, sterben ab. Mit den Ligationsansätzen wurden DH10B-Zellen elektroporiert. Die mit Zeocin selektierten Klone wurden auf ihre Concatemerenlänge hin überprüft. Die Inserts der Klone wurden mit Hilfe der PCR mit den Vektor-spezifischen Primern M13F und M13R amplifiziert und lagen hauptsächlich zwischen 500bp und 1kb für den oberen ausgeschnittenen Bereich und bei 300-600bp für den unteren Bereich.

Es zeigte sich, daß bei der Auftrennung der Concatemeren ihr Laufverhalten nicht exakt mit ihrer Größe korrelierte. Die Produkte liefen in der Elektrophorese aufgrund von Wechselwirkungen (Aggregation) langsamer als in der Theorie. Aufgrund der *Insert*-Größe wurde mit den Klonen aus dem oberen Bereich weitergearbeitet.

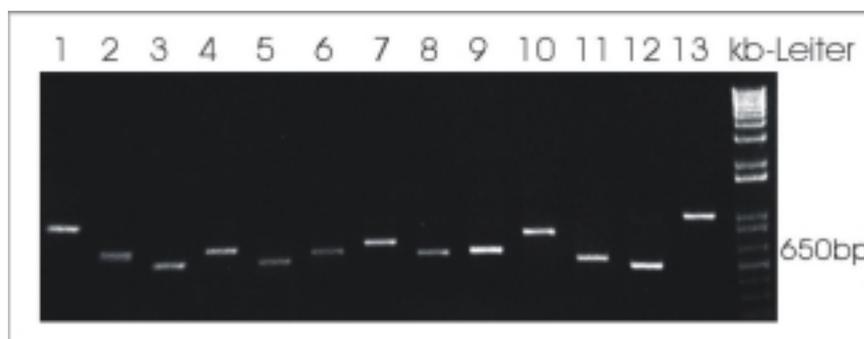


Abb. 10: Gelelektrophoretische Auftrennung der Klon-*Inserts*, die durch PCR amplifiziert wurden.

Da die Sequenzierung den kostenintensivsten Teil der SAGE-Methode darstellt, war es wichtig, die Leseweiten der Sequenzierung optimal auszunutzen. Daher wurden nur jene *Inserts* sequenziert, die oberhalb der kritischen Größe von 620bp lagen. Zur Vermeidung von Fehlern wurden die Sequenzen kontrollgelesen.

Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe eines Programmes von Dr. Kay Hofmann, MEMOREC GmbH, ausgewertet. Dieses extrahiert die *Tags* aus den Sequenzdaten, wobei Duplikationen von *Ditags* verworfen werden. Die Wahrscheinlichkeit, daß zwei bestimmte *Tags* sich mehr als einmal finden, ist statistisch sehr gering und wahrscheinlich ein PCR-Artefakt. Es wurden 30.037 *Tags* für den Wildtyp und 31.329 *Tags* für die Doppelmutante gesammelt und nach Signifikanz aufgelistet (siehe Anhang). Die Signifikanz gibt die Wahrscheinlichkeit an, daß ein Unterschied in der Genexpression vorliegt. Hier spielt nicht nur der Faktor des *Tag*-Unterschiedes eine Rolle, sondern auch die Anzahl der *Tags*, da die Unterschiede nach mathematischen Berechnungen um so sicherer sind, je öfter die *Tags* vorhanden sind [Audic 1997]. Zum Beispiel ist die Wahrscheinlichkeit, daß bei einer 47:15-Verteilung tatsächlich ein Unterschied in der Genexpression vorliegt, größer als bei einer 19:1-Verteilung. Einen Überblick über die Verteilung der *Tags* liefert Abb. 11, in der alle *Tags* des Wildtyps und der Doppelmutante in einem Diagramm dargestellt sind.

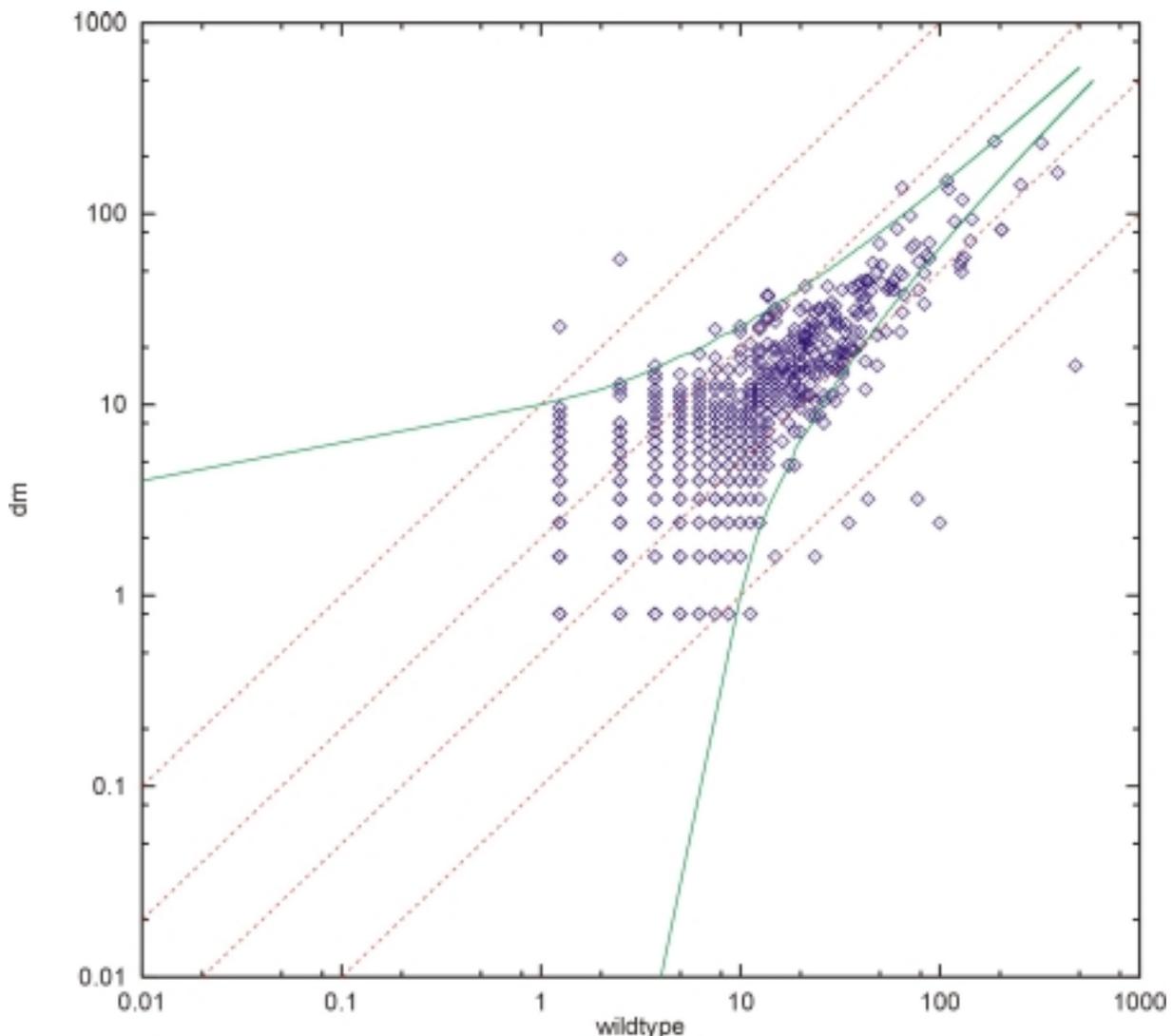


Abb. 11: Darstellung der Signifikanz der Unterschiede aller ermittelten *Tags*:

Jedes Kästchen symbolisiert einen *Tag*, die x-Achse gibt seine Häufigkeit im Wildtyp, die y-Achse die in der Doppelmutante an (logarithmische Skalierung). Auf der Diagonalen sind die *Tags* in beiden Proben gleich häufig. Parallel zur Geraden geben die gestrichelten Linien einen 2- bzw. 10fachen Unterschied in einer Probe an.

Je näher die Kästchen an der Diagonalen liegen, desto kleiner sind die Unterschiede der *Tags*. Außerhalb der durchgezogenen Kurve verfügen die *Tags* über eine 95%ige Wahrscheinlichkeit, daß sie signifikant unterschiedlich sind. Die *Tags*, die in einer Mauslinie nicht vorhanden waren, wurden nicht mit aufgetragen, da der Logarithmus von 0 nicht existiert.

Insgesamt wurden 16.379 verschiedene *Tags* aufgelistet, wobei einem Gen aufgrund alternativer Polyadenylierung oder Mutation teilweise mehrere *Tags* zugeordnet werden konnten. Unter den signifikant unterschiedlichsten *Tags* wurden die ersten 500 näher charakterisiert. Den *Tags* wurde mittels Datenbankrecherche direkt ein Maus-Gen zugeordnet oder ein Gen aus einer anderen Spezies, wenn zu den *Tags* passende Maus-Est's deutliche Homologien aufwiesen. Zunächst wurden die *Tags* eliminiert, bei denen sich die Unterschiede mehrerer *Tags* eines Gens offensichtlich durch Mutation im *Tag* oder im CATG davor relativierten. Nicht zusammengezogen wurden jene *Tags*, die zwar einem Gen entsprachen, bei denen sich jedoch mehrere CATG's zwischen den *Tag*-Sequenzen befanden. Diese beruhten auf unterschiedlichen Polyadenylierungen. Die Linker zeigten einen Anteil von 6,5%.

Artefakte:

TAG	WT	DM	GEN
TCCCCGTACAT	1168	690	Linker 2
TCCCTATTAAG	1103	1010	Linker 1
GGCTTCGGTCT	116	3	<i>Acidic Ribosomal Phosphoprotein P0</i>
GGCTTTGGTCT	3	73	
TGGGCATCCAC	84	4	L26
CACGGCTTTCA	1	32	
GGTGAGCCTGA	28	2	<i>Thiol-specific Antioxidant</i>
GGGAAGTCTGC	1	19	
TTCTAGGAATG	0	12	Alpha-Tropomyosin
TCCAGAAAATC	8	0	
GCTCAGCTTAG	12	0	Procollagen III
ACAGGGTTGGC	1	11	
CTTCCCCGGGA	23	9	Cu-Zn-Superoxid-Dismutase
CTTCCCCGGAA	0	7	
GGGATTGCTGT	5	1	Unbekannt
GGAATTGCTGT	0	7	
GTGGCTCACAA	368	295	<i>B2-Repeat</i>
ATGGCTCGCAA	0	15	
CAGGAGTTCAA	0	8	BRCA2
TTGCACCTCCT	5	3	

Standards:

TAG	WT	DM	GEN
GCCTCCAAGGA	131	114	GAPDH
GCTGCCCTAGA	148	148	Alpha-Tubulin
GCAGGCACTCA	20	18	Beta-Tubulin
GAGCGTTTTGG	77	38	Cyclophilin
TTTCAGCAGTG	6	3	HPRT
GTGACCACGGG	62	50	18S RNA
GAAGTCGGAAT	53	62	28S RNA
GTAAGCATAAA	34	33	Ubiquitin
GTAAGCAAAAA	31	35	

Die weiteren *Tags* wurden nach funktionellen Aspekten in Gruppen unterteilt. Um sich an einem Standard zu orientieren, wurden einige *Tags* für *housekeeping*-Gene aufgelistet. Diese treten ubiquitär in jeder Zelle auf und haben eine geringe Wahrscheinlichkeit, deutlich reguliert zu sein. Die Standards zeigten relativ ausgeglichene Werte für GAPDH, Ubiquitin, alpha- und beta-Tubulin und 18S- und 28S-RNA. Beim Cyclophilin und HPRT war die *Tag*-Zahl in der Doppelmutante erniedrigt. Insgesamt wurde von einem gemittelten Standardwert ausgegangen, der in der Doppelmutante um 15% unter dem des Wildtyps (WT = 100%) lag. Zunächst wurden Oligodendrozyten-spezifische Gene näher betrachtet. Erwartungsgemäß zeigten die *Tags* für MBP und PLP einen drastischen Unterschied. Im Wildtyp waren die MBP-*Tags* fünfmal häufiger als die PLP-*Tags*. Das MBP war das mit Abstand häufigste Gen. In der Doppelmutante wurden 3,5% MBP-*Tags* gegenüber dem Wildtyp registriert. Zusätzlich enthielt der Wildtyp einen weiteren *Tag* für ein verkürztes Transkript, das allerdings nur 0,5% des gesamten MBP's ausmachte. Für das PLP wurden *Tags* für alle drei Transkripte beobachtet, deren Anteil in der Doppelmutante auf 7% gegenüber dem Wildtyp gesunken war. Dieser Anteil korreliert gut mit Beobachtungen, daß ein schwaches Transkript in PLP-defizienten Mäusen gefunden wurde, bei dem die Neomycin-Kassette nicht herausgespleißt wird. Die *Tag*-Zahlen der frühen Myelogene *Myelin-associated Glycoprotein* (MAG) und der 2', 3'-*Cyclic Nucleotide-3'-phosphodiesterase* (CNP) waren in der Doppelmutante deutlich erhöht. Andere Myelogene wie *Myelin Oligodendrocyte basic Protein* (MOBP), *Oligodendrocyte-Myelin Glycoprotein* (OMGP), *Oligodendrocyte-specific Protein* (OSP), MAL und Connexin32 zeigten niedrigere *Tag*-Zahlen in der Doppelmutante; der *Tag* für das *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein* (MOG) war unverändert.

Myelogene:

TAG	WT	DM	GEN
GCTTCGTCCAG	560	20	MBP
GCGAGACGCTG	3	0	MBP (kurz)
CACACACACAC	40	3	PLP (3,2kb)
AAATTATTGGG	48	4	PLP (2,4kb)
GGCCGAGGCAC	10	0	PLP (1,6kb)
CGCAGCGTTGG	83	42	MOBP
TTAATCCCAA	17	41	CNP (lang)
CCTTCCACCTG	4	6	CNP (kurz)
TTAGTCTGACT	5	5	MOG
ATGTACAGTTG	2	0	OMGP
TCGGTGGGGAG	5	2	Connexin 32
AAATAAATGTC	2	9	MAG
CTGGGTAAGCA	10	5	MAL
GGTGTAACAC	12	6	OSP

Da die Doppelmutante große Defizite in der Myelinstruktur aufweist, wurden Veränderungen von Faktoren für Zelladhäsion und -struktur gesucht. Dabei zeigte sich in der Doppelmutanten einerseits eine deutliche Erhöhung eines *Tags* für das neuronale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) sowie ein leichter Anstieg beim Basigin, einem Mitglied der Immunglobulinfamilie. Signifikant erhöht war der *Tag* für das antiadhäsive, extrazelluläre Matrixmolekül SC1 (*synaptic complex 1*), das Homologie zum SPARC/BM-40 (*secreted protein, acidic and rich in cysteine*) besitzt und von Astrozyten sezerniert wird [McKinnon 1995]. Beim SPARC selbst war nur die kurze Isoform leicht erhöht. Für andere astrozytenspezifische Gene wie Connexin 43 und GFAP waren kaum *Tags* vorhanden. Das neuronale Glykoprotein M6A, ein Mitglied der Proteolipid Genfamilie, zeigte kaum einen Unterschied.

Stukturgene:

TAG	WT	DM	GEN
CACACGCGCAC	0	5	NCAM
CTCTGACTTAC	24	39	Basigin
CTGAGGAAGTG	12	31	SC1
AACAGTCAACA	0	4	
GAACATTGCAC	28	40	SPARC (kurz)
CAAACCTCTCAC	35	36	SPARC (lang)
TAATGTAGACC	1	2	Connexin 43
TGGGTGCTGGG	1	2	
TGCCATAGACT	1	2	GFAP
GAAATAACTAC	2	3	M6A

Desweiteren wurden einige Ionen-Transporter und -Kanäle untersucht. Hier wiesen die *Tags* aller beta-Untereinheiten der Na-K-ATPase sowie eines Natriumkanals eine Hochregulation auf. Bei den beta-Untereinheiten zeigte die beta1-Isoform den signifikantesten Unterschied, die anderen beiden Isoformen waren nicht so verbreitet. Der *Tag* für den Natriumkanal war nicht spezifisch einem Kanal zuzuordnen, da die Natriumkanäle I, II und III starke Homologien aufweisen. Interessant war die Vielzahl der *Tags* für die alpha2-Untereinheit der Na-K-ATPase. Hier wurde anhand von Homologievergleichen mit est-Klonen in der Datenbank eine neue alternative Polyadenylierung für die alpha2-Untereinheit gefunden, deren *Tags* in der Doppelmutante deutlich erhöht waren. Eine verringerte *Tag*-Zahl wies der organische Kationentransporter BOCT auf.

Transporter/Kanäle:

TAG	WT	DM	GEN
TAGCTGTAACG	8	7	NA-K-ATPase alpha1
GCCCCCTCTC	35	39	NA-K-ATPase alpha3
AGGAAAGCCTC	5	12	NA-K-ATPase alpha2 (kurz)
TGTAATTGAAA	7	0	
ATAGCTCGCAA	3	0	
GTGACGGTGCT	0	7	NA-K-ATPase alpha2 (lang) AI482521
TTCTAGCATAT	13	31	NA-K-ATPase beta1
ATTTTCGAGGA	5	9	NA-K-ATPase beta1 (kurz)
TAAACTATACT	0	2	NA-K-ATPase beta2
TGTGAGTGGTG	1	3	NA-K-ATPase beta3
GCTTCCAATCC	1	6	Natrium-Kanal
CCAACCGTCTA	7	0	BOCT

Signifikante Unterschiede ergaben sich bei *Tags*, die im Glutamattransport und -metabolismus eine Rolle spielen. Sowohl die Glutaminsynthetase als auch Glutamatdehydrogenase und -decarboxylase wiesen in der Doppelmutante erhöhte *Tag*-Zahlen auf. Auch Gene, die in den synaptischen Vesikeltransport involviert sind, zeigten eine solche Tendenz wie z.B. das SNAP-25, das Phosphoprotein AP180, *sulfated Glycoprotein-1*, Clusterin, der synaptische Vesikel Transporter, Dynamin I und die Carboxypeptidase H. Ebenfalls auffällig waren erhöhte *Tag*-Zahlen für Gene, die bei neurologischen Krankheiten funktionell wichtig erscheinen. Dazu gehören das *Amyloid beta Precursor Protein* (APP, Alzheimer), das Prion Protein (BSE), Alpha-Synuclein (*Lewy-bodies*, Parkinson) und das *Tetratricopeptid Repeat Protein* (TPRD, Down Syndrom). Die Tetratricopeptid-Domäne ist ein strukturelles Motiv von Protein-Protein-Interaktionen.

Vesikeltransport/Neurotransmitter:

TAG	WT	DM	GEN
TATAGTATGTT	2	12	Glutaminsynthetase
ATTAAGTTGGT	0	5	Glutamatdehydrogenase
CCCATTGGAGA	0	2	Glutamattransporter GLT1
ACTAGCTCTCC	3	14	NMDA-Rezeptor1
TTTCAAGGGAG	7	11	NMDAR <i>glutamate-binding protein</i>
TATATTAATC	0	12	SNAP-25
GGGTAGGGGTA	5	15	<i>synaptic vesikel transmembrane transporter</i>
TCTGCCCTCTG	5	14	Phosphoprotein FI-20 =AP180
TTTCCTTCAAC	1	4	<i>Clathrin light chain</i>
CTGCTGGTGGC	37	23	<i>Prenylated RAB acceptor 1 (Pral)</i>
GGGAAAAAAAAA	3	10	Dynamin I
TATTTTGTTTT	6	13	Prion Protein
AGACTATGCAC	8	18	Alpha-Synuclein
CTGCCTCACAG	8	1	<i>Bleomycin hydrolase (Cystein protease)</i>
ACACTGCCCAT	6	0	<i>amyloid beta-binding protein ERAB</i>
AAATTGGATCT	2	8	<i>amyloid like protein</i>
TATCTTTGGAT	4	10	<i>amyloid beta precursor</i>
ATAGCTTTCTA	15	35	
AACTGAGGGGT	18	36	<i>Sulfated Glycoprotein-1/Sphingolipid activator</i>
TCTCCAGGCGA	24	42	<i>Clusterin/ApoJ/Sulfated glycoprotein-2</i>
CCTTACACTTG	1	10	TPRD (lang)
TGAGAAGTGGC	1	5	TPRD (kurz)
GCCTCTTGAAG	4	14	<i>Cell Division Cycle 10</i>
ATCCTGGTAAT	15	37	Carboxypeptidase H/E <i>neuropeptid processing</i>
GGCTGGATGGA	34	18	Cholecystokinin

Weiterhin waren die *Tags* für die Mikrotubuli-bindenden Proteine wie das Mikrotubuli-assoziierte Protein MAP-2, tau und ein Kinesin (*Kinesin light chain1*) erhöht.

Mikrotubulus-bindende Proteine:

TAG	WT	DM	GEN
TTTTTCAATCA	0	6	<i>MAP-2</i>
CTGCCTGCCCT	1	8	<i>Tau</i>
TGCTGCACGTC	1	8	<i>Kinesin light chain 1</i>

Eine Gruppe von unterschiedlichen *Tags* wurde in die Rubrik Signalmoleküle eingeordnet. Hier war die Anzahl der *Tags* für die meisten Gene jedoch ziemlich gering. Vor allem für die Myelinisierung essentielle Differenzierungsfaktoren von Oligodendrozyten wie die *Platelet-derived growth factor*-Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren wie SCIP und QKI waren kaum vorhanden. In der *quaking*-Maus drückt sich das Fehlen von QKI in einer schweren Dysmyelinisierung aus [Hardy 1998]. Von den für Signaltransduktion wichtigen Genen zeigten die Phospholipase C alpha, die *Mitogen activated Protein Kinase* (erk-1), die Gs-Adenylatcyclase, das ER cornichon, ein Neurotensin Rezeptor, der *G-Protein-pathway supressor* und das Stathmin-ähnliche Protein RB3 die signifikantesten *Tag*-Erhöhungen in der Doppelmutante. Im Gegensatz zum RB3 war das ubiquitäre Stathmin selbst nicht erhöht. Verringerte *Tag*-Zahlen in der Doppelmutante ergaben sich für die katalytischen Untereinheiten der Protein-Phosphatase PP-1, das Neuronatin [Usui 1997] sowie für einige schwach exprimierte Gene: das Apoptosis-bezogene Protein TFAR15, das Calcium-bindende Protein

Cab 45 [Scherer 1996], das Steroid-regulierte Tex261 [Lopez-Fernandez 1998] und das für die Entwicklung des Neuralrohrs essentielle Calmodulin- und Proteinkinase C-bindende Protein F52 [Wu 1996]. Für zwei Mitglieder der Calcium-bindenden S100-Familie, A1 und B, ergaben sich jeweils zwei *Tags*, die in der Doppelmutante ein zum Wildtyp gegenläufiges Muster zeigten. Das Zink-Finger-Protein 216 ist kaum charakterisiert worden [Scott 1998].

Signalmoleküle:

TAG	WT	DM	GEN
Differenzierungs-und Transkriptionsfaktoren:			
TGCGACCTCCA	0	1	PDGF α receptor
GTAAGGGGAA	0	1	PDGF β receptor
GACGACGTTTA	0	1	SCIP
TTGTTTGTA	0	4	QKI-7B
GGGGGAGTGGA	31	14	Neuronatin
TATGCAACCCC	10	19	Necdin
ATTGAGCGGCC	5	0	TFAR15
GCTGCCAGGGG	16	7	Bcl2-binding protein BAG-1
CTATTCAGCAT	0	8	ZNF216
GCCCTAAGTGG	9	1	tex261
CTAAAAAAAAA	0	7	<i>FGF inducible gene16</i>
GCAGAAATGCA	0	7	Cyr61
Proteinphosphatasen:			
GCTGGCAGCCA	28	13	Proteinphosphatase PP-1 alpha (katalytisch)
TGCTGAGAATG	7	3	Proteinphosphatase PP-1 gamma
ACTGTAGATGA	13	8	Proteinphosphatase PP-2A alpha (katalytisch)
ACAGTGCTTGC	6	4	Proteinphosphatase PP-2A beta (katalytisch)
G-Proteine/Signaltransduktion:			
TAACGCCCTTG	5	14	MAP-Kinase (erk-1)
TATGAAAATGT	0	1	MAP-Kinase (erk-2)
CATTTGAAA	0	2	MAPKK
ATCAACACCGC	18	32	Gs-adenylatcyclase
CCGAGTTACCT	1	6	Cornichon
CCATTACTAAC	1	6	Neurotensin Rezeptor
TAGTTCCGACT	2	8	Gps1 = Fusca (<i>G-protein pathway suppressor</i>)
CAGGAGGAGTT	0	8	Phospholipase C alpha
CACTGATTTAA	1	6	14-3-3 beta/skm-BOP
TGTGTCAACCT	29	41	14-3-3 eta
ACCAATGAAAC	1	9	Stathmin-like Protein RB3
AGAAGGAGGT	19	19	Stathmin
Calcium-bindende Signalmoleküle:			
ACAAACTTAGG	33	52	Calmodulin I
GCCCAGGTTTA	5	0	Calcium-binding protein Cab45
TCTCTGACTTG	5	0	F52
AGTGAGACCAA	3	10	S100 beta (kurz)
TCTGACCTGCT	9	2	S100 beta (lang)
CCCATTCGGGC	8	1	S100A1 (kurz)
CTTGCTCCTCA	0	1	S100A1 (lang)

Da Mikrotubuli-bindende Proteine höhere *Tag*-Zahlen aufwiesen, wurden auch die Filament-bildenden Proteine näher untersucht. Bei den Actinen wurde eine deutliche Erhöhung des

Tags der alpha-Isoform gegenüber der beta- und gamma-Isoform registriert. Ebenfalls leicht erhöht in der Doppelmutanten waren die drei alpha-Tropomyosin-Isoformen (TMBR1-3). Bei den Neurofilamenten war die *Tag*-Zahl zu gering, um eine Aussage zu machen.

Filamente:

TAG	WT	DM	GEN
AAGATCAAGAT	10	30	Alpha-Actin
CCCTGAGTCCA	53	38	Beta-Actin
TGGCTCGGTCA	32	38	Gamma-Actin
TTCTAGGAATG	0	12	Alpha-Tropomyosin (mittel)
TCCAGAAAATC	8	0	
AAAGTCATTGA	1	2	Alpha-Tropomyosin (kurz)
CCCGTAGCCCC	2	3	Alpha-Tropomyosin (lang)
TCAGGGTAGAA	0	4	
CTTATGAGTTC	0	1	Neurofilament L
CAATAAAACCA	0	1	Neurofilament H

Ferner wurden wichtige Gene für den Energiestoffwechsel betrachtet. Eine detaillierte Analyse der mitochondrialen F1F0-ATPase zeigte, daß vorwiegend die *Tags* der ATPase 6-Untereinheit und der delta-Untereinheit der ATPase verstärkt auftraten. Im Gegensatz dazu wiesen die anderen Untereinheiten eine geringere Anzahl in der Doppelmutante auf. Die ATPase 6-Untereinheit ist neben der ATPase 8-Untereinheit die einzige, die in den Mitochondrien auch transkribiert wird [Borst 1981]. Andere Gene wie die Cytochrom C-Oxidase und die NADH ubiquinon Oxidoreduktase zeigten keine einheitliche Tendenz in ihren Untereinheiten; lediglich die mitochondrial codierten NADH-Ubiquinon Oxidoreduktasen wiesen eine höhere *Tag*-Zahl auf. Auch für die Pyruvatkinase war die Anzahl der *Tags* in der Doppelmutante erhöht.

Energiestoffwechsel:

TAG	WT	DM	GEN
ATAATACATAA	77	172	ATPase 6
AACCCTAATAA	4	15	
CCAGTCCTGGT	59	37	F1F0-ATPase c
GAGGATTCCCC	6	18	F1F0-ATPase Delta
GTTCACTTTCA	20	10	F1F0-ATPase Epsilon
GCATACGGCGC	52	30	F1F0-ATPase e
GCCGAGCATAA	34	19	F1F0-ATPase f
CGGGAGATGCT	34	18	F1F0-ATPase <i>oligomycin sensitivity</i>
TTTGGGGCTGG	34	19	<i>lysosomal vacuolar</i> Proton-ATPase
CGTCTGTGGAG	57	55	<i>vacuolar</i> H-ATPase
TCACCTGTGGG	4	11	Acyl-CoA Oxidase (Peroxisomen)
GTCTGGGGGGA	4	11	Monoglycerin Lipase
GGTGGTGCTTT	19	25	ATP-ADP <i>carrier</i> Protein
CAATAGAGACC	14	32	Pyruvatkinase M
AGGAGGACTTA	61	87	NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase 2
AGCAATTCAAA	57	67	NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase 3
ATGACTGATAG	79	104	NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase 4

Eine weitere Gruppe von *Tags*, die hochreguliert waren, gehören zur Klasse der *heat shock* Proteine, deren Funktion als Chaperone in der Faltung von Protein bei deren Synthese bzw. bei deren Abbau liegt.

Heat shock Proteine:

TAG	WT	DM	GEN
GTGAGCCCATT	24	46	HSP 84
TCTACAAGAAT	6	14	
GAGGCTTTGCA	10	23	HSP 86
GAATAATAAAA	13	23	HSC 70
GATGTCCGCAA	0	5	MRJ (HSP-bindend)

Zu einer weiteren Gruppe gehörten Initiationsfaktoren der Translation. Der *Guanin-nucleotide exchange factor* eIF-2B ist ein Schlüsselenzym bei der Proteinsynthese [Webb 1997]. Sui1 ist ebenfalls ein Initiationsfaktor der Translation, der in den Abbau von *nonsense*-RNA involviert ist [Cui 1999].

Translation-Initiationsfaktoren:

TAG	WT	DM	GEN
ATCCCTTGCAAG	0	6	<i>Guanin-nucleotide exchange factor</i> eIF-2B
CAATAAACTGA	0	7	Sui1
GTGACCGAAGA	2	7	eIF-4AI
TCTTAATGAAG	3	11	eIF-4AII

Für eine Reihe von Genen wurden *Tags* ermittelt, die exakt auf den Gegenstrang eines bekannten Gens paßten. Sie betrafen hauptsächlich Gene, die mehrere Isoformen besitzen, und befanden sich *antisense* zur 3'-untranslatierten Region des Gens.

Tags in antisense-Orientierung zu bekannten Genen:

TAG	WT	DM	GEN
GATACTTGGAA	23	47	Beta-Actin
TCCTTGGACTC	8	0	MBP
TGGCAGCTCTG	2	8	CNP
GGACCGTACAA	7	0	PLP
ACAGCCCACCC	2	7	Na-K-ATPase beta1
TGAGCCTGGTC	0	7	<i>Latent TGF-binding 3</i>

Sonstige interessante Gene sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt. Die alpha Glukosidase II ist ein ER-ständiges Protein, das beim Prozessieren von Glykoproteinen eine Rolle spielt.

Sonstige Gene:

TAG	WT	DM	GEN
TTCCTGAGGCC	6	1	Alpha-Glukosidase II beta
TGTACCCAGGG	0	6	Alpha-Glukosidase II alpha
GCGGCGGTGCT	8	1	H2A Histon
TCCGGGCGAGG	18	6	H2A Histon
ACTAACTGTGT	6	1	RbAp48
GTGTAATAAGA	1	5	hnRNP A2/B1
GCGGCGGATGG	2	12	L14 Lektin

H2A gehört zu den Histonen, die DNA in Nucleosomen binden. Für das heteronukleare Ribonucleoprotein hnRNP A2/B1 wurde eine Bindung an die MBP-mRNA nachgewiesen [Hoek 1998].

Die meisten *Tags* für ribosomale Gene zeigten in der Doppelmutante eine leichte Abnahme. Vor allem bei denen, die mitochondrial codiert sind, war eine deutliche Reduzierung festzustellen. Diese sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Mitochondrial codierte ribosomale Gene:

TAG	WT	DM	GEN
CAAACCTCCAT	485	206	12S-RNA
AACGGCTAAAC	298	178	16S-RNA
ACCAATGAACA	232	103	t-RNA Valin
AATATCACCTT	28	11	t-RNA Cystein
GCTTTCTTACC	149	71	t-RNA Serin
GCTTTCTTCCC	12	1	
GCTTTCTTCCA	5	0	

Einige unterschiedliche *Tags* wurden zwar Maus-Est's zugeordnet, zeigten aber keine eindeutigen Homologien zu gefundenen Genen. Diese sind im folgenden aufgelistet.

Unbekannte Gene:

TAG	WT	DM	GEN
TGCCATAGAAA	6	17	est:AI390702 (EstC3.2)
GAGGAGTGGGA	33	15	est:AA855973
CATTGTGAAA	0	11	est:AA199416 (EstB2.2)
CTGGCTTTGTT	14	3	est:X73478
CAGCGCGCCCT	19	6	est:AA270420
CTCACATAACT	0	8	est:AI573912 (EstC3.1)
TCTGTGATGTG	21	9	est:AA764322
TGCGGGGGTGG	12	3	est:AI181756
GTGCGTGGGTG	0	6	est:AI327138
GTGCCAAGGTC	1	8	est:AA209635 (EstA6.2)
CCGGCGTGGAA	24	14	est:AI414620
TAGATGTTGCT	6	0	est:AA217907
TCAGCCTTGTC	18	6	est:AA615439
CGGCTGTCGCA	1	7	est:AA615329

Übrig blieben einige *Tags*, denen gar kein Eintrag in der Datenbank zugeordnet wurde.

Unbekannte Tags:

TAG	WT	DM	GEN
GAGCCCCTTGG	21	6	---
CCTCGCACAGT	9	1	---
TTCTATGAGTT	0	7	---
ATGAAACTTTG	0	7	---
GTCGCGTCCGG	6	0	---
GTCCAGCTCAC	6	0	---

1.2 Untersuchungen auf *Northern Blot*-Ebene

1.2.1 Vergleich des Wildtyps (wt) mit der Doppelmutanten (dm)

Das SAGE-Projekt lieferte eine quantitative Statistik aller im Hirn vorkommenden Transkripte. Dabei zeigte sich eine Anzahl von Genen, deren *Tag*-Zahl in 20 Tage alten Doppelmutanten im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlich war. Diesen Hinweis der Regulation galt es durch *Northern Blot*-Hybridisierung zu verifizieren. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus Hirnen 20 Tage alter Mäuse präpariert und durch *Northern Blot*-Analyse untersucht. Es wurden jeweils gleiche Mengen des Wildtyps und der Doppelmutante aufgetragen.

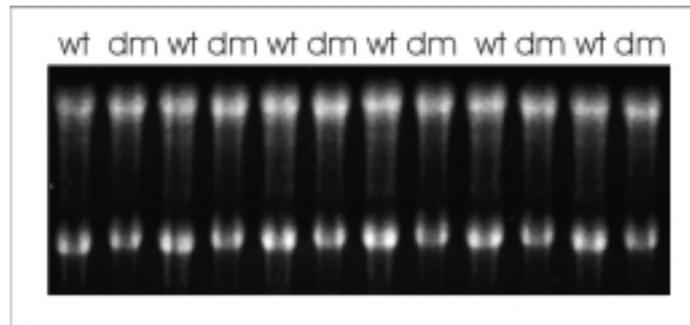


Abb.12: RNA-Gel für *Northern Blot*-Analyse: 18S- und 28S-RNA-Banden sind angefärbt.

Um einen vollständigen Transfer auf die Membran und damit eine quantitative Aussage zu gewährleisten, wurde die RNA nach der Elektrophorese teilhydrolysiert und so lange transferiert, bis die 18S- und 28S-RNA-Banden nicht mehr detektierbar waren. Die Blot-Membranen wurden in Streifen geschnitten, so daß jeweils eine wt- und eine dm-Spur auf jedem Streifen vorhanden war; die Streifen wurden mit unterschiedlichen cDNA-Fragmenten (im Anhang aufgelistet) hybridisiert. Kommerziell erworbene Est-Klone wurden aufgrund der Fehlerhäufigkeit mittels Sequenzierung auf ihr korrektes *Insert* hin überprüft. Weitere cDNA-Fragmente wurden durch eine RT-PCR generiert. Da bei der Auswertung der *Northern Blots* mit Hilfe der IMAGE Quant Software von einem Fehler von 20% ausgegangen werden muß, wurde auf eine spezifische Fehlerabweichung für jedes Gens verzichtet. Im folgenden sind die Ergebnisse der *Northern Blot*-Hybridisierung und die Quantifizierung der Banden dargestellt. Zunächst wurden wiederum einige *housekeeping*-Gene untersucht, um mit einem verlässlichen Standard zu arbeiten. Mit GAPDH (*Tag* 131:114)- und Cyclophilin (*Tag* 77:38)-Fragmenten wurden im wt wie auch in der Doppelmutante eine Bande detektiert, die sich in ihrer Stärke kaum unterschieden. Das beta-Tubulin (*Tag* 20:18)-Fragment hybridisierte mit 3 Isoformen, deren Intensität zum größten Transkript hin deutlich abnahmen. Die mittlere Isoform beta III-Tubulin wird hirnspezifisch exprimiert. Sie war in der Doppelmutante kaum erhöht. Die anderen beiden Isoformen zeigten keinen signifikanten Unterschied.

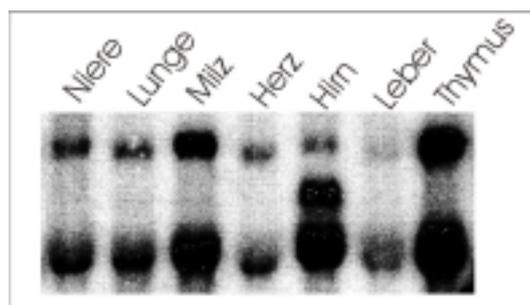


Abb. 13: Hirnspezifische Expression von beta III-Tubulin.

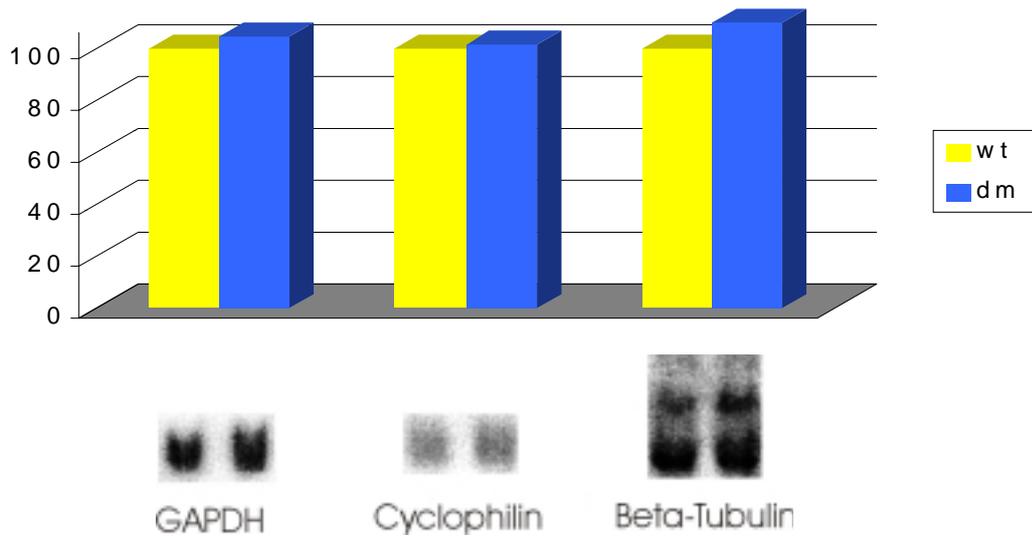


Abb. 14: Northern Blot-Analyse von Standards.

Die signifikant unterschiedlichsten *Tags* aus der Gruppe der Myelinproteine waren das MAG, CNP und MOBP. Der Unterschied des MAG (*Tag* 2:9) wurde auf Northern Blot-Ebene bestätigt. Das MAG-Signal war in der dm um 120% verstärkt. Im Falle des CNP (*Tag* 17:41) wurde ebenfalls eine Tendenz der Hochregulation festgestellt, jedoch war der Unterschied deutlich schwächer. Das größere RNA-Transkript codiert für die kleinere Isoform (CNPI, 46kD), das kleinere Transkript für CNPII (48kD). MOBP stellte nach MBP und PLP auf RNA-Ebene das dritthäufigste Myelinprotein dar. Die *Tag*-Zahl für das MOBP war in der dm halbiert (*Tag* 83:42). Dieser Unterschied war in der Northern Blot-Analyse nicht nachweisbar.

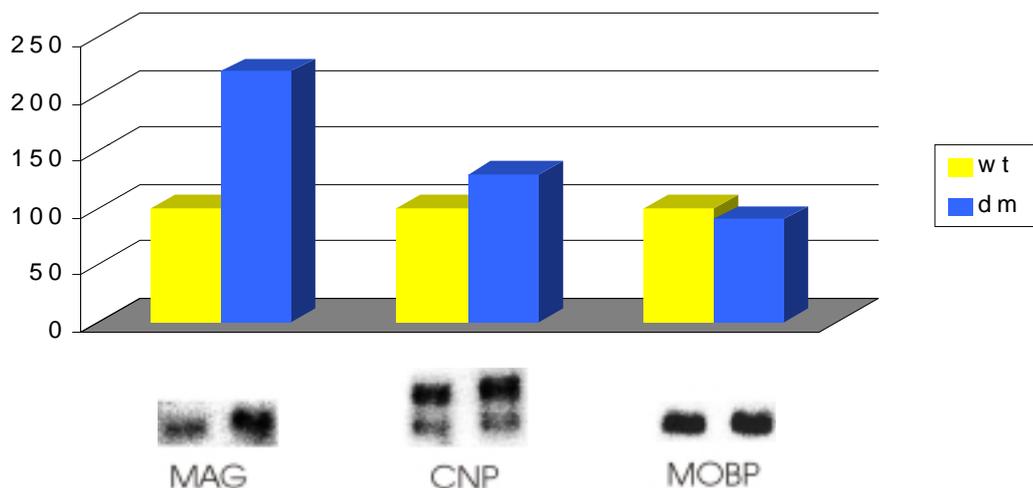


Abb. 15: Northern Blot-Analyse von Myelingenen.

Bei den Strukturgenen wurden das *Neural cell adhesion molecule* (N-CAM) und die Astrozytenmarker SC1 und Connexin 43 näher charakterisiert. Beim N-CAM wird eine Vielzahl von Isoformen unterschieden. Auf Proteinebene existieren drei Gruppen von Translationsprodukten (120, 140 und 180kD) [Edelman 1982, Rougon 1982]. Auf RNA-Ebene sind durch Spleißen und alternative Polyadenylierung mehr als 30 verschiedene Transkripte bekannt. Mit dem N-CAM-Fragment wurden 4 Signale erhalten, die in der Doppelmutante zwischen 50% und 100% hochreguliert waren (*Tag* 0:5). Besonders das

größte Transkript war stark unterschiedlich. Eine genaue Zuordnung der Banden war allerdings nicht möglich. Das extrazelluläre Matrixprotein Sc1 (*Tag* 12:35) und das Connexin 43 (*Tag* 2:4) waren in der Doppelmutante 50% bzw. 60% erhöht.

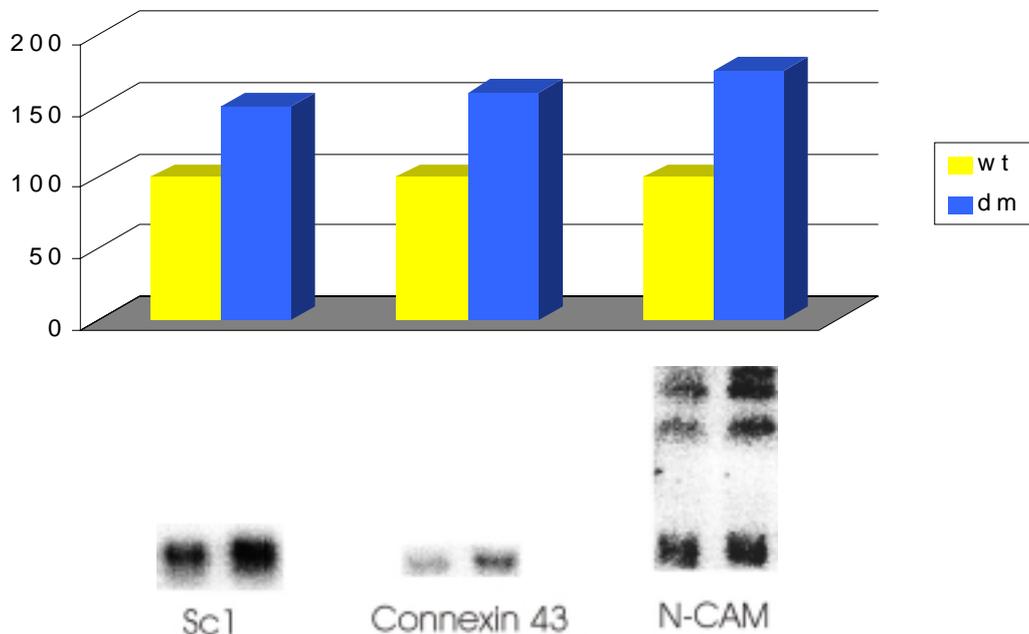


Abb. 16: Northern Blot-Analyse von Strukturgenen.

In der Rubrik Transporter/Kanäle wurden die alpha2- und beta1-Untereinheiten der Na-K-ATPase und der organische Kationentransporter BOCT untersucht. Auf Northern Blot-Ebene wurde bestätigt, daß es sich beim est-Klon AA797576 um eine späte Polyadenylierungsform der Na-K-ATPase alpha2 handelt, die nicht als deren Isoform in der Datenbank vermerkt ist. Eine Rehybridisierung mit einem weiter 5'-wärts gelegenen Fragment ergab sowohl mit der kurzen als auch mit der langen Variante ein Signal. Das Signal für die lange Isoform (5,7 kb, *Tag* 0:7) wies in der Doppelmutante einen um 600% erhöhten Wert auf. Die kurze Variante zeigte kaum einen Unterschied.

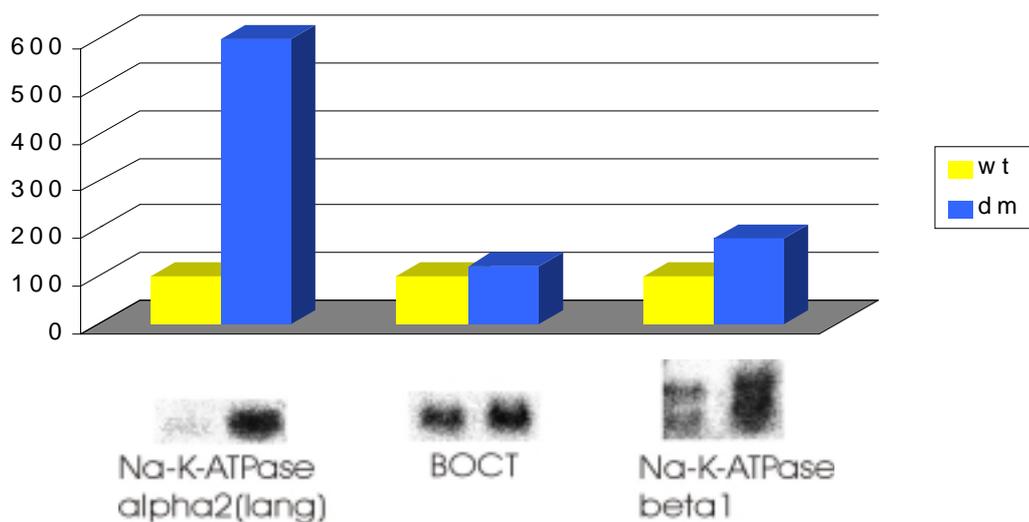


Abb. 17: Northern Blot-Analyse von Transportern/Kanälen.

Eine gewebespezifische Hybridisierung ergab, das die lange Form der Na-K-ATPase alpha2 neben dem Hirn auch im Herzen hochreguliert wird (Abb. 18).

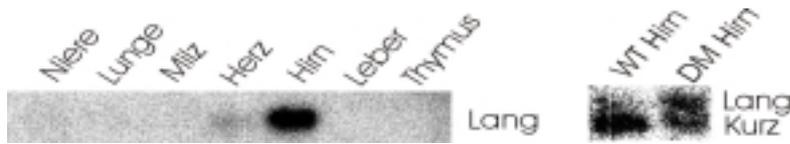


Abb.18: Gewebespezifische Analyse mit langer Isoform bzw. Hybridisierung mit kurzer Isoform.

Für die beta1-Untereinheit wurden zwei Signale (2,4 und 2,7 kb) detektiert, die in der dm um 80% überexprimiert wurden (*Tag* 13:31). Einen Unterschied des Kationentransporters BOCT wurde im Gegensatz zum SAGE-Projekt (*Tag* 7:0) nicht beobachtet.

Weiterhin wurden einige Gene näher charakterisiert, die im Transport bzw. bei der Ausschüttung von Neurotransmittern eine Rolle spielen. Vor allem der Glutamatmetabolismus war in der dm betroffen. Die Glutamatdehydrogenase (*Tag* 0:5) und die Glutaminsynthetase (*Tag* 2:12) zeigten eine 50% bzw. 60%ige Erhöhung in der dm. Deutlicher war der Unterschied beim *synaptosomal-associated protein 25* (SNAP-25) mit 100% (*Tag* 0:12). Dieses Protein besteht aus zwei Spleißvarianten a und b, die auf *Northern Blot*-Ebene nicht unterscheidbar sind.

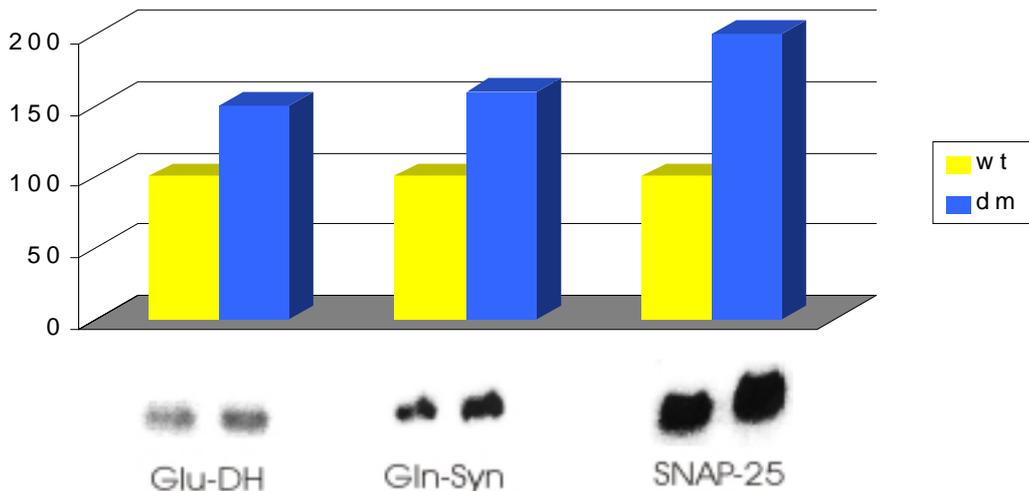


Abb. 19: *Northern Blot*-Analyse von Vesikeltransport-assoziierten Proteinen.

Ebenfalls involviert in den synaptischen Prozess ist das Alpha-Synuclein. Es ist ein Bestandteil der zytosolischen Plaques (*Lewy-Bodies*) bei der Parkinson-Krankheit [Vogel 1997, Spillantini 1997]. Das Protein ist in der Doppelmutante um 60% erhöht (*Tag* 8:18).

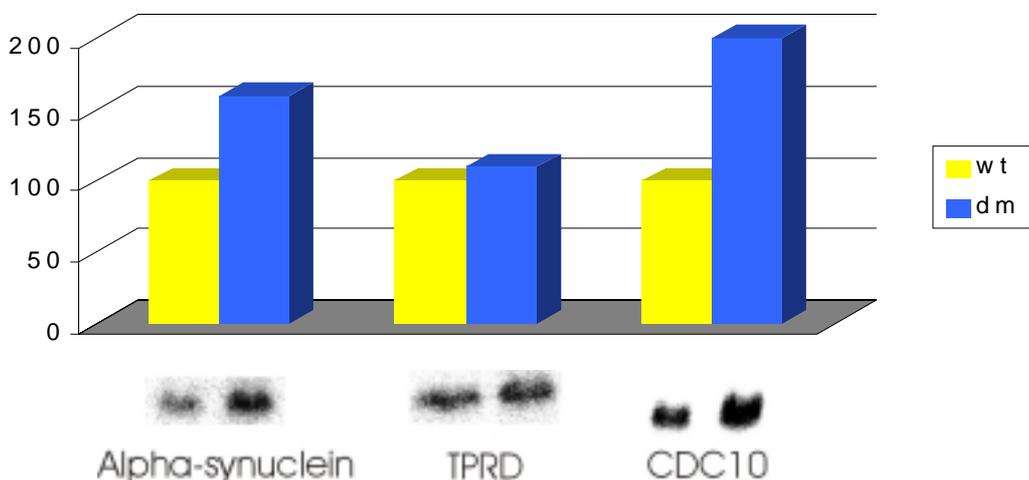


Abb. 20: *Northern Blot*-Analyse von Vesikeltransport-assoziierten Proteinen (2).

Auch das *Cell division cycle Protein 10* (CDC10), das zur Familie der Septine gehört, wurde in synaptischen Prozessen gefunden. Es hat weiterhin Bedeutung bei der Zytokinese und ist in der Doppelmutante (*Tag 4:14*) um 100% erhöht. Ein weiteres interessantes Protein ist das *Tetratricopeptid repeat protein* (TPRD), dem eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Down Syndroms eingeräumt wird [Tsukahara 1998]. Dieses ist jedoch in der *Northern Blot*-Analyse nur schwach erhöht (*Tag 1:10*).

Dagegen zeigten andere in neurologische Krankheiten involvierte Gene ein deutliches Ansteigen in der Doppelmutante. Das *Amyloid beta Precursor Protein*, dessen betaA4-Peptidablagerungen in extrazellulären Plaques als Ursache der Alzheimer-Krankheit gilt [Glennner 1984], ist um 70% erhöht. Das Protein ist verstärkt in Axonen zu finden, wird allerdings auch von Oligodendrozyten gebildet [Garcia-Ladona 1997]. Auch für die Mikrotubulus-bindenden Proteine MAP-2 und Tau wurde eine 80%ige Verstärkung des Signals gemessen, beim *Kinesin light chain 1* war der Unterschied mit 20% weniger stark. Kinesine sorgen für den anterograden Transport von Vesikeln über den Mikrotubulusapparat [Vale 1985]. Das MAP-2-Gen beinhaltet die hochmolekularen Proteine MAP2a und b, die hauptsächlich in Dendriten lokalisiert sind [Caceres 1983] und die niedermolekulare Variante MAP-2c, die primär von Oligodendrozyten gebildet wird [Vouyiouklis 1995]. Beim Tau-Protein, das ebenfalls in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung involviert ist, gibt es noch weitere Isoformen [Himmler, 1989]. Spezifische Signale für die einzelnen Isoformen waren in der *Northern Blot*-Analyse nicht zu ermitteln bzw. überlagerten sich.

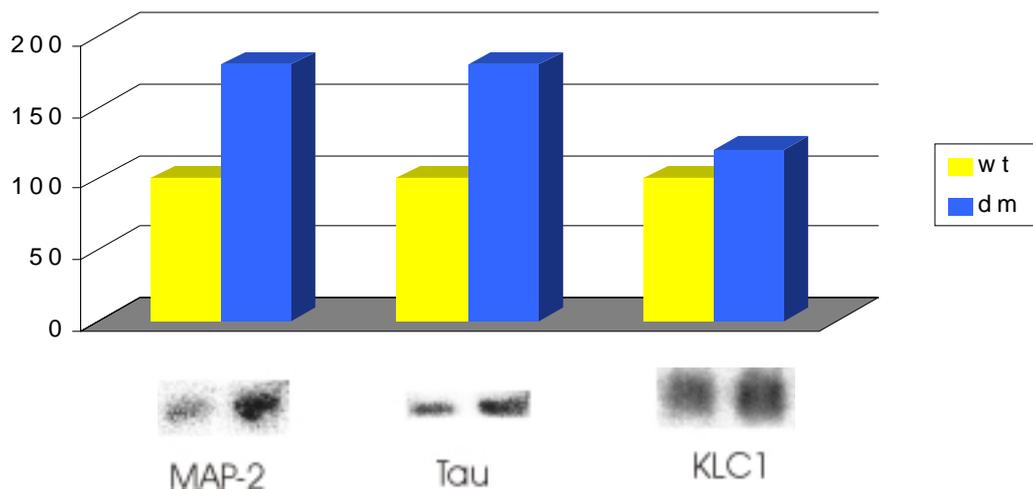


Abb. 21: *Northern Blot*-Analyse von Mikrotubulus-assoziierten Genen.

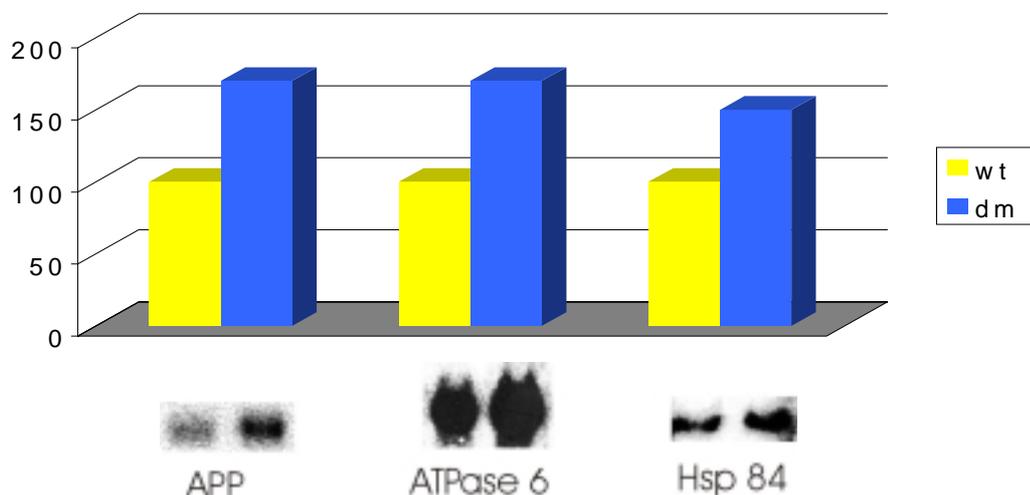


Abb. 22: *Northern Blot*-Analyse von verschiedenen Genen.

Aus der Gruppe der *Heat shock Proteine* wurde das signifikanteste Gen, Hsp84 (*Tag* 30:60), herausgesucht. Mit dem cDNA-Fragment wurde ein 50% stärkeres Signal in der Doppelmutante ermittelt.

Von der FOF1-ATPase wurde als einzige Untereinheit die ATPase 6 untersucht, da sie den deutlichsten Unterschied (*Tag* 77:172) zeigte. Sie gehört zur F0-Untereinheit, die den Protonenkanal darstellt und ist neben der ATPase 8 die einzige Untereinheit, die mitochondrial codiert wird. Das Gen wies in der *Northern Blot*-Analyse eine 70%ige Erhöhung auf.

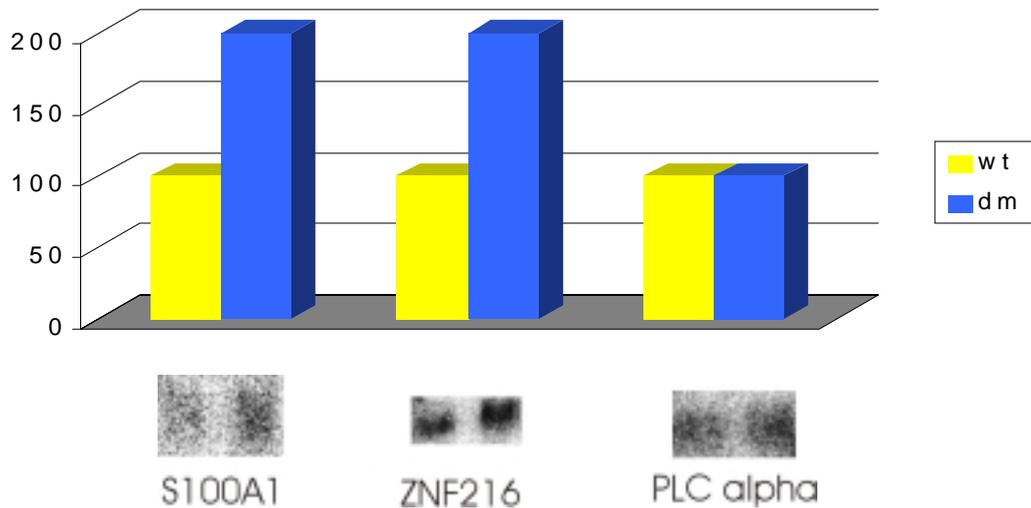


Abb. 23: *Northern Blot*-Analyse von Signalmolekülen (1).

In der Rubrik Signalmoleküle zeigte das S100A1-Protein, entgegen der Abnahme der *Tags* (8:1) in der Doppelmutante, in der *Northern Blot*-Analyse eine Verstärkung des Signals um 100%. S100-Proteine sind Ca^{2+} -bindende Proteine, die zellspezifisch exprimiert werden und eine Depolymerisierung der Mikrotubuli bewirken. Das Zink-Finger-Protein 216 ist entsprechend der *Tag*-Zahl (*Tag* 0:8) in der dm um 100% erhöht. Die Phospholipase C alpha (*Tag* 0:8) zeigte dagegen nur eine schwache Steigerung der Expression.

Eine Überexpression um 100% zeigte das RB3 (*Tag* 1:9), ein zur Phosphoproteinfamilie der Stathmine gehörendes Protein [Gavet 1998]. Im Gegensatz zum ubiquitär vorkommenden Stathmin ist RB3 hirnspezifisch und in der weißen Substanz des Hirns angereichert. Es existiert in drei Spleißformen (RB3, RB3' und RB3''), die sich nur wenig in ihrer Größe unterscheiden.

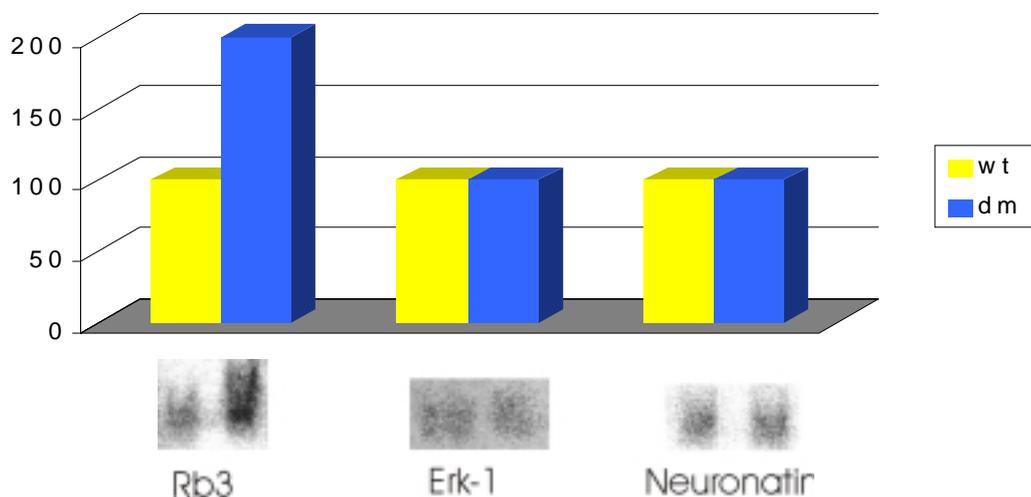


Abb. 24: *Northern Blot*-Analyse von Signalmolekülen (2).

Eine Erhöhung der MAP-Kinase erk-1 wurde im Gegensatz zum SAGE-Projekt (*Tag* 5:14) nicht nachgewiesen. Das Protein hat eine wichtige Funktion bei der Signaltransduktion und phosphoryliert unter anderem das MBP [Erickson 1990]. Das Neuronatin ist ein wichtiges Molekül bei der Zelldifferenzierung und existiert ebenfalls in mehreren Spleißformen. Eine Reduzierung des Signals (*Tag* 31:14) wurde auf *Northern Blot*-Ebene jedoch nicht festgestellt. Beim hnRNPA2/B1 wurde eine 50%ige Verstärkung des Signals in der Doppelmutante beobachtet.

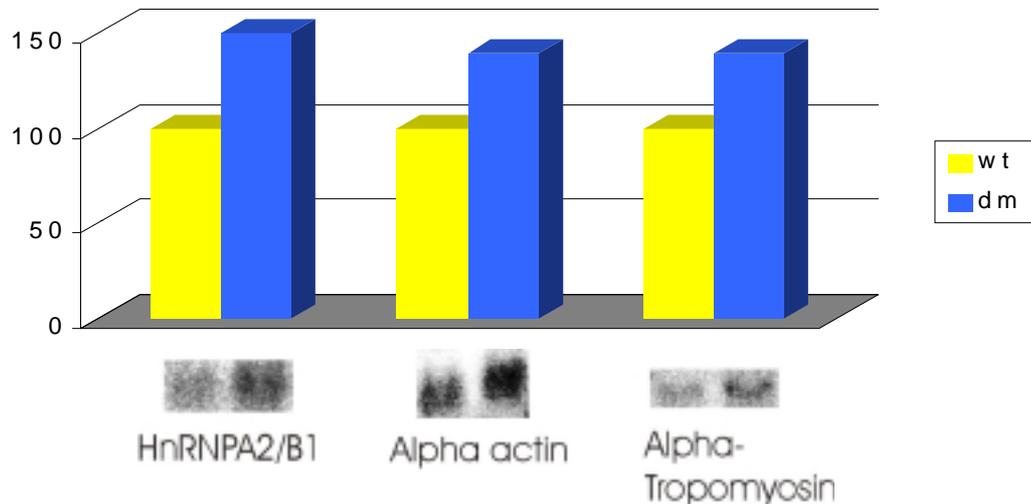


Abb. 25: *Northern Blot*-Analyse von Filament- und sonstigen Proteinen.

Weiterhin wurden die Filament-bildenden Proteine alpha-Actin und alpha-Tropomyosin anhand der *Northern Blot*-Analyse untersucht. Ein spezifisches cDNA-Fragment war hier schwer zu erhalten, da die alpha-, beta- und gamma-Unterformen des Actins große Homologien aufwiesen. Dasselbe galt für die drei hirnspezifischen alpha-Tropomyosinvarianten (TMBr 1-3), von denen TMBr1 bereits pränatal und TMBr3 erst nach 3 Wochen exprimiert wird [Stamm 1993]. Sowohl beim alpha-Actin (*Tag* 10:30) als auch beim Tropomyosin (verschiedene *Tags*) wurde eine 40%ige Verstärkung des Signals in der Doppelmutante beobachtet.

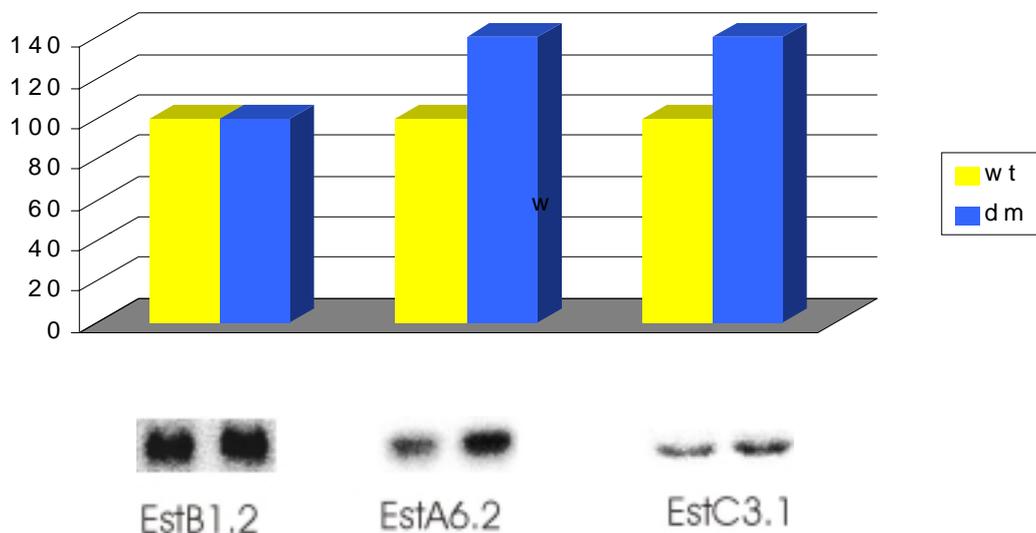


Abb. 26: *Northern Blot*-Analyse von Est's.

Von den *Tags*, die nicht eindeutig bekannten Genen zuzuordnen waren, wurden die zugehörigen Est's EstB1.2 (*Tag* 14:3), EstA6.2 (*Tag* 1:8), EstB2.2 (*Tag* 0:15), EstC3.1 (*Tag* 0:8), EstA3.1 (*Tag* 0:6) und EstC3.2 (*Tag* 6:17) untersucht. Homologievergleiche der Est's mit der Datenbank ergaben, daß EstC3.1 wahrscheinlich das 3'-Ende des Inhibitors der cAMP-abhängigen Proteinkinase, EstA6.2 eventuell eine Histondeacetylase und EstB1.2 ein Aktivator der Proteinphosphatase2 darstellen. In der *Northern Blot*-Analyse wurde für estB1.2 kein Unterschied festgestellt; hingegen wurde für EstA6.2 und EstC3.1 eine 60%ige Steigerung der Expression in der Doppelmutante detektiert. Für EstC3.2, EstB2.2 und EstA3.1 wurden keine spezifischen Signale beobachtet.

1.2.2 Northern Blot-Analyse der Einzelmutanten

Nach der Untersuchung von Genen, die in der Doppelmutante (dm) eine andere Expressionsstärke als im Wildtyp (wt) aufwiesen, wurden einige auch in den Einzelmutanten *mbp*^{-/-} und *plp*^{-/-} untersucht. Die signifikant unterschiedlichsten Gene sind im folgenden aufgeführt. Wiederum wurde GAPDH als Standard ausgewählt.

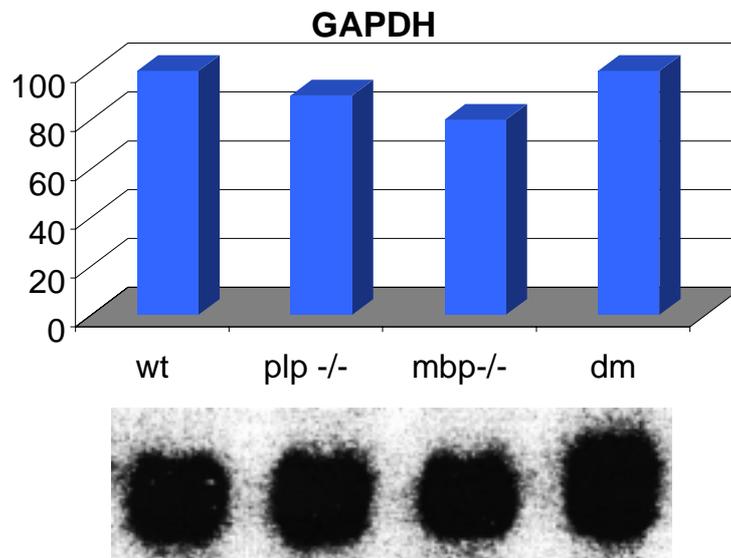


Abb. 27: Northern Blot-Analyse der Einzelmutanten mit GAPDH-cDNA-Fragment.
wt entspricht in allen Tabellen 100 (willkürliche Einheiten), dm: *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante.

Das *synaptosomal-associated* Protein (SNAP-25) zeigte in allen Mausmutanten, sowohl in der *plp*^{-/-} als auch in der *mbp*^{-/-} und der Doppelmutante, eine deutliche Erhöhung der Expression.

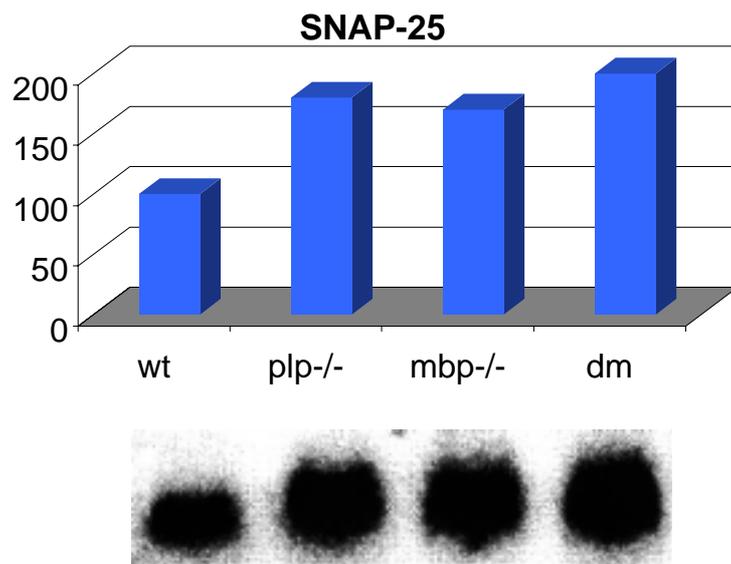


Abb. 28: Northern Blot-Analyse der Einzelmutanten mit SNAP-25-cDNA-Fragment.

Deutliche Unterschiede in den einzelnen Mauslinien zeigte die ATPase 6, die Untereinheit der mitochondrialen F1F0-Untereinheit. Hier war das Signal in der *plp*^{-/-} Linie deutlich stärker als das in der Doppelmutante.

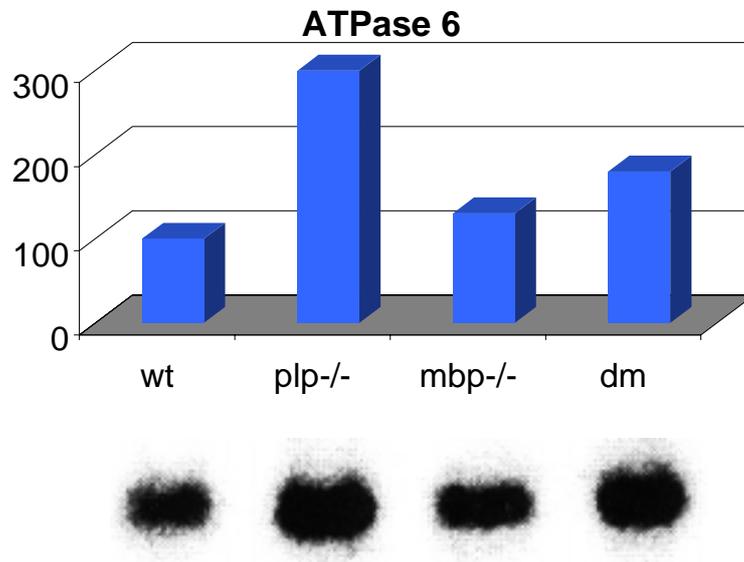


Abb. 29: Northern Blot-Analyse der Einzelmutanten mit ATPase 6-cDNA-Fragment.

Die mRNA des *Cell division control* Protein CDC10 war in den Einzelmutanten zwar deutlich, aber nicht so stark ausgeprägt wie in der *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante.

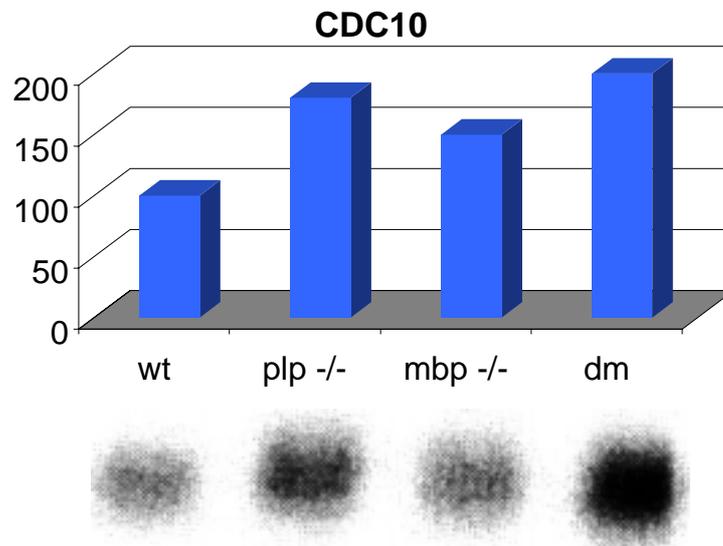


Abb. 30: Northern Blot-Analyse der Einzelmutanten mit CDC10-cDNA-Fragment.

Das alpha-synuclein wies eine sehr ähnliche Verteilung auf wie die ATPase 6. Hier war auch das stärkste Signal in der plp^{-/-} Mutante vorhanden, gefolgt von der Doppelmutante und der mbp^{-/-} Maus.

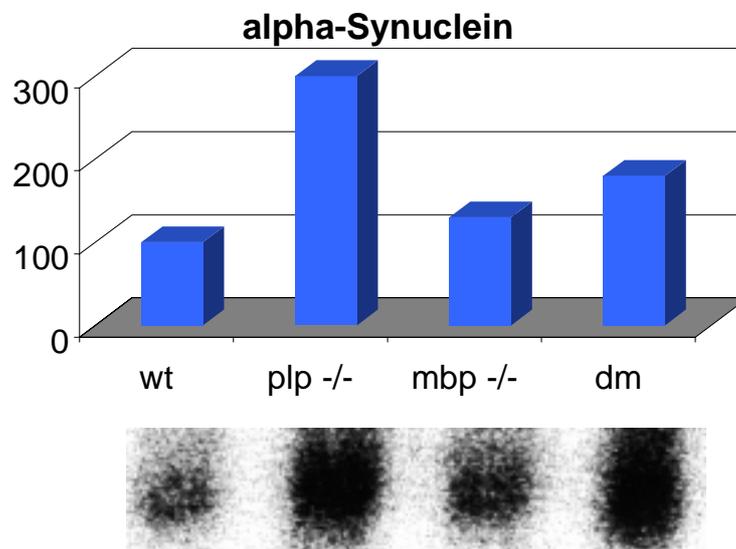


Abb. 31: Northern Blot-Analyse der Einzelmutanten mit alpha-Synuclein-cDNA-Fragment.

Das S100A1-Protein war wie das SNAP-25 in allen Mutanten erhöht.

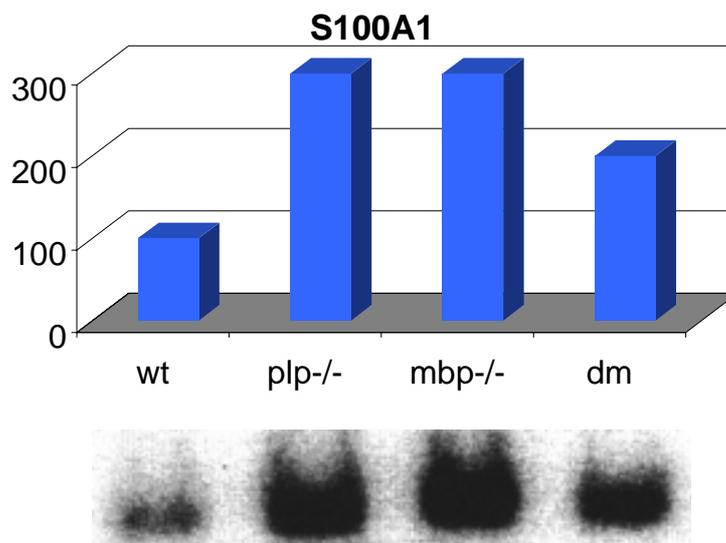


Abb. 32: Northern Blot-Analyse der Einzelmutanten mit S100A1-cDNA-Fragment.

Der deutliche Unterschied in der langen Transkriptvariante der Na-K-ATPase-alpha2 war ebenfalls in den Einzelmutanten sichtbar.

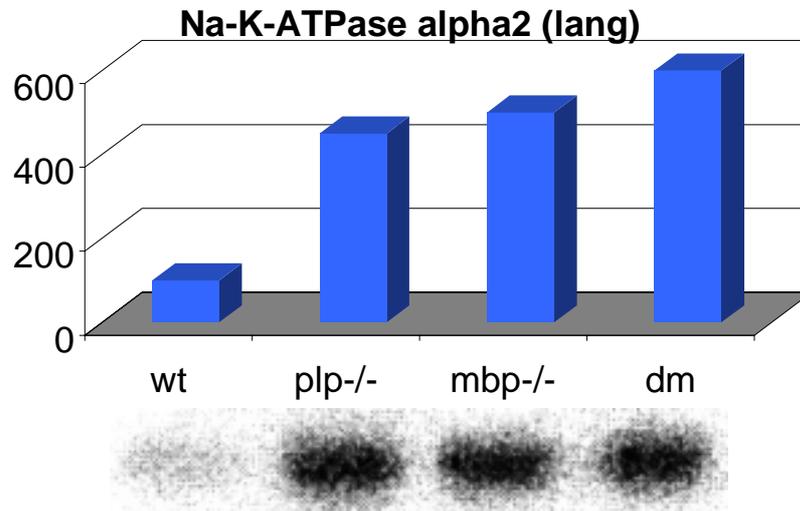


Abb. 33: Northern Blot-Analyse der Einzelmutanten mit Na-K-ATPase-alpha2-cDNA-Fragment.

Beim N-CAM waren die verstärkten Signale nicht nur in der Doppelmutante, sondern auch in der mbp-/- Mutante vorhanden. Hingegen waren die Banden in der plp-/- Maus nicht vom Wildtyp unterscheidbar.

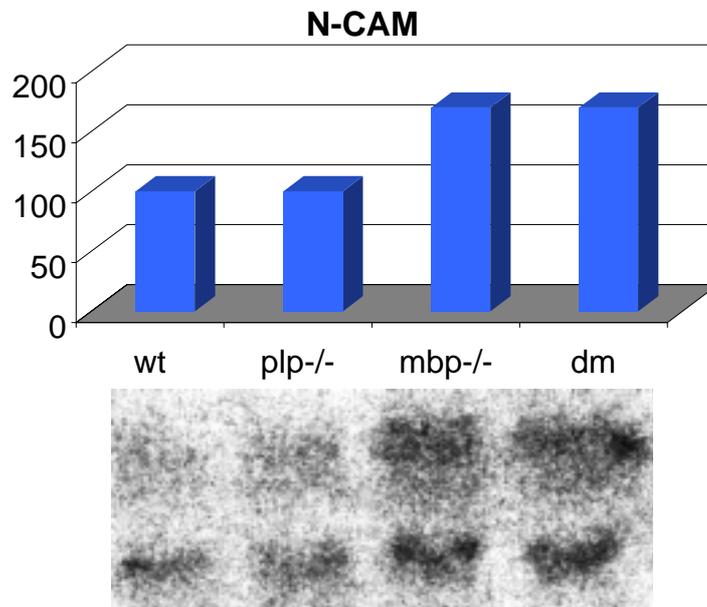


Abb. 34: Northern Blot-Analyse der Einzelmutanten mit N-CAM-Fragment.

1.2.3 Zeitliches Muster der Genexpression

Da mit der SAGE-Methode nur ein bestimmter Zeitpunkt in der Myelinisierungsphase untersucht wurde, stellte sich die Frage nach der temporären Regulierung der Gene. Dazu wurde zusätzlich Hirn-RNA von Wildtyp und Doppelmutante (dm) zu Beginn der Myelinisierung (postnataler Tag P10) und zum Ende der Wachstumsphase (Tag P48) präpariert. Exemplarisch wurde bei einigen Genen die zeitliche Genexpression charakterisiert.

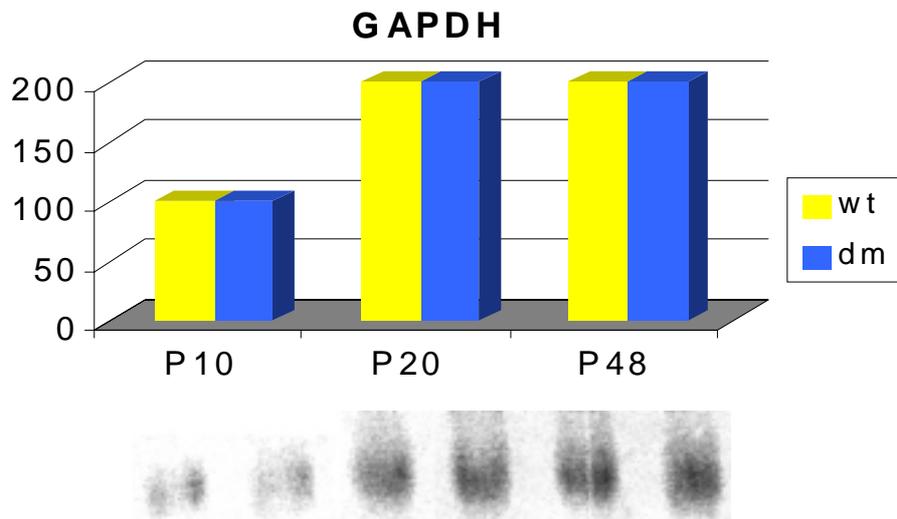


Abb. 34: Zeitliche Expression von GAPDH, aufgetragen wurde von links nach rechts: wt P10, dm P10, wt P20, dm P20, wt P48 und dm P48, die Banden wurden quantitativ ausgewertet und in der darüberliegenden Tabelle dargestellt.

Das GAPDH-Signal zeigte zu allen drei Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede und rechtfertigt seine Verwendung als Standardwert.

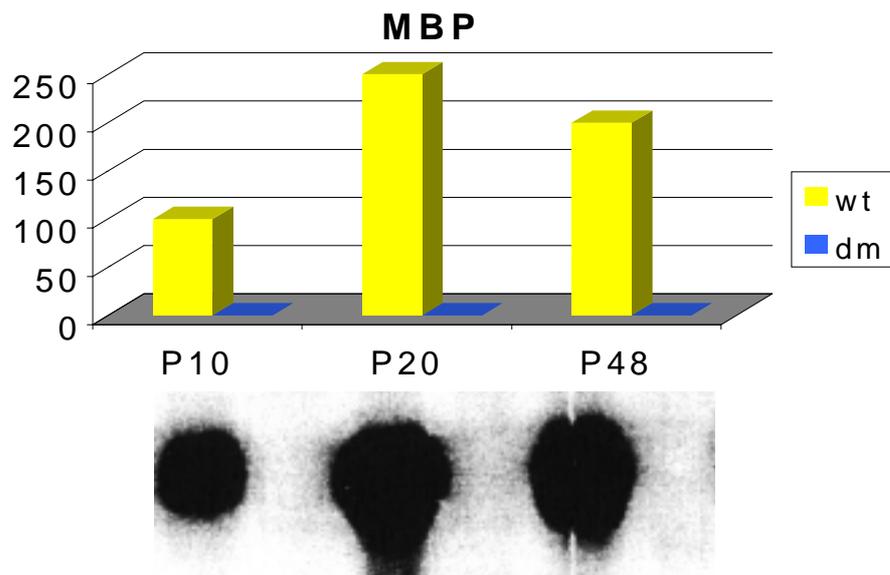


Abb. 35: Zeitliche Expression von MBP.

Als Kontrolle wurde mit der MBP-cDNA hybridisiert. Das MBP wurde schon am Tag P10 deutlich exprimiert, zeigte sein Maximum am 20.Tag und schwächte sich danach ab.

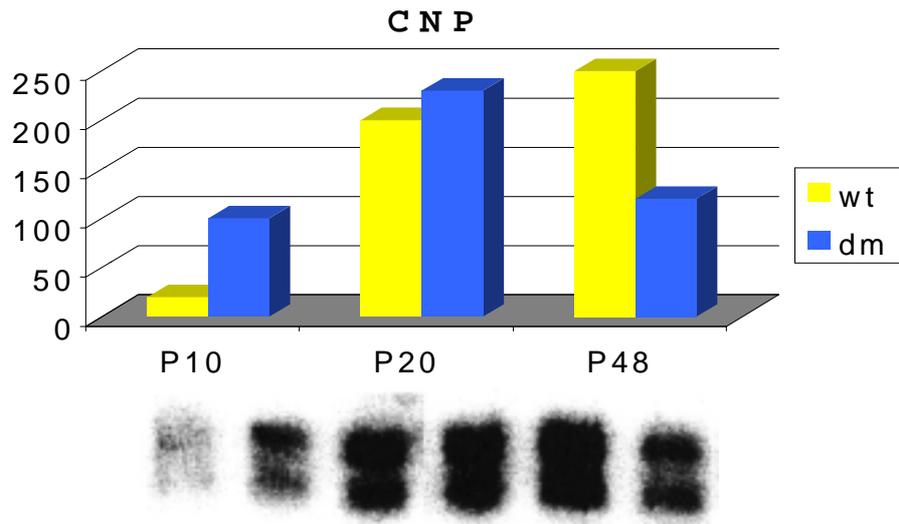


Abb. 36: Zeitliche Expression von CNP.

Beim CNP war die Hochregulation in der *mbp^{-/-} plp^{-/-}* Doppelmutante am Tag P10 am stärksten. Am Tag P20 war der Unterschied nur noch schwach vorhanden. In der adulten Doppelmutante war das Signal schwächer als beim Wildtyp.

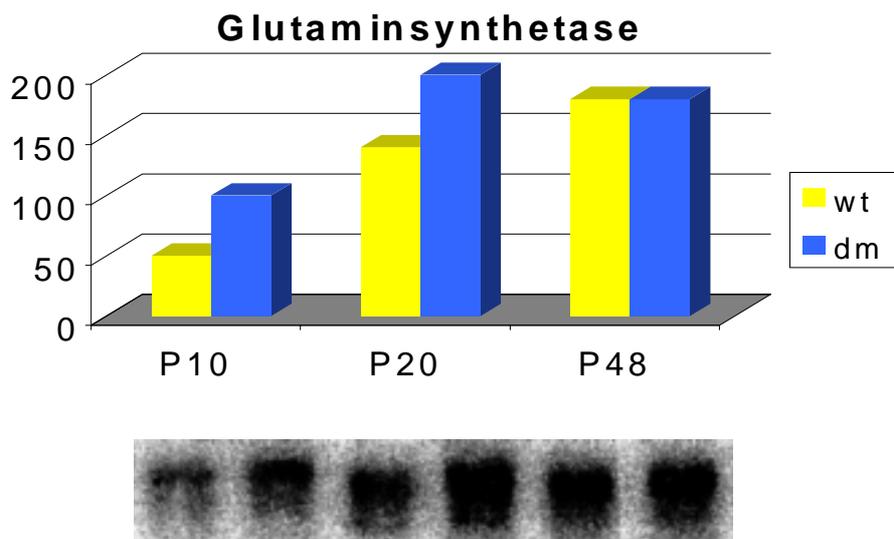


Abb. 37: Zeitliche Expression der Glutaminsynthetase.

Die Glutaminsynthetase zeigte ebenfalls am Anfang der Myelinisierung ihre stärkste Hochregulation. Diese war am Tag P20 noch vorhanden, allerdings nicht mehr im adulten Stadium.

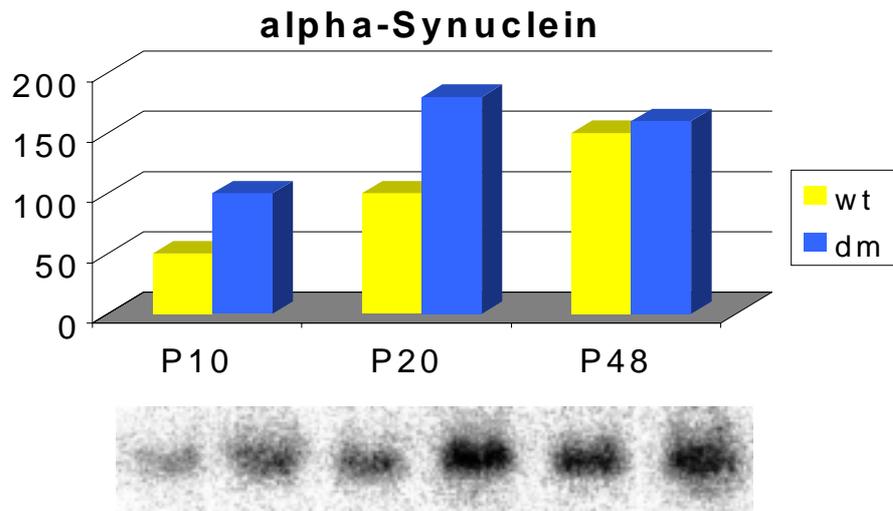


Abb. 38: Zeitliche Expression des alpha-Synucleins.

Analog zur Glutaminsynthetase war der Anstieg der Expression von alpha-Synuclein in der *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante nur in der Myelinisierungsphase vorhanden, in der adulten Maus waren kaum Unterschiede zu erkennen.

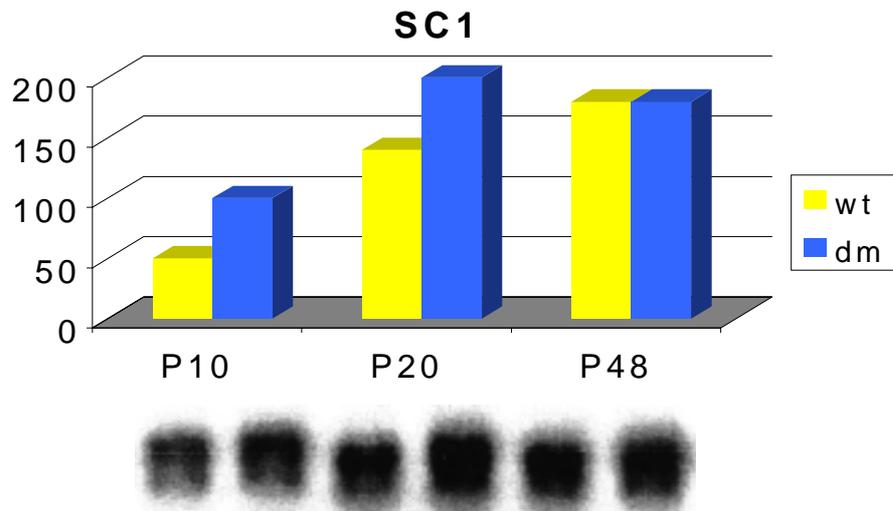


Abb. 39: Zeitliche Expression des SC1.

Die zeitliche Expression des SC1 ähnelte sehr der des alpha-Synucleins. Auch hier waren die Unterschiede hauptsächlich an den Tagen P10 und P20 vorhanden und verschwanden im erwachsenen Tier.

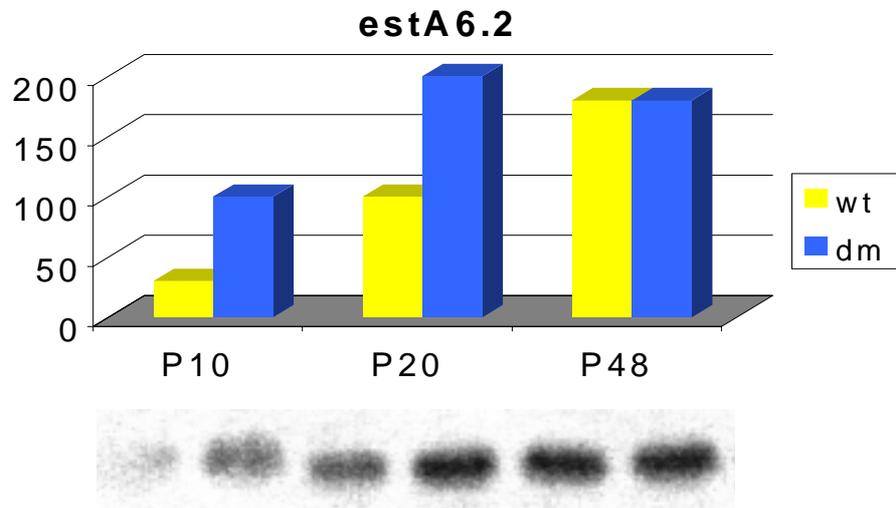


Abb. 40: Zeitliche Expression des estA6.2.

Auch der estA6.2, der wahrscheinlich zur Histondeacetylase gehört, zeigte nur in der Myelinisierungsphase eine Erhöhung des Signals in der *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante. Ein stärkerer Unterschied war am Tag P10 vorzufinden.

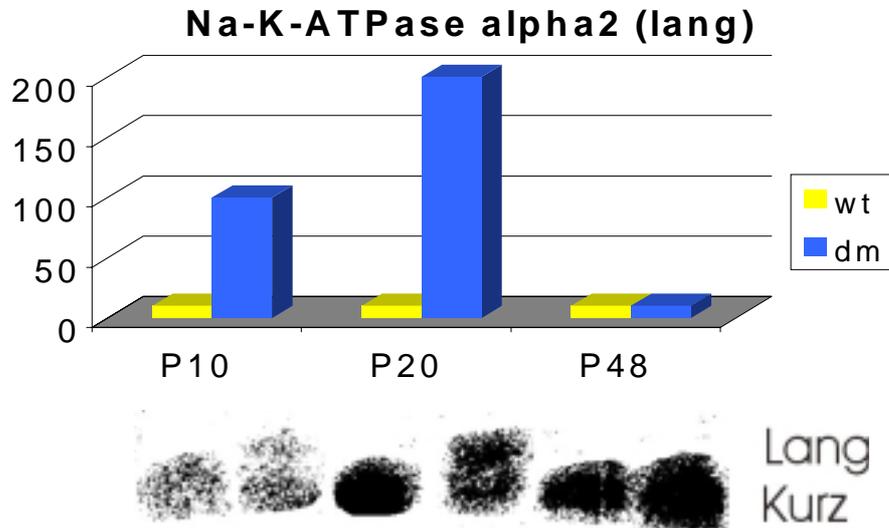


Abb. 41: Zeitliche Expression der Na-K-ATPase (lang).

Die lange Form der Na-K-ATPase alpha2 wurde nur in der Myelinisierungsphase der *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante überexprimiert. Zum Zeitpunkt P48 war in der Doppelmutante die kurze Form dominant.

Insgesamt war deutlich zu erkennen, daß die Regulation der Gene fast ausschließlich auf die Myelinisierungsphase beschränkt war. Nur das CNP zeigte im adulten Stadium eine deutliche Veränderung in der Doppelmutante. Für einige Gene waren die Unterschiede am Tag P10 deutlicher als am Tag P20. Die Regulation der Gene findet demnach schon zu Beginn der Myelinisierung statt.

1.4 Überprüfung der Genregulationen durch die *Mikro-Array-Technik*

Zur weiteren Bestätigung von aus der SAGE-Methode ermittelten differentiell exprimierten Genen und umfassenderen Analyse Hirn-spezifischer Transkripte wurde die RNA von Wildtypmäusen und *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutanten einer *Mikro-Array-Analyse* unterzogen. 40 cDNA-Fragmente wurden mit Hilfe der RT-PCR kloniert. In Zusammenarbeit mit der Firma MEMOREC GmbH wurden diese und weitere 153 Gene und sechs Standards aus deren cDNA-Fragment-Datenbank analysiert. PolyA⁺-RNA wurde aus Gesamthirn-RNA von männlichen Mäusen zu drei verschiedenen postnatalen Zeitpunkten (P10, P20 und P48) gewonnen und revers transkribiert. Die resultierende cDNA wurde im Falle des Wildtyps mit dCTP-Cy3 und im Falle der Doppelmutanten mit dCTP-Cy5 fluoreszenzmarkiert. Um Expressionsunterschiede der Cy3- und Cy5-Fluoreszenz quantifizieren zu können, wurden die vereinigten, markierten cDNA-Proben als Sonden benutzt, die mit den kovalent an einen Objektträger gebundenen cDNA-Fragmenten hybridisieren können. Durch optische Messung der roten (Cy3) und der grünen (Cy5) Fluoreszenz eines jeden Spots und Abzug des Hintergrundes wurde für jedes cDNA-Fragment der Expressionsunterschied durch Bestimmung des Signalquotienten errechnet. Zur Ermittlung der Standardabweichung wurden die cDNA-Fragmente zweimal auf jedem Chip aufgetragen. Zur Reproduzierbarkeit der Expressionsunterschiede wurden für die drei untersuchten Expressionszeitpunkte jeweils zwei Chips hybridisiert. Die Signalquotienten wurden auf den GAPDH-Standard normiert. Die Auswertung der erhaltenen Daten ist in den Abb. 42-44 dargestellt. Der Grenzwert der statistischen Signifikanz wurde auf eine 1,4fach differentielle Expression festgelegt.

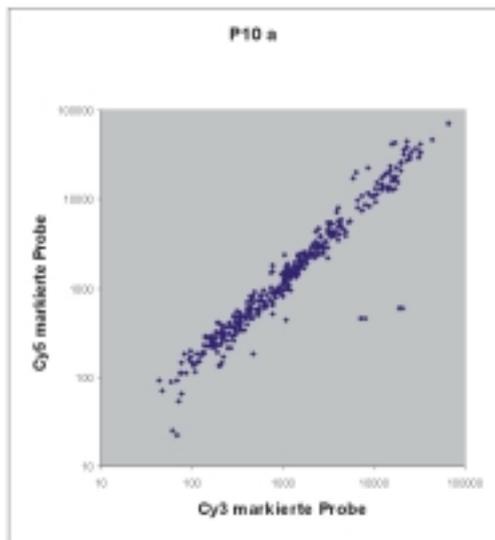
Mit der Tree View Software (M. Eisen, Stanford University) wurde ein *Clustering* der sechs *Arrays* bzw. der Gene durchgeführt. Das *Clustering* der *Arrays* wies deutliche Ähnlichkeiten der *Arrays* P10a und P10b sowie der restlichen vier *Arrays* auf.

Expressionsunterschiede in der Doppelmutante zu allen Zeitpunkten zeigte das ApoE (P10: 1,7fach; P20: 2fach; P48: 3fach) sowie in schwächerer Form das APP (P10: 1,5fach; P20: 1,4fach; P48: 1,8fach), die lange Form der Na-K-ATPase alpha2 (P10: 1,8fach; P20: 1,6fach; P48: 1,4fach) und das QKI (P10: 1,6fach, P20: 1,4fach; P48: 1,6fach). Auch das S100B (P10: 1,5fach; P20: 1,2fach; P48: 1,4fach) war in diesem Gen-*Cluster* vertreten.

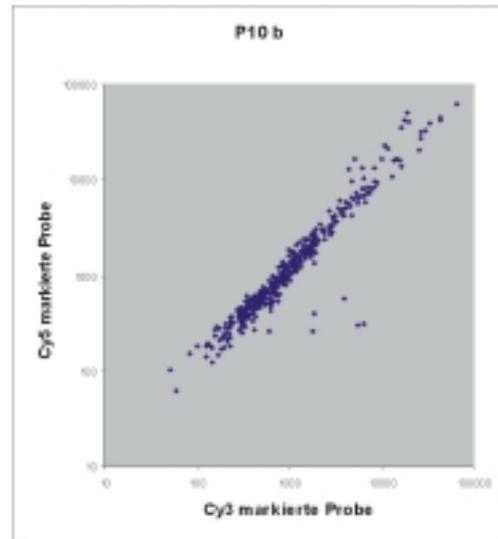
Weitere Expressionsunterschiede wurden vorwiegend in der frühen Phase der Myelinisierung (P10) festgestellt. Stark hochreguliert zu diesem Zeitpunkt waren mitochondrial codierte Gene wie die NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase 4 (3fach), Cytochrom C Oxidase 1 (2,5fach) und die ATPase 6 (1,9fach) sowie Gene des Glutamat-*Signallings* wie der Glutamattransporter (GLT1, 2fach), die metabotropen (MGR3, 1,5fach; MGR4, 1,5fach; MGR8, 1,9fach) sowie die ionotropen Glutamatrezeptoren (Kainat: GLK1, 1,5fach; GLK3, 1,6fach; AMPA: GLR4, 1,6fach). Desweiteren wiesen CDC10 (1,8fach), ZNF216 (1,5fach), SNAP-25 (1,5fach), SERCA2 (1,5fach), HSP86 (1,5fach), estA6.2 (1,6fach), BMP-2 (1,5fach), Connexin 43 (1,4fach), MOG (1,6fach), CNP (1,5fach) und der G-Protein-gekoppelte Rezeptor (GPR3, 1,7fach) eine Hochregulation am Tag P10 auf.

Im Maximum der Myelinisierung (P20) zeigten nur ApoE, APP, die Na-K-ATPase alpha2 und QKI eine erhöhte Expression. Zu diesem Zeitpunkt wiesen alle Myelogene, darunter MAL (-2fach) ihren niedrigsten Expressionquotienten auf. Weiterhin war die Phospholipase C (-1,9fach) deutlich erniedrigt.

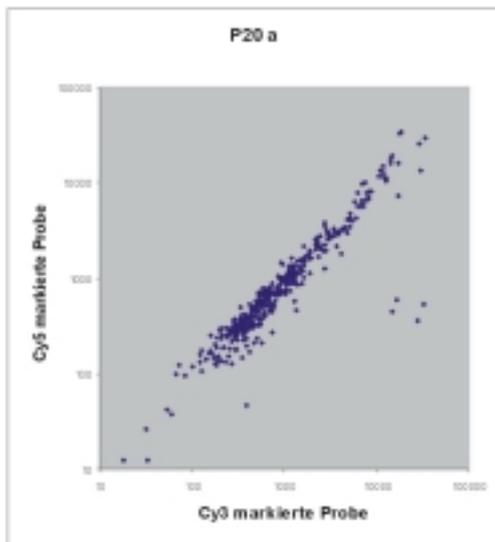
In der adulten Form zeigten die Myelogene wie das MOG (1,8fach), MAL (1,5fach), OSP (1,5fach), OMGP (1,5fach) und CNP (1,5fach) ebenso wie das RB3 (1,8fach), KLC1 (1,5fach) und APLP1 (1,5fach) eine leichte Erhöhung. Dem entgegen wiesen der Endothelin B-Rezeptor (-1,6fach) und der Dopamin Rezeptor D3DR (-1,6fach) eine Erniedrigung der Expression auf.



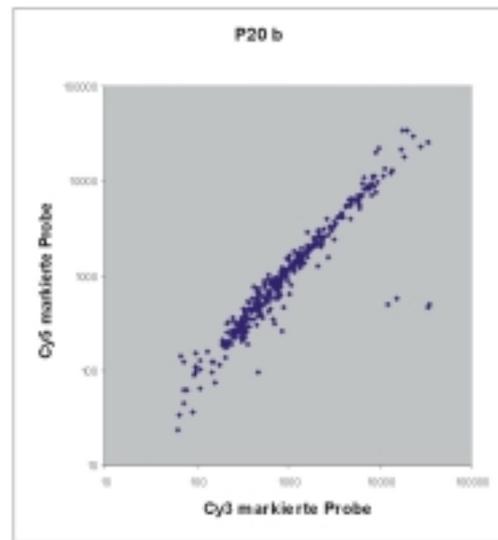
A.



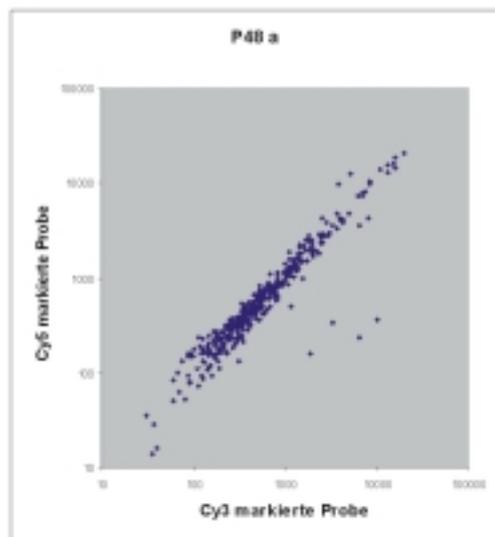
B.



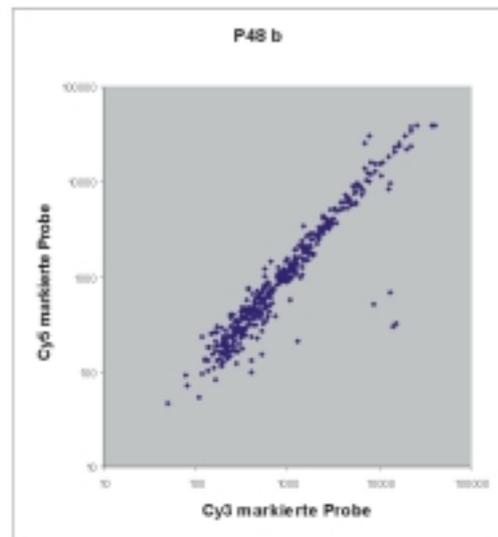
C.



D.



E.



F.

Abb. 42: *Mikro-Array-Analyse des Wildtyps (Cy3) und der Doppelmutanten (Cy5) zu den Zeitpunkten P10 (A und B), P20 (C und D) und P48 (E und F). Die Signale für die cDNA-Fragmente sind logarithmisch als Scatter-Blot aufgetragen.*

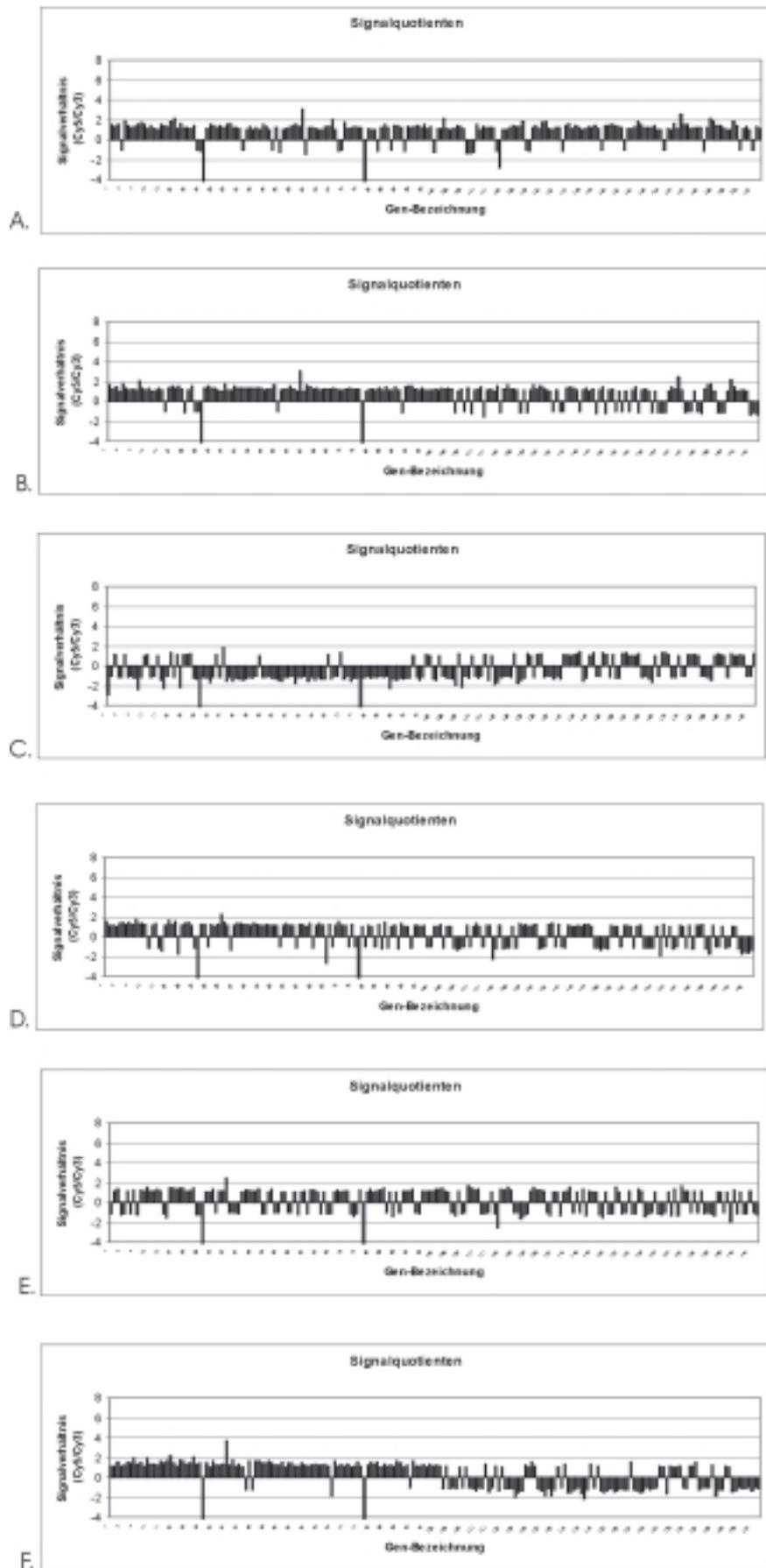


Abb. 43: Expressionsquotienten (Doppelmutante: Wildtyp) aller Signale zu den Zeitpunkten P10a (A), P10b (B), P20a (C), P20b (D), P48a (E) und P48b (F). Belegung des *Mikro-Array* ist im Anhang aufgeführt.

Abb. 44: *Clustering* der untersuchten Gene (siehe vorherige Seite):

Sowohl die Gene als auch die Arrays wurden nach Homologien im zeitlichen Muster der Signalquotienten (Doppelmutante:Wildtyp) in *Cluster* eingeteilt. Der Grad der Homologie nimmt entsprechend den feineren Verästelungen zu. Eine Überexpression ist rot, eine Reprimierung grün gekennzeichnet. Die Stärke des Unterschiedes ist proportional zur Intensität der Farbe dargestellt.

1.4 Quantitative Untersuchung der Myelinproteine mittels *Western Blot*-Analyse

Da in der *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante für einige Gene eine deutliche Regulation nachgewiesen wurde, war es interessant, mehr über deren Regulierung auf Translationsebene zu erfahren. Es standen die Möglichkeiten zur Auswahl, die Proteine anhand von *Western Blot*-Analysen oder mit Hilfe von immunhistochemischen Methoden zu untersuchen. Da mit der *Western Blot*-Analyse eine bessere quantitative Aussage möglich ist, wurde sie zunächst für die Untersuchung der Translationsprodukte herangezogen.

Es wurde zunächst Gesamtprotein von jeweils 20 Tage und 6 Monate alten Wildtyp- und Doppelmutante-Männchen präpariert, durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und in einem Nassblot-Verfahren auf eine Membran transferiert. Das Nassblot-Verfahren war wegen seiner effizienten Übertragungsrate gegenüber dem Semi-Dry-Blot-Verfahren für eine quantitative Bestimmung besser geeignet.

Bei der Benutzung von Gesamtprotein zeigte sich das Problem, daß in Maus generierte Antikörper neben dem gewünschten Protein mit zwei Signalen hybridisierten, die den leichten und schweren Ketten des Immunglobulins zuzuordnen waren. Beispielhaft dafür war der Anti-MAP-2-Antikörper.

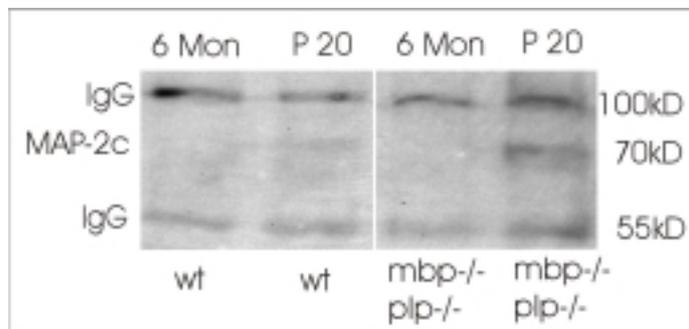


Abb. 45: *Western Blot*-Analyse mit Anti-MAP-2-Antikörpern, wt = Wildtyp.

Die unspezifischen Banden bei 55 und 100kD sind deutlich zu erkennen. Von den MAP-2-Isoformen wurde nur die 70kD-Form in den jüngeren Mäusen detektiert. In der 20 Tagen alten Doppelmutante ist ein deutlicher Anstieg des MAP-2c zu erkennen. Die Bande ist in alten Mäusen nicht vorhanden, da die Isoform nach 20 Tagen herunterreguliert wird. Für die höher molekularen Formen MAP-2a und MAP-2b (280kD) wurde kein Signal erhalten.

Da vorwiegend mit Mausantikörpern gearbeitet wurde, erwies es sich als sinnvoller, durch die Präparation von Myelin die Störsignale zu umgehen. Da die Doppelmutante deutliche Defekte in der Morphologie des Myelins aufweist, waren in der dortigen Proteinzusammensetzung am ehesten Unterschiede zu erwarten. Deshalb wurde von 2 Monate alten Wildtyp-, MBP-defizienten, PLP-defizienten, Dm20- und Doppelmutante-Männchen Myelin präpariert. Der späte Zeitpunkt wurde gewählt, um Proteinveränderungen im fertigen Myelin nachzuweisen.

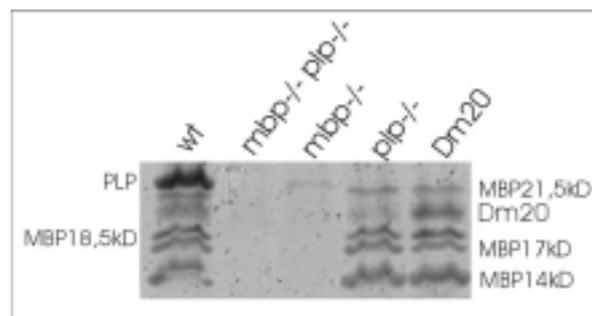


Abb. 46: Charakteristisches Muster der Myelinproteine in den Mutanten.

Das charakteristische Proteinmuster der Mutanten demonstriert das Polyacrylamid-Gel. Der Wildtyp enthält alle vier verschiedenen MBP-Banden sowie das PLP und seine Isoform Dm20. In der *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante ist keines der Proteine vorhanden. Die *mbp*^{-/-} (*shiverer*)-Maus ist für alle MBP's defizient und besitzt auch sehr wenig PLP. Bei der PLP-defizienten Maus fehlen beide PLP-Isoformen. Die Dm20-Mutante besitzt nur die Dm20-Isoform des PLP. In den MBP-defizienten Linien *mbp*^{-/-} und *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante kommt es nur zu einer schwachen, unkompaktierten Ausbildung des Myelins. Die Myelinlipide sind kaum vorhanden, von den Gangliosiden wird nur das GM3 gebildet [Uschkureit 2000]. Für eine quantitative Auswertung der Proben wurden gleiche Mengen Protein für jede Maus aufgetragen. Als interner Standard wurde die Na-K-ATPase alpha1 gewählt, der eine *housekeeping*-Funktion zugeschrieben wird.

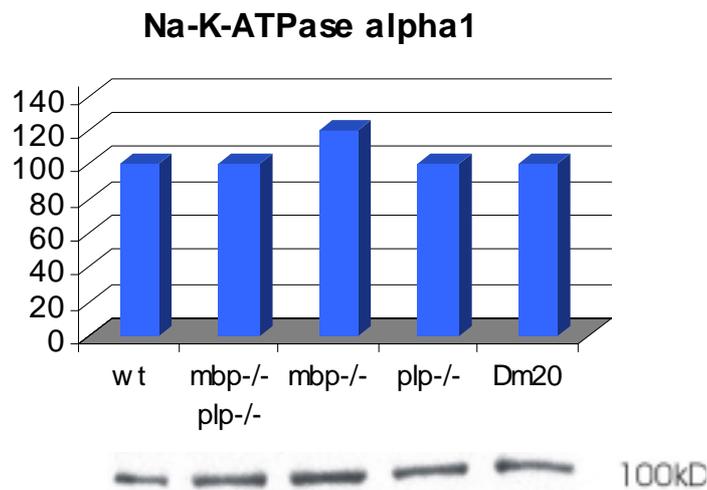


Abb. 47: *Western Blot*-Analyse mit Anti-Na-K-ATPase alpha1-Antikörpern, Das wt-Signal wurde als Referenzwert benutzt (=100).

Im Vergleich zur alpha1-Untereinheit wurde die alpha2-Untereinheit der Na-K-ATPase aufgetragen. Bei dieser Form existiert eine lange Transkriptform, die in der Doppelmutante überexprimiert war. Die alpha2-Isoform zeigte im aufgereinigten Myelin in den MBP-defizienten Linien eine deutliche Erhöhung.

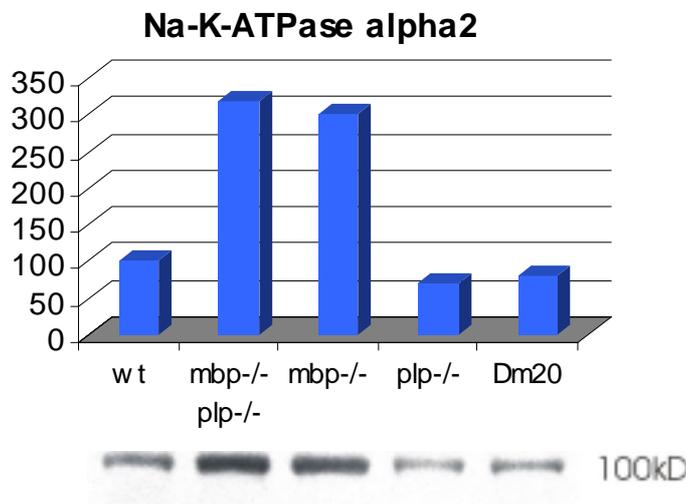


Abb. 48: *Western Blot*-Analyse mit Anti-Na-K-ATPase alpha2-Antikörpern.

Außerdem wurde die beta1-Untereinheit der Na-K-ATPase, die auf *Northern Blot*-Ebene erhöht war, im Myelin untersucht. Diese zeigte im Myelin kein verstärktes Signal. In der *plp*^{-/-} und der Dm20-Linie war sie sogar leicht reduziert.

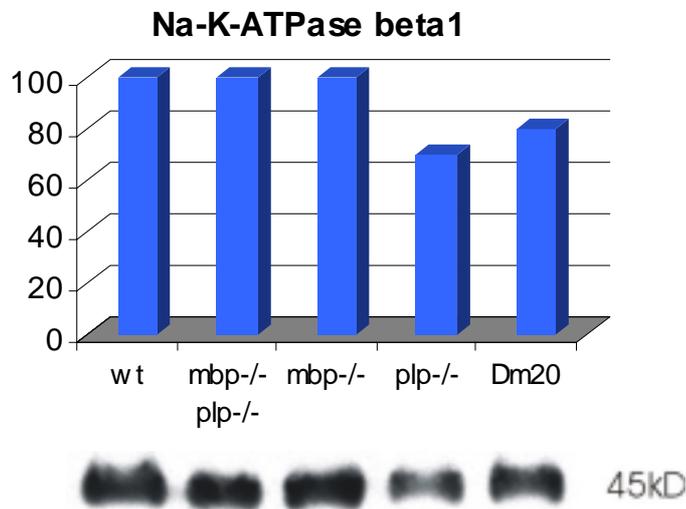


Abb. 49: *Western Blot*-Analyse mit Anti-Na-K-ATPase beta1-Antikörpern.

Weiterhin wurden einige Myelinkomponenten auf Proteinebene untersucht. CNP war in allen Mauslinien relativ gleichmäßig vorhanden. Es wurden für die 46kD (CNPI)- und die 48kD (CNPII)-Isoform zwei Signale detektiert. In der *mbp*^{-/-} Maus war 50% weniger CNP als in der Doppelmutante vorhanden. In allen Mutanten war das Verhältnis von CNPI:CNPII kleiner als im Wildtyp.

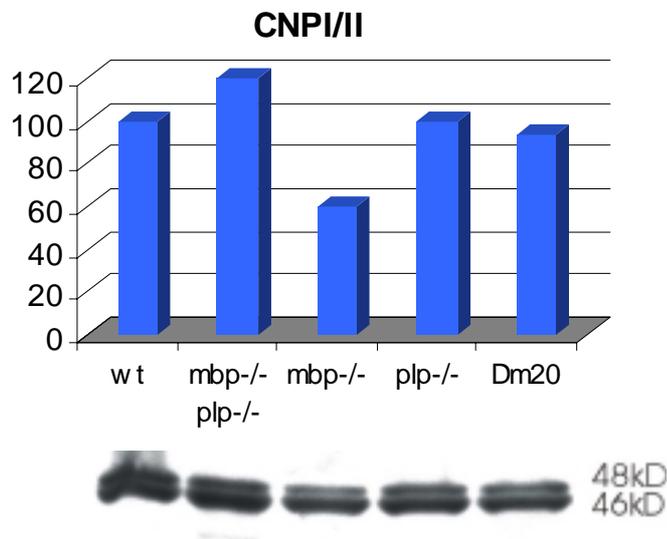


Abb. 50: *Western Blot*-Analyse mit Anti-CNP-Antikörpern.

Desweiteren wurde das auf *Northern Blot*-Ebene in der Doppelmutante überexprimierte MAG untersucht. Das Protein zeigte in der *Western Blot*-Analyse aufgrund seiner starken Glykosylierung eine ziemlich breite Bande. Das MAG-Signal war in MBP-defizienten Linien deutlich reduziert. In diesen Proben war zudem eine weitere scharfe Bande sichtbar. Eine Unterscheidung der L- und S-Isoformen war nicht möglich.

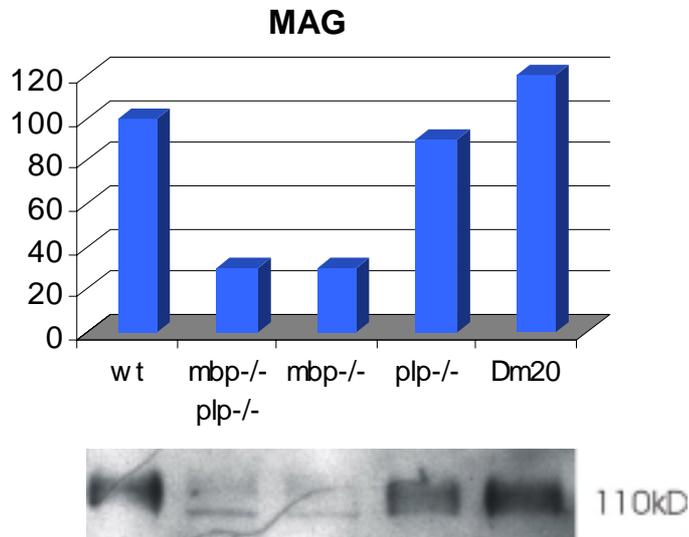


Abb. 51: *Western Blot*-Analyse mit Anti-MAG-Antikörpern.

Da MAG entgegen der Hochregulierung des Transkriptes in der Doppelmutante auf Proteinebene reduziert war, wurde ein weiteres transmembranständiges Glykoprotein im Myelin untersucht, das MOG. Dieses war ebenfalls in den MBP-defizienten Linien kaum vorhanden.

Insgesamt ergab sich bei den Proben eine deutliche Abstufung der Signalintensität von wt > plp-/- > Dm20+ > mbp-/- plp-/- > mbp-/- . Zudem war in den MBP-defizienten Linien ein höhermolekulares Signal bei etwa 80kD zu beobachten.

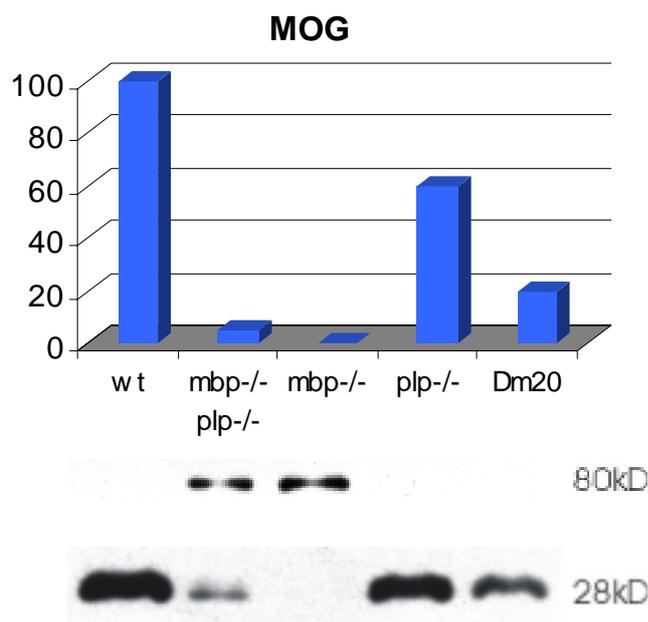


Abb. 52: *Western Blot*-Analyse mit Anti-MOG-Antikörpern.

Weiterhin wurden zwei in der Doppelmutante hochregulierte, astrozytenspezifische Gene in der Myelinaufreinigung charakterisiert. Connexin 43 war in den MBP-defizienten Linien leicht hochreguliert.

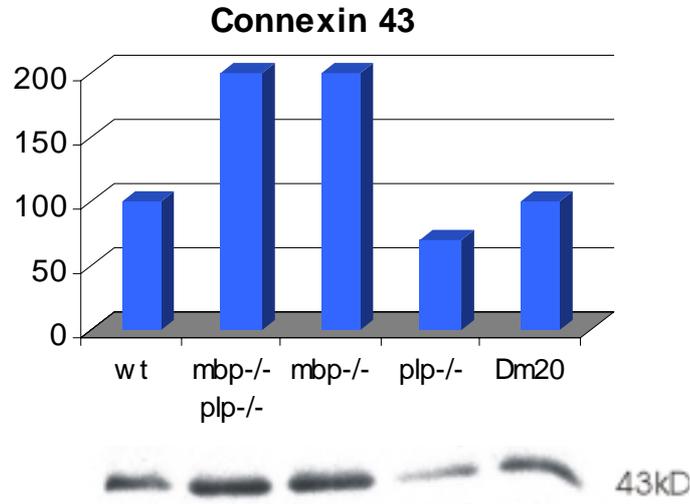


Abb. 53: *Western Blot*-Analyse mit Anti-Connexin 43-Antikörpern.

Bei der extrazellulären Matrix-Komponente SC1 waren mehrere Banden sichtbar. Das eigentliche Protein zeigte wiederum in den MBP-defizienten Mauslinien ein verstärktes Signal bei 120kD. Darüberhinaus war in diesen beiden Mutanten im Bereich um 55kD ein weiteres Signal zu erkennen, das wahrscheinlich von einem Abbau des Proteins herrührte.

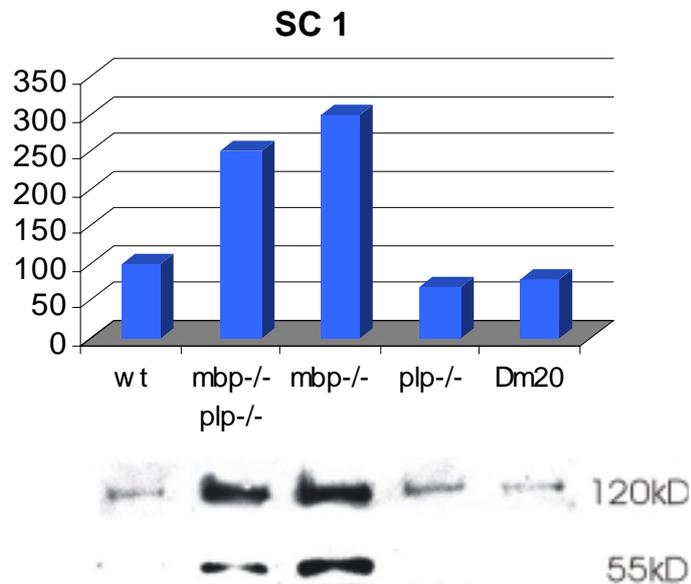


Abb. 54: *Western Blot*-Analyse mit Anti-SC 1-Antikörpern.

Von den neurologisch pathogenen Proteinen wurde das alpha-Synuclein in der Myelinfraktion untersucht, da das Protein in intrazellulären glialen Einschlüssen nachgewiesen wurde. Alpha-Synuclein wies in den MBP-defizienten Linien einen gravierenden Anstieg auf. Weiterhin war im Wildtyp ein schwaches höhermolekulares Signal bei 50kD, in allen Mutanten bei 100kD zu beobachten.

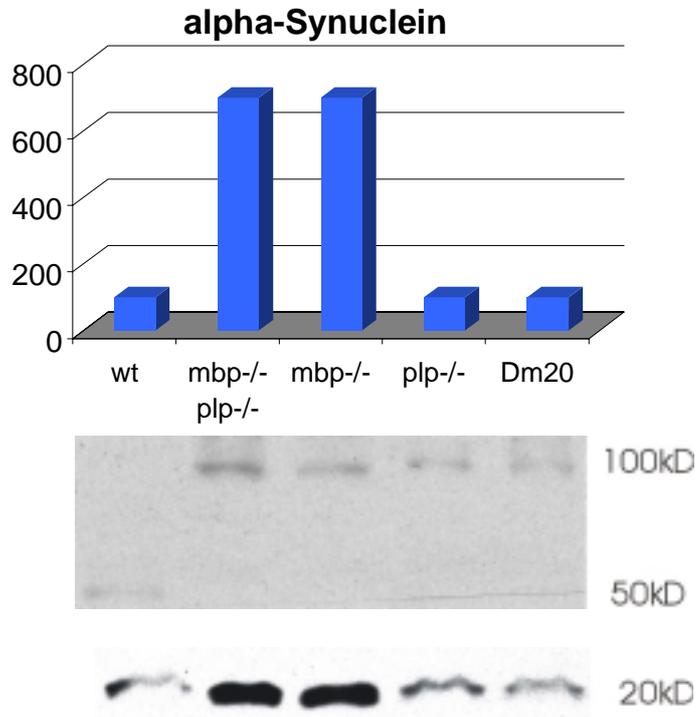
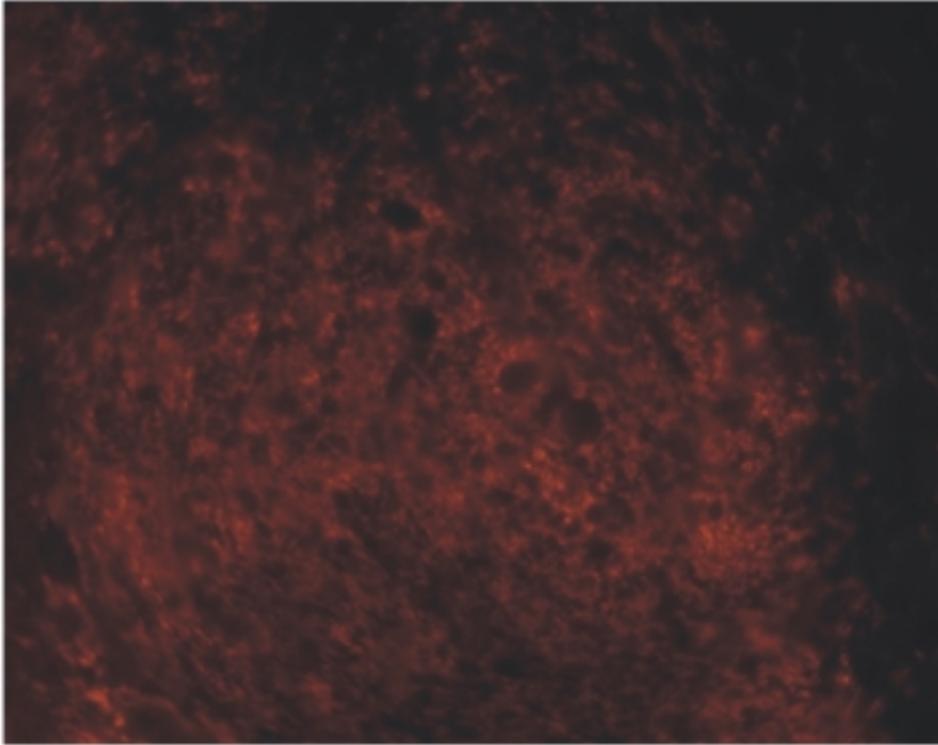


Abb. 55: *Western Blot*-Analyse mit Anti-alpha-Synuclein-Antikörpern.

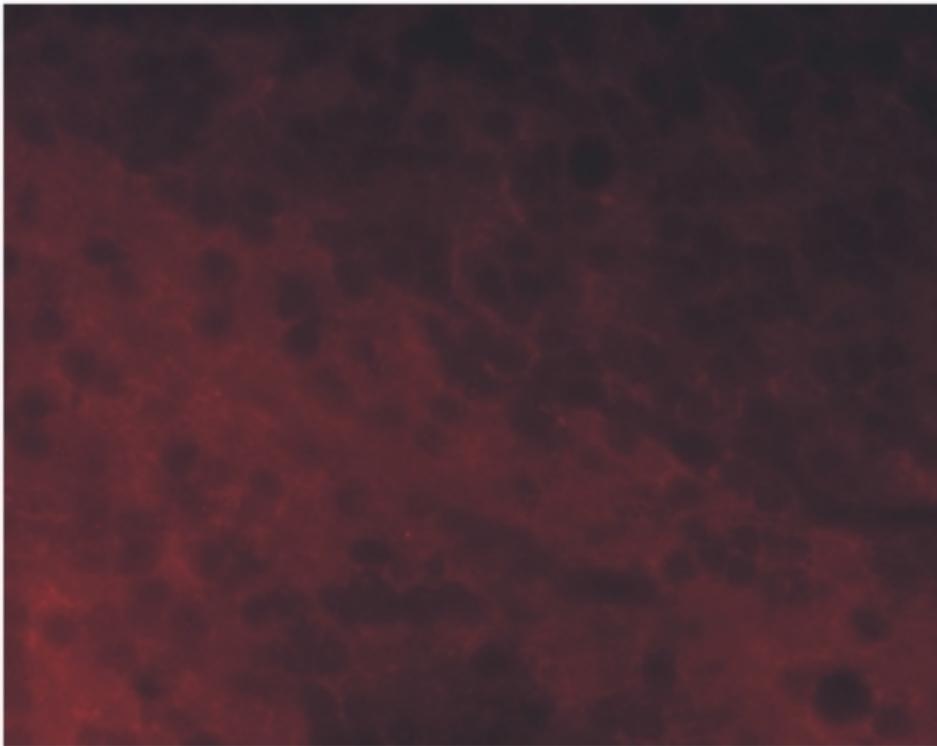
1.5 Immunhistochemische Untersuchungen

Um eine Reduzierung der integralen Myelinproteine in der *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante weiter zu charakterisieren, wurden eine Wildtypmaus und eine Doppelmutante perfundiert und von deren Hirnen transversale Paraffinschnitte hergestellt. Die Hirnschnitte wurden mit Anti-PLP-, Anti-MOG-, Anti-MAG- und Anti-SC1-Antikörpern hybridisiert. In Maus generierte Antikörper wurden wegen des hohen Hintergrundes nicht verwendet.

Anti-PLP-Antikörper (Abb. 56) zeigten eine deutliche Anfärbung der Myelinbahnen im Wildtyp, in der Doppelmutante jedoch waren erwartungsgemäß keine spezifischen Signale zu beobachten. Mit den Anti-MAG-Antikörpern (Abb. 57) wurden ebenfalls myelinreiche Regionen angefärbt. Bereiche spezifischer Färbung waren in der Doppelmutante kaum vorhanden. Mit den Anti-MOG-Antikörpern (Abb. 58) wurden im Wildtyp - wenn auch schwächer - dieselben Bereiche angefärbt, die PLP- und MAG-positiv waren. In der Doppelmutante hingegen waren kaum spezifische Signale identifizierbar. Das extrazelluläre Matrixprotein Sc1 (Abb. 59) zeigte ebenfalls eine Colokalisation in myelinreichen Regionen. Im Gegensatz zu PLP, MAG und MOG wurden jedoch im Falle von SC1, das in der *Western Blot*-Analyse eine Überexpression im aufgereinigten Myelin zeigte, auch in der Doppelmutante mehrere Bereiche spezifisch angefärbt.

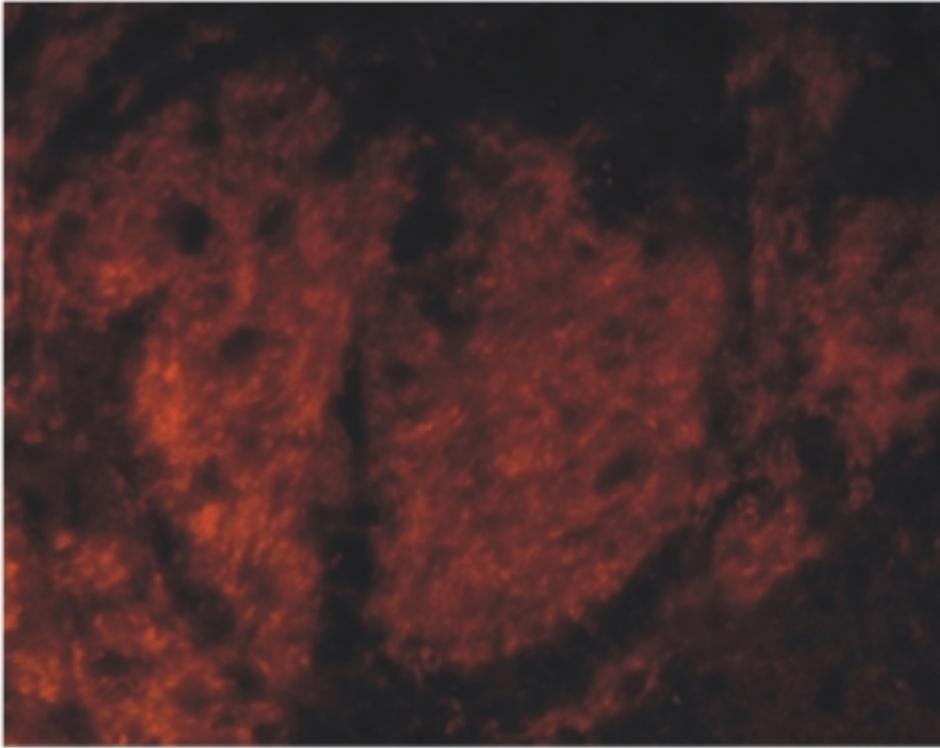


A.

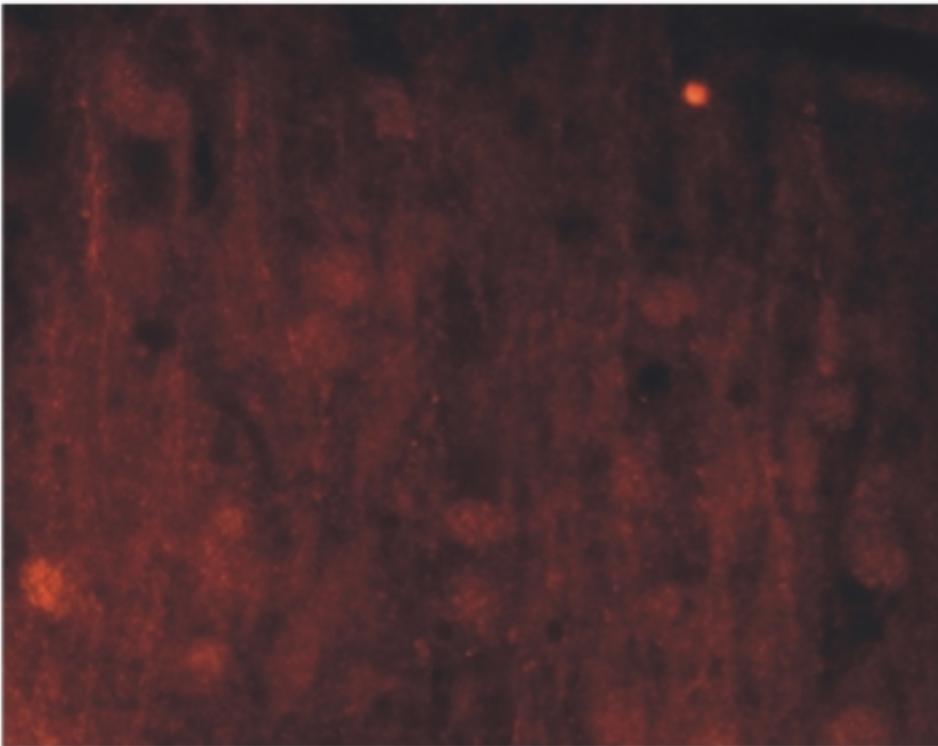


B.

Abb. 56: Immunhistochemische Färbung mit Anti-PLP-Antikörpern (Vergrößerung 100x): A: wt, B: dm.

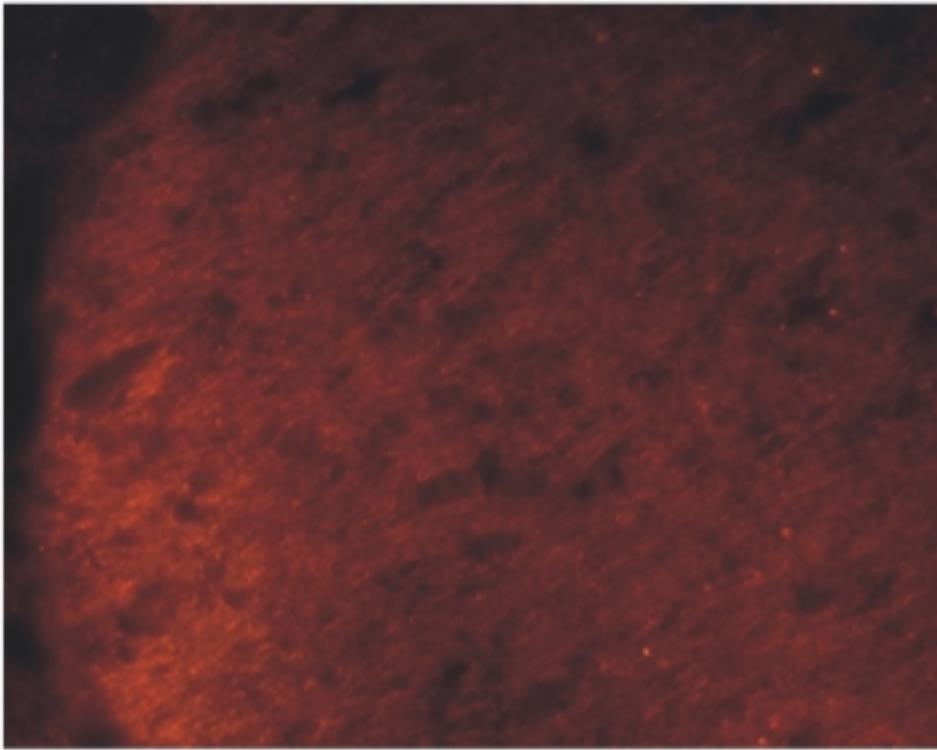


A.

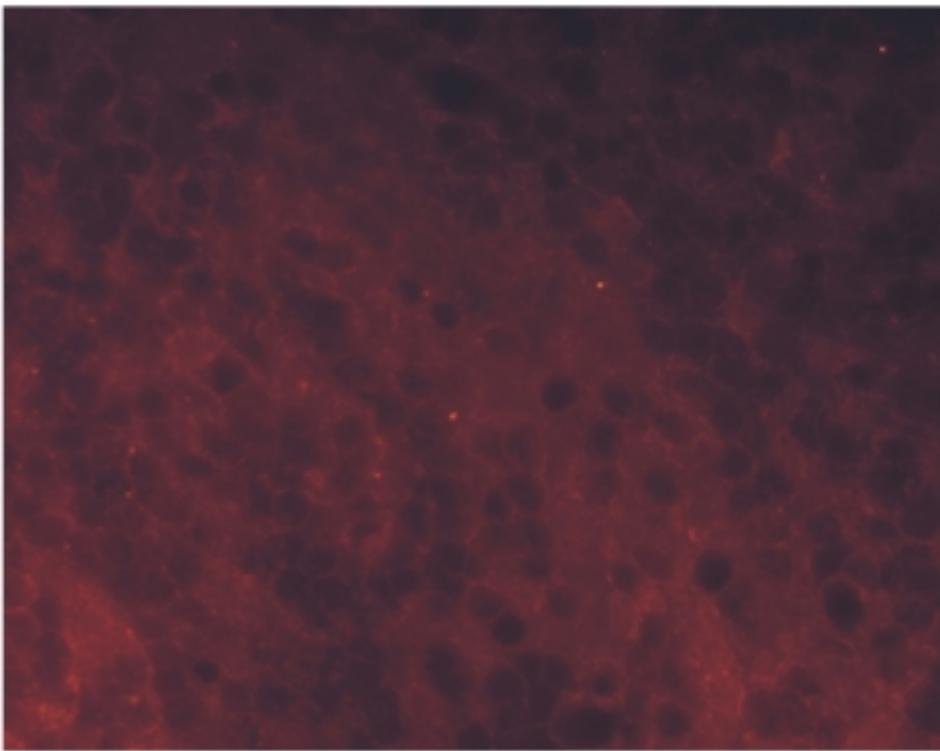


B.

Abb. 57: Immunhistochemische Färbung mit Anti-MAG-Antikörpern (Vergrößerung 100x): A: wt, B: dm.

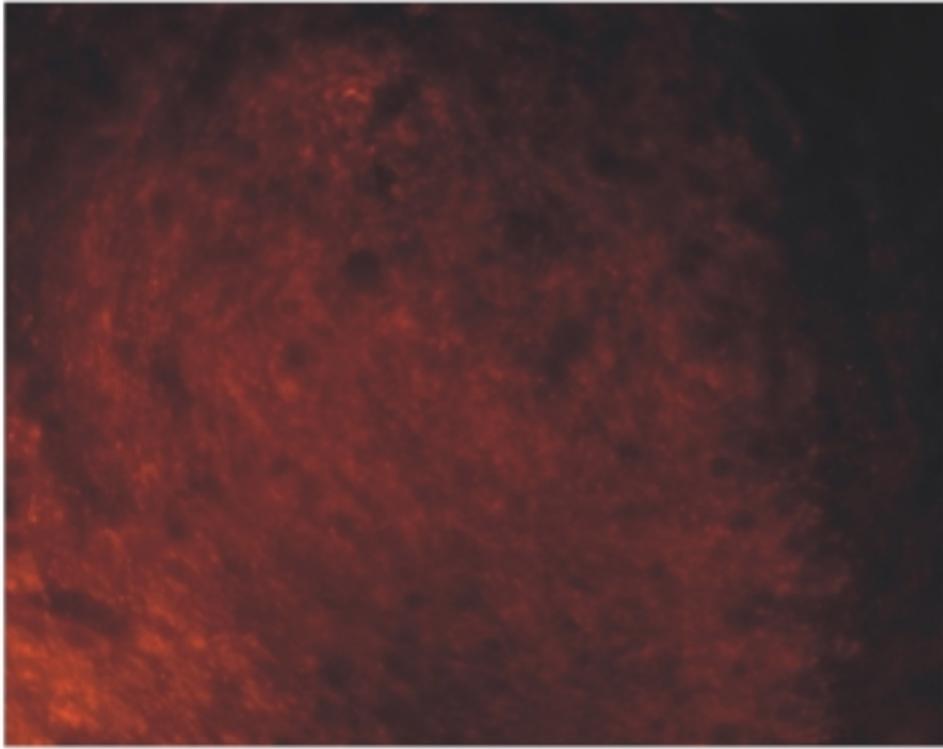


A.

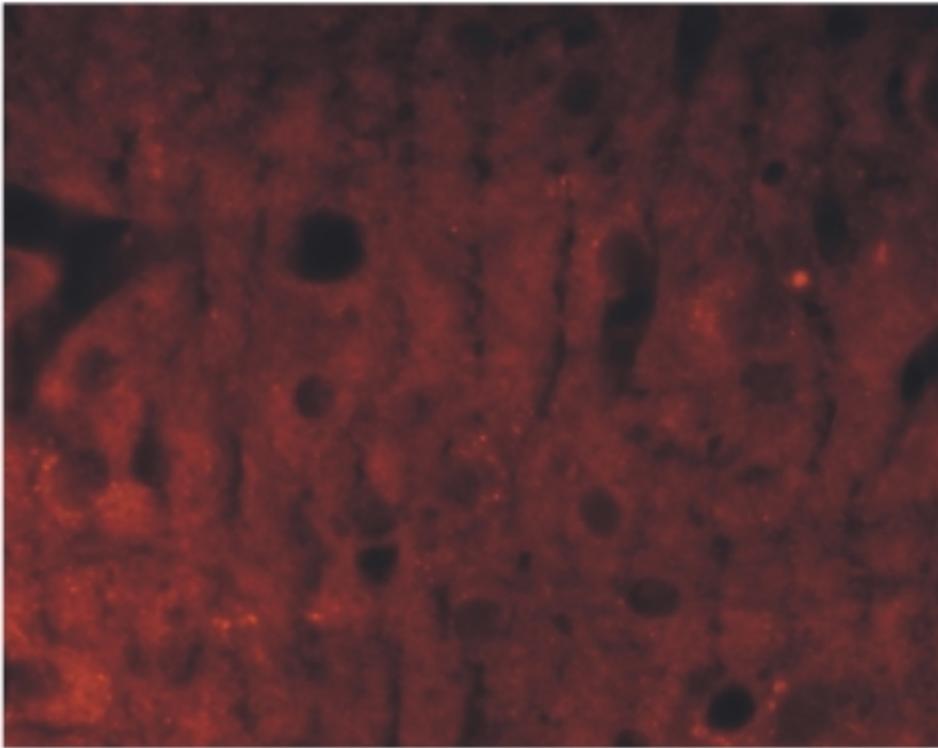


B.

Abb. 58: Immunhistochemische Färbung mit Anti-MOG-Antikörpern (Vergrößerung 100x): A: wt, B: dm.



A.



B.

Abb. 59: Immunhistochemische Färbung mit Anti-SC1-Antikörpern (Vergrößerung 100x): A: wt, B: dm.

2. Rescue der Doppelmutante mittels Mikroinjektion

2.1 Klonierung von Konstrukt 1

Die Expression von Transgenen in der Maus durch heterologen Einbau erfordert ein Konstrukt von spezifischem Aufbau. Es wird ein starker Promoter für eine hohe Expression des Gens benötigt, der aber nur zell- und entwicklungsspezifisch die Transkription induziert. Diese Eigenschaften treffen auf das 1,3kb-Fragment des MBP-Promoters zu, der spezifisch in Oligodendrozyten für eine starke Expression des MBP-Gens verantwortlich ist [Gow 1992, Wrabetz 1993, Haas 1993]. Weiterhin muß die Transkription durch ein definiertes Polyadenylierungssignal gestoppt werden. Durch Einführung einer *Cap*-Struktur und einer Polyadenylierung werden Transkripte im Organismus stabilisiert. Eine wichtige Funktion für eine effiziente Expression haben Introns, die mit dem Spleißosom interagieren und für ein Ausschleusen der gespalteten RNA aus dem Zellkern sorgen.

Für das Konstrukt wurde ein 1kb-Fragment des pSVK3-Vektors gewählt, das sowohl eine *small t-Antigen* Spleißstelle als auch ein SV40-Polyadenylierungssignal enthält. Problematisch ist die Auswahl des zu exprimierenden Genbereiches, da regulierende Faktoren der Transkriptionseinheit kaum aufgeklärt sind. So ergeben sich die folgenden zwei Möglichkeiten: zum einen eine weitgehend komplette Transkriptionseinheit mit Introns zu verwenden, um Fehler bei der Genexpression durch zu artifizielle Transgene zu vermeiden. Der Nachteil ist hierbei die enorme Größe des Transgens, das mit Hilfe von *yeast artificial chromosomes* (YACs) kloniert wird. Die zweite Möglichkeit ist, den cDNA-Bereich des Gens zu benutzen, um das Transgen klein und damit besser handhabbar zu gestalten. Bei letzterer Methode wächst die Gefahr, für die Expression essentielle Genbereiche zu vernachlässigen und durch künstliche Genkonstrukte Artefakte hervorzurufen. Beide Strategien wurden im Falle des MBP [Readhead 1987, Kimura 1989, 1998] und des PLP [Readhead 1994, Nadon 1994, Kagawa 1994, Schneider 1995, Johnson 1995] mit Erfolg angewandt. Da für die Remyelinisierung der *shiverer*-Maus die MBPcDNA der 14kD-Isoform ausreicht [Kimura 1989], wurde hier zunächst ein 0,45kb-Fragment für das Konstrukt benutzt, das den kompletten translatierten Bereich dieser Isoform umfaßt. Dazu wurde in einer RT-PCR mit den Primern 5'-MBP und 3'-MBP das entsprechende Fragment amplifiziert und in den pCRII-Vektor inkloniert. Entsprechend wurde für das PLP ein 0,8kb-Fragment mit dem kompletten translatierten PLPcDNA-Bereich verwendet. Die gleichzeitige Koexpression dieser Gene impliziert die zusätzliche Schwierigkeit, daß PLP im endoplasmatischen Retikulum, MBP hingegen an freien Ribosomen in den Ausläufern des Oligodendrozyten translatiert wird. Daher wurde zunächst die Strategie gewählt, zwei unterschiedliche Transkriptionseinheiten hintereinander in das Konstrukt zu klonieren, die jeweils vom MBP-Promoter-Fragment gestartet werden. Die Einführung von flankierenden loxP-Stellen sollte die Elimination des Konstruktes in den Transgenen durch Anwendung der Cre-Rekombinase ermöglichen, um in den gesunden, transgenen Mäusen eine transiente Demyelinisierung zu untersuchen.

Die Klonierung erfolgte wie in Abb. 60 dargestellt: Das MBP-Promoter-Fragment wurde in die SmaI-Schnittstelle und die MBP- bzw. PLPcDNA's jeweils getrennt in die XbaI-Schnittstelle des pSVK3-Vektors inkloniert. Die KpnI/PvuI-Fragmente der resultierenden Transkriptionseinheiten wurden nacheinander in die SmaI-Schnittstelle (PLP) bzw. in die EcoRV-Schnittstelle des pBS246-Vektors eingefügt.

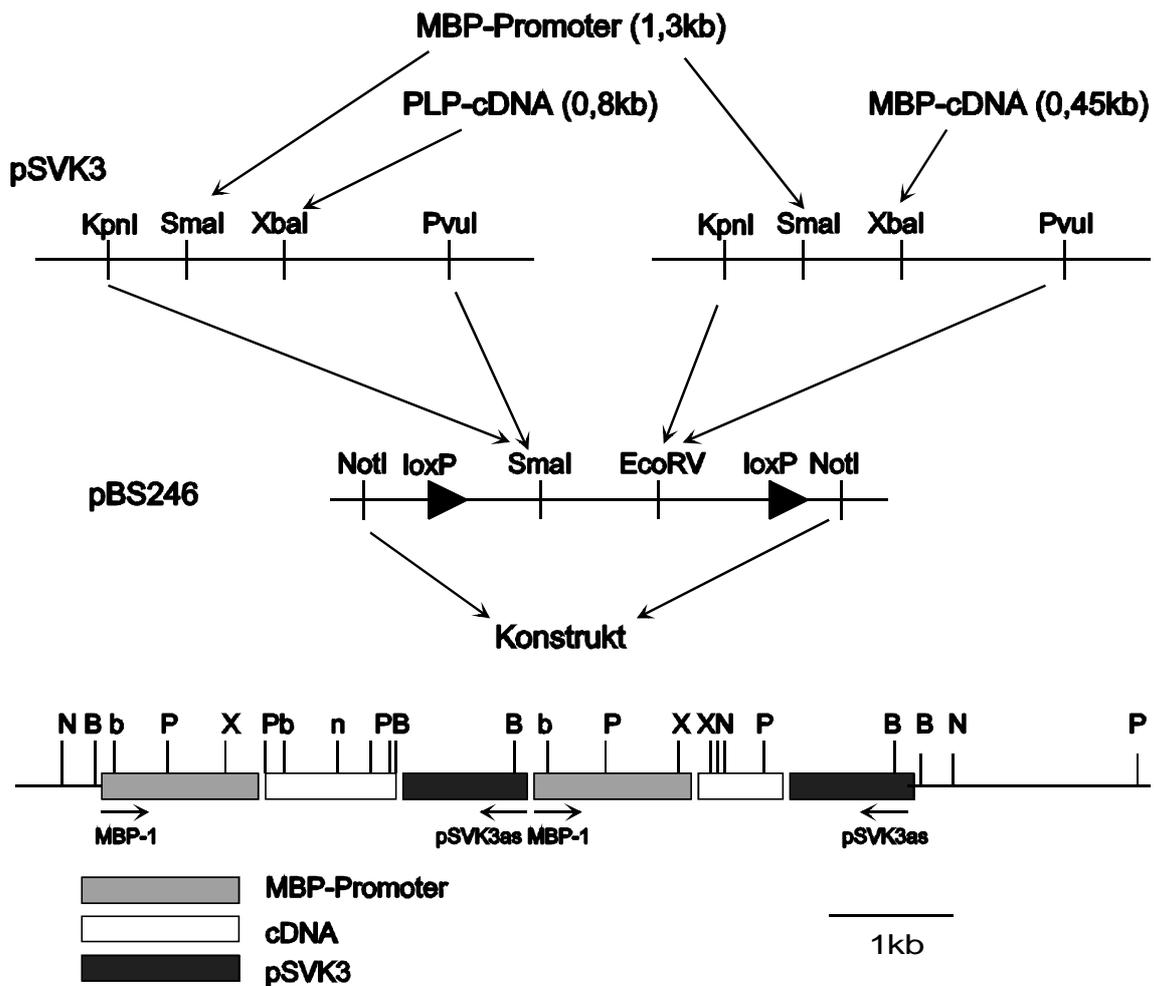


Abb.60: Klonierungsstrategie des ersten Konstruktes:
 N: NotI, B: BamHI, b: BglII, P: PstI, X: BstXI.
 Primer für die genomische PCR- und RT-PCR-Analyse sind eingezeichnet.

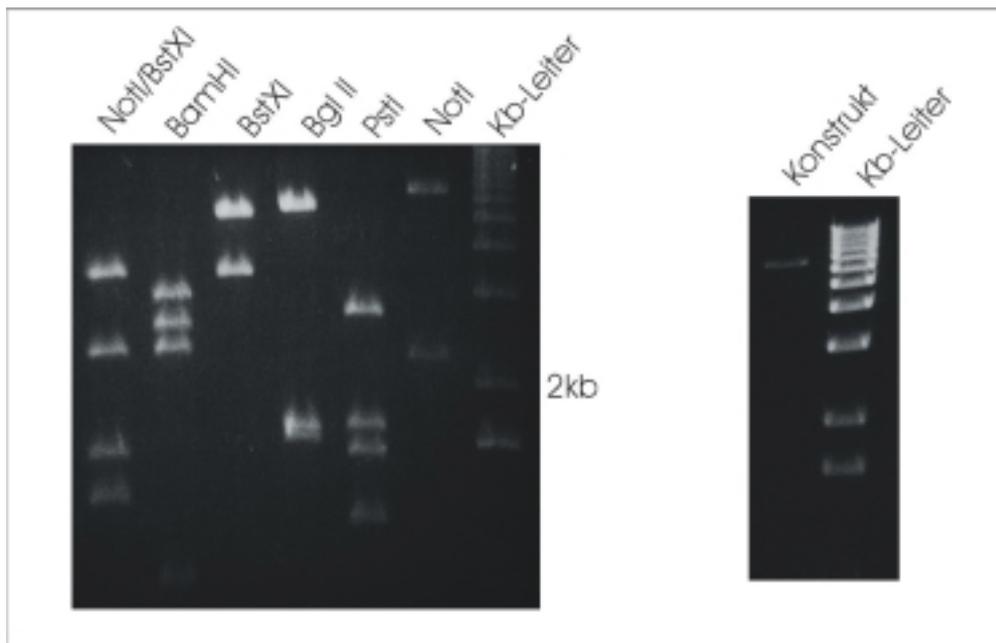


Abb. 61: Restriktionsverdau des ersten Konstruktes.

Abb.61 zeigt den Restriktionsverdau zur Verifizierung des Konstruktes. Es ergaben sich folgende Fragmente:

BstXI (X)/ NotI (N) : 0,3kb; 1,3kb; 1,5kb; 2,2kb; 3,2kb
 BamHI (B): 0,2kb; 0,9kb; 2,1kb; 2,5kb; 2,9kb
 BstXI (X): 0,3kb; 3,2kb; 5,1kb
 BglII (b): 1,6kb; 1,6kb; 5,4kb
 PstI (P): 0,2kb; 0,7kb; 0,7kb; 1,2kb; 1,5kb; 1,7kb; 2,6kb
 NotI (N): 2,2kb; 6,4kb

Das 6,4kb-NotI-Fragment (MBP-Promoter, PLPcDNA, pSVK3-Fragment, MBP-Promoter, MBPcDNA, pSVK3-Fragment) wurde gereinigt und als erstes Konstrukt für die Mikroinjektion in den männlichen Vorkern von befruchteten Mausoozyten verwendet.

2.2 Analyse der transgenen Mäuse

Das Konstrukt wurde in den Vorkern befruchteter Eizellen von stimulierten *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Weibchen injiziert. Etwa die Hälfte der injizierten Eizellen teilte sich über Nacht im Brutschrank. Die Zweizellstadien wurden in den Eileiter von scheinchwangeren CD1-Weibchen reimplantiert.

Auf diese Weise konnten 16 Nachkommen generiert werden, die anhand von *Southern Blot*-Hybridisierung und PCR-Analyse genotypisiert wurden. Durch Schwanzbiopsien wurde genomische DNA gewonnen. Nach BamHI-Verdau der DNA wurden drei Nachkommen (TG5, TG14, TG15) durch *Southern Blot*-Hybridisierung mit einer pSVK3-spezifischen Probe ermittelt, bei denen das Transgen durch heterologe Rekombination ins Genom integriert wurde (Abb. 62).



Abb. 62: *Southern Blot*-Hybridisierung nach BamHI-Verdau mit vektorspezifischer Probe: Mäuse 5, 14, 15 sind transgen, Mäuse 6-13 und 16 sind nicht transgen.

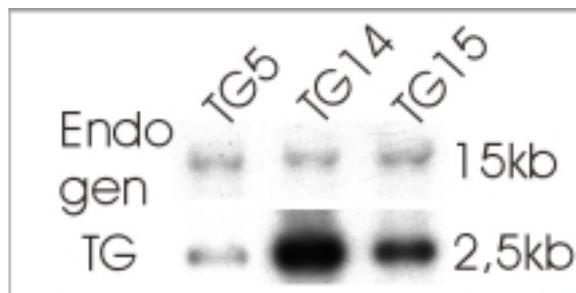


Abb. 63: *Southern Blot*-Hybridisierung zur Bestimmung der Kopienanzahl.

Die Quantifizierung der integrierten Kopien erfolgte über Hybridisierung mit dem MBP-cDNA-Fragment, das mit dem endogenen, ExonI enthaltenden 15kb-Fragment (MBP-Lokus siehe Abb. 73) hybridisiert. In den transgenen Linien TG5, TG14 und TG15 wurden ein 2-, 60- und 16facher Einbau des Transgens ermittelt.

In einer genomischen PCR wurde die Integration des Konstruktes mit den Primern MBP-1 und pSVK3as bestätigt. Es wurden zwei Banden von 2,7kb (für den MBP-Teil) und 3,1kb (für den PLP-Teil) amplifiziert.

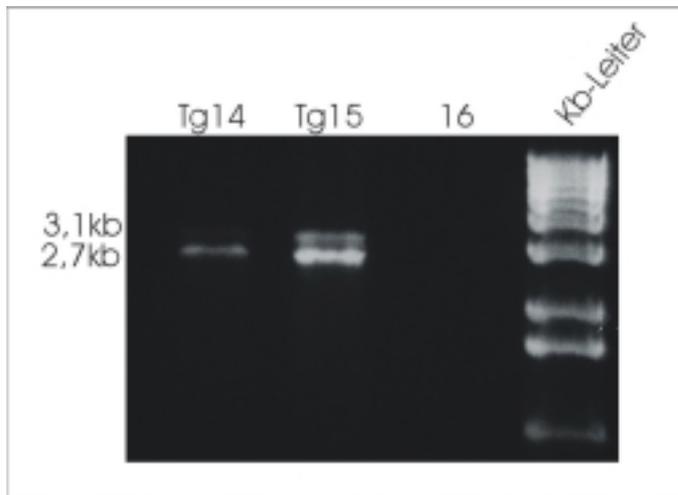


Abb. 64: Genomische PCR mit den Primern MBP-1 und pSVK3as:
Spur 1: Tg14, Spur 2: Tg15, Spur 3: Maus 16 als Negativkontrolle.

Der Phänotyp der transgenen Mäuse zeigte jedoch keinerlei Unterschiede zur MBP/PLP-defizienten Ausgangslinie. Die transgenen Linien wiesen dieselben neurologischen Symptome auf wie die Doppelmutante ($mbp^{-/-} plp^{-/-}$).

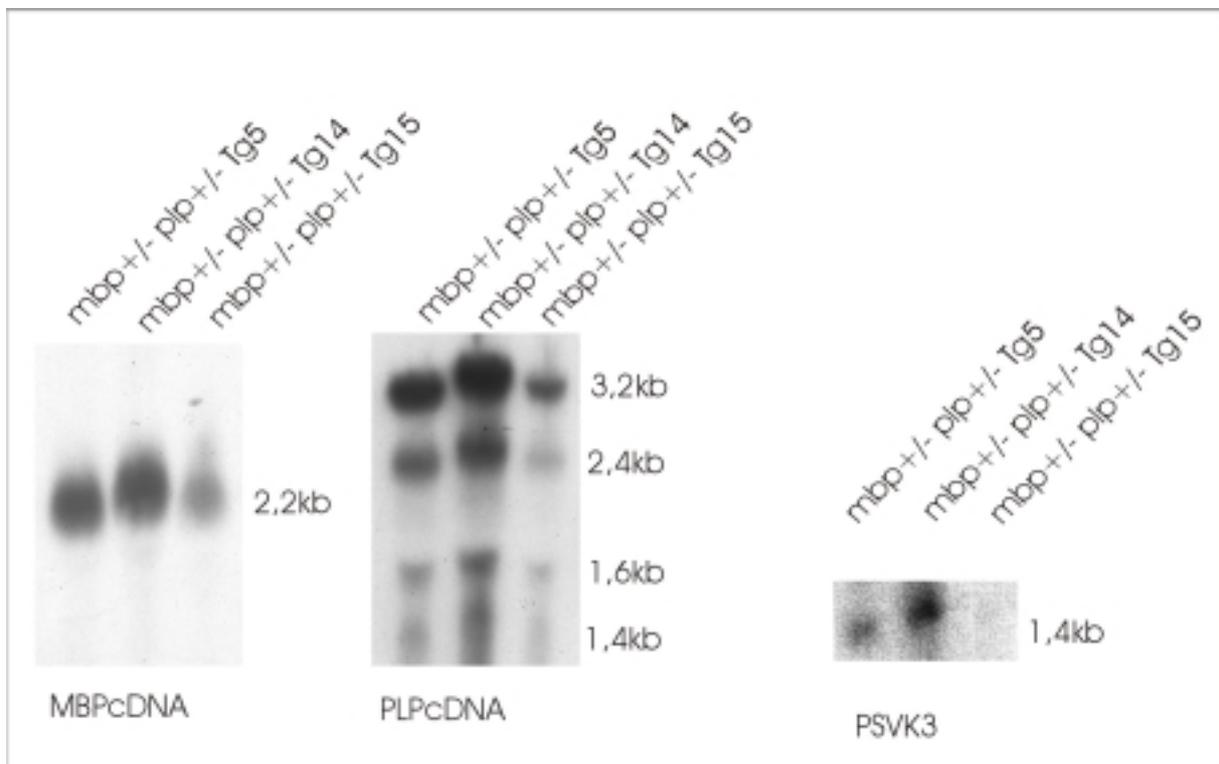


Abb. 65: Northern Blot-Hybridisierung mit verschiedenen Fragmenten:
Links: MBP, Mitte: PLP, rechts: vektorspezifisches Fragment.

Durch *Northern Blot*- und RT-PCR-Analyse wurden die transgenen Tiere weiter charakterisiert. Dabei wurden die transgenen Linien zum Vergleich der exo- und endogenen Synthese der Transkripte in den heterozygoten *mbp+/- plp+/-* Hintergrund gekreuzt.

Die Hybridisierung des *Northern Blots* mit der MBPcDNA ergab außer dem endogenen 2,2kb-Transkript kein weiteres Signal; demnach wurde von dem Transgen aus kein MBP-Transkript gestartet. Mit der PLPcDNA konnten hingegen neben den endogenen Signalen (1,6kb, 2,4kb und 3,2kb) ein weiteres Signal bei 1,4kb detektiert werden. Dieses war jedoch signifikant kürzer als das erwartete 1,8kb-Transkript. Durch Rehybridisierung mit dem pSVK3-spezifischen Teil des Konstruktes konnte die Existenz des verkürzten exogenen Transkriptes verifiziert werden.

Die Expression des transgenen Transkriptes wurde in Hirn, Thymus, Leber, Niere, Herz, Lunge und Milz untersucht. In einer *Northern Blot*-Analyse wurde die gewebespezifische Hybridisierung des pSVK3-Fragmentes im Hirn festgestellt.

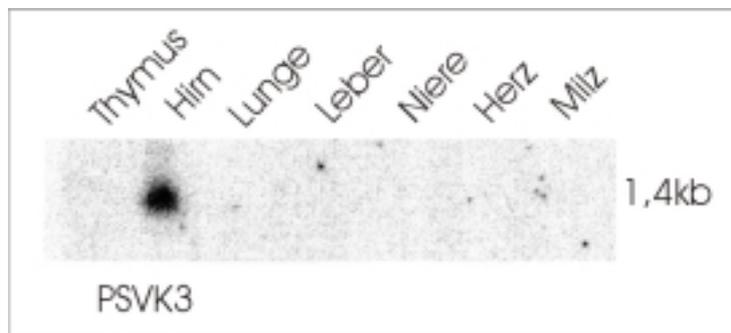


Abb. 66: Gewebespezifische Expression des PLP-Transkriptes im Hirn durch Hybridisierung mit vektorspezifischer Probe.

Durch RT-PCR-Analyse mit dem ExII_s(PLP)- und dem pSVK3_{as}-Primer wurde die Ursache der Verkürzung genauer charakterisiert (Abb. 67). Zum Vergleich wurde die PCR mit der genomischen DNA aufgetragen. Im Gegensatz zur Größe des genomischen Amplifikats (1,6kb) ist auch hier das Fragment aus der RT-Reaktion verkürzt (0,9kb).

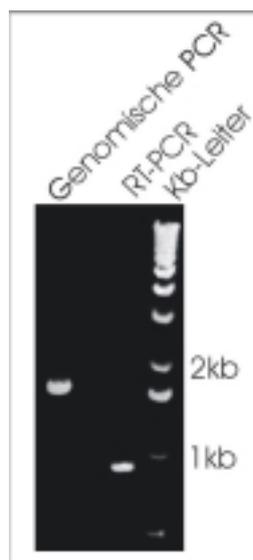


Abb. 67: Nachweis für die Verkürzung des Transkriptes durch Vergleich der RT-PCR und der genomischen PCR mit den Primern ExII_s und pSVK3:
Spur 1: genomischen PCR, Spur 2: Negativkontrolle, Spur 3: RT-PCR, Spur 4: kb-Leiter.

Das RT-PCR-Produkt wurde in den pCRII-Vektor inkliniert und sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab eine vollständige Deletion des PLPcDNA-Bereiches ab der DM20-Spleißstelle. Die *small t antigen* Spleißstelle des pSVK3-Vektors erkannte die kryptische DM20-Spleißstelle des PLP im Transgen und schnitt das Fragment bis zu seiner Akzeptorspleißstelle heraus (Abb. 68).

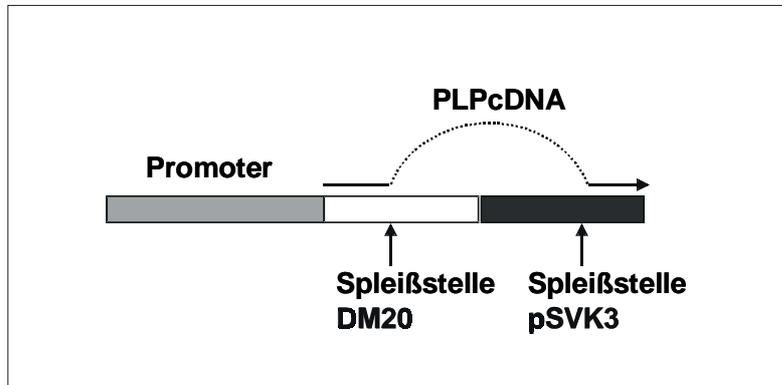


Abb. 68: Spleißdefekt als Ursache der Verkürzung des PLP-Transkriptes.

Zur Untersuchung der Translation des PLP-Transkriptes wurde Myelin von Mäusen präpariert, die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und in einer *Western Blot*-Analyse mit Anti-PLP-Antikörpern inkubiert. Da MBP-defiziente Mäuse die PLP-Synthese stark herunterregulieren, wurden Transgene im *mbp*^{+/-} *plp*^{-/-} Hintergrund analysiert. Als Positivkontrolle wurden Wildtypmäuse, als Negativkontrolle *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Mäuse verwendet.

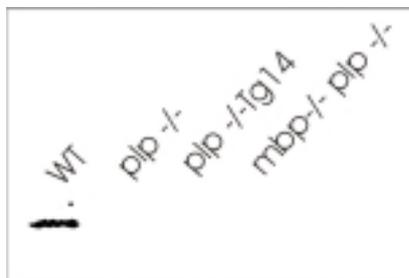


Abb. 69: *Western Blot*-Analyse mit Anti-PLP-Antikörpern:
Spur 1: Wildtyp, Spur 2: *plp*^{-/-}, Spur 3: *plp*^{-/-} TG14, Spur 4: Doppelmutante.

Auf Proteinebene konnte mit PLP-Antikörpern kein transgenes Produkt nachgewiesen werden. Das Transgen erzeugte keinerlei negative Veränderungen im heterozygoten *mbp*^{+/-} *plp*^{+/-} Hintergrund. Die schwache Expression des exogenen PLP-Transkriptes und das Fehlen eines Translationsproduktes deutet auf einen raschen Abbau des Transgens in den Mäusen hin.

2.3 Klonierung von Konstrukt 2

Da eine Koexpression von zwei Transkripten hintereinander auf einem Konstrukt nicht möglich war, wurde eine andere Strategie gewählt, bei der beide Gene in einer bicistronischen Transkriptionseinheit abgelesen wurden. Da Eukaryonten nicht befähigt sind, zwei Gene hintereinander zu translatieren, wurde eine *internal ribosome entry site* (IRES) zwischen den Genen plaziert, um auch das hintere Gen effizient zu translatieren [Morgan 1991, Dirks 1993,

Aran 1994]. Das MBP-Promoter-Fragment, das das Transgen gewebspezifisch exprimierte, wurde wiederum als Promoter gewählt. Zur Vermeidung von Artefakten wurden diesmal die kompletten cDNA's in das Konstrukt inkloniert. Ein 1,9kb-MBPcDNA-Fragment ohne Polyadenylierungssignal wurde in einer RT-PCR mit den Primern MBPs und MBPas hergestellt. In den MBPs-Primer wurde eine Kozak-Sequenz eingeführt [Kozak 1986], um eine maximale Translation zu erreichen und um das ATG 5bp vor dem eigentlichen Translationsstart zu mutieren. Als PLPcDNA wurde der komplette HURA-Klon [Budzinski 1987] benutzt. Dieser enthält die drei endogenen Polyadenylierungsstellen und wurde deshalb in die hinterste Position des Konstruktes kloniert. Das Intron des beta-Globins, das beim *rescue* der *shiverer* [Kimura1989] erfolgreich verwendet wurde, wurde direkt hinter den Promoter eingefügt. Da Spleißdonorstellen immer in 5'-Richtung des Akzeptors liegen, sollten auf diese Weise Spleißartefakte vermieden werden.

Die Funktion der IRES-Sequenz wurde zunächst *in vitro* in HEK-Zellen überprüft. Da der MBP-Promoter dort nicht aktiv ist, wurde der pRC-CMV-Vektor mit seinem CMV-Promoter als Grundlage benutzt. Das LacZ-Gen mit Kernlokalisationssequenz diente als Repotergen für die IRES-Sequenz. Es ermöglicht durch Blaufärbung des Zellkerns den Nachweis der Translation des LacZ-Gens. Nach Linearisierung mit NruI wurde das Konstrukt in HEK293-Zellen elektroporiert. Durch Neomycin-Resistenz des pRC-CMV-Vektors wurden positive Klone selektioniert. Diese Zellen zeigten eine fast 100%ige Anfärbung der Zellkerne.

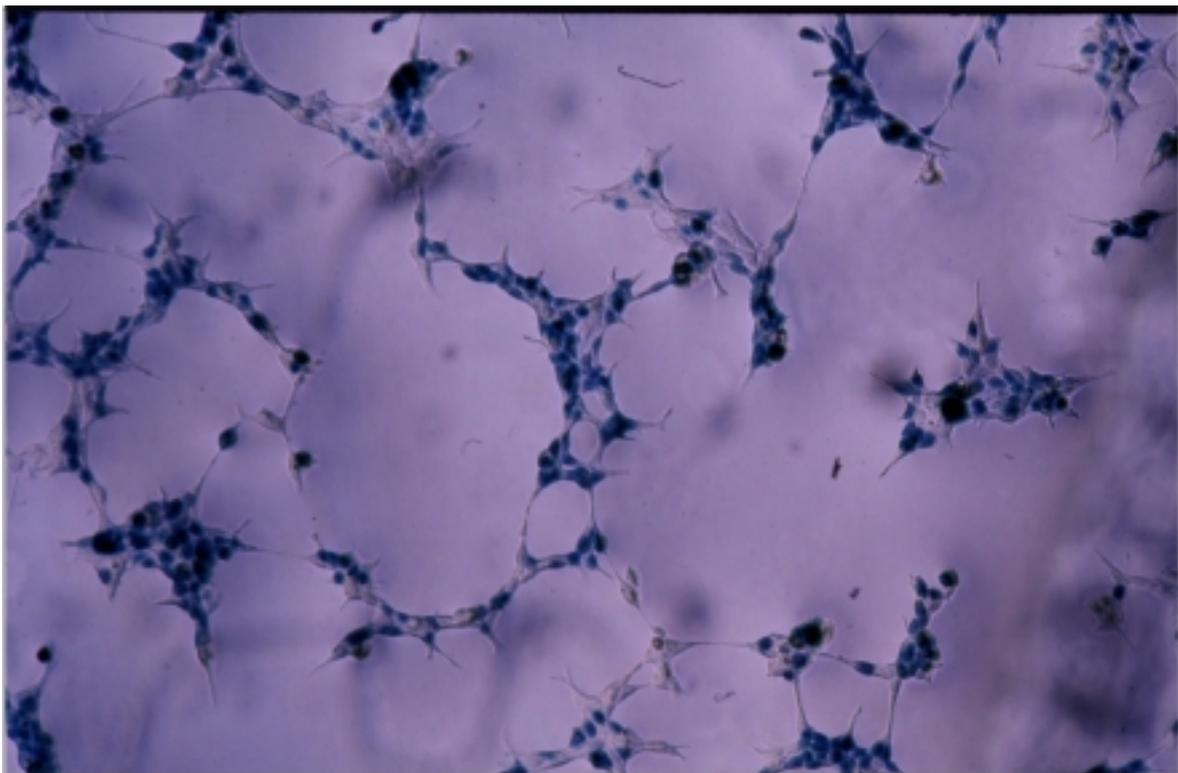


Abb. 70: LacZ-Färbung zur Funktionsüberprüfung der IRES-Sequenz in HEK293-Zellen:
Die HEK293-Zellen zeigten eine fast 100%ige Anfärbung der Zellkerne.

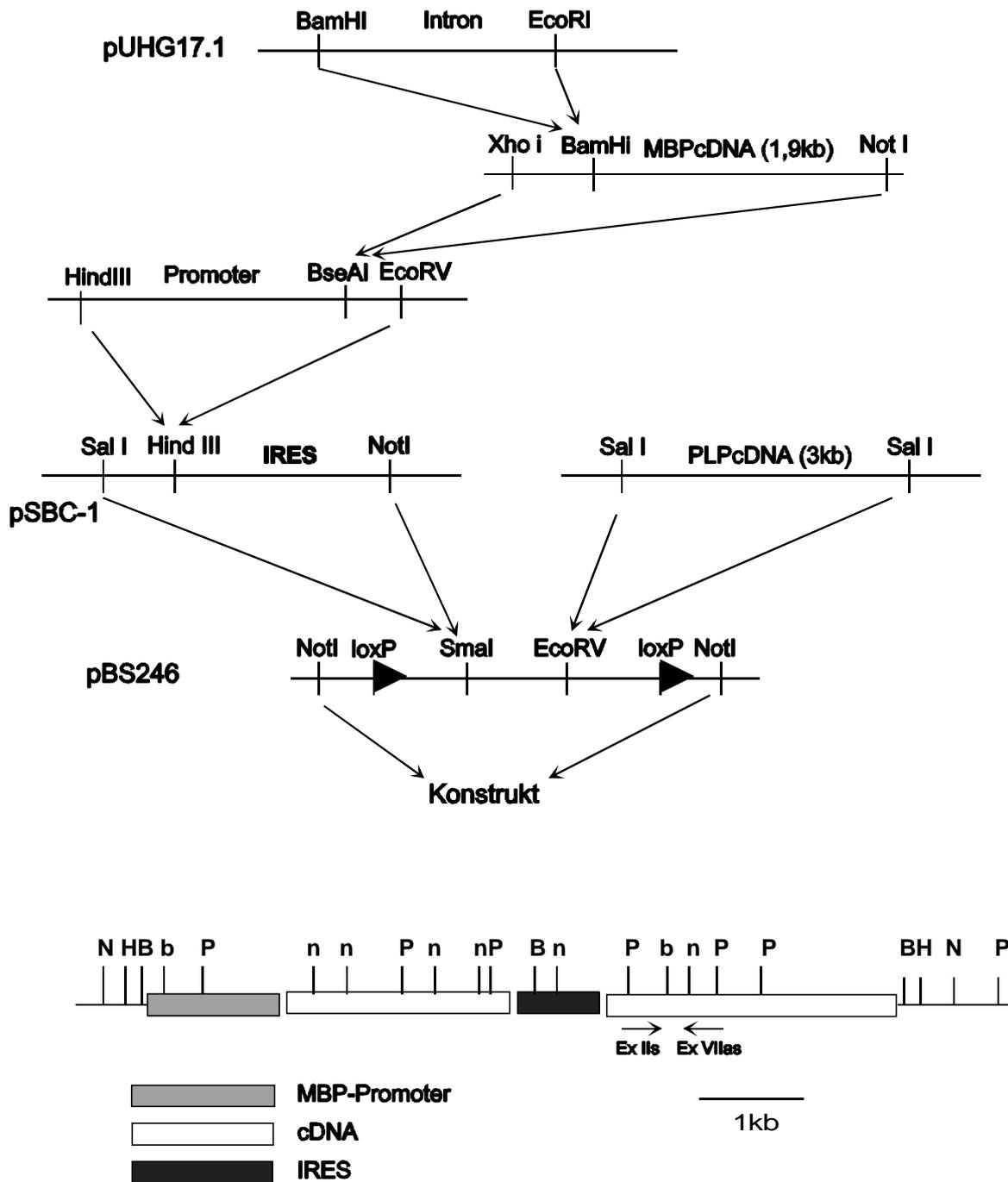


Abb. 71: Klonierungsstrategie des zweiten Konstruktes:
 N: NotI, H: HindIII, B: BamHI, b: BglII, P: PstI, n:NcoI.

Das SalI-Fragment (2,9kb) aus dem PLP-HURA-Klon wurde in die EcoRV-Schnittstelle des pBS246 kloniert. Das beta-Globin-Intron wurde mit BamHI/EcoRI aus dem pUHG17.1 geschnitten und in die BamHI-Schnittstelle des pCRII-Vektors+MBPcDNA eingefügt. Das XhoI/NotI-Fragment (Intron+MBPcDNA) wurde in die BseAI-Schnittstelle des MBP-Promoters kloniert. Promoter, Intron und MBPcDNA wurden mit HindIII/EcoRV ausgeschnitten und in den pSBC-1 vor die IRES-Sequenz eingefügt. Zur Komplettierung wurde das SalI/NotI-Fragment (Promoter+Intron+MBPcDNA+IRES) in die SmaI-Schnittstelle des pBS246+PLPcDNA eingefügt.

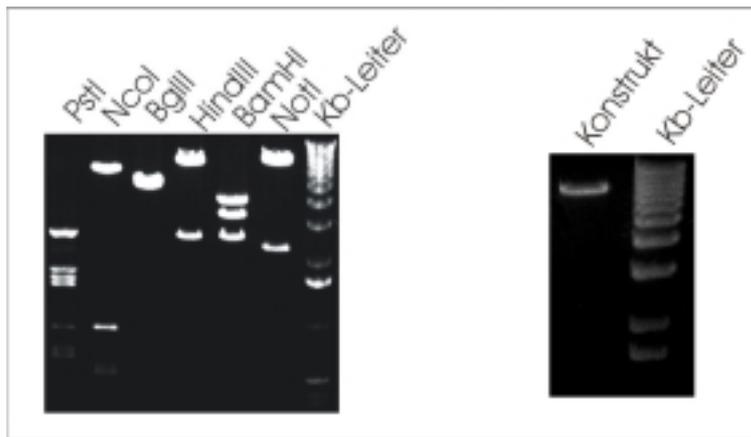


Abb. 72: Restriktionsverdau des zweiten Konstruktes.

Das Konstrukt wurde mit mehreren Restriktionsenzymen verifiziert:

PstI (P):	0,6kb; 0,7kb; 0,9kb; 1,5kb; 1,6kb; 1,8kb; 2,8kb
NcoI (n):	0,3kb; 0,4kb; 0,6kb; 0,7kb; 0,9kb; 0,9kb; 6,1kb
BglII (b):	4,9kb; 5,0kb
HindIII (H):	2,5kb; 7,4kb
BamHI (B):	2,5kb; 3,2kb; 4,2kb
NotI (N):	2,2kb; 7,7 kb

Das 7,7kb-NotI-Fragment (MBP-Promoter, beta-Globin-Intron, MBP-cDNA, IRES, PLPcDNA) wurde aus dem Vektor herausgeschnitten, gereinigt und in Injektionspuffer aufgenommen.

2.4 Analyse der transgenen Mäuse

Die Injektion erfolgte wie oben beschrieben, teilweise wurde auch in heterozygote *mbp +/- plp +/-* Eizellen injiziert. Es wurden 33 Nachkommen erhalten, von denen sich drei (TG1, TG 18 und TG19) als transgen erwiesen. In der *Southern Blot*-Analyse wurde nach BamHI-Verdau bei den Transgenen ein 4,2kb-Fragment mit der MBPcDNA-Probe detektiert (Abb. 74). Da die Mäuse 1-14 aus heterozygoten Mäusen stammten, hybridisierte die Sonde ebenfalls mit einem Wildtyp-Signal bei 4,4kb. Dieses war jedoch signifikant schwächer als das Transgen, da die MBPcDNA-Probe beim endogenen 4,4kb-Fragment nur mit dem 3. Exon hybridisierte. Da die cDNA-Probe für die 14kD-Isoform Exon II nicht enthielt, wurde keine Bande bei 7,5kb detektiert. Durch Vergleich mit den endogenen 15/20kb-Signalen wurde quantitativ eine einfache (TG1), zweifache (TG18) und sechsfache (TG19) Integration des Transgens nachgewiesen.

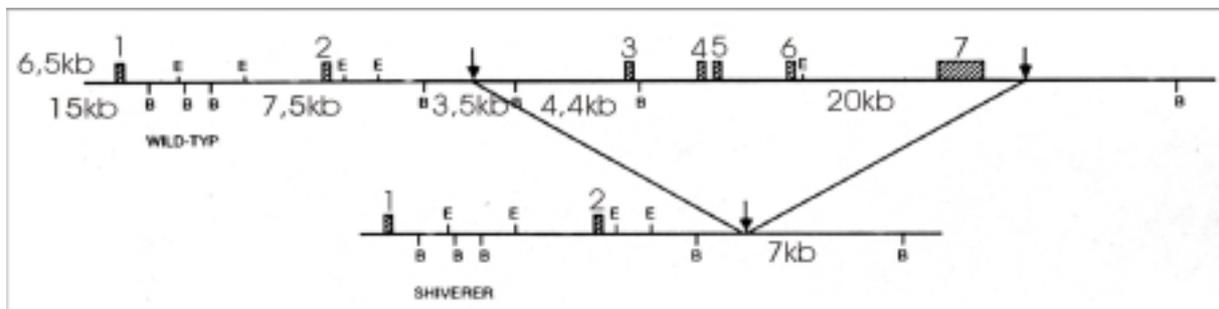


Abb. 73: Schema des MBP-Locus in der *shiverer*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp:

Exons III-VII sind in der *shiverer*-Maus deletiert.

Die Fragmentgrößen zwischen den Schnittstellen (E: EcoRI, B: BamHI) sind angegeben, Schnittstellen 5'wärts im Promoterbereich sind nicht angegeben.

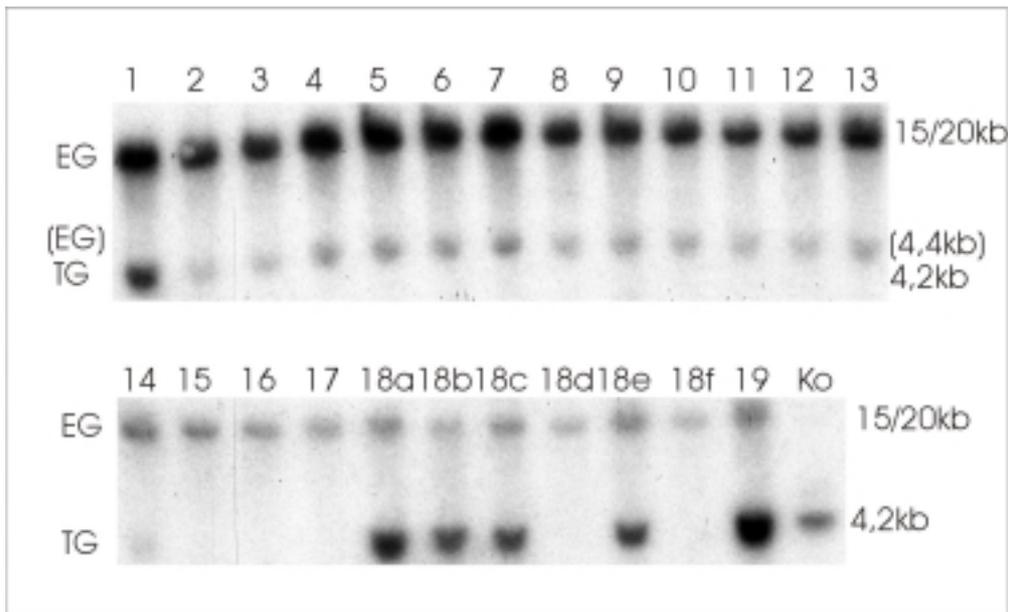


Abb. 74: *Southern Blot*-Hybridisierung nach BamHI-Verdau mit MBPcDNA:
 Mäuse 1-14 sind mbp+/-, 15-19 mbp-/-; Mäuse 1, 18, 19 sind transgen;
 18a-f sind Nachfahren aus der Kreuzung von TG18 mit der Doppelmutante.
 EG: endogenes Signal, TG: transgenes Signal, Ko: Positivkontrolle des mit BamHI verdauten
 Konstruktes.

Mit dem Primerpaar ExII/ExVIIa wurde auf PCR-Ebene die Insertion des Transgens nach heterologer Rekombination bestätigt.

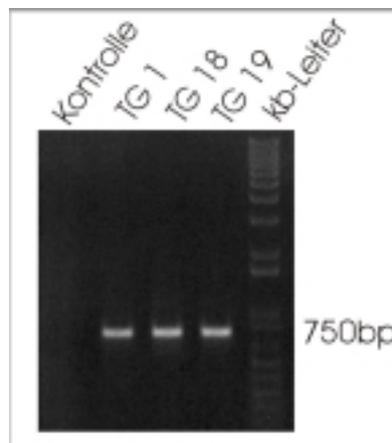


Abb. 75: Genomische PCR: Spur 1 Negativkontrolle, Spuren 2-4: Transgene.

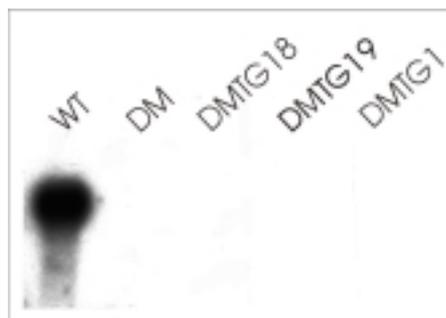


Abb. 76: *Northern Blot*-Hybridisierung mit MBPcDNA-Probe:
 Spur 1: Wildtyp, Spur 2: Doppelmutante, Spur 3-5: Transgene Doppelmutanten.

Der Phänotyp der Mäuse ließ wiederum keine Verbesserung der neurologischen Symptome erkennen. Aus Hirnen von 3 Wochen alten Mäusen wurde RNA präpariert und anhand von *Northern Blot*-Hybridisierung mit einer MBPCDNA-Probe untersucht. Es wurde jedoch auf RNA-Ebene kein Transgen-spezifisches Transkript in den drei Linien detektiert. Ebenso wurde in der *Western Blot*-Analyse kein Signal mit Anti-PLP- bzw. Anti-MBP-Antikörpern gefunden.

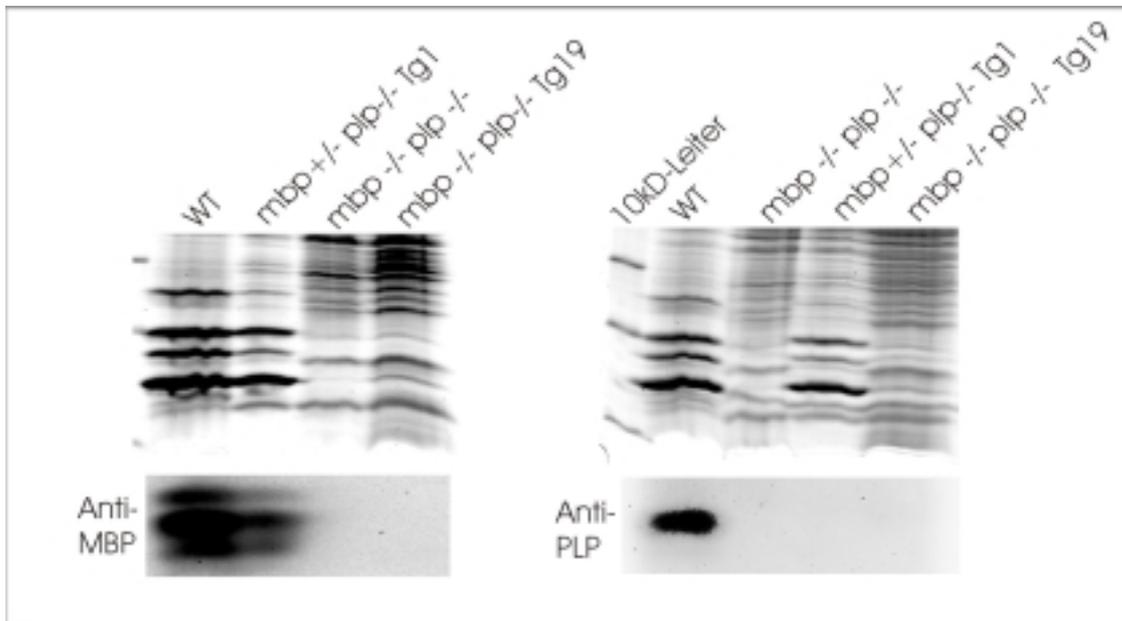


Abb. 77: *Western Blot*-Analyse des zweiten Konstruktes mit Anti-PLP bzw. Anti-MBP-Antikörpern: Vom Marker sind die 10kD, 20kD und 30kD-Banden sichtbar.

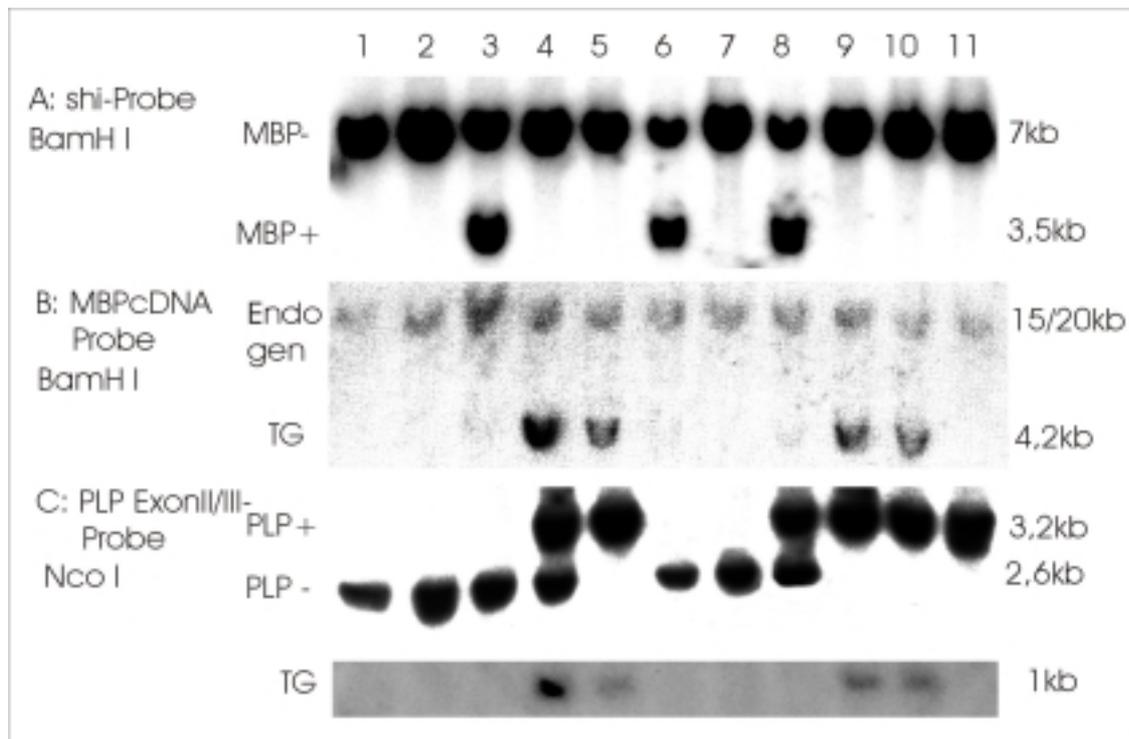


Abb. 78: *Southern Blot*-Hybridisierung zum Nachweis der heterozygoten Mäuse: Maus 4: mbp-/- plp+/- TG1+/-.

Um einen Einfluß des Transgens auf die Lethalität der *shiverer*-Mutation zu ermitteln, wurde dieses für die Linie TG1 exemplarisch in den *mbp*^{-/-} *plp*^{+/+} Hintergrund gekreuzt (Abb.78). Hier zeigten die *shiverer*-Mäuse, die das Transgen TG1 enthielten, keine längere Lebenserwartung. *mbp*^{-/-} *plp*^{+/-} TG1-Mäuse verstarben ebenfalls 6 Wochen später. Weitere Kreuzungen auch ohne Transgen ergaben, daß *mbp*^{-/-}*plp*^{+/-} Weibchen zwar eine längere Lebensspanne aufwiesen, jedoch ebenfalls nach 5-8 Monaten verstarben. Eine PLP-Kopie hat demnach im *shiverer*-Hintergrund schon eine dominant negative Bedeutung, die je nach Aktivierung des X-Chromosoms in den Weibchen zu einem lethalen Phänotyp führt.

IV. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genexpression der dysmyelinisierenden Doppel-, „knock out“-Mausmutante (mbp^{-/-} plp^{-/-}) mit der des C57/Bl6-Wildtyps verglichen. Mit der *Serial analysis of gene expression* (SAGE)-Methode wurde ein Genexpressions-Profil im Maximum der Myelinisierungsphase (P20) erstellt. Es wurden für beide Mauslinien etwa 30.000 *Tags* gesammelt, die für den 3'-Bereich eines bestimmten Gens codieren. Die 500 signifikantesten Änderungen in der *Tag*-Zahl wurden charakterisiert. Etwa 40 Gene wurden durch *Northern Blot*-Hybridisierung näher untersucht. Hierbei wurde eine späte Polyadenylierungsform der Na-K-ATPase alpha2 entdeckt, die in der Doppelmutante um ein Vielfaches hochreguliert war. Weiterhin wurde eine Reihe von Genen ermittelt, deren Überexpression zwischen 50% und 150% lag. Dazu gehörten Strukturgene (MAG, NCAM, SC1 und Cx 43), Transporter (Na-K-ATPase beta1), Gene von Enzymen des Glutamatmetabolismus (Glutamatdehydrogenase, Glutaminsynthetase), mit den Mikrotubuli assoziierte Gene (MAP-2 und Tau), am Vesikeltransport beteiligte Gene (SNAP-25, alpha-Synuclein, *Amyloid Precursor Protein*, CDC10), Signalmoleküle (S100A1, ZNF216 und RB3) und weitere Gene, wie z.B. hnRNP-A2/B1.

Zur weiteren Verifizierung des Genexpression-Profiles wurde die *Mikro-Array*-Technik eingesetzt. Hierzu wurden 40 cDNA-Fragmente für Gene, die durch die SAGE-Analyse auf eine differentielle Expression schließen ließen, durch RT-PCR generiert. Zusammen mit 160 schon in der Datenbank vorhandenen Genen wurden diese in der Wildtypmaus und der Doppelmutante zu drei verschiedenen postnatalen Zeitpunkten (P10, P20, P48) charakterisiert. Der zeitliche Verlauf der Genexpression ergab, daß eine Hochregulation der Gene analog zur *Northern Blot*-Analyse überwiegend schon am Tag P10 zu erkennen war. Zu diesem Zeitpunkt waren in der mbp^{-/-} plp^{-/-} Doppelmutante vor allem mitochondriale Gene der Atmungskette (ATPase 6, NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase 4 und Cytochrom C Oxidase 1) und im Glutamat-Signalling beteiligte Gene (Glutamattransporter GLT1, metabotrope und ionotrope Glutamatrezeptoren) überexprimiert. Über den gesamten Zeitraum hinweg waren das Apo E, die lange Form der Na-K-ATPase alpha2 sowie etwas schwächer das APP, QKI und S100B hochreguliert.

Zudem wurden einige Proteine des gereinigten Myelins mit der *Western Blot*-Analyse untersucht. Neben dem Fehlen des PLP lagen weitere Transmembranproteine, wie das *Myelin-associated Glycoprotein* (MAG) und das *Myelin-Oligodendrocyte Glycoprotein* (MOG) in deutlich geringerer Menge vor. MOG zeigte als einziges Protein auch in den Einzelmutanten eine deutliche Abstufung: wt > plp^{-/-} > dm20 >> mbp^{-/-} plp^{-/-} > mbp^{-/-}. Das CNP war in den Myelinfraktionen normal vorhanden; allerdings war das 46kD:48kD-Verhältnis in allen Mutanten ungewöhnlich hoch. Einen deutlichen Anstieg in den gereinigten Myelinfraktionen zeigten die Na-K-ATPase alpha2, das alpha-Synuclein und das extrazelluläre Matrixprotein SC1 sowie etwas schwächer das Connexin 43.

Immunhistochemische Analysen ergaben, daß analog zur *Western Blot*-Analyse neben PLP auch MAG und MOG in der mbp^{-/-} plp^{-/-} Doppelmutante kaum nachzuweisen waren.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde versucht, durch eine Gentherapie von Transgenen des *Myelin basic Protein* (MBP) und des Proteolipid Protein (PLP) den normalen myelinisierenden Phänotyp in der Doppel-, „knock out“-Mausmutante wiederherzustellen. Zu diesem Zweck wurden zwei Vektoren mit einem entsprechenden Transgen konstruiert und in Oozyten von Doppelmutanten injiziert. Für beide Konstrukte wurden drei transgene Linien generiert, bei denen das Transgen durch heterologen Einbau insertiert wurde. Die Genexpressionsanalyse des Transgens ergab, daß die aus Konstrukt 1 hervorgegangenen Linien einen Spleißartefakt des PLP-Transkriptes durch Benutzung der kryptischen DM20-Spleißstelle aufwiesen; im Falle von Konstrukt 2 wurde kein Transgen-spezifisches Transkript erhalten.

V. Diskussion

1. Genexpressions-Profil in der DM

Die Untersuchungsmethoden zur Genexpression im Vergleich

Mit der SAGE-Analyse wurde die unterschiedliche Genexpression der *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp zu einem Zeitpunkt charakterisiert, bei dem die Myelintranskripte MBP und PLP ihr Expressionsmaximum zeigen. Im Vergleich zu anderen Bestimmungen der Genexpression hat die SAGE-Methode einige Vor- und Nachteile. Zunächst erlaubt sie die Aussage, welche Gene in dem untersuchten Gewebe überhaupt exprimiert werden. Dann kann eine gleichzeitige quantitative Aussage über die Expression aller Gene gemacht werden. Dies ist bei anderen Methoden wie der *Mikro-Array*-, RT-PCR- und der *Northern Blot*-Technik nicht der Fall. Für eine Detektion von schwach exprimierten Genen ist jedoch die Gewinnung von mehreren 100.000 *Tags* erforderlich.

Da sich die *Tags* stets am 3'-Ende des Gens befinden, enthalten Gene bei unterschiedlicher Polyadenylierung mehrere *Tags*. Nur die SAGE-Technik läßt Aussagen über die unterschiedliche Polyadenylierung der Gene zu. Bei der *Mikro-Array*-Technik hingegen überlappen in Hybridisierungen mit cDNA-Fragmenten alle verschiedenen Isoformen, die das Fragment enthalten.

Über die Funktion der nichttranslatierten 3'-Enden der cDNA ist sehr wenig bekannt. Vorstellbar ist, daß Polyadenylierungen zellspezifisch sind und der nicht translatierte Bereich für eine Regulation oder den Transport der RNA wichtig ist. So könnten durch die SAGE-Technik neue Erkenntnisse über die Gen-Isoformen gewonnen werden. Andererseits läßt sich durch die SAGE-Technik bei gleicher Polyadenylierung keine Aussage über verschiedene Spleißformen machen, wie z.B. bei den Isoformen SNAP-25a und SNAP-25b. Hier ist es sinnvoller, mit Isoform-spezifischen Fragmenten *Northern Blot*-Analysen oder *Mikro-Arrays* durchzuführen oder entsprechende Primer für eine RT-PCR zu benutzen.

Ein weiterer Vorteil der SAGE-Methode ist, da sie eine Analyse aller Transkripte darstellt, neue Gene zu erfassen. So konnten in der beschriebenen Analyse etwa 60% der *Tags* bekannten Genen zugeordnet werden, etwa 30% entfielen auf *Expressed sequence tags* (Est's) und der Rest war unbekannter Herkunft. Obwohl für viele Gene der 3'-Bereich unbekannt und damit der Anteil unbekannter Gene wahrscheinlich geringer ist, lassen sich mit den unbekanntem *Tags* neue Gene finden, indem die *Tag*-Sequenz und der Oligo(dT)-Primer in einer RT-PCR eingesetzt mit anschließendem 5'-*RACE* des RT-PCR-Produktes oder über den zu den *Tags* gehörenden Est-Klon neue Gene identifizieren werden können.

Ein interessanter Aspekt der SAGE-Technik ist die Bestimmung der Ableserichtung der Gene im Genom. Da sich die *Tags* auf die einzelsträngige mRNA des Gens beziehen, kann festgestellt werden, welcher der beiden DNA-Stränge abgelesen wird. So konnten einige der *Tags* genau auf den Gegenstrang von untranslatierten 3'-Bereichen bereits charakterisierter Gene passend ermittelt werden. Hier sind zwei *Tags*, die sich in *antisense*-Richtung zum MBP und PLP befinden, in der *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante nicht vorhanden. Andere Beispiele für dieses Phänomen sind CNP, Na-K-ATPase beta1, alpha-Actin und das *latent transforming growth factor binding protein* (LTBP-3). Die *antisense*-Produkte sind allerdings für das PLP und MBP mit dem *Tag* und OligodT-Primern in einer RT-PCR-Reaktion schwer nachzuweisen. Die *Tags* passen auch zu den *sense*-Transkripten, da nach der RT-Reaktion das *template* doppelsträngig ist und die OligodT-Primer nicht spezifisch sind. Zudem ist die Anzahl der *antisense*-*Tags* gering; einzige Ausnahme ist das Actin. Hier finden sich auch in der Datenbank Einträge über beide Ableserichtungen des Gens. Ob es sich bei dem Phänomen um ein Artefakt handelt, ist fraglich. Es sind jedoch bereits Gene veröffentlicht worden, bei denen ein weiteres Transkript vom Gegenstrang gestartet wird [Dolnick 1997]. Interaktionen

der beiden Stränge sind im pre-RNA-Spleißen und in die Inhibition der mRNA-Translation involviert. Weiterhin kann doppelsträngige RNA verschiedene RNA-Adenosindeaminasen aktivieren, die Mutationen in die Sequenz einführen. Dieses RNA-*editing* wurde beim Glutamat-Rezeptor B beobachtet [Sommer 1991]. Interessanterweise sind *antisense*-Produkte meistens bei Genen mit mehreren Isoformen vorhanden. Eine Funktion dieser *antisense*-Produkte könnte in der Regulation der Synthese des *sense*-Produktes liegen. Beim bFGF (FGF2) wurde eine zeitlich und gewebespezifisch entgegengesetzte Expression der *sense*- und *antisense*-Transkripte beobachtet [Li 1996]. In manchen Fällen ist die Generierung eines Translationsproduktes vom Gegenstrang möglich, so z.B. bei der Na-K-ATPase beta1 und NM23-H7, einem Mitglied der Nukleosiddiphosphatkinasfamilie bzw. beim *Amyloid beta Precursor* und dem neuronalen Glykoprotein M6A. Hier befinden sich die Überlappungen im 3'-untranslatierten Bereich. Einen Einfluß auf die gegenseitige Translation ist weniger wahrscheinlich als eine Interaktion der Stränge beim Transport der mRNA.

Method	Vorteile	Nachteile
SAGE	<ul style="list-style-type: none"> - Kein Signalhintergrund, da keine Hybridisierungstechnik - Bestimmung der Ableserichtung des Stranges möglich - Gleichzeitige Untersuchung aller Gene - Entdeckung neuer Gene bzw. neuer Transkriptvarianten möglich 	<ul style="list-style-type: none"> - Viele Sequenzierungen erforderlich, daher hohe Kosten - Unterscheidung von Spleißvarianten mit gleicher Polyadenylierung nicht möglich - Langwieriges Verfahren
Mikro-Array	<ul style="list-style-type: none"> - Hoher Durchsatz an zu untersuchenden Genen - Schnelles Verfahren 	Dot-Blot-Methode, daher: <ul style="list-style-type: none"> - hoher Hintergrund bei unspezifischen cDNA-Fragmenten - gleichzeitige Hybridisierung aller Transkriptvarianten, die das cDNA-Fragment enthalten
Northern Blot	<ul style="list-style-type: none"> - Größenauftrennung der Transkripte - Unterscheidung von Spleißvarianten meistens möglich - Schnelles Verfahren 	<ul style="list-style-type: none"> - Niedriger Durchsatz an zu untersuchenden Genen
RT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> - Größenauftrennung der Transkripte - Hohe Empfindlichkeit - Unterscheidung von Spleißvarianten möglich - Schnelles Verfahren 	<ul style="list-style-type: none"> - Niedriger Durchsatz an zu untersuchenden Genen - Hohe Artefaktanfälligkeit

In der Tabelle sind Vor- und Nachteile der Hybridisierungsverfahren (*Mikro-Array*, *Northern Blot* und RT-PCR) und des statistischen Verfahrens (SAGE) aufgelistet. Der hohe Durchsatz und die schnelle Durchführung macht die *Mikro-Array*-Technik für diagnostische Genexpressionsuntersuchungen attraktiv. Allerdings zeigte die *Mikro-Array*-Technik eine starke Stauchung der aus der SAGE- und *Northern Blot*-Methode ermittelten differentiell exprimierten Gene. So war der Unterschied bei der langen Variante der Na-K-ATPase alpha2 im Gegensatz zu den anderen drei Verfahren schwach ausgeprägt. Dies ist nicht verwunderlich, da die *Mikro-Array*-Technik eine Inversion der klassischen Dot-Blot-Methode darstellt. Dort werden die Transkripte nicht nach Größe aufgetrennt und das spezifische Signal wird von der unspezifischen Bindung des cDNA-Fragments überlagert. Genauso wird bei der *Mikro-Array*-Technik das spezifische Signal durch die unspezifische Bindung der cDNA-Probe überschattet. So eignet sich die *Mikro-Array*-Technik nicht für eine Feinbestimmung der Genexpression, sondern für eine Analyse von deutlich differentiell exprimierten Gene. Durch die Kombination der SAGE- mit der *Mikro-Array*-Technik eröffnet sich die Möglichkeit, interessante Gene, die mit der SAGE-Technik ermittelt wurden, auf einem Chip als *Mikro-*

Array anzuordnen und mit diesem zu mehreren Zeitpunkten eine Expressionsanalyse durchzuführen. So läßt sich genau verfolgen, welche Gene zu welchem Zeitpunkt ihre Funktion ausüben. Die temporäre Expressionsanalyse einiger Gene läßt vermuten, daß eine Regulation der Genexpression vor allem zu Beginn der Myelinisierung deutlich ist und zum adulten Stadium hin abflacht.

Fehlerquellen der SAGE-Methode

Bei der SAGE-Analyse zeichnet sich eine Hauptfehlerquelle ab: im 3'-Bereich der cDNA treten gehäuft Mutationen auf, die zu einem mutierten *Tag* oder einem völlig anderen *Tag* führen können, wenn die Mutation das Palindrom CATG betrifft. Da die Mutationen schon im Genotyp einer bestimmten Mauslinie verankert sein können, muß bei der SAGE-Methode auf einen möglichst gleichen Hintergrund der zu vergleichenden Expressionszustände geachtet werden. In der Arbeit trat das unvermeidbare Problem auf, daß die Doppelmutante aufgrund des *shiverer*-Anteils nicht den sauberen C57Bl6-Hintergrund besaß. Zudem erfolgte die Generation der PLP-defizienten Maus auf dem Genotyp der E14-ES-Zelllinie. Einheitliche transfizierte Zelllinien, bei denen ein Fehler durch den Genotyp weitgehend vermieden werden kann, haben einen großen Vorteil für die SAGE-Methode. Ein Vergleich des Wildtyps mit homozygoten Maus-Mutanten ist am günstigsten, wenn sie aus einer Verpaarung von heterozygoten Mäusen entspringen. Auf diese Weise können die meisten genetischen Artefakte ausgeschlossen werden.

Eine andere Fehlerquelle birgt die Statistik in sich. Bei einer zufälligen Auswahl von Genen aus einem großen *Pool* gibt es nach der Gauß-Verteilung immer eine bestimmte Anzahl von Genen, die in der Auswahl über- oder unterrepräsentiert sind. So ist die Chance, daß ein Gen in einer zufälligen Auswahl x -mal vorhanden ist und diese Bestimmung richtig ist, umso größer, je höher der Wert x ist. Sie ist jedoch unabhängig von der Größe der zufälligen Auswahl. Große Unterschiede bei niedrigen *Tag*-Zahlen müssen demnach also nicht mehr bedeuten als mittlere Unterschiede bei hohen *Tag*-Zahlen. Ein 12:0 Unterschied hat jedoch bei 30.000 gesammelten *Tags* dieselbe Aussagekraft wie bei 300.000 *Tags*.

Einige Fehlerquellen bei der Durchführung der SAGE-Methode wurden vermieden. Die Reaktionen wurden analog durchgeführt, durch die Wahl der Elongase wurden PCR-Fehler bei der ersten Amplifikation vermieden. Zusätzlich wurden die Sequenzdaten kontrollgelesen. Vom Wildtyp und der *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante wurden jeweils etwa 30.000 *Tags* gesammelt und miteinander verglichen. Diese Zahl ist nicht besonders groß, wenn man bedenkt, daß wahrscheinlich 100.000 unterschiedliche Gene existieren. Für eine umfassende Analyse wäre eine 10-20fach größere Anzahl von *Tags* erforderlich gewesen. Erschwerend kam hinzu, daß die primären Defekte der Doppelmutante in einem Zelltyp, den Oligodendrozyten, vorhanden sind, der nur ein Drittel der Zellpopulation im Gehirn ausmacht. Eine Alternative wäre gewesen, die SAGE-Methode ausschließlich mit Oligodendrozyten durchzuführen. Hierdurch könnte ein Unterschied schneller detektiert werden. Allerdings wäre es aufwendiger, genügend Material (5µg mRNA) für eine Analyse zu präparieren. Eine Möglichkeit bestünde in der Isolierung der Oligodendrozyten aus Gesamtgehirnen über Ficoll-Gradienten [Fewster 1975]. Desweiteren könnte das Problem mit einer Kultivierung von Oligodendrozyten *in vitro* umgangen werden. Es hat sich jedoch gezeigt, daß Wechselwirkungen zwischen Oligodendrozyten und Neuronen für deren Reifung essentiell sind. Eine Analyse kultivierter, isolierter Oligodendrozyten, losgelöst von zu myelinisierenden Substraten, den Axonen, gäbe daher möglicherweise nur ein verzerrtes Bild der Regulation *in vivo* wieder und würde neuronale und extrazelluläre Reaktionen ausschließen.

Aus den oben genannten Gründen waren signifikante Unterschiede nicht zu erwarten. Vielmehr mußte auf eine Anzahl schwächerer Unterschiede (Faktor 2) von stark exprimierten und deutliche Unterschiede von schwach abgelesenen Genen (*Tag*-Zahl <10) zurückgegriffen werden. Hier jedoch ist die Gefahr von statistischen Fehlern enorm hoch. Unabhängig von

diesen Bedenken konnte jedoch eine Reihe von Genen identifiziert werden, die in der Doppelmutante hochreguliert waren. Diese sollen im folgenden näher betrachtet werden.

Verändertes Genexpressionsprofil in der *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante: Myelinprotein-Regulation

In der Doppelmutante wurden im Vergleich zum Wildtyp noch 3% MBP-*Tags* gefunden. Da im *shiverer*-Locus die Exons III-VII vollständig deletiert sind, dürfte theoretisch kein MBP-*Tag*, der im Exon VII lokalisiert ist, vorhanden sein. Es ist relativ unwahrscheinlich, daß der *Tag* noch einem weiteren Gen zuzuordnen ist. Eine andere Ursache wäre eine minimale Kontamination der Proben miteinander, die in dieser Größenordnung jedoch vernachlässigbar gering ist. Weiterhin ist nicht auszuschließen, daß bei der Deletion der Exons III-VII der hintere Teil des Exon VII in einen anderen Genlocus auf demselben Allel integriert wurde als Folge einer mißlungenen Genduplikation. Diese Genduplikationen sind in der Evolution weit verbreitet. Gerade im MBP-Locus existiert neben der *shiverer*-Linie eine weitere natürliche Mausmutante, die *shiverer*^{mld}-Maus, die hinter dem normalen MBP-Gen eine invertierte Anordnung eben dieser Exons III-VII trägt. Der 10%ige Anteil der PLP-Transkripte in der Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp stimmt mit vorherigen Beobachtungen überein, daß das mutierte PLP-Transkript in der PLP-defizienten Maus stark herunterreguliert, aber noch vorhanden ist [Boison 1995].

MBP-Transport

Ein Großteil des MBP wird erst in den Ausläufern des Oligodendrozyten translatiert [Colman 1982]. Für die mRNA wurde sowohl eine Transportsequenz für hnRNPA2/B1 als auch eine Lokalisationssequenz für das Myelinkompartiment nachgewiesen [Ainger 1997]. Es wird spekuliert, daß die MBP mRNA eine Transportfunktion für Translationskomponenten (Ribosomen) in Form von *Granules* entlang der Mikrotubuli zum Myelinkompartiment besitzt. Die Hochregulation des *Tags* für hnRNPA2/B1 unterstützt diese Theorie. Eine Beteiligung am MBPmRNA-Transport könnte ebenfalls QKI haben [Hardy 1998b], das in der *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante auf Transkriptebene erhöht ist. Das Protein liegt in drei alternativen Spleißformen vor, von denen das nukleare QKI-5 während der Embryogenese und die zytosolischen Formen QKI-6 und QKI-7 in der Myelinisierung exprimiert werden. Zwar ist das Protein in Oligodendrozyten, jedoch nicht im Myelin lokalisiert. Da QKI über eine KH-RNA-Bindungsdomäne, ursprünglich im heterologen, nuklearen Ribonukleoprotein K charakterisiert, und über die Fähigkeit zur Repression der Translation mittels TGE (*tra-2* und *GLI*)-regulatorischer Elemente verfügt [Saccomanno 1999], könnte es die Translation von MBP reprimieren, bevor das Myelinkompartiment erreicht wird. *Quaking*, eine natürliche Mausmutante mit einer Deletion im Promoterbereich des QKI, weist wie die *shiverer*-Mutante eine schwere Hypomyelinisierung mit zytoplasmatischen Einschlüssen in der *major dense line* auf. Auch bei der *quaking*-Mausmutante gibt es einen generellen Defekt bei der Integration von Proteinen wie MBP und MAG sowie den Lipiden in das Myelin [Hogan 1984]. Die Expression von L-MAG wird stark reduziert, während S-MAG auf Transkriptebene hochreguliert wird. In der *mbp*^{-/-} (*shiverer*)-Mutante wie auch in der *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante wurde ebenfalls eine Hochregulation des S-MAG gefunden [Ushkureit 2000]. Weiterhin wurde in der *quaking*-Mausmutante nicht nur bei MAG, sondern auch bei N-CAM ein abnormaler Spleißvorgang beobachtet [Bhat 1988]. Neben MAG wurde in der *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante eine Überexpression einzelner Transkriptformen von N-CAM und der Na-K-ATPase alpha2 beobachtet. Möglicherweise werden wie in der *quaking*-Mutante nur einige Spleiß- oder Polyadenylierungsvarianten der Gene reguliert.

Hochregulation der Na-K-ATPase in der Doppelmutante

Die deutlichsten Expressionsunterschiede ergaben sich bei einem 0:7-Tag. Ein dazu passender Est-Klon zeigte in der *Northern Blot*-Analyse eine 600%ige Erhöhung in der DM. Ein Homologievergleich von teils überlappenden Klonen demonstrierte, daß es sich hierbei um eine späte Polyadenylierung des Na-K-ATPase alpha2-Gens handelte. Die erhöhte Expression der Isoform wurde in der postnatalen Entwicklungsphase des Gehirns, in den Einzelmutanten und auch im Herzen nachgewiesen. Eine kürzere Isoform lag im Wildtyp und in der adulten Doppelmutante vor. Es stellt sich die Frage, ob die Regulation dieser Polyadenylierung einen zellspezifischen oder einen zufälligen Vorgang widerspiegelt. Zwar sind gewebespezifische Polyadenylierungen üblich; diese sind jedoch nicht einem bestimmten Zelltyp zugewiesen worden. Da in dieser Expressionsstudie Gesamthirn benutzt wurde, läßt sich die späte Polyadenylierung keinem spezifischen Zelltyp zuordnen. Dies wäre nur durch eine *in situ*-Hybridisierung möglich, in der ein Vergleich eines Fragmentes für die späte Polyadenylierung mit einem für beide Formen durchgeführt wird. Eine Regulation der alpha2-Isoform wurde auch durch *Western Blot*-Analyse der Myelinproteine gestützt. Eine Hybridisierung mit Anti-Na-K-ATPase-alpha2-Antikörpern ergab einen 3fachen Anstieg der Isoform in MBP-defizienten Linien. Im Gegensatz dazu war die alpha1-Untereinheit unverändert. Die alpha1-Isoform hat ein ubiquitäres Expressionsmuster, niedrigere Affinität zum Inhibitor *Ouabain* ($K_i = 10^{-4}$) und gilt im Zusammenhang mit der beta1-Form als *housekeeping*-Enzym [Blanco 1998]. Die alpha2-Isoform hingegen wird bevorzugt im Hirn [McGrail 1991], Herz [Zahler 1992], Muskel [Hundal 1992] und in Adipozyten [Lytton 1985] exprimiert. Im Hirn ist sie hauptsächlich in Gliazellen vorhanden [Watts 1991, Brines 1993]. Sie hat wie die alpha3-Untereinheit eine höhere Affinität zu *Ouabain* ($K_i = 10^{-7}$). Letztere ist hirnspezifisch und wird hauptsächlich in Neuronen gebildet [McGrail 1991]. Weiterhin wurde eine vierte Untereinheit in den Testes gefunden [Shamraj 1994].

Die Na-K-ATPase transportiert unter ATP-Hydrolyse 3 Na^+ -Ionen aus und 2 K^+ -Ionen in die Zelle. Sie sorgt damit für das osmotische Gleichgewicht in der Zelle, reguliert deren Membranpotential und ermöglicht die exzitatorischen Eigenschaften von Muskel- und Nervenzellen. Ferner wird die Energie des Na^+ -Gradienten in sekundären aktiven Transportsystemen für eine Translokation von Ionen, Glukose, Aminosäuren und Neurotransmittern genutzt [Glynn 1993, Skou 1992].

Es stellt sich die Frage nach dem funktionellen Sinn der Überexpression der alpha2-Untereinheit im Myelin von MBP-defizienten Linien. Ohne MBP ist das Myelin nur schwach ausgebildet und nicht kompaktiert. Die Na-K-ATPase könnte ein entscheidender Faktor beim Beginn der Myelinisierung sein. Die alpha2-Isoform wird *in vitro* nicht von isolierten Oligodendrozyten synthetisiert, jedoch zeigten Oligodendrozyten *in vivo* in der weißen Substanz eine starke immunhistochemische Färbung des Proteins [Fink 1996]. Schon früher konnte gezeigt werden, daß Astrozyten nur in Kontakt mit Neuronen die alpha2-Untereinheit exprimieren [Brines 1992]. In diesem Zusammenhang könnte das lange Transkript, das während der Myelinisierung in den MBP-defizienten Linien überexprimiert wird, ein wichtiges Signal für die Reifung der Oligodendrozyten sein. Fraglich ist, ob Oligodendrozyten und/oder Astrozyten die Isoform verstärkt exprimieren. Interessant ist die genaue Lokalisation des Proteins in der Zelle [Juhaszova 1997]. Im Gegensatz zur ubiquitären Expression der alpha1-Untereinheit zeigt die alpha2- wie die alpha3-Untereinheit ausschließlich eine retikuläre Färbung der Plasmamembran parallel zum Endoplasmatischen Retikulum. Da dort ebenfalls der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher lokalisiert ist, gibt es Spekulationen, ob zwischen der Plasmamembran und dem ER Mikrodomänen entstehen, in denen eine lokal erhöhte Ca^{2+} -Konzentration bestimmte Signaltransduktionsprozesse in Gang setzt. Im Falle der Oligodendrozyten könnte dies zum Beispiel für deren Differenzierung oder für die Vesikelbildung der Myelinkomponenten aus dem ER bzw. Golgi wichtig sein. In der frühen Phase der Myelinisierung wurde eine leichte Erhöhung der ER-ständigen Ca^{2+} -ATPase (SERCA2)

nachgewiesen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen in den MBP-defizienten Linien könnten weitere Aufschlüsse geben, wie die Na-K-ATPase alpha2 im Myelinisierungsprozess involviert ist.

Da die Na-K-ATPase aus zwei katalytischen alpha- und zwei regulativen beta-Untereinheiten besteht, ist fraglich, welche der drei beta-Untereinheiten an der Überexpression partizipiert. In der SAGE-Analyse sind alle drei Formen in der Doppelmutante erhöht, jedoch sind beta2 und beta3 schwach exprimiert. Die beta1-Untereinheit zeigte zwar auf *Northern Blot*-Ebene ebenfalls eine Überexpression, allerdings wurde sie im gereinigten Myelin nur im Vergleich zur PLP-defizienten Linie verstärkt angetroffen. Interessanterweise führt Insulin im Skelettmuskel zu einer Translokation der alpha2/beta1-Untereinheiten von intrazellulären Kompartimenten zur Plasmamembran [Hundal 1992]. Ein ähnlicher Vorgang könnte in Oligodendrozyten durch den *Insulin growth factor* (IGF-1) stimuliert werden. Weiterhin wäre eine Beteiligung der beta2-Isoform denkbar, die hauptsächlich in Gliazellen lokalisiert ist und Zelladhäsionsfähigkeit besitzt [Gloor 1990]. Beta2-defiziente Mäuse weisen motorische Störungen auf, zittern und sterben noch in der Myelinisierungsphase [Magyar 1994].

Veränderte neuronale Aktivität in der Doppelmutante

Im SAGE-Projekt wurden weiterhin einige Gene gefunden, deren Überexpression in der Doppelmutante auf eine verstärkte neuronale Aktivität hinweist. Zum einen ist das für die Exozytose von Neurotransmittern wichtige SNAP-25 [Hodel 1999], das in zwei Isoformen vorliegt, in der Doppelmutante erhöht. Ähnlich wie beim PLP/DM20 unterscheiden sich die Isoformen durch die Deletion einer mit Cysteinen versehenen Peptidomäne; die kürzere Variante wird ebenfalls vorwiegend in der Embryonalentwicklung exprimiert [Bark 1995]. Die SNAP-25-Deletion in einer Mausmutante ist lethal; die heterozygote Maus weist Defekte in der neuronalen Aktivität auf und zeigt als Phänotyp Hyperreaktivität [Hess 1996].

Überexprimiertes SNAP-25 könnte in der Doppelmutante zu einer verstärkten Glutamatausschüttung führen. Hierauf weist die Hochregulation von Proteinen, die für eine Glutamat-induzierte Signaltransduktion (metabotrope Glutamat-Rezeptoren MGR3 und MGR8, ionotroper Glutamat-(AMPA)-Rezeptor GLR4 und Glutamat-(Kainat)-Rezeptor GLK3), Ausschleusung des Glutamats aus dem synaptischen Spalt (Glutamattransporter GLT1) und dessen Deaktivierung in Astrozyten sorgen (Glutamatdehydrogenase, Glutaminsynthetase). Letztere Proteine werden auch von Oligodendrozyten gebildet. In diesem Zusammenhang könnte die Na-K-ATPase auch an der Glutamat-Aufnahme in Astrozyten und Oligodendrozyten beteiligt sein. Glutamat sorgt *in vitro* für eine Hochregulierung der alpha1- und alpha2-Untereinheiten der Na-K-ATPase in Astrozyten [Brines 1993].

Wie in der Einleitung erwähnt, ist die neuronale Aktivität und Neurotransmitterausschüttung für die Initiierung der Markscheidenbildung essentiell [Demerens 1996]. Da die temporäre Expressionsanalyse eine Hochregulation der im Glutamat-*Signaling* beteiligten Gene vor allem zu Beginn der Myelinisierung aufwies, könnte Glutamat ein - wenn nicht der - Faktor für die einsetzende Myelinisierung sein. Einerseits besteht die Möglichkeit, daß in Vesikel verpacktes Glutamat über Mikrotubuli nicht ausschließlich zur Synapse, sondern in geringem Maße auch zur Oberfläche des Axons transportiert wird, wo es zur Myelinbildung anregt. Eine synaptische Aktivität der Axone wurde während der Entwicklung der Neurone nachgewiesen [Matteoli 1992]. Eine zweite Möglichkeit besteht in der Beteiligung von Astrozyten, die bei Glutamatausschüttung ein entsprechendes Signal an die Oligodendrozyten weitergeben. Da die Vesikel entlang der Mikrotubuli transportiert werden, könnten Mikrotubulus-assoziierte Proteine und deren Phosphorylierungsgrad eine entscheidende Rolle bei der Verzweigung der mikrotubulären Strukturen spielen.

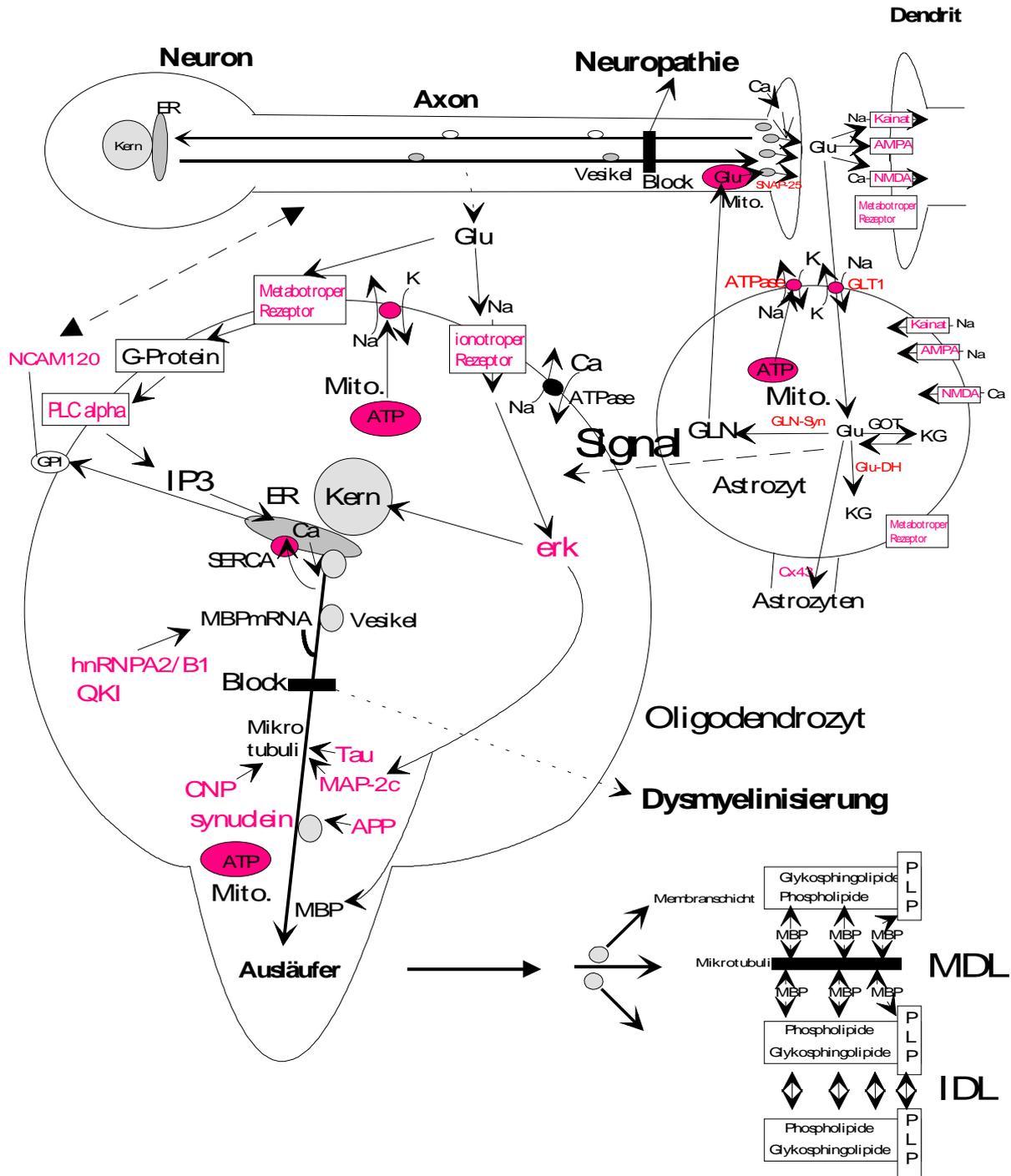


Abb. 79: mögliches Schema der Initiierung der Myelinisierung.

Mögliche Beteiligung von Proteinen an der Neurodegeneration der Doppelmutante
 Die Hochregulation der Gene für den neuronalen Vesikeltransport könnte auf den Versuch hindeuten, die Oligodendrozyten zur Myelinsynthese anzuregen. Diese bilden in der Doppelmutante bekanntermaßen aber kaum Myelin. Dieser Kreislauf könnte zwangsläufig zu hohen Glutamatkonzentrationen im synaptischen Spalt und somit zu excitotoxischen, neurologischen Schäden führen. Diesem wird durch eine verstärkte Astrozytenbildung bzw. -aktivität entgegengewirkt, die für eine Abnahme der toxischen Glutamatkonzentrationen sorgen. So war der Faktor für die Differenzierung zu Astrozyten, BMP2 am Tag P10 leicht erhöht. Weiterhin traten die Astrozytenmarker SC1 und Connexin 43 im gereinigten Myelin stark vermehrt auf. Beide Gene werden bei reaktiver Astrozytose hochreguliert [Ochalski

1995, McKinnon 1996]. SC1 ist ein extrazelluläres Matrix-Glykoprotein, das mit SPARC/BM-40, Testican, Qr1, Agrin und Follistatin eine Genfamilie bildet. Interessant ist das Umschalten des Expressionsmusters von SC1 auf das sich entwickelnde Nervensystem am Tag E12. Die genaue Funktion des Proteins konnte auch mit Hilfe einer SC1-defizienten Mauslinie noch nicht beschrieben werden [McKinnon 2000]. Das Connexin 43 gehört in die Klasse der *gap junction*-Proteine. Diese Membrankanäle verbinden das Zytosol von Zellen miteinander und ermöglichen einen Austausch von kleinen Molekülen und Ionen. Sie verbinden prä- und postsynaptische Membran über den synaptischen Spalt und bilden die Basis für die elektrische Synapse. Möglicherweise wird in der Doppelmutante der Glutamat- oder Ionenfluß angeregt. Da Connexin 43-defiziente Mäuse bei der Geburt aufgrund von Herzfehlern einen lethalen Phänotyp ausbilden, konnte der Einfluß des Proteins in die Myelinisierung nicht untersucht werden [Reaume 1995].

Connexin 43 ist interessanterweise in der Nähe von amyloiden Alzheimer-Plaques gefunden worden [Nagy 1996]. Die Hauptkomponenten der extrazellulären Plaques sind die Beta/A4-Peptide [Glenner 1984]. Ihr Vorläufer, das transmembranale *Amyloid beta Precursor Protein* (APP), ist primär in Axonen lokalisiert, kommt aber auch in Oligodendrozyten vor [Sapirstein 1992, 1994]. Seine Funktion ist nicht bekannt. Das APP ist in der Doppelmutante ebenso auf *Northern Blot*-Ebene erhöht wie das Tau-Protein, das sich in manchen Fällen in Form von intrazellulären neurofibrillären *Tangles* bei der Alzheimer- und der Parkinsonkrankheit ablagert. Tau ist ein primär axonal vorkommendes, Mikrotubulus-bindendes Protein. Zu dieser Klasse gehört auch das MAP-2, das vor allem in Dendriten lokalisiert ist. Tau-Isoformen und MAP-2c werden zudem auch von Oligodendrozyten synthetisiert [Müller 1997]. Beide Proteine weisen drei Mikrotubulus-Bindungsdomänen auf, die bei der Reifung der Oligodendrozyten ein Umschalten auf vier Bindungsdomänen erkennen lassen [Richter-Landsberg 1999]. Erhöhte MAP-2-Konzentrationen wurden in Patienten mit Multipler Sklerose, einer mit Demyelinisierung einhergehenden Krankheit beobachtet [Shafit-Zagardo 1999]. Bei der Parkinsonkrankheit hingegen ist alpha-Synuclein die Hauptkomponente von ebenfalls intrazellulären Ablagerungen, sogenannten *Lewy-bodies*. Dieses Protein ist sowohl auf Transkriptebene als auch im Myelin deutlich erhöht. Weiterhin zeigte die *Western Blot*-Analyse eine weitere höhermolekulare Bande in den Einzel- und Doppelmutanten. Alpha-Synuclein ist im neuronalen Zytosol verbreitet und vor allem im Zytoskelett der präsynaptischen Endigungen angesiedelt [Clayton 1999]. *In vitro* wurde eine Bindung des Proteins an Tau und eine Stimulierung der Tau-Phosphorylierung nachgewiesen [Jensen 1999]. Alpha-Synuclein wurde auch in glialen Einschlüssen bei Multipler System-Atrophie (MSA) beschrieben [Tu 1998, Gai 1999].

Weiterhin wurde mittels *Mikro-Array*-Analyse gezeigt, daß das Apolipoprotein E (Apo E) zu allen Zeitpunkten in der Doppelmutante überexprimiert ist. Das 36kD-Glykoprotein ist eine Komponente der zirkulierenden Plasmalipoproteine, wie z.B. VLDL, HDL und Chylomicron *Remnants*, und für die Entfernung von Cholesterinestern aus dem Kreislauf zuständig. Im ZNS wird es für den lokalen Transport von Cholesterin und Phospholipiden benötigt. ApoE weist einen drastischen Anstieg nach einer Verletzung des optischen Nervens im ZNS auf [Ignatius 1986]. Zellspezifische Untersuchungen ergaben, daß Oligodendrozyten für die erhöhte Expression verantwortlich sind [Stoll 1989]. ApoE-beinhaltende Lipoproteine sorgen für einen Abtransport von Cholesterin aus dem Myelin des verletzten Nervens [Goodrum 1991]. In den MBP-defizienten Mutanten ist die Lipidzusammensetzung der Myelinschicht verändert: Myelin-spezifische Ganglioside werden nicht gebildet, ebenso ist das Verhältnis von Glykosphingolipiden zu Phospholipiden stark reduziert [Uschkureit 2000]. Möglicherweise werden die im Myelin der Doppelmutante vorhandene Phospholipide und Cholesterin verstärkt durch Endozytose aufgenommen und wiederverwertet. Weiterhin ist das allelspezifische ApoE4 ein Risikofaktor für Alzheimer [Travis 1993]. Untersuchungen in transgenen APP^{V717F} apoE^{-/-} Einzel- und Doppelmutanten ergaben, daß ApoE an beta-Amyloid-

Ablagerungen und einer Degeneration von Neuriten beteiligt ist [Holtzman 2000]. Auch die Überexpression von S100B verstärkt die Bildung von beta-Amyloiden Plaques in APP^{V717F}-Mäusen [Sheng 2000]. Die erhöhte Expression von ApoE, APP und S100B vor allem in der adulten Doppelmutterante lassen die Proteine als Kandidaten für eine Beteiligung an der altersabhängigen Neurodegeneration erscheinen.

Wie gezeigt, sind MAP-2, Tau, APP, ApoE, S100B und alpha-Synuclein Proteine in neurodegenerativen Krankheiten mit sich teils überlagernden Symptomen beteiligt. Es stellt sich die Frage, ob diese Gene möglicherweise in ihrer Funktion aneinander gekoppelt sind oder durch gleiche Faktoren reguliert werden. Möglicherweise haben alle Proteine eine Funktion im mikrotubulären Transport von Vesikeln, die mit Neurotransmittern zur Synapse bzw. mit Myelinkomponenten gefüllt zu den Plasmamembranfortsätzen von Oligodendrozyten geleitet werden. Durch eine Fehlfunktion eines Gens könnte der Transport gestört sein. Intrazelluläre Plaques der Transportbestandteile, z.B. Tau und alpha-Synuclein wären also eher als Ursache eines fehlenden Transports zu interpretieren. Die Art der neurodegenerativen Krankheit könnte je nach Transportfunktion des Proteins und dessen Lokalisation in Neuronen oder Gliazellen differieren. Wird in Neuronen die Fortleitung des Aktionspotentials an die nächste Nervenzelle durch einen Defekt unterbrochen, werden funktionsunfähige Neuronen degenerieren. An diesem Prozess sind die Astrozyten und Mikroglia in der Nähe der degenerierenden Synapsen beteiligt [Price 1998]. Extrazelluläre Plaques können Überbleibsel von Synapse-assoziierten Transmembranproteinen, z.B. APP, sein, die von den Astrozyten und Mikroglia nicht abgebaut werden können. Ein Hinweis hierauf könnte die Kolokalisation von Connexin 43 mit den Amyloiden Plaques sein.

In Anlehnung an die oben genannten neurodegenerativen Erkrankungen stellt sich die Frage, ob in den MBP-defizienten *mbp*^{-/-} Einzel- und *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutanten ebenfalls Plaques gebildet werden. Die drastische Erhöhung des alpha-Synuclein in der gereinigten Myelinfraktion weist am ehesten auf *Lewy-body*-ähnliche intrazelluläre Plaques in MBP-defizienten Mutanten hin.

Mögliche Beteiligung der Myelinproteine an der Neurodegeneration

Es ist davon auszugehen, daß Axon und Myelin eng miteinander wechselwirken. Allerdings wurde noch kein Gen ermittelt, dessen Produkt bei diesem Prozess entscheidend beteiligt ist. Möglicherweise üben die Myelinkomponenten PLP und MBP selbst einen entscheidenden Einfluß auf die Neuronen aus. Da MBP- und PLP-Isoformen schwach auch in Neuronen gebildet werden, könnte deren Fehlen in Neuronen ebenfalls an dem neurologischen Erscheinungsbild beteiligt sein. Zumindest im Falle der PLP-defizienten Linie sind Anschwellungen des Axons beobachtet worden. Auch in der DM20-Mauslinie treten Degenerationen auf, obwohl das Myelin ultrastrukturell normal erscheint. PLP, das im Soma der Neuronen nachgewiesen wurde, könnte eine entscheidende Bedeutung für die Aufrechterhaltung des Myelins haben. Fraglich ist, ob das Protein selbst dafür sorgt oder den Prozess nur steuert. Möglicherweise werden in den Axonen Vesikel nicht nur zur Synapse, sondern mit bestimmten Signalmolekülen gefüllt auch zur Plasmamembran (Axolemma) transportiert. Es wäre interessant zu erfahren, welche neuronalen Gene nur in Gegenwart von Myelin verstärkt auftreten oder ob kurze Peptidfragmente von PLP oder MBP selbst von den Axonen ausgeschüttet werden. Aus Rinderhirn wurde ein N-terminales, amidiertes MBP-Peptid gereinigt [Takamatsu 1990]. MBP-Peptide konnten über den bFGF-Rezeptor und das Gangliosid GM1 die Schwannzellen *in vitro* zur Teilung anregen [Tzeng 1999], so daß eine ähnliche Funktion auch im ZNS vorstellbar ist. Auch für das PLP wurde ein Peptidfragment nachgewiesen, das sekretiert wird und die Zahl der Oligodendrozyten erhöht [Yamada 1999]. MOG ist die einzige Komponente, die in allen Mutanten-Linien deutliche Unterschiede im gereinigten Myelin besaß. In den MBP-defizienten Mäusen war MOG kaum vorhanden. Neben dem vermuteten Zusammenbruch des mikrotubulären Transports der Myelinkompo-

zenten könnte dies auch an der unvollständigen Myelinbildung liegen, denn das Protein ist in der äußersten Lamellenschicht lokalisiert. Interessant ist der geringe MOG-Anteil im Myelin von PLP-defizienten und vor allem von DM20-Mäusen. Dort ist das Protein reduziert, obwohl eine kompakte Myelinstruktur vorliegt. Da bei der PLP-defizienten [Griffiths 1998, Stecca 2000] und vor allem bei der DM20- Mausmutanten [Uschkureit 2000, Stecca 2000] Anzeichen von später Neurodegeneration gefunden wurde, könnte MOG eine wichtige Funktion für die Aufrechterhaltung der Myelinmembran haben. Allerdings haben Stecca et al. [2000] in immunhistochemischen Färbungen mit Anti-MOG-(Maus!)-Antikörpern keine Abnormalitäten feststellen können. Das Protein weist in EAE-Versuchen, einem Mausmodell zur Multiplen Sklerose, ein starkes antigenes Potential auf [Linnington 1987]. Eine Inkubierung von Oligodendrozyten mit Anti-MOG-Antikörpern führt *in vitro* zu einer Depolymerisierung der Mikrotubuli [Dyer 1994]. Der *turnover* der mikrotubulären Strukturen spielt eine wichtige Rolle bei der Myelinisierung. Eine exzessive Stabilisierung der Mikrotubuli durch Taxol führt zur Zurückbildung der Myelinschicht [Benjamins 1994]. Möglicherweise gewährleistet MOG in der äußeren Lamellenschicht, daß die Myelinkomponenten aus dem mikrotubulären Vesikeltransport kommend vom Mikrotubulusapparat abfallen und in die Myelinschicht integriert werden.

Veränderungen des Zytoskeletts und der Mikrotubuli in der Doppelmutante

Die MBP's sind zwar primär für die Kompaktierung der *major dense line* verantwortlich, zusätzlich sind in den MBP-defizienten Mauslinien zweifellos Defekte beim Transport der Membranproteine zu beobachten. Im Gegensatz zum CNP erreichen die integralen Membranproteine PLP, MAG und MOG sowie die myelinspezifischen Lipide nicht die Myelinmembran. So stellt sich die Frage nach einer Funktion des MBP's beim mikrotubulären Vesikeltransport dieser Membrankomponenten zu den Plasmamembranfortsätzen zur Myelinassemblierung. MBP und/oder PLP könnten selbst Funktionen im vesikulären Transport besitzen. Interessant in diesem Zusammenhang sind Beobachtungen, daß im Rind eine 18,5 kD-Isoform des MBP's, bei der nur Exon II herausgespleißt ist, bei der Reinigung von *Clathrin*-assoziierten Proteinen gefunden wurde [Prasad 1995]. In einer Stöchiometrie von drei MBP-Molekülen pro *Clathrin*-Molekül wurde dessen Polymerisation initiiert. Durch das *Heat shock Protein 70* (HSP 70) konnte der Effekt rückgängig gemacht werden. Möglicherweise spielt die 18,5 kD-Isoform des MBP's für die Bildung der *Clathrin-coated* Vesikel eine Rolle. Dieselbe Isoform wurde als Ca^{2+} -Calmodulin bindender Effektor gereinigt, der für eine temperaturunabhängige Stabilisierung der Mikrotubuli sorgt [Pirollet 1992].

Bei den Proteolipid Proteinen wurde eine Bindung des PLP, jedoch nicht des DM20, an Inositolhexakisphosphat (IP6) beschrieben [Yamaguchi 1996]. IP6-bindende Proteine wie *Clathrin assembly*-Proteine AP2, AP3 und Synaptotagmin II sind am vesikulären Transport beteiligt.

Analog zu den anderen neurodegenerativen Erkrankungen wäre der Defekt im Vesikeltransport zur Zelloberfläche die primäre Ursache der Erkrankung. Fraglich ist die Ursache des gestörten Transports. Unreife Oligodendrozyten sind morphologisch von kurzen Ausstülpungen geprägt, in denen mehr Mikrofilamente als Mikrotubuli vorkommen. Bei der Reifung der Zellen werden große Ausstülpungen gebildet, an deren Prozessen hauptsächlich Mikrotubuli teilhaben [Wilson 1989]. In Oligodendrozyten von *shiverer*-Mäusen wurden *in vitro* in Größe und Verteilung abnormale mikrotubuläre Strukturen festgestellt. Zudem zeigten CNP und Mikrofilamente in den Mutanten keine Colokalisation mit den Mikrotubuli wie im Wildtyp [Dyer 1995, 1997]. Eine Inkubierung von Wildtyp-Oligodendrozyten mit Anti-GalC-Antikörpern [Dyer 1993] führen *in vitro* analog zu Anti-MOG-Antikörpern zu einer Depolymerisierung der Mikrotubuli als Folge der Degradierung von MBP [Menon 1997] und einer Reorganisation der Actin-Filamente. Im Gegensatz dazu wurde nach Zugabe

von Anti-MOSP-Antikörpern ein MOSP/CNP *signaling pathway* beschrieben, der die Zahl und Größe mikrotubulärer Strukturen und Prozesse erhöht [Dyer 1994]. Interessanterweise führen beide *pathways* zu einer lateralen Umverteilung des ansonsten gleichmäßig in der Membran verteilten Cholesterins von MBP-Regionen zu Verästelungen des Zytoskeletts [Lintner 2000]. Letzterer Vorgang findet nicht in Oligodendrozyten von *shiverer*-Mutanten statt. Cholesterin oder assoziierte Proteine könnten eine Signalwirkung auf das Zytoskelett ausüben. Durch eine Inkubation mit Triton X-100 bei 4 °C - Bedingungen, in denen *lipid rafts* unlöslich sind – konnte die Subpopulation des Cholesterins, die mit dem Zytoskelett verbunden ist, nicht herausgelöst werden.

Die Oligodendrozyten der MBP-defizienten Linien scheinen in einem unreifen Stadium zu verbleiben, unfähig einige essentielle Myelinkomponenten zu transportieren. Möglicherweise versucht die Zelle, die für die mikrotubuläre Anordnung benötigten Komponenten wie MAP-2c, Tau und alpha-Synuclein hochzuregulieren. Auch frühe Myelinmarker wie MAG und CNP sind auf Transkriptebeine hochreguliert, weil diese für erste Schritte der Myelinisierung benötigt werden. Es ist nicht geklärt, wie der Transport der Myelinkomponenten von statten geht. Es wird postuliert, daß integrale und über Lipidanker integrierte Myelinproteine in Glykosphingolipid- und Cholesterin-reichen *rafts* zu den Membranfortsätzen transportiert werden [Verkade 1997, Ledesma 1998, Krämer 1999]. Da CNP im Myelin auftaucht, scheint es in der Zelle einen anderen Transportweg zu nehmen. Es wurde neben APP und Plasmalipin in *Clathrin-coated Pits* im Myelin angereichert [Sapirstein 1992, 1994]. Da eine sechsfache Überexpression von CNP zu dessen Einbau in der *major dense line* führt, wäre eine interessante Fragestellung, ob CNP im unkompaktierten Myelin der MBP-defizienten Mäusen lokalisiert ist.

Neben Mikrotubulus-assoziierten Proteinen zeigten auch Filament-bildende Proteine wie das alpha-Actin und das alpha-Tropomyosin in der Doppelmutante eine leicht erhöhte Expression. Weiterhin war das CDC10 erhöht, eine zur Familie der Septine gehörende GTPase des Zytoskeletts, die an der Zytokinese beteiligt ist [Hsu 1998]. Das Protein zeigte die deutlichste Erhöhung zu Beginn der Myelinisierung (P10). Da Septine in Membranausstülpungen lokalisiert sind, könnte CDC10 in den distalen Prozessen des Oligodendrozyten lokalisiert sein.

Ein ebenfalls mit den Mikrotubuli interagierendes Protein ist RB3, ein zur Familie der Stathmine gehörendes Phosphoprotein. RB3 zeigte die deutlichste Erhöhung in der adulten Doppelmutante. Das Protein kommt in mehreren Spleißvarianten vor (RB3, RB3' und RB3''), die Tubulin in einer phosphorylierungsabhängigen Weise binden und eine Depolymerisierung der Mikrotubuli in der Interphase bewirken [Gavet 1998]. Rb3 ist im Golgi-Apparat lokalisiert und wird durch neuronale Aktivität hochreguliert [Beilharz 1998]. Es wurde in Neuronen, aber auch in Gliazellen in der weißen Substanz gefunden [Ozon 1999]. Diese Daten sprechen für seine mögliche Beteiligung in den Myelinisierungsprozess.

Interessant sind weiterhin die S100-Proteine, die im Genom in *Clustern* vorliegen. Der SAGE-Analyse zur Folge sind vor allem S100A1 und S100B verändert. Für beide Gene liegen jeweils *Tags* für ein kurzes und ein langes Transkript vor, die in der Doppelmutante gegensätzlich reguliert wurden. Sowohl für S100A1 wie für S100B wurde eine Erhöhung in der Doppelmutante festgestellt. S100-Proteine sind Ca²⁺-bindende Proteine, die über die Bindung an Tubulin die Aggregation von Mikrotubuli inhibieren und die Dissoziation stimulieren [Donato 1988]. Weitere Funktionen sind die Regulierung der Proteinkinase C-abhängigen Phosphorylierung und die von im Energiemetabolismus beteiligten Enzymen [Zimmer 1995]. Obwohl S100A1 primär im Zytoplasma von Neuronen und S100B intra- und extrazellulär in Gliazellen vorkommen, können die Proteine neben Homo- auch Heterodimere bilden [Schäfer 1996]. Die beiden Proteine könnten in der Myelinisierung wichtige Calcium-abhängige Signaltransduktionsprozesse anregen oder für die Anordnung der Mikrotubuli in den distalen Prozessen des Oligodendrozyten eine entscheidende Rolle spielen.

Regulation der mitochondrialen Gene in der Doppelmutante

Interessanterweise sind die Anzahl der ribosomalen *Tags* in der Doppelmutante reduziert. Da in der Doppelmutante keine MBPmRNA gebildet wird, könnte dies ein Zeichen dafür sein, daß zwangsläufig keine Translationskomponenten zu den distalen Prozessen transportiert werden. Ferner könnte die Reduzierung der mitochondrial codierten ribosomalen Gene in einer Regulation der mitochondrialen Transkription begründet sein. Dort werden an verschiedenen Startpunkten zwei Transkripte gestartet, die dann weiter geschnitten, editiert und zum Teil polyadenyliert werden. Über die Regulation der mitochondrialen Transkription ist bisher wenig bekannt. Das erste Transkript, das die 12S-, 16S-RNA und zwei t-RNA's beinhaltet, wird wahrscheinlich herunterreguliert. Im Gegensatz dazu könnte der zweite Strang, aus dem die ATPase 6, einige NADH-Ubiquinon Oxidoreduktasen und Cytochrom C Oxidasen hervorgehen, wegen des gesteigerten Energiebedarfs hochreguliert werden. Ohne die Myelinschicht müssen die Zellen mehr Energie für die Weiterleitung der Aktionspotentiale durch kontinuierliche Repolarisation aufbringen. Die *Mikro-Array*-Analyse zeigte, daß zum Beginn der Myelinisierung (P10) die Cytochrom C Oxidase 1, die NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase 4 und die ATPase 6 deutlich erhöht waren. Somit wird deutlich, daß die Bereitstellung von Energie durch Mitochondrien auch schon zu Beginn der Myelinisierung ein essentieller Faktor ist. So nimmt die Expression des ATPase 6-Transkriptes umgekehrt zum Grad der Dysmyelinisierung von der *mbp*^{-/-} Mutante über die *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} Doppelmutante zur *plp*^{-/-} Mutante zu. Interessant ist das identische Expressionsmuster von alpha-Synuclein. Möglicherweise ist das Protein in der Myelinisierungsphase an die Mitochondrien gekoppelt.

2. *Rescue* der Doppelmutante

Der zweite Teil der Arbeit bestand in dem Versuch, durch einen *Rescue* mit den Transgenen von MBP und PLP den myelinisierenden Phänotyp in der Doppelmutante wiederherzustellen. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob eine äquimolare Stöchiometrie für eine intakte Myelinschicht erforderlich ist. Hierbei wurde MBP und PLP als Transgen injiziert und durch heterologe Rekombination in das Erbgut inseriert. Zwar wurden bei vorherigen Versuchen die beiden Proteine jeweils einzeln als Transgen benutzt, eine Koexpression von PLP und MBP als Transgen ist jedoch noch nicht gelungen. Zunächst wurde ein Konstrukt entworfen, bei dem beide Transkripte jeweils getrennt transkribiert werden. Diese Strategie wurde gewählt, da die Transkripte an völlig unterschiedlichen Lokalisationen in der Zelle translatiert werden [Colman 1982]. PLP ist ein integrales Membranprotein und wird im endoplasmatischen Retikulum translatiert, MBP hingegen wird erst an den Ausläufern des Oligodendrozyten synthetisiert. Um die angestrebte äquimolare Koexpression der Transkripte zu erreichen, wurden beide Gene unter dem MBP-Promoter exprimiert.

Mit diesem Konstrukt wurden drei transgene Linien erzeugt, die alle unabhängig von ihrer eingebauten Kopienzahl dasselbe Expressionsmuster aufwiesen: das PLP-Transkript war zwar vorhanden, aber durch ein Spleißartefakt verkürzt. Dieser äußerte sich dadurch, daß die *t-antigen splice site* vom pSVK3-Vektor die DM20-Spleißdonorsequenz erkannte und ein großen Teil des translatierten Bereichs entfernte. Die *t-antigen splice site* wurde in einem DM20-Konstrukt von einer anderen Arbeitsgruppe in Verbindung mit dem translatierten cDNA-Bereich benutzt und neben dem gewünschten Transkript ein um 450bp verkürztes Transkript erhalten, das nicht identifiziert wurde [Johnson 1995]. Möglicherweise ist auch hier ein Spleißartefakt entstanden. Bei Arbeiten mit dem kompletten cDNA-Bereich wurden solche Artefakte bisher nicht entdeckt. Vorstellbar ist, daß neben Intron III [Boison 1994, Vouyiouklis 2000] auch der untranslatierte PLP-Bereich eine wichtige regulatorische Funktion für den Spleißvorgang hat.

Ein MBP-Transkript fehlte völlig, obwohl dieselbe Promotersequenz wie im Falle des PLP benutzt wurde. Dieses Ergebnis könnte durch zwei Effekte hervorgerufen worden sein. Zum einen könnten essentielle regulatorische Sequenzen des untranslatierten cDNA-Bereich fehlen. Da allerdings ein PLP-Transkript existierte, ist es wahrscheinlicher, daß das MBP-Promoter-Fragment einen störenden Einfluß auf dasselbe Fragment weiter 3'wärts ausübt. Das würde auch die schwache Expression des PLP-Transkripts unabhängig von der unterschiedlichen Kopienzahl in allen drei Linien erklären.

Von der Alternative, die beiden Transgene unabhängig voneinander als eigenständiges Konstrukt zu injizieren, wurde kein Gebrauch gemacht, da die Chance sehr gering gewesen wäre, die Proteine gleich stark zu exprimieren. Daher wurde für ein zweites Konstrukt eine Variante gewählt, in der beide Gene in einer Transkriptionseinheit abgelesen werden. Die zwischengeschaltete IRES-Sequenz sollte eine effiziente Translation des zweiten Gens ermöglichen. Auf ein Anhängen eines Reportergens wie LacZ oder *Green fluorescent protein* wurde verzichtet, um Spleißartefakte eines 3'wärts befindlichen Introns zu vermeiden. Regulatorische Elemente wurden einbezogen, indem die kompletten cDNA-Bereiche vom PLP (2,9kb) und MBP (1,9kb) verwendet wurden. Für das MBP sind einige cis-Elemente bekannt, zum Beispiel befindet sich zwischen +25 und +45 eine für die Initiierung der Translation wichtige Sequenz [Tamura 1991]. Weiterhin sind im 3'-UTR eine RNA-Lokalisationssequenz für das Myelinkompartiment [Ainger 1993] und ein RNA-Transportsignal für RNPA2/B1 gefunden worden [Hoek 1998]. Obwohl alle diese Elemente im zweiten Konstrukt enthalten waren, konnte weder auf RNA-Ebene noch auf Proteinebene ein transgenspezifisches Signal nachgewiesen werden. Ein Grund dafür könnte in der zu komplexen Struktur der Transkriptionseinheit liegen, die im Kern als unnatürlich erkannt wird und rasch abgebaut wird. Die regulierenden cDNA-Bereiche könnten sich gegenseitig in der Funktion stören. Ein weiterer Grund ist die niedrige Integrationsrate (1, 2 und 6fach). Beim

Rescue der *shiverer* mit der 14kD-Isoform wies nur jede fünfte transgene Mauslinie eine Verbesserung der neurologischen Symptome auf. Diese hatten allesamt hohe Kopienzahlen (30-100) [Kimura1989]. Die hohe Kopienzahl ist allerdings kein Garant für eine hohe Expression. Entscheidend hierfür ist auch der Genlocus, in den das Transgen integriert wurde. Durch Mutagenese-Studien am PLP-Gen konnte eine Mausmutante generiert werden, die durch einen in *sense*-Orientierung in Intron III integrierten neo-Selektionsmarker charakterisiert ist [Uschkureit 2000]. Die Mäuse wiesen eine nur geringfügige Abnahme des PLP-Transkriptes auf, nicht vergleichbar mit dem fast völligen Ausbleiben des PLP-Transkriptes in der analogen PLP-defizienten Maus, die den neo-Selektionsmarker in *antisense*-Orientierung in Intron III trägt [Boison 1994]. Ursache der fehlenden Expression ist das Überlesen des Polyadenylierungsignals der vom *antisense*-Strang gestarteten *neo*-Kassette. Dies führt zu einem *antisense*-PLP-Transkript in der Mutante, das mit der PLPmRNA hybridisiert und zu einem Abbau der doppelsträngigen RNA führt. Ein solches *antisense*-PLP-Transkript würde jedoch auch die Expression des PLP-Transgens in den Tieren verhindern, die innerhalb dieses Projektes zum *Rescue* der Doppelmutante erzeugt wurden. Dieses wäre konform mit dem Nachweis eines transgenen PLP-Transkripts mit Konstrukt1, da dieses im *mbp+/- plp+/-* Hintergrund untersucht wurde, bei denen nur jedes zweite X-Chromosom die *neo*-Kassette trägt. Eine Kreuzung in den Hintergrund der *neo-sense*-Linie könnte darüber weiteren Aufschluß geben. Besser wäre sogar noch die ebenfalls vor kurzem hergestellte DM20-Linie, bei der der PLP-spezifische Bereich fehlt [Uschkureit 2000]. Hier würde das transgene PLP-Protein nicht mit dem endogenen PLP-Protein interferieren.

Bei der Kreuzung der Transgenen in den *shiverer*-Hintergrund wurden Weibchen generiert, die homozygot für die MBP-Deletion und heterozygot für PLP waren. Dieser Genotyp ist nicht uninteressant, da *shiverer*-Mäuse mit beiden PLP-Kopien nach 3-4 Monaten sterben. In Doppelmutanten, die weder MBP noch PLP besitzen, tritt keine frühzeitige Lethalität auf. *mbp-/- plp+/-* Weibchen zeigten überraschenderweise ebenfalls ein früheres Versterben nach 5-8 Monaten. Dieser breite Zeitraum ist möglicherweise durch eine zufällige Inaktivierung des PLP-tragenden X-Chromosoms bedingt. Nichts desto trotz scheint eine PLP-Kopie schon einen dominant negativen Einfluß in der *shiverer*-Mutante zu haben. Da im ersten Teil der Arbeit gezeigt wurde, daß plasmamembranständige Myelinproteine das Myelin nicht erreichen, ist vorstellbar, daß nicht zur Myelinmembran transportiertes PLP einen toxischen Effekt besitzt. Dieser könnte auf eine gestörte Vesikelbildung im ER oder Golgi durch eine Akkumulation des hydrophoben PLP's zurückzuführen sein. Möglicherweise trägt das MBP als Chaperon zur korrekten Faltung des PLP's bei. Zudem ist eine erschwerte Degradierbarkeit des akkumulierten PLP in den Lysosomen vorstellbar.

VI. Methoden

Alle molekularbiologischen Methoden, die hier nicht aufgeführt werden (Herstellung kompetenter Zellen, Transformation, Klonierung usw.) wurden nach Sambrook et al. [1989] oder Hogan et al. [1986] durchgeführt.

1. SAGE-Methode:

mRNA-Präparation

Aus jeweils drei 20 Tage alten, männlichen Wildtypmäusen (C57/Bl6, Durchschnittsgewicht 8,5g) bzw. mbp^{-/-} plp^{-/-} Doppelmutanten (Durchschnittsgewicht 8,0g) wurde Hirn-Gesamt-RNA präpariert, aus der mRNA mit dem Oligotex-dT mRNA Kit (Qiagen) gewonnen wurde.

cDNA-Synthese

5µg mRNA wurde mit einem cDNA-Synthese-Kit (Gibco-BRL) revers transkribiert, wobei gelgereinigte, biotinylierte Oligo-dT-Primer eingesetzt wurden. Nach der Synthese des zweiten Stranges wurde mit PC8 (Chloroform/Phenol 1:1, pH 8) extrahiert, mit Ethanol gefällt, zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20µl L₀TE-Puffer (3mM Tris, 0,2mM EDTA, pH 7,5) aufgenommen.

Restriktionsspaltung der biotinylierten cDNA mit dem *anchoring*-Enzym (AE)

Der Reaktionsansatz enthielt:

cDNA-Probe	10µl
L ₀ TE-Puffer	163µl
BSA (100x, NEB)	2µl
Puffer 4 (NEB)	20µl
Nla III (10U/µl, NEB)	5µl
Gesamtvolumen	200µl

Die Reaktionsmischung wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert, mit PC8 extrahiert, mit Ethanol gefällt, zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20µl L₀TE-Puffer aufgenommen.

Bindung der biotinylierten cDNA-Fragmente an magnetische *Beads*

100µl Dynabead M-280 Streptavidin (Dyna) wurden in jeweils zwei Reaktionsgefäße gegeben und mit 1x B+W-Puffer (5mM Tris, 0,5mM EDTA, 1M NaCl, pH 7,5) gewaschen. Mit einem Magnet wurden die *Beads* von der Waschlösung getrennt. Nacheinander wurden 100µl 2x B+W-Puffer, 90µl Wasser und 10µl cDNA-Verdau zugegeben und 15min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden *Beads* + cDNA-Fragment dreimal mit 200µl 1x B+W-Puffer und einmal mit 200µl L₀TE-Puffer gewaschen.

Ligation von Linkern an cDNA-Fragmente

Vor der Ligation wurden die Linker 1 bzw. 2 durch *Annealing* von Primern 1A und 1B bzw. Primern 2A und 2B generiert. Die Linker 1A und 2A wurden jeweils mit der T4-Polynukleotid-Kinase (Gibco-BRL) phosphoryliert.

Die cDNA-Fragmente wurden vom Puffer abgetrennt und mit folgenden Lösungen versetzt:

<i>Beads</i> + cDNA-Fragment	1.Reaktionsgefäß	2.Reaktionsgefäß
<i>Annealed</i> Linker 1	10µl	-
<i>Annealed</i> Linker 2	-	10µl
L ₀ TE-Puffer	20µl	20µl
5x Ligase Puffer	8µl	8µl

Der Ansatz wurde gemischt, zwei Minuten bei 50°C erwärmt, 15min bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann wurden 2µl T4-Ligase (5U/µl, Gibco-BRL) hinzugegeben und zwei

Stunden bei 16 °C inkubiert. Nach der Ligation wurden die *Beads* viermal mit 200µl 1x B+W-Puffer und zweimal mit 200µl 1x Puffer 4 (NEB) gewaschen.

Freisetzung der cDNA-Tags mit dem *tagging*-Enzym

Die *Beads* wurden in folgenden Lösungen eine Stunde bei 65 °C unter Mischen inkubiert:

L ₀ TE-Puffer	85µl
10 x Buffer 4 (NEB)	10µl
100 x BSA (NEB)	2µl
BsmFI (4U/µl, NEB)	1µl
Gesamtvolumen	100µl

Der Überstand wurde dann von den *Beads* abgetrennt, mit PC8 extrahiert, mit Ethanol gefällt, zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10µl L₀TE-Puffer resuspendiert.

Auffüllen der Enden

Probe 1 bzw. 2	10µl
10 x 2.Strang Puffer (Gibco BRL)	5µl
dNTP's (25mM)	1µl
L ₀ TE-Puffer	31µl
Klenow (1U/µl, Böhlinger)	3µl
Gesamtvolumen	50µl

Die Reaktionsmischung wurde 30min bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine PC8-Extraktion, eine Ethanol-Fällung und zweimaliges Waschen mit 70% Ethanol vorgenommen. Das Präzipitat wurde in 6µl L₀TE-Puffer aufgenommen.

Ligation der *Tags* zu *Ditags*

Die Proben 1 und 2 wurden über Nacht bei 16 °C ligiert:

Probe 1	2µl
Probe 2	2µl
5x Ligase Puffer (Gibco-BRL)	1,2µl
T4 Ligase (5U/µl, Gibco-BRL)	0,8µl
Gesamtvolumen	6µl

Zu der Mischung wurden 14µl L₀TE-Puffer gegeben. Als Negativkontrolle für die darauffolgende PCR diente derselbe Ansatz ohne Ligase.

PCR Amplifikation der *Ditags*

Mit den Primern 1 und 2 wurden die *Ditags* in einer Polymerase-Ketten-Reaktion in *Hot Start* 50 Reaktionsgefäßen (Molecular BioProducts) amplifiziert. Dazu wird zur Vermeidung von Primer-Amplifikationen die Polymerase zunächst durch eine Wachsschicht von den Primern getrennt. Als *Template* dienten 1µl einer 1:20-Verdünnung des Ligationsansatzes.

5x PCR Puffer	6µl
(300mM Tris, 90mM Ammoniumsulfat, 8mM Magnesiumsulfat, pH 9,1; Gibco-BRL)	
25mM dNTP's	3µl
Primer 1 (175ng/µl)	1µl
Primer 2 (175ng/µl)	1µl
Wasser (bidest.)	18µl
Ligationsprodukt (1:20)	1µl

Das Reaktionsgemisch wurde zwei Minuten bei 70 °C erwärmt und danach auf Eis abgekühlt.

Auf die Wachsschicht wurden gegeben:

5x PCR Puffer	4µl
Wasser (bidest.)	15µl
Elongase (2U/µl)	1µl
Gesamtvolumen	50µl

Die PCR-Reaktion wurde in einer PCR-Maschine (MJ Research) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

27 Zyklen	95 °C	0,5min
	55 °C	1min
	70 °C	0,5min
1 Zyklus	70 °C	5min

150 Reaktionen wurden pro Mauslinie durchgeführt. Die Negativkontrollen wurden ohne Ligase über 35 Zyklen amplifiziert.

Isolation der Dtags

Die PCR-Reaktionen wurden vereinigt, mit PC8 extrahiert, mit Ethanol gefällt, zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und in 216µl Puffer aufgenommen. Die Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und mit Hilfe von jeweils vier 12%igen Polyacrylamid-Gelen (19:1 Acrylamid/ Bisacrylamid in TAE-Puffer) aufgetrennt. Die Banden wurden mit *Sybr Gold* (MoBiTec, 1µl in 10ml TAE-Puffer) sichtbar gemacht. Die 102bp-Banden wurden ausgeschnitten, das Gel zerkleinert (3 Banden pro Reaktionsgefäß) und in 300µl Puffer pro Reaktionsgefäß 15min bei 65°C resuspendiert. Die Lösung wurde durch SpinX-Säulen von Gelresten befreit und die DNA ausgefällt, zweimal mit 75% Ethanol gewaschen und in 81µl L₀TE-Puffer gelöst.

Die Proben wurden wiederum mit dem *Anchoring*-Enzym eine Stunde bei 37 °C verdaut:

Probe	81µl
10x NEB Puffer 4	10µl
100x BSA	1µl
Nla III (10U/µl)	10µl
Gesamtvolumen	102µl

Nach PC8-Extraktion wurde die DNA 10min mit Ethanol bei -80 °C gefällt, einmal mit 75% Ethanol gewaschen und in 32µl L₀TE-Puffer gelöst.

Die Proben wurden wiederum durch ein 12%iges Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die 24-26bp-Banden wurden ausgeschnitten, zerkleinert, bei 37 °C eluiert und mit SpinX gereinigt. Die DNA wurde mit Ethanol bei -80 °C ausgefällt, zweimal mit 75% Ethanol gewaschen und in 8µl L₀TE-Puffer gelöst.

Selbst-Ligation der Dtags

Die *Dtags* wurden 30min bei 16 °C zu Concatemeren ligiert:

Probe	8µl
5x Ligase Puffer	1µl
T4 Ligase (5U/µl)	1µl
Gesamtvolumen	10µl

Die Ligationen wurden über ein 8%iges Polyacrylamid-Gel (37,7:1 Acrylamid/ Bisacrylamid in TAE-Puffer) aufgetrennt. Das Gel wurde mit *Sybr Gold* gefärbt; die Bereiche von 400-800bp und 800bp-4kb wurden ausgeschnitten und zerkleinert und die DNA mit L₀TE-Puffer eluiert, von den Gelresten befreit, mit Ethanol gefällt, viermal mit 70% Ethanol gewaschen und in 6µl L₀TE-Puffer gelöst.

Klonierung der Concatemeren

Die Concatemere wurden über Nacht bei 16 °C in den pZero-Vektor (Invitrogen) kloniert:

Concatemer	6µl
pZero (mit SphI linearisiert, 25ng/µl)	1µl
5x Ligase-Puffer	2µl
T4 Ligase (1U/µl)	1µl
Gesamtvolumen	10µl

2µl des Reaktionsgemisches wurde in ElectroMAX DH10B-Zellen (Gibco-BRL) nach Angaben des Herstellers elektroporiert. Die transfizierten Bakterien wurden auf Platten (10g Pepton, 5g Natriumchlorid, 5g Hefeextrakt pro Liter, 50µg/ml Zeocin) ausplattiert. Durch Zeocin wurden die positiven Klone selektioniert. Deren *Inserts* wurden mittels PCR amplifiziert.

PCR-Reaktion

10x PCR-Puffer	2,5µl
(166mM NH ₄ SO ₄ , 670mM Tris pH 8,8; 67mM MgCl ₂ , 100mM Mercaptoethanol)	
DMSO	1,5µl
dNTP (25mM)	1,5µl
M13F-Primer (10pmol/µl)	0,5µl
M13R-Primer (10pmol/µl)	0,5µl
Wasser	18µl
Taq-Polymerase	0,5µl
Gesamtvolumen	25µl

Der Reaktionsansatz wurde in 96er PCR-Lochplatten mit jeweils einem Klonplaque angeimpft. Die *Inserts* wurden mit folgendem Programm amplifiziert:

1 Zyklus	95 °C	2,0min
30 Zyklen	95 °C	0,5min
	56 °C	1,5min
	70 °C	1,5min
1 Zyklus	70 °C	5,0min

Die PCR-Reaktionen wurden mit 1 Vol. 4M Ammoniumacetat und 6 Vol. Ethanol in den PCR-Platten gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 25µl L₀TE-Puffer gelöst. Je 10µl wurden mit einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt. Klone mit größeren *Inserts* als 620bp wurden sequenziert.

Sequenzierungen

Sequenzreaktionen (*DNA-Sequencing KIT*, Applied Biosystems) und Sequenzierungen (*ABI-Prism 377 DNA-Sequencer*, Perkin Elmer) wurden vom ZMMK-ServiceLabor durchgeführt. Die Sequenzdaten wurden eigenhändig kontrollgelesen.

Zellkultur

Humane embryonale Nierenzellen (HEK293) wurden in DMEM-Medium (Sigma) mit 10% fötalem Kälberserum bei 37 °C, 5% CO₂ kultiviert und etwa alle 3 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen mit 5ml PBS gewaschen, mit 0,05% Trypsin/EDTA (0,2g/ml) in PBS abgelöst und auf neue Platten verteilt. Die Transfektion mit dem Konstrukt erfolgte durch Elektroporation mit dem *Gene Pulser* (Biorad). Die positiven Klone wurden mit G418-Medium (900µg/ml) selektioniert.

Die LacZ-Färbung wurde nach Lim [1989] durchgeführt. Die Zellen wurden 15min mit 1% Glutaraldehyd, 100mM Natriumphosphat, pH 7, 1mM Magnesiumchlorid fixiert. Die Färbung erfolgte 1h in einer Lösung von 10mM Natriumphosphat, pH 7, 150mM Natriumchlorid, 1mM Magnesiumchlorid, 3,3mM Kaliumhexacyanoferrat(II), 3,3mM Kaliumhexacyanoferr-

rat(III), 0,5% Triton X-100 und 0,2% X-Gal bei 37 °C. Die Färbelösung wurde durch 70% Glycerin ersetzt und die Blaufärbung der Zellkerne unter dem Phasenkontrastmikroskop identifiziert.

Mikroinjektion

Die Methode zur DNA-Mikroinjektion in den männlichen Vorkern von befruchteten Eizellen ist in der Literatur beschrieben [Hogan 1986]. Als Oozytenspender dienten superovulierte Weibchen der Doppelmutante *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-}, die 2 Tage vor der Verpaarung mit 10 U Gonadotropin (Sigma) und unmittelbar davor mit 10 U humanem Choriongonadotropin (Sigma) stimuliert wurden. Die befruchteten Eizellen wurden aus der Ampulle des Eileiters präpariert. Die Oozyten wurden in M16-Medium (Sigma) überführt und im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C und 5 % CO₂ aufbewahrt. Die zu injizierende DNA wurde gelelektrophoretisch gereinigt, ausgeschnitten, eluiert und mit Injektionspuffer (10mM Tris/HCl; 0,1mM EDTA, pH 7,5) auf 1ng/μl verdünnt. Vor der Injektion wurde die Probe zur Entfernung von Schwebeteilchen 15min zentrifugiert.

Die Injektion erfolgte in M2-Medium (Sigma) an einem Mikromanipulatorstand (Leitz Typ M) mit einem Mikroinjektor (Eppendorf Typ 5242, Kompressor Jun-Air Mod. 6). Die Injektionskapillaren (Clarke GC 120 TF-10) wurden mit dem Pipetten Puller (Kopf Modell 720) gezogen, Haltekapillaren (Clarke GC 100 F-10) wurden an der Mikroschmiede (Bachofer) bearbeitet. Die injizierten Eier wurden über Nacht im Brutschrank kultiviert. Die Zweizellstadien wurden unter dem Mikroskop (Wild/Heerburg) in das Infundibulum von CD1-Fosterweibchen, bei denen ein Plaque nach Verpaarung mit vasktomierten Männchen festgestellt wurde, reimplantiert. Das Vasktomieren von 6 Wochen alten Männchen erfolgte nach Hogan et al. [1986]. Transgene Nachkommen wurden durch *Southern Blot*-Analyse und PCR-Technik bestimmt.

Genomische DNA-Präparation

Schwanzbiopsien wurden modifiziert nach Laird et al. [1991] durchgeführt. Die Schwanzspitzen wurden über Nacht bei 55°C in 500μl Lysispuffer (50mM Tris/HCl, pH8; 100mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS) mit 25μl Proteinase K (10mg/ml) im Schüttler inkubiert. Die Lösung wurde 1h mit 5μl RNase (10mg/ml) behandelt und einer Phenol- bzw. Phenol/Chloroform-Extraktion unterworfen. Die DNA wurde aus dem Überstand mit dem gleichen Volumen Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und über Nacht bei 55°C in 100μl TE-Puffer gelöst.

***Southern/Northern Blot*-Analyse**

Mit Restriktionsenzymen verdaute genomische DNA wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Anleitung des Herstellers folgend auf eine PVDF-Membran (Qiabrane, Qiagen) transferiert. Im Falle von RNA wurden entsprechend denaturierende Agarosegele (6% Formaldehyd) und eine Nitrocellulosemembran (GeneScreenPlus, Du Pont) verwendet. Die RNA wurde zur besseren Bloteffizienz kleinerer Fragmente aus dem Gel mit 0,05N NaOH 20min teilhydrolysiert und mit 10x SSC neutralisiert. Die Blotmembranen wurden zwei Stunden im Ofen (80 °C) getrocknet und nach Herstellerangaben prä- bzw. hybridisiert. Das entsprechende cDNA-Fragment (siehe Anhang) wurde mit dem *Random Primed Labeling Kit* (Böhringer) radioaktiv ($\alpha^{32}\text{P}$ -dATP, Amersham) markiert. Die Probe wurde von den Nukleotiden über eine P30-Säule (Biorad) getrennt. Die Blot-Membranen wurden einmal 10min mit 2x SSC (RNA: 2x SSPE) bei Raumtemperatur und ein bis zweimal mit 2x SSC (RNA: 2x SSPE)/1% SDS bei 65 °C gewaschen. Die Signale wurden mit dem Phosphoimager (445 SI, Molecular Dynamics) gescannt und mit dessen Software (IMAGE Quant, Molecular Dynamics) ausgewertet.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen von DNA, RNA und Oligonukleotiden wurden spektralphotometrisch bei 260nm gemessen.

1 OD₂₆₀ = 50 µg/ml (doppelsträngige DNA) bzw. 40 µg/ml (RNA)

Oligonukleotide: Konzentration (µmol/ml) = OD₂₆₀ x Verdünnung x Basenzahl / 10.000

DNA-Fragmentisolaton

DNA-Fragmente wurden mit Qiaex (Qiagen) bzw. (Macherey-Nagel) nach Anweisung des Herstellers isoliert.

Plasmidpräparation

Präparationen von kleinen DNA-Mengen wurden nach Birnboim (1983) durchgeführt mit anschließender RNase-Behandlung und PEG-Fällung. Große Mengen wurden mit dem Maxi-Präparations-Kit (Qiagen) hergestellt.

RNA-Präparation

Gehirne wurden mit dem Ultra-Turrax nach der Methode von Chomczynski et al. [1987] aufgearbeitet. Die gewonnene RNA wurde zweimal gefällt und in frisch autoklaviertem, bidestilliertem Wasser gelöst.

Mikro-Array:

Für 40 Gene wurden 200-400bp große cDNA-Fragmente durch RT-PCR generiert. Die Genfragmente wurden zusammen mit weiteren 159 cDNA-Fragmenten aus der Datenbank der Firma MEMOREC GmbH unter Zuhilfenahme deren Technologie auf ein *Mikroslide*-CHIP aufgetragen und mit der fluoreszenzmarkierten cDNA des Wildtyps bzw. der mbp-/- plp -/- Doppelmutante hybridisiert.

RT-Reaktion

Die Reverse Transkription wurde in folgendem Reaktionsansatz eine Stunde bei 37°C durchgeführt:

RNA	4µl
5 x <i>First Strand</i> Puffer	2µl
DTT (1M)	1µl
Hexanukleotide	1µl
dNTP's (10mM)	1µl
RNase-Inhibitor (40U/µl)	0,5µl
<i>Super Script</i> (Gibco)	0,5µl
Gesamtvolumen	10µl

Die PCR-Reaktion erfolgte wie in der SAGE-Analyse angegeben, nur über 35 Zyklen.

Myelinpräparation

Maushirne wurden nach Norton et al. [1973] mit einem Potter (Elvehjem) in 16ml 0,32 M Sucrose homogenisiert und auf 32ml 0,85 M Sucrose geschichtet. Nach einer zweistündigen Dichtegradientenzentrifugation (Swing out-Rotor, Beckmann) bei 4°C und 10.000g wurde das Myelin aus der Interphase mit einer Pasteurpipette abgenommen und zweimal mit Wasser ausgefällt. Das Präzipitat wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Proteingele

Proteine aus Myelinpräparationen wurden mit 10-15%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen nach Lämmli [1970] elektrophoretisch aufgetrennt. Gele wurden mit 0,1% Commassie Brilliant Blue R-250 angefärbt.

Western Blot-Analyse

Proteine wurden mittels Nassblotverfahren (Sartorius) auf Nitrocellulose (Schleicher-Schüll) transferiert. Die Blots wurden über Nacht bei 4°C mit 3% BSA, 0,02% NP-40 in TBS geblockt und über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper in 1% BSA, 0,02% NP-40 in TBS inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit 0,1% NP-40 in TBS wurde die Membran eine Stunde bei RT mit dem zweiten Antikörper inkubiert, wiederum fünfmal mit 0,1% NP-40 in TBS gewaschen und 5min mit *Lumi-Light* (Boehringer Mannheim) inkubiert. Die Banden wurde mit einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Für den weiteren Gebrauch wurden die Blotmembranen 30min bei 70°C mit 62,5mM Tris, pH8/2% SDS/100mM Mercaptoethanol und dreimal 5min mit TBS gewaschen.

Immunhistochemische Färbungen

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden drei Monate alte Männchen über den linken Herzventrikel mit 4% Paraformaldehyd in PBS perfundiert. Das Gehirn wurde präpariert und über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyd in PBS inkubiert. Die Paraffinschnitte wurden von der Abteilung Neurochirurgie der Medizinischen Kliniken Köln durchgeführt. Vor dem Färben wurde das Paraffin zweimal 5min mit Xylol gewaschen. Die Hirnschnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe (100% Isopropanol, 96% Ethanol, 80% Ethanol, 60% Ethanol) rehydratisiert, einmal mit PBS gewaschen, 15min bei 37°C mit 1% Anti-Ziegen Serum geblockt, 1h mit dem 1. Antikörper (1:50) inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen, eine Stunde mit dem 2. Antikörper (Cy3-Anti-Rabbit-IgG 1:800, Jackson Laboratories) inkubiert und wiederum dreimal mit PBS gewaschen. Die Objektträger wurden mit Glyceringelatine (Merck) eingedeckelt.

Sequenzanalysen

Homologievergleiche wurden mit Hilfe des *BLAST*-Programmes am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) mit den Datenbanken (GenBank, EMBL, SwissProt) durchgeführt. Sonstige DNA- und Proteinanalysen wurden auf dem Unix-Rechner des Regionalen Rechenzentrums Köln unter Verwendung der *Wisconsin Package Version 10.0* getätigt.

Anhang

A. Primer

Primer für die SAGE-Methode:

Linker 1A (gelgereinigt)

5' TTT GGA TTT GCT GGT GCA GTA CAA CTA GGC TTA ATA GGG ACA TG 3'

Linker 1B (gelgereinigt)

5' TCC CTA TTA AGC CTA GTT GTA CTG CAC CAG CAA ATC C Aminomodifikation 3'

Linker 2A (gelgereinigt)

5' TTT CTG CTC GAA TTC AAG CTT CTA ACG ATG TAC GGG GAC ATG 3'

Linker 2B (gelgereinigt)

5' TCC CCG TAC ATC GTT AGA AGC TTG AAT TCG AGC AG Aminomodifikation 3'

Primer 1

5' GGA TTT GCT GGT GCA GTA CA 3'

Primer 2

5' CTG CTC GAA TTC AAG CTT CT 3'

Biotinylierter oligodT-Primer (gelgereinigt)

5' (Biotin)-T₁₈

M13F

5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3'

M13R

5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'

Primer für die Konstrukte:

MBPcDNA (1,9kb):

MBPs

5' ATA CCA TGG CAT CAC AGA AGA GAC CCT CAC 3'

MBPas

5' CAA TAT TCA AGA ATA GTA GGT GCT TCT GTC 3'

MBPcDNA (0,45kb):

5'-MBP

5' CAA GAA GAC CCC ACA GCA GCT TCC GGA GGC 3'

3'-MBP

5' CAG GAT TCG GGA AGG CTG AGC GGG GAG GGC 3'

MBP-Promoter:

MBP-1

5' AAG CTT TGA GAG AAA AGG GAC CAG ATC TTA 3'

MBPPromAs

5' ATC CAG GCC TCC GGA AGC TGC TGT GGG GTC 3'

pSVK3as

5' AAC CAT TAT AAG CTG CAA TAA ACA AGT TAA 3'

ExIIIs (PLP)

5' GCT TGT TAG AGT GTT GTG CTA GAT GTC TGG 3'

ExVIIIs (PLP)

5' TTG TAA GTG GCA GCA ATC ATG AAG GTG AGC 3'

Primer für die Mikro-Array-Analyse:

Genname	Orientierung	Primersequenz
ESTA3.1: evt. PROTEINPHOSPHATASE PP2	antisense	AGCAGAGTCCACCAATTCAG
ESTA3.1: evt. PROTEINPHOSPHATASE PP2	sense	GAGGACCAAGTGTGTCTTG
ESTA6.2: evt. HISTONE DEACETYLASE 3	sense	CTTGTTGGAATTGAAGCATCC
ESTA6.2: evt. HISTONE DEACETYLASE 3	antisense	TCACTTGTGGGGAGACCTTG
ESTAA217907:	sense	GAATGTTTGCGAACGAACGG
ESTAA217907:	antisense	GTTTAGTTGTACAACAGAGGC
ESTB2.1	sense	CAAGAAGGAGACGCAGCGCC
ESTB2.1	antisense	AGCCGCATGTTGGGGTTCTC
ESTB2.2:	sense	TTTGGGGTTCATTCCAAATAG
ESTB2.2:	antisense	AACCAGAGGTTTTTGTCTGAG
NA-K-ATPASE ALPHA2	sense	AAAGACAAGCATTAGGCCAG
NA-K-ATPASE ALPHA2	antisense	GTGCGGGAGGTAAACTTTTG
NA-K-ATPASE ALPHA2 (lang)	sense	TCCAAGACAGGGAAGAGTAG
NA-K-ATPASE ALPHA2 (lang)	antisense	TGAGAGTGGGTTGTAAGAGC
ESTC3.2:	sense	TTAGATAGCAGTACACTATAG
ESTC3.2:	antisense	CATTGAAGCAGCTCCTTTAC
ESTTGF: ANTISENSE VON LTBP-3	sense	CAGTGACAAGGGCGACCCC
ESTTGF: ANTISENSE VON LTBP-3,	antisense	GGCTCACATGGTTTGTACAA
SUII TRANSLATION INITIATION FACTOR	sense	TAATTCAGCTACAGGGTGAC
SUII TRANSLATION INITIATION FACTOR	antisense	CTAGTCCAAGTTAAAAGCGG
TEX261:	sense	TTACTTCACCAAAGGCAAGC
TEX261:	antisense	TCCTAGCATAGCAGGCTCTG
ADP-RIBOSYLARGININ HYDROLASE	sense	CCCATGATTGCCTACGATGC
ADP-RIBOSYLARGININ HYDROLASE	antisense	TCCAAGGGACTTGTTATCTC
CDC10	sense	AAACTGAAGGACTCTGAAGC
CDC10	antisense	ACAATTCAAGGCATCTTAATC
CNP	sense	GATGACCTGAAGAAGCTGAAG
CNP	antisense	GTCTTGGGTGTCACAAAGAG
ER-PROTEIN CORNICHON	sense	AAGGGATTCTATCCAGCAAG
ER-PROTEIN CORNICHON	antisense	GGTTATGGCTGTTCCCTAAG
AMYLOID BETA-BINDING PROTEIN ERAB	sense	TGTGGCTGTCAACTGTGCAG
AMYLOID BETA-BINDING PROTEIN ERAB	antisense	AGCAATGGGCAGTGTGCATGC
GALECTIN-1	antisense	CCATGTAGTTGATGGCCTCC
GALECTIN-1	sense	TCGCCAGCAACCTGAATCTC
HEAT SHOCK PROTEIN 84	sense	TCCTGATGAGATCCCCCCTC
HEAT SHOCK PROTEIN 84	antisense	CACCCAACCCTGCTATTCTG
KINESIN LIGHT CHAIN 1	sense	GTAGCTTTGCCAGATATGTAC
KINESIN LIGHT CHAIN 1	antisense	CAGATTAGTAGAGAAAAGCAG
M6A	sense	GTCTGCCAACTGGGCCTATG
M6A	antisense	AGACTGAATAGGAGCTTGTAG
MAL	sense	GCGTCTCTTGGGGTGTATG
MAL	antisense	CCGGAGACCTCTGTTGGGTG
MAP-2	sense	AGGCAGAATTTCCACTCCTG
MAP-2	antisense	ATGGAGGAAGGTCTTGGGAG
MBOCT	sense	CCCTCCTCAACTACCGCAAC
MBOCT	antisense	ACAGCCCCAGCAGGACCAG
MOBP	antisense	CAGCAGATCCAGTCTCCTC
MOBP	sense	GACAAGCGGAGACCAGAGTTC
MYELIN REGULATORY FACTOR 1	sense	TCCTTGAACAAGCAACTGG
MYELIN REGULATORY FACTOR 1	antisense	GAGGCCACAAATTAGGTTAC
MRJ	sense	AATCTCTGTATGCACTTTGC
MRJ	antisense	TGCACAAC TAGAAAACATCC
LAMININ REZEPTOR	sense	GAAGAGGACCTGGGAGAAGC
LAMININ REZEPTOR	antisense	ACTAGAAGCCGTGGCTCCC
MYELIN TRANSCRIPTION FACTOR 1	sense	AGCTACAGTAGCTACCAGGG
MYELIN TRANSCRIPTION FACTOR 1	antisense	CTGCTTACTTGACTCTTCAC
MYELIN TRANSCRIPTION FACTOR 1-like	sense	CATGCTTAAAAAGGATGCCTC

MYELIN TRANSCRIPTION FACTOR 1-like	antisense	CAGCTATAAACATTACATGGC
NEURONATIN	sense	TACTCCCTGCAGAAGCTGGC
NEURONATIN	antisense	GACTTGGTCCAGATCAGAATG
NM23-M7: NM23-H7	sense	GTTTTTTCCTTCAAGTGGAGG
NM23-M7: NM23-H7	antisense	ATTCAGGATCAGCAGGTCC
OSP	sense	AATGACTGGGTGGTGACCTG
OSP	antisense	AGCCAAAGCTCACGATGGTG
QKI	sense	TAATCACTGTGGAAGATGCTC
QKI	antisense	GAGGAGTTCGGTTTGGCATG
RB3: STATHMIN-LIKE PROTEIN RB3	sense	CAGTGAAGCCATCTATTG
RB3: STATHMIN-LIKE PROTEIN RB3	antisense	TTATCCCACCCGCTGCAGG
S100B	sense	CAGCAAAGGCTCATGGGCTC
S100B	antisense	ACAGGGGCATGGTGGTCAGC
SCN2A	sense	AGTGCAGCTCATTGCCATGG
SCN2A	antisense	GACACCTCCTCTTGTGTTGCG
G-PROTEIN-PATHWAY SUPPRESSOR	sense	GATGCTGGACGAGATGAAGG
G-PROTEIN-PATHWAY SUPPRESSOR	antisense	TGGTTGCGGAGCACAGCTG
SULFATED GLYCOPROTEIN-1	sense	CCCTTCCTTGCGACATATGC
SULFATED GLYCOPROTEIN-1	antisense	AGGTTGAGCGCAGAGCACAC
SNAP-25	sense	AAAGGTTGTACATAGTGGTC
SNAP-25	antisense	TTAGTGCAATGCCTGTTATG
TFAR15	sense	GAGATGTA CTCTCAGTGGC
TFAR15	antisense	TGCAGCATATCGCTTTCAAG
TPRD	sense	ACCAGCACTGAGCTTGCTGG
TPRD	antisense	TGCTTAAAGCACCTTTGTG
ZNF216	sense	GCTAGTGGTTCCAACAGTC
ZNF216	antisense	ACTGGGCTGAGAACTGATG

B. Besetzung der Mikro-Arrays:

1	EC7	101	PDGF B-CHAIN
2	GAPDH	102	FERHA FERRITIN HEAVY CHAIN MRNA
3	CYCLOPHILIN 1	103	NMYRIST N-MYRISTOYLTRANSFERASE 1
4	ACTIN, ALPHA	104	NUM3 NADH-UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE CHAIN 3 (EC 1.6.5.3)
5	ALPHA TUBULIN	105	NUM4 NADH-UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE CHAIN 4 (EC 1.6.5.3)
6	BETA TUBULIN	106	SOD-1 CU-ZN SUPEROXIDASE DISMUTASE
7	HPRT	107	CGT
8	UBIQUITIN	108	MBP MYELIN BASIC PROTEIN (MBP)
9	SALZ	109	MOG
10	HERINGSSPERMA DNA	110	EC20
11	INTERFERON GAMMA; IFNG	111	NCA1 NEURAL CELL ADHESION MOLECULE, 140 KD ISOFORM PRECURSOR (N-CAM 140)(NCAM-140) (CD56 ANTIGEN)
12	BAX	112	OMGP
13	BCLX	113	PLP PROTEOLIPID PROTEIN MRNA (PLP)
14	BRCA2	114	TGF2 TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 2 PRECURSOR
15	P21	115	TGF3 TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 3 PRECURSOR (TGF-BETA 3)
16	P27	116	SCG1 SCG10 PROTEIN
17	CYCLIN D3	117	SCLIP SCG10-LIKE-PROTEIN(SCLIP) MRNA
18	ERK1 (MAP-KINASE)	118	STHM STATHMIN (PHOSPHOPROTEIN P19)
19	ERK5/BMK1 (MAP-KINASE)	119	PLC MRNA FOR PHOSPHOLIPASE C
20	GAS3/PMP22	120	PACR PITUITARY ADENYLATE CYCLASE ACTIVATING POLYPEPTIDE TYPE I RECEPTOR PRECURSOR
21	CD114 / GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR RECEPTOR	121	NOS1 NITRIC-OXIDE SYNTHASE, BRAIN

22	CD115 / MACROPHAGE COLONY STIMULATING FACTOR I RECEPTOR	122	SNT-B1 BETA1-SYNTROPHIN
23	CD119 / INTERFERON GAMMA RECEPTOR	123	SP02 PRESYNAPTIC PROTEIN SAP102 (SYNAPSE-ASSOCIATED PROTEIN 102)
24	CD140A / ALPHA PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR RECEPTOR	124	SP90 PRESYNAPTIC DENSITY PROTEIN 95 (PSD-95)
25	CD140B / BETA PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR RECEPTOR	125	SP93 CHANNEL ASSOCIATED PROTEIN OF SYNAPSE-110 (CHAPSYN-110)
26	CD147 / BASIGIN	126	SP97 PRESYNAPTIC PROTEIN SAP97 (SYNAPSE-ASSOCIATED PROTEIN 97)
27	CD56/NCAM ALLE SPLICE FORMEN NCAM1,2,3	127	ZO1 TIGHT JUNCTION PROTEIN ZO-1 (TIGHT JUNCTION PROTEIN 1)
28	CD74 / HLA CLASS II HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, GAMMA CHAIN	128	SNTA1 ALPHA1-SYNTROPHIN
29	CD47	129	SNTB2 BETA2-SYNTROPHIN
30	5H1B 5-HYDROXYTRYPTAMINE 1B RECEPTOR (5-HT-1B)	130	TKA-1 TYROSINE KINASE ACTIVATOR PROTEIN 1 (TKA-1)
31	5H1D 5-HYDROXYTRYPTAMINE 1D RECEPTOR (5-HT-1D)	131	CALCIUM TRANSPORTING ATPASE SERCA2
32	5H1F 5-HYDROXYTRYPTAMINE 1F RECEPTOR (5-HT-1F)	132	TAU MICROTUBULE BINDING PROTEIN
33	5H2A 5-HYDROXYTRYPTAMINE 2A RECEPTOR (5-HT-2A)	133	ATPA ATP SYNTHASE ALPHA CHAIN, MITOCHONDRIAL PRECURSOR
34	5H2B 5-HYDROXYTRYPTAMINE 2B RECEPTOR (5-HT-2B)	134	ATPF ATP SYNTHASE B CHAIN, MITOCHONDRIAL PRECURSOR
35	5H5A/B 5-HYDROXYTRYPTAMINE 5A RECEPTOR (5-HT-5A)	135	HSP86 = HSP90 ALPHA
36	5H5B 5-HYDROXYTRYPTAMINE 5B RECEPTOR (5-HT-5B)	136	APLP1 APP-LIKE PROTEIN 1
37	5H7 5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X)	137	APOE APOLIPOPROTEIN E
38	ACM2 ACETYLCHOLINE VERTEBRATE TYPE 2	138	APP ALZHEIMER PRECURSOR PROTEIN A4
39	ACM3 ACETYLCHOLINE VERTEBRATE TYPE 3	139	PSL2 SECRETASE KANDIDATE 2
40	ACM5 ACETYLCHOLINE VERTEBRATE TYPE 5	140	PSL3 SECRETASE KANDIDAT 3
41	D2DR D(2) DOPAMINE RECEPTOR	141	PSN1 PRESENILIN 1
42	D3DR D(3) DOPAMINE RECEPTOR	142	PSN2 PRESENILIN 2
43	D4DR D(4) DOPAMINE RECEPTOR	143	SYU1 ALPHA-SYNUCLEIN
44	DADR D(1A) DOPAMINE RECEPTOR	144	SYU2 BETA-SYNUCLEIN
45	DBDR D(1B) DOPAMINE RECEPTOR	145	FYN TYROSINE KINASE C-FYN
46	ET1R ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A)	146	LTBP3, HSAF11407 ORF FROM O15107,
47	ETBR ENDOTHELIN B RECEPTOR PRECURSOR (ET-B)	147	NCAML1, HUMAN CELL ADHESION MOLECULE L1 (L1CAM)
48	GASR GASTRIN/CHOLECYSTOKININ TYPE B RECEPTOR (CCK-B RECEPTOR)	148	SPARC, SPARC PRECURSOR (SECRETED PROTEIN ACIDIC AND RICH IN CYSTEINE)
49	NTR2 NEUROTENSIN RECEPTOR TYPE 2 (NT-R-2)	149	TENASCIN-C, TENASCIN PRECURSOR (TN)
50	OPRD DELTA-TYPE OPIOID RECEPTOR (DOR-1)	150	TENASCIN-R, TENASCIN-R
51	OPRX NOCICEPTIN RECEPTOR (ORPHANIN FQ RECEPTOR)	151	TENASCIN-X, HUMAN TENASCIN-X (XA)
52	ATP6 ATPASE 6 (ATP SYNTHASE A CHAIN)	152	HEVIN = SC1
53	COX1 CYTOCHROME C OXIDASE SUBUNIT 1	153	BMP4 BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 4 PRECURSOR (BMP-4)
54	DCE1 GLUTAMATE	154	BAG-1 BCL2-BINDING PROTEIN

	DECARBOXYLASE, 67 KD ISOFORM		
55	DCE2 GLUTAMATE DECARBOXYLASE, 65 KD ISOFORM	155	NSM2 BRAIN-SPECIFIC NEUTRAL SPHINGOMYELINASE (CCA1)
56	CABV CALBINDIN (VITAMIN D- DEPENDENT CALCIUM-BINDING PROTEIN	156	PPAR alpha
57	CART CALRETININ (CR) (29 KD CALBINDIN)	157	PPAR gamma
58	CTR2 LOW-AFFINITY CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER-2 (CAT-2)	158	PPAR delta
59	CXA1 GAP JUNCTION ALPHA-1 PROTEIN (CONNEXIN 43)	159	ADP-RIBOSYLARGININHYDROLASE
60	CXB1 GAP JUNCTION BETA-1 PROTEIN (CONNEXIN 32	160	CDC10: SEPTIN CDC10
61	EAT1 (SLC1A3 OR EAAT1) EXCITATORY AMINO ACID TRANSPORTER 1 (GLAST1)	161	CNP: CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE
62	EAT2 (SLC1A2 OR EAAT2 OR GLT1) EXCITATORY AMINO ACID TRANSPORTER 2	162	ER-PROTEIN CORNICHON
63	EAT3 EXCITATORY AMINO ACID TRANSPORTER 3	163	AMYLOID BETA-BINDING PROTEIN ERAB
64	EAT4 EXCITATORY AMINO ACID TRANSPORTER 4	164	GALECTIN-1
65	GLK1 GLUTAMATE RECEPTOR, IONOTROPIC KAINATE 1 PRECURSOR	165	HSP84: HEAT SHOCK PROTEIN 84
66	GLK2 GLUTAMATE RECEPTOR, IONOTROPIC KAINATE 2 (GLUR-6)	166	KLC1: KINESIN LIGHT CHAIN 1
67	GLK3 GLUTAMATE RECEPTOR, IONOTROPIC KAINATE 3 PRECURSOR (GLUR-7)	167	M6A: M6A GLYCOPROTEIN
68	GLK_DELTA1 GLUTAMATE RECEPTOR, IONOTROPIC, DELTA 1	168	MAL: MAL, MVP17
69	GLK_DELTA2 GLUTAMATE RECEPTOR DELTA-2 SUBUNIT	169	MAP-2: MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 2
70	GLNA GLUTAMINE SYNTHETASE (EC 6.3.1.2) (GLUTAMATE--AMMONIA LIGASE)	170	MRF1: SFRS10, SRFA, MYELIN REGULATORY FACTOR
71	GLR1 GLUTAMATE RECEPTOR 1 PRECURSOR (GLUR-1) (GLUR-A) (GLUR-K1)	171	MRJ: (MSJ-1 OR HSJ2) MSJ-1, DNAJ-LIKE PROTEIN
72	GLR3 GLUTAMATE RECEPTOR 3 PRECURSOR (GLUR-3) (GLUR-C) (GLUR-K3)	172	MUSLAMR: LAMININ REZEPTOR
73	GLR4 GLUTAMATE RECEPTOR 4 PRECURSOR (GLUR-4)	173	MYT1: MYELIN TRANSCRIPTION FACTOR 1/KIAA0835/KIAA1050
74	NME1 GLUTAMATE (NMDA) RECEPTOR SUBUNIT ZETA 1 LONG FORM PRECURSOR (NR1)	174	MYTL1: MYELIN TRANSCRIPTION FACTOR 1- LIKE/PNG-1/MYT2/KIAA1106/NZF-1
75	NME2 GLUTAMATE (NMDA) RECEPTOR SUBUNIT EPSILON 1 PRECURSOR	175	NEURONATIN: NEURONATIN /PEG5
76	NMZ1 GLUTAMATE (NMDA) RECEPTOR SUBUNIT ZETA 1 LONG FORM PRECURSOR (NR1)	176	NM23-M7: NM23-H7
77	S10D VITAMIN D-DEPENDENT CALCIUM-BINDING PROTEIN (CABP)	177	OSP: OLIGODENDROCYTE SPECIFIC PROTEIN/CLAUDIN-11
78	MGR3 METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 3 PRECURSOR	178	QKI: KH DOMAIN RNA BINDING PROTEIN QKI
79	MGR4 METABOTROPIC GLUTAMATE	179	RB3: STATHMIN-LIKE PROTEIN RB3

	RECEPTOR 4 PRECURSOR		
80	MGR8 METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 8 PRECURSOR	180	S100B: S100B
81	CB1R CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6)	181	SCN2A: (SCN2A OR SCN2A1 OR NAC2) SODIUM CHANNEL
82	GBI1 GUANINE NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN G(I), ALPHA-1 SUBUNIT	182	SGN1: GPS1, G-PROTEIN-PATHWAY SUPPRESSOR, FUSCA-HOMOLOG
83	GBI2 GUANINE NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN G(I), ALPHA-2 SUBUNIT	183	SGP1: SULFATED GLYCOPROTEIN-1, PROSAPOSIN
84	GPR3 PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR GPR3 (ACCA ORPHAN RECEPTOR)	184	SNAP25A: SYNAPTOSOMAL ASSOCIATED PROTEIN 25 SNAP-25
85	GPRD PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR GPR13 (V28) (BETA CHEMOKINE RECEPTOR-LIKE 1)	185	TFAR15: APOPTOSIS-RELATED PROTEIN TFAR15
86	PTRR PARATHYROID HORMONE/PARATHYROID HORMONE-RELATED PEPTIDE RECEPTOR PRECURSOR	186	TPRD: TETRATRICOPEPTIDREPEAT PROTEIN
87	NTDO SODIUM-DEPENDENT DOPAMINE TRANSPORTER (DA TRANSPORTER) (DAT)	187	ZNF216LANG: ZINK FINGER PROTEIN 216
88	NTG1 SODIUM- AND CHLORIDE-DEPENDENT GABA TRANSPORTER 1	188	ESTA3.1: EVT.PROTEINPHOSPHATASE PP2
89	NTG2 SODIUM- AND CHLORIDE-DEPENDENT GABA TRANSPORTER 2 (GAT3)	189	ESTA6.2: BELONGS MAYBE TO HISTONE DEACETYLASE 3 (HDAC3) ?
90	NTG3 SODIUM- AND CHLORIDE-DEPENDENT GABA TRANSPORTER 3	190	ESTAA217907:
91	EC17	191	ESTB2.1
92	NTSE SODIUM-DEPENDENT SEROTONIN TRANSPORTER (5HT TRANSPORTER) (5HTT)	192	ESTB2.2:
93	ORPT ORPHAN TRANSPORTER	193	NA-K-ATPASE ALPHA2 (kurze Variante)
94	KF1A KINESIN-LIKE PROTEIN KIF1A (AXONAL TRANSPORTER OF SYNAPTIC VESICLES)	194	ESTC3.2:
95	PPOL POLY (ADP-RIBOSE) POLYMERASE	195	ESTTGF: KURZER 3'-BEREICH, ANTISENSE VON LTBP-3
96	BMP2 BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 2 PRECURSOR (BMP-2) (BMP-2A)	196	SUI1KURZ: SUI1 TRANSLATION INITIATION FACTOR
97	CYR6 CYR61 PROTEIN PRECURSOR (GIG1 PROTEIN) (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR- BINDING PROTEIN 10)	197	TEX261:
98	GDF1 EMBRYONIC GROWTH/DIFFERENTIATION FACTOR 1 PRECURSOR (GDF-1)	198	ESTB3.2: NA-K-ATPASE ALPHA2 (ALTERNATIVE POLYADENYLIERUNG) lange Variante
99	GDNF GLIAL CELL LINE-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR PRECURSOR	199	-
100	PDGF A-CHAIN	200	EC21

C. cDNA-Fragmente für die Northern Blot-Analyse:

Gen-Banknr.	Image-Klonnr.	Gen	Gen-Banknr.	Image-Klonnr.	Gen
aa089309	557940	CNP	aa422463	846824	estB2.2
ai664389	1495626	Na-K-ATPase alpha 2(kurz)	aa260265	746985	estB1.2 (PP2 activator?)
ai118308	1482785	Na-K-ATPase beta-1	ai573912	1920287	C3.1 (Proteinkinase Inhibitor?)
w61911	371974	mBOCT	ai482521	864653	Na-K-ATPase alpha2 (lang)
ai173888	1498611	hsp84	ai327138	425211	estA3.1 (PP2-regulator?)
ai196383	1887164	alpha synuclein	aa190040	637305	estA6.2 (Histondeacetylase?)
aa794580	1197570	amyloid beta precursor	ai227494	1510962	MAP-2
ai267109	1907677	CDC10	aa011759	440344	Glutaminsynthetase
ai596260	1969918	alpha actin	ai118167	1482659	Glutamatdehydrogenase
ai121145	1498323	alpha tropomyosin	aa967567	1616638	TPRD
ai528808	606733	MAPKinase	ai573410	552102	tau
aa691482	1180770	L14Lektin	w34176	352661	rb3
aa396929	599993	neuronatin	aa109939	572494	S100A1
ai156712	1494017	necdin	aa105748	518666	Phospholipase C alpha
aa270814	736753	ATPase6	aa510137	891102	ZNF216
ai385690	404745	SNAP25	w29679	347834	KLC1
ai314314	1921376	estC3.2	ai155442	1477661	hnRNPA2/B1
			w64749	385062	ADP-Ribosylargininhydrolase

D. 1. Antikörper für die Western Blot-Analyse bzw. Immunhistochemie:

Antikörper	Name	Spezies	Firma/Uni
Na-K-ATPase alpha 1	C464.6 (6H)	Maus	Upstate Biotechnology
Na-K-ATPase alpha 2	McB2	Maus	Dr. Sweadner
CNP	11-5B	Maus	Boehringer Mannheim
Alpha-Synuclein	H3C	Maus	Dr.George (University of Illinois, Urbana)
Na-K-ATPase beta 1	#757	Kaninchen	Dr.Ball
MOG	MOG-ExII	Kaninchen	Dipl.Chem. L.von Hoch (Institut für Biochemie, Köln)
MAP-2	HM-2	Maus	Sigma
Connexin43	CX-1B1	Maus	Zymed
MBP	α-MBP	Maus	Böhringer Mannheim
PLP (Transgene)	PLP-Peptid	Kaninchen	Rolf Müller (Institut für Biochemie, Köln)
PLP (Immunhistologie)	PLP-Protein	Kaninchen	Dr. T.Uschkureit (Institut für Biochemie, Köln)
MAG	MAG II	Kaninchen	Dr. J.Stracke (Institut für Biochemie, Köln)
SC1	-	Kaninchen	Dipl.Chem. H.Hambrock (Institut für Biochemie, Köln)

E. SAGE-Tags:

TAG	WT	DM	Signifikanz	Datenbankeintrag	GEN
GCTTCGTCCAG	560	20	142.86		MBP
TCCCCGTACAT	1168	690	33.28		Linker 2
GGCTTCGGTCT	116	3	31.44	est:AA738898	Acid. Rib.Phosphoprotein P0
CAAACCTCCAT	485	206	29.28		12S RNA
TGGGCATCCAC	84	4	20.87	est:AI324055	L26
GGCTTTGGTCT	3	73	17.41	est:AA592812	Acid. Rib.Phosphoprotein P0
GCTGCCCTCCA	244	103	15.47	est:T25568 Cyto	Cyt. C oxidase Polypeptid 1
ACCAATGAACA	232	103	13.62		t-RNA Valin
AAATTATTGGG	48	4	10.64	est:AA967808	PLP
CCCCCGTACAT	146	62	9.60		Linker2-ähnlich
AGGTCGGGTGG	154	68	9.48	est:AA711167	L13A
AACGGCTAAAC	298	178	9.22		16S
CACACACACAC	40	3	9.20		PLP
ATAATACATAA	77	172	8.50	est:AA270814	ATP synthase 6, A-chain
CACGGCTTTCA	1	32	8.14	emb:MML26MRN	L26

GCTTCTTACC	149	71	8.12		t-RNA Serin
AGAGCGAAGTG	149	74	7.55	est:AA691225	L41
GGTGAGCCTGA	28	2	6.64	est:MM1192386	Thiol-specific antioxidant
TCAGGCTGCCT	163	90	6.62	est:AA592346	Ferritin heavy chain
CCCCAGCCAGT	76	30	5.99	est:AA589618	S3
TGGATCCTGAG	188	117	5.64	est:AA544593	Beta Globin
GCAGAGTGCGC	47	15	5.00		S6
CGCCGCCGGCT	95	50	4.68	est:AA691791	L34
GGGAAGTCTGC	1	19	4.57	emb:MMTSA	Thiol-specific antioxidant
TATGTCAAGCT	52	20	4.49	est:AA869922	S12
CGCAGCGTTGG	83	42	4.49		MOBP
GAGCGTTTTGG	77	38	4.41		Cyclophilin
ATGGCTCGCAA	0	15	4.39		B-repeat-ähnlich
GTGGGCGTGTA	88	47	4.29	est:AA638410	S15
AGGAAGGCGGC	43	15	4.26	est:MMA32911	L36
GTGGCTCACAA	368	295	4.00		B2-repeat
GCTCAGCTTAG	12	0	3.73		Procollagen III alpha
TCCCTATTAAG	1103	1010	3.71		Linker1
TTCTAGGAATG	0	12	3.51		Alpha Tropomyosin
TATATTAATC	0	12	3.51		Snap-25
TTGGCTGCCCA	98	61	3.44	est:AI117662	S14
ATACTGACATT	220	299	3.41	est:AA259328	Cyt. C oxidase Polypeptid 3
TGGGCAAAGCC	30	10	3.31	est:AA839309	Elongationsfaktor 1 gamma
CATTGTGAAA	0	11	3.22	Est:AA199416	
TTCTGGGTAGG	34	13	3.21	est:MM52237	NADH ubiquinon oxidoreduktase ashi
GGCGGCTTTGC	15	2	3.11	est:MM81214	NADH ubiquinon oxidoreduktase B12
GGCCGAGGCAC	10	0	3.11		PLP
CTTGCAAGTGA	51	26	3.06	est:AI118218	NADH ubiquinon oxidoreduktase B22
AGGCAGACAGT	108	73	3.04	est:AA547285	Elongationsfaktor 1 alpha
TTAATCCCAAA	17	41	2.96		CNP
AAGATCAAGAT	10	30	2.94	est:AA799108	Alpha actin
GCTTCTTCCC	12	1	2.91		t-RNA Serin?
CCTGATCTTTA	55	30	2.91	est:AA545952	Laminin rezeptor
ACTCGGATGCT	47	24	2.88		NADH ubiquinon oxidoreduktase aggg
ATCCTGGTAAT	15	37	2.82	est:AI152312	Carboxypeptidase E
GAGCCCCTTGG	21	6	2.81		
GCGAAGCTCAG	30	12	2.78	est:AI385892	S25
CACCACCACAG	45	23	2.78	est:AA547008	L29
AATATCACCTT	28	11	2.68	est:MM1170336	t-RNA Cystein
GATACTTGGAA	23	47	2.62	est:AA543411	Antisense beta Actin
CTGAGGAAGTG	12	31	2.60	emb:MMU64827	SC1
GAGGAGTGGGA	33	15	2.59	Est: 855973	
GCATACGGCGC	52	30	2.56	est:AA544965	F1F0 ATPase E
CCTTGCTCAAT	139	188	2.54	est:AA673903	Cystatin C
ATAGCTTTCTA	15	35	2.53	emb:MMABP	Amyloid beta Precursor
AGGACAAATAT	28	53	2.52		Cytochrom C
TCCTTGGACTC	8	0	2.49		Antisense MBP
TCCAGAAAATC	8	0	2.49		Alpha Tropomyosin?
GGGGGAGTGGA	31	14	2.49		Neuronatin
GCCCCGGAATA	50	29	2.47	emb:MMHEX	L17
ACAGGGTTGGC	1	11	2.45		Procollagen III alpha
TCCGCGTACAT	19	6	2.41		Linker2-ähnlich
CAGCGCGCCCT	19	6	2.41	est:MMA33011	
CTGGCTTTGTT	14	3	2.40	Est: AI182172	
CCAGTCCTGGT	59	37	2.40	est:AA674982	F1F0 ATPase C

TTCTAGCATAT	13	31	2.38	est:AI118308	Na-K-ATPase beta1
CTCACATAACT	0	8	2.35	Est: AI573912	
CTATTCAGCAT	0	8	2.35		ZNF216 (lang)
CAGGAGTTCAA	0	8	2.35		BRCA2
CAGGAGGAGTT	0	8	2.35		PLC alpha
GTGAGCCATT	24	46	2.34		Hsp 84 (kurz)
CTTCCCCGGGA	23	9	2.33	est:MMA34654	Cu-Zn-Superoxid dismutase
CAATAGAGACC	14	32	2.32	est:AA982591	Pyruvatkinase M
TCGTGATTGTG	41	23	2.28	est:AA789729	Ornithin decarboxylase antizym
GCTGGCAGCCA	28	13	2.25		Proteinphosphatase alpha1
TCCGGGCGAGG	18	6	2.22		H2A Histon
TCAGCCTTGTC	18	6	2.22	est:AA615439	
CCTTACACTTG	1	10	2.20		TPRD
CCTACCAAGAC	29	14	2.20	est:AI006617	S20
ATGACAAAGAA	1	10	2.20		Cytochrom P450
ACTAGCTCTCC	3	14	2.20		NMDA rezeptor zeta1
TGTACTIONGAAA	7	0	2.18		Na-K-ATPase alpha2 (kurz)
GGCTGGATGGA	34	18	2.18		Cholecysokinin
GGACCGTACAA	7	0	2.18		Antisense PLP
CGGGAGATGCT	34	18	2.18	est:MM1135557	ATP synthase oligomycin
CCAACCGTCTA	7	0	2.18	est:MMAA71558	BOCT
TATAGTATGTT	2	12	2.17	est:AI413315	Glutaminsynthetase
GTGGCTAACAA	13	3	2.17		B-repeat-ähnlich
GCGGCGGATGG	2	12	2.17	emb:MML14L	L14-Lectin
AGCAGTCCCCT	129	169	2.17	est:W80325	Cyt. C oxidase Polypeptid 2
GGCACTGCGGC	42	25	2.12		S13
AACTGAGGGGT	18	36	2.12	est:AI035652	Sulfated glycoprotein-1
TGCTGGGATGG	11	2	2.11	emb:MMMRPS12	S12
TGTGCCAAGTG	37	21	2.10	est:AA879734	S14
CCTGATGTGCC	37	21	2.10	est:AA590349	NADH ubiquinon oxidoreduktase B9
ATCCGGCGCCA	27	13	2.10		Polymerase II transcription factor SIII p18
GCCCTAAGTGG	9	1	2.09	est:AA792430	Tex 261
CCTCGCACAGT	9	1	2.09		Antisense L13
TTGGGCCAGAG	98	76	2.05	est:AA939541	Cyt. C oxidase Polypeptid VIIc
TTCTATGAGTT	0	7	2.05		
TGAGCCTGGTC	0	7	2.05	est:AI323799	Antisense LTBP-3
GTGACGGTGCT	0	7	2.05	est:AA797576	Na-K-ATPase alpha2 (lang)
GGAATTGCTGT	0	7	2.05	Est: aa915154	
GCAGAAATGCA	0	7	2.05		Cyr61 (kurz)
CTTCCCCGGAA	0	7	2.05	est:AA895484	Cu-Zn-Superoxid dismutase
CTAAAAAAAAA	0	7	2.05	emb:MM42385	FGF inducible gen 16
CAATAAACTGA	0	7	2.05	est:AA789726	Sui1 (kurz)
ATGAAACTTTG	0	7	2.05		Mitochondrial
AACCCTAATAA	4	15	2.04		ATPase 6 (kurz)
TTTGGGGCTGG	34	19	2.03		ATPase-like
GCCGAGCATAA	34	19	2.03	est:AA688448	F1F0 ATPase F
CACGGGACCAC	40	24	2.03	est:AI316883	Hinge protein
AAAACAGTGGC	35	20	2.01	est:AA612439	L37
TCTGTGATGTG	21	9	2.00	est:AA764377	
GAGGATTCCCC	6	18	2.00	est:AI181019	F1F0 ATPase delta
AACGGGAGGTG	69	50	1.99		SCLIP
AGGAGGACTTA	61	87	1.96		NADH ubiquinon oxidoreduktase 2
TGCGGGGGTGG	12	3	1.95	est:AI181756	
TGCAGTGCACCT	1	9	1.95		NCBP-29
TCAAAAAAAAAA	1	9	1.95	est:AA982215	
CCTTTGAGCAG	12	3	1.95	est:MMAA55231	

ACCAATGAAAC	1	9	1.95		RB3
GGCAGCCCCCT	15	5	1.93	est:AA982061	Vimentin?
CACAAACGGTA	46	30	1.93	est:AA555836	S27
TCTCCAGGCGA	24	42	1.92	est:AA986731	Clusterin
GGGAAGGCGGC	39	24	1.92	est:AA688443	S3A
ATACTGAAGCC	33	19	1.91		A52
TGGTGAAGAGC	19	8	1.89	est:MM0252	
GTTTTCCCCTC	10	2	1.88	emb:MM02883	MDGI
GCACAACCTGC	75	57	1.88	est:AI255663	Calmodulin synthesis gene
TAGATGTTGCT	6	0	1.87	Est:AA217907	
GTCGCGTCCGG	6	0	1.87		
GTCCAGCTCAC	6	0	1.87		
GCCGAGTCTGG	6	0	1.87	Est::AA833192	
AGCTCCCCCTG	6	0	1.87		
AGCCCATCAAT	6	0	1.87	Est:AI414853	
AGATCTGCCCC	6	0	1.87	est:MM1192151	Vacuolor ATPase G
ACACTGCCCAT	6	0	1.87	emb:MMU96116	ERAB
AACTTGATTAA	6	0	1.87	est:MM1156047	
AAAAAGTACCA	6	0	1.87		
GAGGCTTTGCA	10	23	1.86	est:AA546620	Hsp84 alpha
GCCTCTTGAAG	4	14	1.85		CDC10
CTGCTGGTGGC	37	23	1.84		RAB acceptor PraI
CCCTTCTTCTC	68	51	1.84	est:AA986470	Alpha globin
TGGCCCTCTGA	8	1	1.83		
TGCCATAGAAA	6	17	1.83	Est:AI390702	Antisense Monocarboxylattransporter
GCGGCGGTGCT	8	1	1.83		H2A Histon
GACCAGTGGAG	13	4	1.83	est:AI196865	Vacuolor ATPase
CTGCCTCACAG	8	1	1.83	est:AI035255	Bleomycin hydrolase
CCCATTCGGGC	8	1	1.83		S-100 A1 (kurz)
ACAAACTTAGG	33	52	1.83	est:AA646840	Calmodulin
AAAAAAAAAAAA	24	41	1.83	est:AA616103	Nicht eindeutig
ATCACACACTA	11	24	1.81		Cytochrom c oxidase II (kurz)
GCGGGGTCGCC	78	61	1.80		
ACCATTAACCTG	3	12	1.79	est:MM1257208	
CAGCTCTGCCT	48	69	1.78		Neurogranin
CCCTGAGTCCA	53	38	1.77	est:AA596262	
ATGACTGATAG	79	104	1.77	est:AI037033	NADH ubiquinon oxidoreduktase
TTTTTCAATCA	0	6	1.76		MAP-2
TTTGTACCCAG	0	6	1.76	Est: AI790306	
TGTACCCAGGG	0	6	1.76	emb:MMU92793	Alpha glucosidase II alpha
GTGCGTGGGTG	0	6	1.76	est:AI327138	Proteinphosphatase PP2?
GATGCACCAGA	22	11	1.76	Est:AI322365	
CTTGCGGAGCG	0	6	1.76	Est:AI646205	
CTCTATTTAAG	0	6	1.76	est:AI326159	Vacuolor ATP synthase F
CGGATTTAGGT	0	6	1.76		Antisense L34
CAAGGTGACAG	69	53	1.76	est:AI035597	S4
ATTGTTTGCAA	0	6	1.76		
ATCCCTTGCAG	0	6	1.76		EIF 2B
ATATTTTTTAA	0	6	1.76	Est: AA240030	
ACACAGAAATA	0	6	1.76	emb:AF071316	COP9 7a
ACAAAGGTTAA	0	6	1.76		LIM-only4
GGGTAGGGGTA	5	15	1.75		Synaptic vesicle transporter
CGCCAGACAA	14	5	1.75		Ubiquinon oxidoreduktase I
AAGAGGCAAGA	28	16	1.75	emb:AF085809	Synapsin Ib
GGCTAGCCCA	11	3	1.74	est:MM1189658	S15A
GCCTCCAAGGA	131	114	1.74	GAPDH	
AGAGGTGGTTA	11	3	1.74		Ubiquitin conjugating enzym
TGCTGCACGTC	1	8	1.70	emb:AF055665	Kinesin light chain 1

GTTGGCTCCTT	1	8	1.70	est:AI325406	
GTGCCAAGGTC	1	8	1.70	Est: AA209635	
CTGCCTGCCCT	1	8	1.70		Tau
AGCTTGATTAA	1	8	1.70	Est:AI120198	
CATGTCAGGCT	19	9	1.69		Ferritin heavy chain
TCATTGGTCGC	15	6	1.68		NADH ubiquinon oxidoreduktase 6
CACGCTCCCGG	25	14	1.68	est:AI173005	S13
ATCAACACCGC	18	32	1.68	est:AI119894	Gs-adenylatcyclase
TTGAGGGGGGG	4	13	1.67	Est:AV102050	
TGTATAAAAAA	6	16	1.67		
TCCCGTACATC	105	90	1.66		Linker1-ähnlich
GTTCACTTTCA	20	10	1.66	est:AA832900	F1F0-ATPase epsilon
AGCAAAAGCCC	20	10	1.66		Cytochrom Coxidase I (kurz)
TTCCTGGCGCG	9	2	1.65	Est:AA543146	
TCTGACCTGCT	9	2	1.65		S100 beta
GCAAAGGATGA	9	2	1.65	est:AI121089	26S Proteasom 4 ATPase
CTCTGACTTAC	24	39	1.65	emb:MMBAS	Basigin
TGACCGCCCAG	12	4	1.64	Est: AA199204	
GTCCTATAAAG	9	20	1.64	est:MM1141323	
GGCTGCAGCCA	12	24	1.64	est:AI043095	IgE-binding factor
GCTGCAGCGTT	12	4	1.64	Est:AA260269	
CCTCGGAAAAT	35	23	1.64	est:AA592651	L38
ACTACCATCAG	12	4	1.64		NADH ubiquinon oxidoreduktase 5
TGGACCTTTTT	36	24	1.63		Zebrin II
GCTGCCAGGGG	16	7	1.63	emb:AF022223	BAG-1
AAGGTCTGCCT	84	70	1.62	est:AI225796	Phospholipid hydroperoxidgluthationperoxidase
TGAACCCACTT	38	26	1.61	est:AA674967	Cyt. C Via
CATCGCCAGTG	99	122	1.61	est:AA738843	APO E
TCTTAATGAAG	3	11	1.59	est:AA987069	EIF4-AII
TCCCTATTAGC	17	8	1.59		Linker
GGGTGGCCCGT	3	11	1.59		
TCTGCCCTCTG	5	14	1.58		AP180
TAACGCCCTTG	5	14	1.58	est:AA982204	Erk-1
GGATTTGGCTT	31	20	1.58	est:AA560839	Acid. Rib.Phosphoprotein P2
GATTCGCTGAG	31	20	1.58	est:AA590852	L37
GAGGCCCAAGA	7	1	1.57		Clp Protease
CCCCACACACA	7	1	1.57	Est:AA396672	
AGCTGGGGTTC	7	1	1.57	est:MM1141261	
TGGGCCACCTC	5	0	1.56		Parvalbumin
TGACCCCGGGG	5	0	1.56		Ubiquitin/60S
TCTCTGACTTG	5	0	1.56	est:MM1161012	F52
TCCTGTCACAG	5	0	1.56	est:AI098096	Sepiapterin reduktase
TCCACCACCCT	5	0	1.56		Antisense S16
TAACTGGTGCA	5	0	1.56		
GGTTTGCTCAG	5	0	1.56	est:AI390728	
GCTTTCTTCCA	5	0	1.56		
GCCCAGGTTTA	5	0	1.56	est:AA959817	Calcium binding Protein precursor
CTATCCTTGAG	5	0	1.56	Est:AI849101	
CCGGCGTGGAA	24	14	1.56	Est:AI414620	
CAGATTTAGGT	5	0	1.56		
ATTGCCTACGA	5	0	1.56		ADP-Ribosylargininhydrolase
ATTGAGCGGCC	5	0	1.56		TFAR15
AGATCCTTAGA	5	0	1.56		
ACAGTGCCTAG	5	0	1.56		Coronin
AGACTATGCAC	8	18	1.55	est:AI196383	Alpha synuclein
GTGACCACGGG	62	50	1.53		

CACACTGCCTG	10	3	1.53		
TTGATTTTTTT	6	15	1.52	Est:AV009094	
TAGTCAGGGAG	6	15	1.52		
ATCGGGCGCAG	14	6	1.52	est:AI415253	
ACTTTATATGC	2	9	1.52		
ACCCTATTAAG	14	6	1.52		
AAATAAATGTC	2	9	1.52		
TCCCTTTAAGC	20	11	1.50		
TGCGTGCTGGA	4	12	1.49		
GTTGGGAGCTG	73	62	1.48	emb:MMSY	Synaptophysin
GCCACCCTCTA	21	12	1.48		
TTGTATAATTT	0	5	1.47		
TTATTGCAAGT	0	5	1.47		KIAA0601
TGAGAACTGCG	0	5	1.47		TPRD
TCTTTAATCCC	0	5	1.47		
TCAGTTTATTA	0	5	1.47	est:AA710467	
TAAGTGGAATA	0	5	1.47		14.3.3 zeta
GTGGAGCTGAA	0	5	1.47		Daxx
GTCTACGTATC	0	5	1.47		
GTATACTGTAA	0	5	1.47		
GGTGTGCCCAG	0	5	1.47		
GGAGAAGAGCT	0	5	1.47		
GCTAAGATCCA	0	5	1.47		
GCCTCGGGGGA	0	5	1.47	est:AA797778	
GATGTCGGCAA	0	5	1.47	emb:AF035962	MRJ
GAACCTGTGGA	0	5	1.47		
CTGCTATGCTT	0	5	1.47		
CTGATCCAGCT	0	5	1.47		
CCTTTCCAAAC	0	5	1.47		
CCTGCCAGACG	0	5	1.47		
CCTGAGAAAAA	0	5	1.47		
CCCCTGTGTT	0	5	1.47		
CAGGAAGGATA	0	5	1.47		
CAGAGTCATTA	0	5	1.47		
CACACGCGCAC	0	5	1.47	emb:MMNCAMR	NCAM
ATTAACCTGGT	0	5	1.47	est:AI132707	Glutamat-dehydrogenase
ATGACAAAAAA	0	5	1.47	est:AI042831	
AGGCTGTTCTC	0	5	1.47		Ras-specific guaninnucleotide-relatid factor
TCCCCGTACAG	11	4	1.46		Linker-ähnlich
TACAAGTACCG	1	7	1.46		Cyclophilin pseudogen
GAGTGCTTTGT	7	16	1.46		
CGGCTGTCGCA	1	7	1.46		
AATGGATGAAC	1	7	1.46		
CTCTTCCCCCC	36	26	1.45		Phosphatidylethanolamin-binding protein
GTTGCTGAGAA	24	15	1.44	est:AA571249	
TCGAATTGCAA	8	2	1.42		
TCCTTTGTGCT	8	2	1.42		
TCCAATCCTT	8	2	1.42	est:MM3652	
TATTGGCTCTG	31	44	1.42	emb:MM37721	Cytochrom C
GCGTTCCTCTG	8	2	1.42	est:AI256577	
GCGCCAGCTCA	51	41	1.42		
GCGACAGCCAC	8	2	1.42		RNA Polymerase II RPB 14
GAGCCTGAGGA	8	2	1.42		
GAACCTATGTTG	8	2	1.42		
GTTTCTCAGGC	3	10	1.40		
GGGAAAAAAA	3	10	1.40	emb:MMBRED	Dynamain
GGCCCAAGGCC	3	10	1.40		

GCAGGACATTT	3	10	1.40	est:AA794202	
GACATTGATTC	3	10	1.40	est:MMAA47980	
CGCTGGTTCCA	29	20	1.40	est:AA591051	L11
CCCTATTAAGC	18	10	1.40		
CAGTCCCCGTC	18	10	1.40	est:AI021432	
AGTGAGACCAA	3	10	1.40		S100 beta
ACCCAGGCTGG	12	5	1.40	est:AI036280	
ACCAAGTGTAT	12	5	1.40		
AAGCTGGGCTC	3	10	1.40		
GAATAATAAAA	13	23	1.39	est:AA636915	Hsp70
ATCCGCACCCT	37	50	1.39		Calmodulin 3
GAACATTGCAC	28	40	1.38	est:AA879684	SPARC
CACCACCGTTG	33	24	1.38	est:AI173218	L7a
TGTGTCAACCT	29	41	1.37	est:MM1160486	14.3.3 eta
TCTACAAGAAT	6	14	1.37	est:AA546326	Hsp84
GGAAGCCACTT	39	30	1.37	est:AA592756	S27A
GCTGCCCTAGA	148	148	1.37	est:AI035651	Tubulin alpha
CCTCCCGAGTG	6	14	1.37		18S
TTCTGGCTGCG	20	12	1.36	est:AA624880	Ubiquinon Cytochrom oxidoreduktase core
TGGACACTCAA	10	19	1.36		Neurochondrin-1
TATGCAACCCC	10	19	1.36		Necdin
CACGCCGTGGG	13	6	1.36	est:MMAA24895	
GGCCAGTTGGA	21	13	1.35		
TTTCCAGGTGT	89	83	1.34	emb:AF015284	Selenoprotein W
GTGGCTCACAG	22	14	1.34	est:AI132415	
GCCAAGATGCC	9	3	1.34		
CAGTTCGATGA	23	15	1.34		
CACAGAACCAG	9	3	1.34	est:AA674095	
TCCTATTAAGC	91	86	1.33		Linker-ähnlich
TCACCTGTGGG	4	11	1.33	emb:MMAF6688	Peroxisomal Acyl-CoA oxidase
TAATAGTAACT	4	11	1.33	est:AA692501	Cyt. Coxidase Va
TAAGTAGCAAA	14	7	1.33	est:MM1176049	
GTCTGGGGGGA	4	11	1.33	est:AI046684	Monoglycerid lipase
GCCCTGGGGCT	14	7	1.33	est:AI132679	
GCATCCTGTTA	4	11	1.33		
CCCTGAGGGGT	24	16	1.33	est:AA968377	Serotransferrin
TTCCTGAGGCC	6	1	1.32	emb:MMU92794	Alpha glucosidase II beta
GGCCAGAGACA	6	1	1.32		
GCGACAGAGGT	6	1	1.32	est:AI047828	Erg2
GAGGGCGCTGG	6	1	1.32		
GACTTGGCCCT	6	1	1.32		
GAAGTGCAGGA	6	1	1.32		
CTTTGCCCTGG	6	1	1.32		
AGGCAGGCCGT	6	1	1.32		
ACTAACTGTGT	6	1	1.32	est:AI118242	RbAp48
AAGCAGGAGAA	6	1	1.32		
TGGCAGCTCTG	2	8	1.31		Antisense CNP
TGGATCAGTCT	41	33	1.31	est:AA596221	L19
TAGTTCGGACT	2	8	1.31	est:AI326345	G protein pathway supressor
GTTTAGTGGAT	2	8	1.31	est:AI194989	MC3
GCCTGTTCCAT	2	8	1.31		Valosin containing protein
CCTCAGCCTGG	28	20	1.31	emb:MMCATD	Cathepsin D
CCCGTGTGCTC	41	33	1.31	est:AA616235	S9
CATAGGGTGCA	2	8	1.31		
CAGGTGAGCCT	2	8	1.31		
AAATTGGATCT	2	8	1.31	est:AA929106	Amyloid-like protein
TACTTGTGTTC	8	16	1.30	est:AA790392	
AAACCCCCAGC	56	49	1.29	est:MM1296977	S-Adenosylmethioninsynthetase

TAGATATAGGC	17	10	1.28		
GCTCACAGAGG	10	4	1.28	est:MM1139810	
CCCCGTACATC	10	4	1.28		
CAACAAAACCT	10	4	1.28		
ATCAGTGGCTT	10	4	1.28	est:AI158865	Proteasom beta
AATGGCTAGCA	10	4	1.28		
TTGACTTTATT	5	12	1.27	emb:MMP450RA	P450RA
AGTGGAGGACG	24	34	1.27		
AGGAAAGCCTC	5	12	1.27		Gastric H/K-ATPase
TTTGCAGCCAT	4	0	1.25	emb:MMBCAK	Branched chain - ketoacyldecarboxylase
TTGCTTTACTG	4	0	1.25		
TTACTTGATCT	4	0	1.25		
TTAAGCAGCTT	4	0	1.25	est:AA959850	
TGTAACAGGAC	35	28	1.25	est:AA709820	F1F0 ATPase G-Domain
TGCAGTGCACC	4	0	1.25		
TGCAGAGAAAA	4	0	1.25	est:AA790029	
TGCACTGGCCT	4	0	1.25		
TGATTGTTGGT	4	0	1.25	est:MM44211	
TGAGCTGTCTG	4	0	1.25		
TGAGCATCAAA	4	0	1.25		
TGACGTAGCCC	4	0	1.25		
TGACAGCTTGT	4	0	1.25	Est:AI467563	
TCTTGCTGCAC	4	0	1.25		
TCCTTGCTTTC	4	0	1.25		
GTGGGCATAGA	4	0	1.25		
GTGCTGGACCT	4	0	1.25	est:AI118375	
GTGACTCACAG	4	0	1.25		
GGTACTTGAGC	4	0	1.25		
GGAGCACTGGG	4	0	1.25	est:AI182769	
GCGTTCACACA	4	0	1.25		
GCCTTGGTGAA	20	13	1.25		
GCCGCCCTGAA	4	0	1.25		
GCCCTATTAAG	4	0	1.25		
GACTGATCTTG	4	0	1.25		
GACAGAGGCCT	4	0	1.25		
CTGGGCCAGAG	4	0	1.25	est:AI118123	
CTGCTATCCGA	21	14	1.25	emb:MMRPL5	L5
CTCCGGCTGCC	4	0	1.25		
CTCAGTGGGTA	4	0	1.25		
CGCGCTCCCTG	4	0	1.25		
CGAGGGGGGCG	4	0	1.25		
CCTTTCAAACC	4	0	1.25	est:MMA14302	
CCGGGTCCAAC	4	0	1.25		
CAGGCAGAACA	4	0	1.25		
CACCACGACCC	4	0	1.25		
AGCATTGGCGG	4	0	1.25		
AGCACAAGTTC	4	0	1.25		
AGCAATTCAAA	57	67	1.25	est:AA272061	NADH-ubiquinon oxidoreduktase 3
ACGGCCGCATC	4	0	1.25		
ACCAGGGCCTC	4	0	1.25		
AAGGCAAAGAA	17	26	1.25		
AAGGACTTTGG	4	0	1.25		
AAGCTCGAAAG	4	0	1.25		
TGCCGTTTTGA	11	5	1.24		
GACAACGCCAG	28	21	1.24		
CTGGGTTCGGG	11	5	1.24	emb:AF035814	BEC1
CTAGTCTTTGT	45	55	1.24	est:AA563101	40S

CCAGAACAGAC	27	20	1.24	est:AA590961	L30
ATCTGTACTCC	11	5	1.24	est:AI118214	
ATCTAGGAGGC	11	5	1.24		
ATAGCAGCACA	22	15	1.24	est:AA590956	Cyt.C oxidase Vb
AATTCGCGGAT	26	19	1.24	est:AA822938	Prealbumin
AACGCTGCCAA	25	18	1.24	emb:MMGIA	Glycosylation inhibiting factor
TTTTTGAACAA	1	6	1.23	est:AI120644	Catenin beta
TTTTGTTTATG	1	6	1.23		GDP dissociation inhibitor beta
TTGGGAGAACG	3	9	1.23		
TGTGTCATTTC	1	6	1.23	est:AA869226	
TGCAAATGGAC	1	6	1.23		
TGAGTTCGCTT	1	6	1.23		
TCTTCTTCCCC	1	6	1.23		FK506
TCTGCTAAAGA	3	9	1.23		
TCTCTCTGTTG	3	9	1.23		
TATTTTGTTTT	6	13	1.23	est:AI117580	Prion Protein
TAAGGGAAATA	11	19	1.23	emb:MMTP11R	Triosephosphatisomerase
TAAAGCCACTT	1	6	1.23	est:AA986845	KIAA01017
GGTGTTCTGAC	1	6	1.23		
GGGAGCGAAAA	1	6	1.23	est:AI255428	Inhibitor of DNA binding
GGCTCCTTGGG	3	9	1.23		
GGCCACATCA	1	6	1.23		
GGCAGGGGTGT	1	6	1.23		
GGAGCGCTATG	1	6	1.23		
GCTTGCTTCCT	1	6	1.23	est:MM0727	RAB7
GCTTCCAATCC	1	6	1.23		Natriumkanal
GACACTCAATA	3	9	1.23		
CTTCTGCAGTC	1	6	1.23	est:MMAA34665	
CTTAAGGATCC	1	6	1.23	est:AA574743	Clusterin
CTCCACGTCCA	1	6	1.23		
CTAGCTAACCT	1	6	1.23		
CGCGCTCTCTC	1	6	1.23		
CCGAGTTACCT	1	6	1.23	emb:AF022811	Cornichon
CCATTACTAAC	1	6	1.23	emb:MMU51908	Neurotensin receptor
CATTTTACATA	1	6	1.23		Secretory granule neuroendocrine protein 1
CACTGATTTAA	1	6	1.23		14.3.3 beta
ATTTGAAATAA	1	6	1.23	est:AA689127	
ACTGCTTTTTTA	1	6	1.23	est:MM1164757	Transcription factor BTF3
AAGTAAGTGTC	1	6	1.23		
TTTTCCAATTG	12	6	1.22		
TGGGTTGTCTA	60	56	1.22	est:AA608429	Translationally controlled tumor protein
TCGAGCAGTTG	12	6	1.22		
GGTGTAACAC	12	6	1.22		OSP
GAAGTCGGAAT	53	62	1.22		
CCCAGGCTGAA	12	6	1.22		
TTTACAGTGGC	7	2	1.21		
GAAAGTTGGCC	7	2	1.21	emb:MMAPOD	APO D
CCTGGAGCAGT	7	2	1.21	est:MMRS79UNI	
TCTTCTCACAA	13	7	1.20	est:AA616342	L39
GGGGCTCTGGC	13	7	1.20	est:MM1303756	Antisecretory factor
TTTGCTGTGTA	0	4	1.18	est:MMA59879	
TTTAACAGGTT	0	4	1.18		GTP binding associated protein
TTGCTTTTGGGA	0	4	1.18	est:AI098181	ADP ribosylation factor 4
TGTTGGTTGAG	0	4	1.18	est:AA762996	NSP-like 1
TGTATTTATAA	0	4	1.18		Spermidin synthase
TGGCGAAAAAT	0	4	1.18		Metal response element M96
TGCTTCAGACA	0	4	1.18	est:AI098133	Adenosinkinase

TGCACACAAGA	0	4	1.18	est:AI413286	Arginyl t-RNA synthase
TGATATGAGCT	17	25	1.18	est:AI035955	Lactat dehydrogenase
TGACTGTCTGT	0	4	1.18		
TCCCCGTACA	42	37	1.18		Linker-ähnlich
TCCATATTTTT	0	4	1.18		
TCATCAGGCCT	0	4	1.18	est:MMA44543	
TCAGGGTAGAA	0	4	1.18	est:AA709845	Tropomyosin-2
TATGTTGTTCA	0	4	1.18		
TACCGCGTCAC	0	4	1.18		
TACCATCTTCT	0	4	1.18	est:AA592394	Succinat dehydrogenase Cytochrom B 560
TAACAGTTGTG	0	4	1.18	est:AI098158	Calnexin precursor
GTTGAAGTAAT	0	4	1.18	est:AA673394	
GTTCTGCTTC	0	4	1.18		Golgi SNARE
GTCCTGTGACA	0	4	1.18	emb:MMINASPB	CD47
GTCCCAAGGCT	0	4	1.18		
GGTTAATGTTC	0	4	1.18		Praja1
GGCTTGGTTTA	0	4	1.18	est:AI020932	
GGCCCCGGACA	0	4	1.18	est:AI326433	
GGAGCCATTGG	14	8	1.18	est:MM04214	NADH ubiquinon oxidoreduktase 13kD
GGAGCAGGACT	0	4	1.18	est:AA739000	
GGACAGCACAC	0	4	1.18	emb:MMPCD	Pyruvat carboxylase-homolog
GGAAGTGGTGG	0	4	1.18	emb:MMU73941	Rap2 interacting protein 8
GCTCTGGCTT	0	4	1.18		
GCCTGGTGGGC	0	4	1.18	est:MM62619	
GCCTAGAACTA	0	4	1.18		
GCCAGCCACAT	0	4	1.18		
GCACAGTCACA	0	4	1.18		
GAGGCAGCCGC	0	4	1.18		
CTTTGATCGTC	0	4	1.18		Parotid secretory protein
CTTAAATCTGG	0	4	1.18	est:AI114951	Heat shock protein DNAJ-like
CTGTGGAATAA	0	4	1.18		
CTGGAGGCTCT	0	4	1.18		
CTCTGTGGAAT	0	4	1.18	est:AI120504	APC binding protein
CTCTCTCTGT	8	15	1.18		
CTCCTAATCTT	0	4	1.18	est:MM65734	Small nuclear ribonucleo protein
CCTCTTCCCCT	0	4	1.18		
CCCTGTGCTTC	0	4	1.18		
CCACTGTCT	0	4	1.18		Capping protein alpha 1
CAGTTGGTTGT	0	4	1.18		E1B 55kD
CACTGCATAGG	0	4	1.18		
CAATCAAATG	0	4	1.18	est:MM1180667	Mitochondria import receptor
ATTTTGTGCAA	0	4	1.18	est:MMAA88828	Hepatoma derived growth factor
ATGGGTGCATT	0	4	1.18		
AGCTCACGGTT	0	4	1.18		
AGCCAACCGAA	0	4	1.18		
AGAGTAATCAA	0	4	1.18		Growth accentuating Protein 43
ACGTATTTAAC	0	4	1.18		
ACCTGAAGTCA	0	4	1.18		
ACCCAGCAGCC	0	4	1.18		Protein tyrosin phosphatase IF1
AATTCAACTGG	0	4	1.18	est:AI195754	
AAGGAGAGAGA	0	4	1.18		
AAGCTCCAGGA	0	4	1.18		
AAGCGCTGTAG	0	4	1.18		
AAGCATTACAA	0	4	1.18		
AACAGTCAACA	0	4	1.18		SC1
AAAGGACAGCA	0	4	1.18		

- Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merrill CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, et al. (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252:1651-6.
- Adams MD, Dubnick M, Kerlavage AR, Moreno R, Kelley JM, Utterback TR, Nagle JW, Fields C, Venter JC (1992) Sequence identification of 2,375 human brain genes [see comments]. *Nature* 355:632-4.
- Adelman G (1987) *Encyclopedia of Neuroscience*.
- Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV, Suter U (1995) Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22- deficient mice. *Nat Genet* 11:274-80.
- Afar DE, Salzer JL, Roder J, Braun PE, Bell JC (1990) Differential phosphorylation of myelin-associated glycoprotein isoforms in cell culture. *J Neurochem* 55:1418-26.
- Ainger K, Avossa D, Morgan F, Hill SJ, Barry C, Barbarese E, Carson JH (1993) Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J Cell Biol* 123:431-41.
- Ainger K, Avossa D, Diana AS, Barry C, Barbarese E, Carson JH (1997) Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *J Cell Biol* 138:1077-87.
- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5350-4.
- Aran JM, Gottesman MM, Pastan I (1994) Drug-selected coexpression of human glucocerebrosidase and P-glycoprotein using a bicistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3176-80.
- Armstrong RC, Kim JG, Hudson LD (1995) Expression of myelin transcription factor I (MyTI), a "zinc-finger" DNA-binding protein, in developing oligodendrocytes. *Glia* 14:303-21.
- Arquint M, Roder J, Chia LS, Down J, Wilkinson D, Bayley H, Braun P, Dunn R (1987) Molecular cloning and primary structure of myelin-associated glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:600-4.
- Audic S, Claverie JM (1997) The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res* 7:986-95.
- Awatramani R, Scherer S, Grinspan J, Collarini E, Skoff R, D OH, Garbern J, Kamholz J (1997) Evidence that the homeodomain protein Gtx is involved in the regulation of oligodendrocyte myelination. *J Neurosci* 17:6657-68.
- Bark IC, Hahn KM, Ryabinin AE, Wilson MC (1995) Differential expression of SNAP-25 protein isoforms during divergent vesicle fusion events of neural development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1510-4.
- Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC (1992) Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70:31-46.
- Barres BA, Lazar MA, Raff MC (1994) A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development* 120:1097-108.
- Bartsch U, Kirchhoff F, Schachner M (1989) Immunohistological localization of the adhesion molecules L1, N-CAM, and MAG in the developing and adult optic nerve of mice. *J Comp Neurol* 284:451-62.
- Bartsch U, Montag D, Bartsch S, Schachner M (1995) Multiply myelinated axons in the optic nerve of mice deficient for the myelin-associated glycoprotein. *Glia* 14:115-22.
- Beilharz EJ, Zhukovsky E, Lanahan AA, Worley PF, Nikolich K, Goodman LJ (1998) Neuronal activity induction of the stathmin-like gene RB3 in the rat hippocampus: possible role in neuronal plasticity. *J Neurosci* 18:9780-9.
- Benjamins JA, Nedelkoska L (1994) Maintenance of membrane sheets by cultured oligodendrocytes requires continuous microtubule turnover and Golgi transport. *Neurochem Res* 19:631-9.
- Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH (1993) Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262:2039-42.
- Bernard CC, Johns TG, Slavin A, Ichikawa M, Ewing C, Liu J, Bettadapura J (1997) Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med* 75:77-88.
- Bhat S, Silberberg DH (1988) NCAM-180, the largest component of the neural cell adhesion molecule, is reduced in dysmyelinating quaking mutant mouse brain. *Brain Res* 452:373-7.
- Bizzozero OA, Good LK, Evans JE (1990) Cysteine-108 is an acylation site in myelin proteolipid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 170:375-82.
- Blanco G, Mercer RW (1998) Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol* 275:F633-50.
- Boggs JM, Yip PM, Rangaraj G, Jo E (1997) Effect of posttranslational modifications to myelin basic protein on its ability to aggregate acidic lipid vesicles. *Biochemistry* 36:5065-71.
- Bogler O, Wren D, Barnett SC, Land H, Noble M (1990) Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6368-72.
- Boison D, Stoffel W (1989) Myelin-deficient rat: a point mutation in exon III (A----C, Thr75---- Pro) of the myelin proteolipid protein causes dysmyelination and oligodendrocyte death. *Embo J* 8:3295-302.
- Boison D, Stoffel W (1994) Disruption of the compacted myelin sheath of axons of the central nervous system in proteolipid protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11709-13.

- Boison D, Bussow H, D DU, Muller HW ,Stoffel W (1995) Adhesive properties of proteolipid protein are responsible for the compaction of CNS myelin sheaths. *J Neurosci* 15:5502-13.
- Bongarzone ER, Campagnoni CW, Kampf K, Jacobs EC, Handley VW, Schonmann V ,Campagnoni AT (1999) Identification of a new exon in the myelin proteolipid protein gene encoding novel protein isoforms that are restricted to the somata of oligodendrocytes and neurons [In Process Citation]. *J Neurosci* 19:8349-57.
- Borst P ,Grivell LA (1981) Small is beautiful--portrait of a mitochondrial genome [news]. *Nature* 290:443-4.
- Bosio A, Binczek E ,Stoffel W (1996) Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13280-5.
- Bosio A, Bussow H, Adam J ,Stoffel W (1998) Galactosphingolipids and axono-glia interaction in myelin of the central nervous system. *Cell Tissue Res* 292:199-210.
- Boulias C ,Moscarello MA (1990) ADP-ribosylation of myelin basic proteins isolated from normal and mutant mouse brains. *Neuroreport* 1:221-4.
- Bradbury JM ,Thompson RJ (1984) Photoaffinity labelling of central-nervous-system myelin. Evidence for an endogenous type I cyclic AMP-dependent kinase phosphorylating the larger subunit of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. *Biochem J* 221:361-8.
- Braun PE, De Angelis D, Shtybel WW ,Bernier L (1991) Isoprenoid modification permits 2',3'-cyclic nucleotide 3'- phosphodiesterase to bind to membranes. *J Neurosci Res* 30:540-4.
- Brines ML ,Robbins RJ (1993) Cell-type specific expression of Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase catalytic subunits in cultured neurons and glia: evidence for polarized distribution in neurons. *Brain Res* 631:1-11.
- Brines ML ,Robbins RJ (1993) Glutamate up-regulates alpha 1 and alpha 2 subunits of the sodium pump in astrocytes of mixed telencephalic cultures but not in pure astrocyte cultures. *Brain Res* 631:12-21.
- Bronstein JM, Popper P, Micevych PE ,Farber DB (1996) Isolation and characterization of a novel oligodendrocyte-specific protein. *Neurology* 47:772-8.
- Bronstein JM, Micevych PE ,Chen K (1997) Oligodendrocyte-specific protein (OSP) is a major component of CNS myelin. *J Neurosci Res* 50:713-20.
- Brunner C, Lassmann H, Waehnelndt TV, Matthieu JM ,Linington C (1989) Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J Neurochem* 52:296-304.
- Budzinski (1987) Dissertation.
- Caceres A, Payne MR, Binder LI ,Steward O (1983) Immunocytochemical localization of actin and microtubule-associated protein MAP2 in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:1738-42.
- Calver AR, Hall AC, Yu WP, Walsh FS, Heath JK, Betsholtz C ,Richardson WD (1998) Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron* 20:869-82.
- Campagnoni CW, Carey GD ,Campagnoni AT (1978) Synthesis of myelin basic proteins in the developing mouse brain. *Arch Biochem Biophys* 190:118-25.
- Campagnoni CW, Garbay B, Micevych P, Pribyl T, Kampf K, Handley VW ,Campagnoni AT (1992) DM20 mRNA splice product of the myelin proteolipid protein gene is expressed in the murine heart. *J Neurosci Res* 33:148-55.
- Campagnoni AT, Pribyl TM, Campagnoni CW, Kampf K, Amur-Umarjee S, Landry CF, Handley VW, Newman SL, Garbay B ,Kitamura K (1993) Structure and developmental regulation of Golli-mbp, a 105-kilobase gene that encompasses the myelin basic protein gene and is expressed in cells in the oligodendrocyte lineage in the brain. *J Biol Chem* 268:4930-8.
- Canoll PD, Musacchio JM, Hardy R, Reynolds R, Marchionni MA ,Salzer JL (1996) GGF/neuregulin is a neuronal signal that promotes the proliferation and survival and inhibits the differentiation of oligodendrocyte progenitors. *Neuron* 17:229-43.
- Carson JH, Nielson ML ,Barbarese E (1983) Developmental regulation of myelin basic protein expression in mouse brain. *Dev Biol* 96:485-92.
- Carson JH, Worboys K, Ainger K ,Barbarese E (1997) Translocation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes requires microtubules and kinesin. *Cell Motil Cytoskeleton* 38:318-28.
- Cheifetz S, Boggs JM ,Moscarello MA (1985) Increase in vesicle permeability mediated by myelin basic protein: effect of phosphorylation of basic protein. *Biochemistry* 24:5170-5.
- Chenn A ,McConnell SK (1995) Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82:631-41.
- Chernoff GF (1981) Shiverer: an autosomal recessive mutant mouse with myelin deficiency. *J Hered* 72:128.
- Clayton DF ,George JM (1999) Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res* 58:120-9.

- Coetzee T, Fujita N, Dupree J, Shi R, Blight A, Suzuki K, Suzuki K, Popko B (1996) Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell* 86:209-19.
- Colman DR, Kreibich G, Frey AB, Sabatini DD (1982) Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J Cell Biol* 95:598-608.
- Cox ME, Gao EN, Braun PE (1994) C-terminal CTII motif of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase undergoes carboxymethylation. *J Neurosci Res* 39:513-8.
- Cui Y, Gonzalez CI, Kinzy TG, Dinman JD, Peltz SW (1999) Mutations in the MOF2/SUI1 gene affect both translation and nonsense-mediated mRNA decay. *Rna* 5:794-804.
- de Ferra F, Engh H, Hudson L, Kamholz J, Puckett C, Molineaux S, Lazzarini RA (1985) Alternative splicing accounts for the four forms of myelin basic protein. *Cell* 43:721-7.
- della Gaspera B, Pham-Dinh D, Roussel G, Nussbaum JL, Dautigny A (1998) Membrane topology of the myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Eur J Biochem* 258:478-84.
- Demerens C, Stankoff B, Logak M, Anglade P, Allinquant B, Couraud F, Zalc B, Lubetzki C (1996) Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9887-92.
- DeVille JW, L. A. (1992) In R. E. Martenson (ed.) *Synthesis and turnover of myelin phospholipids and cholesterol*. CRC Press, London.
- DeVries GH, Norton WT (1974) The fatty acid composition of sphingolipids from bovine CNS axons and myelin. *J Neurochem* 22:251-7.
- Dickinson PJ, Griffiths IR, Barrie JM, Kyriakides E, Pollock GF, Barnett SC (1997) Expression of the dm-20 isoform of the plp gene in olfactory nerve ensheathing cells: evidence from developmental studies. *J Neurocytol* 26:181-9.
- Diehl HJ, Schaich M, Budzinski RM, Stoffel W (1986) Individual exons encode the integral membrane domains of human myelin proteolipid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9807-11.
- Ding Y, Brunden KR (1994) The cytoplasmic domain of myelin glycoprotein P0 interacts with negatively charged phospholipid bilayers. *J Biol Chem* 269:10764-70.
- Dirks W, Wirth M, Hauser H (1993) Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells. *Gene* 128:247-9.
- Dolnick BJ (1997) Naturally occurring antisense RNA. *Pharmacol Ther* 75:179-84.
- Donato R (1988) Calcium-independent, pH-regulated effects of S-100 proteins on assembly-disassembly of brain microtubule protein in vitro. *J Biol Chem* 263:106-10.
- Doyle JP, Colman DR (1993) Glial-neuron interactions and the regulation of myelin formation. *Curr Opin Cell Biol* 5:779-85.
- Dubois-Dalq M (1987) Characterization of a slowly proliferative cell along the oligodendrocyte differentiation pathway. *Embo J* 6:2587-95.
- Dupree JL, Coetzee T, Blight A, Suzuki K, Popko B (1998) Myelin galactolipids are essential for proper node of Ranvier formation in the CNS. *J Neurosci* 18:1642-9.
- Durand B, Gao FB, Raff M (1997) Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Embo J* 16:306-17.
- Durand B, Fero ML, Roberts JM, Raff MC (1998) p27kip1 alters the response of cells to mitogen and is part of a cell-intrinsic timer that arrests the cell cycle and initiates differentiation. *Curr Biol* 8:431-40.
- Dyer CA (1993) Novel oligodendrocyte transmembrane signaling systems. Investigations utilizing antibodies as ligands. *Mol Neurobiol* 7:1-22.
- Dyer CA, Matthieu JM (1994) Antibodies to myelin/oligodendrocyte-specific protein and myelin/oligodendrocyte glycoprotein signal distinct changes in the organization of cultured oligodendroglial membrane sheets. *J Neurochem* 62:777-87.
- Dyer CA, Philibotte TM, Billings-Gagliardi S, Wolf MK (1995) Cytoskeleton in myelin-basic-protein-deficient shiverer oligodendrocytes. *Dev Neurosci* 17:53-62.
- Dyer CA, Philibotte T, Wolf MK, Billings-Gagliardi S (1997) Regulation of cytoskeleton by myelin components: studies on shiverer oligodendrocytes carrying an Mbp transgene. *Dev Neurosci* 19:395-409.
- Edelman GM, Chuong CM (1982) Embryonic to adult conversion of neural cell adhesion molecules in normal and staggerer mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:7036-40.
- Edlund T, Jessell TM (1999) Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* 96:211-24.
- Erickson AK, Payne DM, Martino PA, Rossomando AJ, Shabanowitz J, Weber MJ, Hunt DF, Sturgill TW (1990) Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 265:19728-35.
- Fewster ME, Blackstone S (1975) In vitro study of bovine oligodendroglia. *Neurobiology* 5:316-28.

- Filbin MT, Walsh FS, Trapp BD, Pizzey JA, Tennekoon GI (1990) Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule. *Nature* 344:871-2.
- Fink D, Knapp PE, Mata M (1996) Differential expression of Na,K-ATPase isoforms in oligodendrocytes and astrocytes. *Dev Neurosci* 18:319-26.
- Folch F, Lees, M. B. (1951) Proteolipids, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain. *J. Biol.Chem.* 191:807-817.
- Fruttiger M, Montag D, Schachner M, Martini R (1995) Crucial role for the myelin-associated glycoprotein in the maintenance of axon-myelin integrity. *Eur J Neurosci* 7:511-5.
- Fruttiger M, Karlsson L, Hall AC, Abramsson A, Calver AR, Boström H, Willetts K, Bertold CH, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD (1999) Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development* 126:457-467.
- Fujita N, Kemper A, Dupree J, Nakayasu H, Bartsch U, Schachner M, Maeda N, Suzuki K, Popko B (1998) The cytoplasmic domain of the large myelin-associated glycoprotein isoform is needed for proper CNS but not peripheral nervous system myelination. *J Neurosci* 18:1970-8.
- Gai WP, Power JH, Blumbergs PC, Culvenor JG, Jensen PH (1999) Alpha-synuclein immunoisolation of glial inclusions from multiple system atrophy brain tissue reveals multiprotein components. *J Neurochem* 73:2093-100.
- Gallo V, Zhou JM, McBain CJ, Wright P, Knutson PL, Armstrong RC (1996) Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K⁺ channel block. *J Neurosci* 16:2659-70.
- Garcia-Ladona FJ, Huss Y, Frey P, Ghandour MS (1997) Oligodendrocytes express different isoforms of beta-amyloid precursor protein in chemically defined cell culture conditions: in situ hybridization and immunocytochemical detection. *J Neurosci Res* 50:50-61.
- Gardinier MV, Macklin WB, Diniak AJ, Deininger PL (1986) Characterization of myelin proteolipid mRNAs in normal and jimpy mice. *Mol Cell Biol* 6:3755-62.
- Gardinier MV, Macklin WB (1988) Myelin proteolipid protein gene expression in jimpy and jimpy(msd) mice. *J Neurochem* 51:360-9.
- Gavet O, Ozon S, Manceau V, Lawler S, Curmi P, Sobel A (1998) The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network. *J Cell Sci* 111:3333-46.
- Gencic S, Hudson LD (1990) Conservative amino acid substitution in the myelin proteolipid protein of jimpymsd mice. *J Neurosci* 10:117-24.
- Ghiani CA, Yuan X, Eisen AM, Knutson PL, DePinho RA, McBain CJ, Gallo V (1999) Voltage-activated K⁺ channels and membrane depolarization regulate accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27(Kip1) and p21(CIP1) in glial progenitor cells. *J Neurosci* 19:5380-92.
- Ghiani CA, Eisen AM, Yuan X, DePinho RA, McBain CJ, Gallo V (1999) Neurotransmitter receptor activation triggers p27(Kip1) and p21(CIP1) accumulation and G1 cell cycle arrest in oligodendrocyte progenitors. *Development* 126:1077-90.
- Giese KP, Martini R, Lemke G, Soriano P, Schachner M (1992) Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell* 71:565-76.
- Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885-90.
- Gloor S, Antonicek H, Sweadner KJ, Pagliusi S, Frank R, Moos M, Schachner M (1990) The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the beta subunit of the Na,K-ATPase. *J Cell Biol* 110:165-74.
- Glynn IM (1993) Annual review prize lecture. 'All hands to the sodium pump'. *J Physiol (Lond)* 462:1-30.
- Goodrum JF (1991) Cholesterol from degenerating nerve myelin becomes associated with lipoproteins containing apolipoprotein E. *J Neurochem* 56:2082-6.
- Gould RM, Byrd AL, Barbarese E (1995) The number of Schmidt-Lanterman incisures is more than doubled in shiverer PNS myelin sheaths. *J Neurocytol* 24:85-98.
- Gow A, Friedrich VL, Jr., Lazzarini RA (1992) Myelin basic protein gene contains separate enhancers for oligodendrocyte and Schwann cell expression. *J Cell Biol* 119:605-16.
- Gow A, Friedrich VL, Jr., Lazzarini RA (1994) Many naturally occurring mutations of myelin proteolipid protein impair its intracellular transport. *J Neurosci Res* 37:574-83.
- Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie SE, Dianas J, Bronstein JM, Kachar B, Lazzarini RA (1999) CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice. *Cell* 99:649-59.
- Griffiths IR, Scott I, McCulloch MC, Barrie JA, McPhilemy K, Cattanach BM (1990) Rumpshaker mouse: a new X-linked mutation affecting myelination: evidence for a defect in PLP expression. *J Neurocytol* 19:273-83.

- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Thomson C, Vouyiouklis D, Nave KA (1998) Current concepts of PLP and its role in the nervous system. *Microsc Res Tech* 41:344-58.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA (1998) Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280:1610-3.
- Gutierrez R, Boison D, Heinemann U, Stoffel W (1995) Decompaction of CNS myelin leads to a reduction of the conduction velocity of action potentials in optic nerve. *Neurosci Lett* 195:93-6.
- Haas S, Gordon J, Khalili K (1993) A developmentally regulated DNA-binding protein from mouse brain stimulates myelin basic protein gene expression. *Mol Cell Biol* 13:3103-12.
- Haas NS, Shipley GG (1995) Structure and properties of N-palmitoleoylgalactosylsphingosine (cerebroside). *Biochim Biophys Acta* 1240:133-41.
- Habib AA, Marton LS, Allwardt B, Gulcher JR, Mikol DD, Hognason T, Chattopadhyay N, Stefansson K (1998) Expression of the oligodendrocyte-myelin glycoprotein by neurons in the mouse central nervous system. *J Neurochem* 70:1704-11.
- Hammer JA, DJ OS, De Leon M, Gould R, Zand D, Daune G, Quarles RH (1993) Immunoreactivity of PMP-22, P0, and other 19 to 28 kDa glycoproteins in peripheral nerve myelin of mammals and fish with HNK1 and related antibodies. *J Neurosci Res* 35:546-58.
- Hardy RJ (1998) QKI expression is regulated during neuron-glia cell fate decisions. *J Neurosci Res* 54:46-57.
- Hardy RJ (1998) Molecular defects in the dysmyelinating mutant quaking. *J Neurosci Res* 51:417-22.
- Hedrick SM, Cohen DI, Nielsen EA, Davis MM (1984) Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* 308:149-53.
- Hess EJ, Collins KA, Wilson MC (1996) Mouse model of hyperkinesis implicates SNAP-25 in behavioral regulation. *J Neurosci* 16:3104-11.
- Himmler A (1989) Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol Cell Biol* 9:1389-96.
- Hodel A (1998) Snap-25. *Int J Biochem Cell Biol* 30:1069-73.
- Hodes ME, Zimmerman AW, Aydanian A, Naidu S, Miller NR, Garcia Oller JL, Barker B, Aleck KA, Hurley TD, Dlouhy SR (1999) Different mutations in the same codon of the proteolipid protein gene, PLP, may help in correlating genotype with phenotype in Pelizaeus-Merzbacher disease/X-linked spastic paraplegia (PMD/SPG2). *Am J Med Genet* 82:132-9.
- Hoek KS, Kidd GJ, Carson JH, Smith R (1998) hnRnp A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry* 37:7021-9.
- Hogan (1984) In P. Morell (ed.) *Animal Models of genetic disorders of myelin*, pp. 489-534.
- Hogan E, Costantini, F. and Lacy, E. (1986) Manipulating the mouse embryo.
- Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D, Paul SM (2000) Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2892-7.
- Hsu SC, Hazuka CD, Roth R, Foletti DL, Heuser J, Scheller RH (1998) Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron* 20:1111-22.
- Hudson LD, Puckett C, Berndt J, Chan J, Gencic S (1989) Mutation of the proteolipid protein gene PLP in a human X chromosome-linked myelin disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8128-31.
- Hundal HS, Marette A, Mitsumoto Y, Ramlal T, Blostein R, Klip A (1992) Insulin induces translocation of the alpha 2 and beta 1 subunits of the Na⁺/K⁺-ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem* 267:5040-3.
- Huttner WB, Brand M (1997) Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Curr Opin Neurobiol* 7:29-39.
- Ignatius MJ, Gebicke-Harter PJ, Skene JH, Schilling JW, Weisgraber KH, Mahley RW, Shooter EM (1986) Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:1125-9.
- Ikenaka K, Kagawa T, Mikoshiba K (1992) Selective expression of DM-20, an alternatively spliced myelin proteolipid protein gene product, in developing nervous system and in nonglial cells. *J Neurochem* 58:2248-53.
- Inuzuka T, Fujita N, Sato S, Baba H, Nakano R, Ishiguro H, Miyatake T (1991) Expression of the large myelin-associated glycoprotein isoform during the development in the mouse peripheral nervous system. *Brain Res* 562:173-5.
- Jaegle M, Mandemakers W, Broos L, Zwart R, Karis A, Visser P, Grosveld F, Meijer D (1996) The POU factor Oct-6 and Schwann cell differentiation. *Science* 273:507-10.

- Jaramillo ML, Afar DE, Almazan G, Bell JC (1994) Identification of tyrosine 620 as the major phosphorylation site of myelin-associated glycoprotein and its implication in interacting with signaling molecules. *J Biol Chem* 269:27240-5.
- Jensen PH, Hager H, Nielsen MS, Hojrup P, Gliemann J, Jakes R (1999) alpha-synuclein binds to Tau and stimulates the protein kinase a-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. *J Biol Chem* 274:25481-9.
- Joe EH, Angelides KJ (1993) Clustering and mobility of voltage-dependent sodium channels during myelination. *J Neurosci* 13:2993-3005.
- Johnson RS, Roder JC, Riordan JR (1995) Over-expression of the DM-20 myelin proteolipid causes central nervous system demyelination in transgenic mice. *J Neurochem* 64:967-76.
- Juhaszova M, Blaustein MP (1997) Na⁺ pump low and high ouabain affinity alpha subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1800-5.
- Kagawa T, Ikenaka K, Inoue Y, Kuriyama S, Tsujii T, Nakao J, Nakajima K, Aruga J, Okano H, Mikoshiba K (1994) Glial cell degeneration and hypomyelination caused by overexpression of myelin proteolipid protein gene. *Neuron* 13:427-42.
- Kamholz J, de Ferra F, Puckett C, Lazzarini R (1986) Identification of three forms of human myelin basic protein by cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4962-6.
- Kaplan MR, Meyer-Franke A, Lambert S, Bennett V, Duncan ID, Levinson SR, Barres BA (1997) Induction of sodium channel clustering by oligodendrocytes. *Nature* 386:724-8.
- Kim S, Lim IK, Park GH, Paik WK (1997) Biological methylation of myelin basic protein: enzymology and biological significance. *Int J Biochem Cell Biol* 29:743-51.
- Kim JG, Armstrong RC, v. Agoston D, Robinsky A, Wiese C, Nagle J, Hudson LD (1997) Myelin transcription factor 1 (Myt1) of the oligodendrocyte lineage, along with a closely related CCHC zinc finger, is expressed in developing neurons in the mammalian central nervous system. *J Neurosci Res* 50:272-90.
- Kimura M, Sato M, Akatsuka A, Nozawa-Kimura S, Takahashi R, Yokoyama M, Nomura T, Katsuki M (1989) Restoration of myelin formation by a single type of myelin basic protein in transgenic shiverer mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5661-5.
- Kimura M, Sato M, Akatsuka A, Saito S, Ando K, Yokoyama M, Katsuki M (1998) Overexpression of a minor component of myelin basic protein isoform (17.2 kDa) can restore myelinogenesis in transgenic shiverer mice. *Brain Res* 785:245-52.
- Kirschner DA, Ganser AL (1980) Compact myelin exists in the absence of basic protein in the shiverer mutant mouse. *Nature* 283:207-10.
- Kitagawa K, Sinoway MP, Yang C, Gould RM, Colman DR (1993) A proteolipid protein gene family: expression in sharks and rays and possible evolution from an ancestral gene encoding a pore-forming polypeptide. *Neuron* 11:433-48.
- Klugmann M, Schwab MH, Puhlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR, Nave KA (1997) Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* 18:59-70.
- Knutson P, Ghiani CA, Zhou JM, Gallo V, McBain CJ (1997) K⁺ channel expression and cell proliferation are regulated by intracellular sodium and membrane depolarization in oligodendrocyte progenitor cells. *J Neurosci* 17:2669-82.
- Kramer EM, Klein C, Koch T, Boytinck M, Trotter J (1999) Compartmentation of Fyn kinase with glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules in oligodendrocytes facilitates kinase activation during myelination. *J Biol Chem* 274:29042-9.
- Kronquist KE, Crandall BF, Macklin WB, Campagnoni AT (1987) Expression of myelin proteins in the developing human spinal cord: cloning and sequencing of human proteolipid protein cDNA. *J Neurosci Res* 18:395-401.
- Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Enderich J, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M (1998) Cooperative function of POU proteins and SOX proteins in glial cells. *J Biol Chem* 273:16050-7.
- Kurihara T, Monoh K, Sakimura K, Takahashi Y (1990) Alternative splicing of mouse brain 2',3'-cyclic-nucleotide 3'- phosphodiesterase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 170:1074-81.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Lai C, Brow MA, Nave KA, Noronha AB, Quarles RH, Bloom FE, Milner RJ, Sutcliffe JG (1987) Two forms of 1B236/myelin-associated glycoprotein, a cell adhesion molecule for postnatal neural development, are produced by alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4337-41.
- Laird PW, Zijderfeld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A (1991) Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* 19:4293.
- Landry CF, Ellison JA, Pribyl TM, Campagnoni C, Kampf K, Campagnoni AT (1996) Myelin basic protein gene expression in neurons: developmental and regional changes in protein targeting within neuronal nuclei, cell bodies, and processes. *J Neurosci* 16:2452-62.

- Landry CF, Ellison J, Skinner E, Campagnoni AT (1997) Golli-MBP proteins mark the earliest stages of fiber extension and terminal arboration in the mouse peripheral nervous system. *J Neurosci Res* 50:265-71.
- Ledesma MD, Simons K, Dotti CG (1998) Neuronal polarity: essential role of protein-lipid complexes in axonal sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3966-71.
- Lees M, Brostoff, SW (1984) *Proteins of myelin*. Plenum Press, New York.
- Lees MB, Bizzozero OA (1992) Structure and acylation of proteolipid protein. CRC Press, Boca Raton.
- Lemke G, Axel R (1985) Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin. *Cell* 40:501-8.
- Li C, Tropak MB, Gerlai R, Clapoff S, Abramow-Newerly W, Trapp B, Peterson A, Roder J (1994) Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein. *Nature* 369:747-50.
- Li AW, Seyoum G, Shiu RP, Murphy PR (1996) Expression of the rat BFGF antisense RNA transcript is tissue-specific and developmentally regulated. *Mol Cell Endocrinol* 118:113-23.
- Liang P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [see comments]. *Science* 257:967-71.
- Lim K, Chae CB (1989) A simple assay for DNA transfection by incubation of the cells in culture dishes with substrates for beta-galactosidase. *Biotechniques* 7:576-9.
- Lin LF, Lees MB (1982) Interactions of dicyclohexylcarbodiimide with myelin proteolipid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:941-5.
- Linington C, Lassmann H (1987) Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: correlation of serum demyelinating activity with antibody titre to the myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *J Neuroimmunol* 17:61-9.
- Lintner RN, Dyer CA (2000) Redistribution of cholesterol in oligodendrocyte membrane sheets after activation of distinct signal transduction pathways [In Process Citation]. *J Neurosci Res* 60:437-49.
- Livingston RB, Pfenniger K, Moor H, Akert K (1973) Specialized paranodal and interparanodal glial-axonal junctions in the peripheral and central nervous system: a freeze-etching study. *Brain Res* 58:1-24.
- Lopez-Fernandez LA, Parraga M, del Mazo J (1998) Tex261, a novel gene presumably related but distinct from steroidogenic acute regulatory (StAR) gene, is regulated during the development of germ cells. *Biochem Biophys Res Commun* 242:565-9.
- Lytton J, Lin JC, Guidotti G (1985) Identification of two molecular forms of (Na⁺,K⁺)-ATPase in rat adipocytes. Relation to insulin stimulation of the enzyme. *J Biol Chem* 260:1177-84.
- Magyar JP, Bartsch U, Wang ZQ, Howells N, Aguzzi A, Wagner EF, Schachner M (1994) Degeneration of neural cells in the central nervous system of mice deficient in the gene for the adhesion molecule on Glia, the beta 2 subunit of murine Na,K-ATPase. *J Cell Biol* 127:835-45.
- Martini R, Schachner M (1986) Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and MAG) and their shared carbohydrate epitope and myelin basic protein in developing sciatic nerve. *J Cell Biol* 103:2439-48.
- Martini R, Mohajeri MH, Kasper S, Giese KP, Schachner M (1995) Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin. *J Neurosci* 15:4488-95.
- Matteoli M, Takei K, Perin MS, Sudhof TC, De Camilli P (1992) Exo-endocytotic recycling of synaptic vesicles in developing processes of cultured hippocampal neurons. *J Cell Biol* 117:849-61.
- McGrail KM, Phillips JM, Sweadner KJ (1991) Immunofluorescent localization of three Na,K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na,K-ATPase. *J Neurosci* 11:381-91.
- McKinnon RD, Matsui T, Dubois-Dalcq M, Aaronson SA (1990) FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron* 5:603-14.
- McKinnon PJ, Margolskee RF (1996) SC1: a marker for astrocytes in the adult rodent brain is upregulated during reactive astrocytosis. *Brain Res* 709:27-36.
- McKinnon PJ, McLaughlin SK, Kapsetaki M, Margolskee RF (2000) Extracellular matrix-associated protein Sc1 is not essential for mouse development. *Mol Cell Biol* 20:656-60.
- Mendz GL (1992) In R. E. Martenson (ed.) *Structure and molecular interactions of myelin basic protein and its antigenic peptides*. CRC Press, London.
- Menon KK, Piddlesden SJ, Bernard CC (1997) Demyelinating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein and galactocerebroside induce degradation of myelin basic protein in isolated human myelin. *J Neurochem* 69:214-22.
- Mikol DD, Stefansson K (1988) A phosphatidylinositol-linked peanut agglutinin-binding glycoprotein in central nervous system myelin and on oligodendrocytes. *J Cell Biol* 106:1273-9.
- Mikol DD, Gulcher JR, Stefansson K (1990) The oligodendrocyte-myelin glycoprotein belongs to a distinct family of proteins and contains the HNK-1 carbohydrate. *J Cell Biol* 110:471-9.

- Milner RJ, Lai C, Nave KA, Lenoir D, Ogata J, Sutcliffe JG (1985) Nucleotide sequences of two mRNAs for rat brain myelin proteolipid protein. *Cell* 42:931-9.
- Milner R, Edwards G, Streuli C, French-Constant C (1996) A role in migration for the alpha V beta 1 integrin expressed on oligodendrocyte precursors. *J Neurosci* 16:7240-52.
- Molineaux SM, Engh H, de Ferra F, Hudson L, Lazzarini RA (1986) Recombination within the myelin basic protein gene created the dysmyelinating shiverer mouse mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:7542-6.
- Montag D, Giese KP, Bartsch U, Martini R, Lang Y, Bluthmann H, Karthigasan J, Kirschner DA, Wintergerst ES, Nave KA, et al. (1994) Mice deficient for the myelin-associated glycoprotein show subtle abnormalities in myelin. *Neuron* 13:229-46.
- Morell P, Norton WT (1980) Myelin. *Sci Am* 242:88-90, 92, 96 passim.
- Morgan RA, Couture L, Elroy-Stein O, Ragheb J, Moss B, Anderson WF (1992) Retroviral vectors containing putative internal ribosome entry sites: development of a polycistronic gene transfer system and applications to human gene therapy. *Nucleic Acids Res* 20:1293-9.
- Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, Furuse M, Tsukita S (1999) Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J Cell Biol* 145:579-88.
- Muller R, Heinrich M, Heck S, Blohm D, Richter-Landsberg C (1997) Expression of microtubule-associated proteins MAP2 and tau in cultured rat brain oligodendrocytes. *Cell Tissue Res* 288:239-49.
- Mutschler E (1991) Arzneimittelwirkung. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Nadon NL, Duncan ID, Hudson LD (1990) A point mutation in the proteolipid protein gene of the 'shaking pup' interrupts oligodendrocyte development. *Development* 110:529-37.
- Nadon NL, Arnheiter H, Hudson LD (1994) A combination of PLP and DM20 transgenes promotes partial myelination in the jimpy mouse. *J Neurochem* 63:822-33.
- Nagy JI, Li W, Hertzberg EL, Marotta CA (1996) Elevated connexin43 immunoreactivity at sites of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Brain Res* 717:173-8.
- Nave KA, Lai C, Bloom FE, Milner RJ (1987) Splice site selection in the proteolipid protein (PLP) gene transcript and primary structure of the DM-20 protein of central nervous system myelin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5665-9.
- Nave KA, Bloom FE, Milner RJ (1987) A single nucleotide difference in the gene for myelin proteolipid protein defines the jimpy mutation in mouse. *J Neurochem* 49:1873-7.
- Nelles E, Butzler C, Jung D, Temme A, Gabriel HD, Dahl U, Traub O, Stumpel F, Jungermann K, Zielasek J, Toyka KV, Dermietzel R, Willecke K (1996) Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9565-70.
- Newman S, Kitamura K, Campagnoni AT (1987) Identification of a cDNA coding for a fifth form of myelin basic protein in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:886-90.
- Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB (1996) Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. *J Neurosci Res* 43:299-314.
- Noble M, Wren D, Wolswijk G (1992) The O-2A(adult) progenitor cell: a glial stem cell of the adult central nervous system. *Semin Cell Biol* 3:413-22.
- Norton WT, Poduslo SE (1973) Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J Neurochem* 21:749-57.
- Ochalski PA, Sawchuk MA, Hertzberg EL, Nagy JI (1995) Astrocytic gap junction removal, connexin43 redistribution, and epitope masking at excitatory amino acid lesion sites in rat brain. *Glia* 14:279-94.
- Omlin FX, Webster HD, Palkovits CG, Cohen SR (1982) Immunocytochemical localization of basic protein in major dense line regions of central and peripheral myelin. *J Cell Biol* 95:242-8.
- Otterbach B, Stoffel W, Ramaekers V (1993) A novel mutation in the proteolipid protein gene leading to Pelizaeus-Merzbacher disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 374:75-83.
- Ozon S, El Mestikawy S, Sobel A (1999) Differential, regional, and cellular expression of the stathmin family transcripts in the adult rat brain. *J Neurosci Res* 56:553-64.
- Pedraza L, Frey AB, Hempstead BL, Colman DR, Salzer JL (1991) Differential expression of MAG isoforms during development. *J Neurosci Res* 29:141-8.
- Pedraza L (1997) Nuclear transport of myelin basic protein. *J Neurosci Res* 50:258-64.
- Pedraza L, Fidler L, Staugaitis SM, Colman DR (1997) The active transport of myelin basic protein into the nucleus suggests a regulatory role in myelination. *Neuron* 18:579-89.
- Peters A (1961) A radial component of central myelin sheaths. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11:733-735.
- Pham-Dinh D, Mattei MG, Nussbaum JL, Roussel G, Pontarotti P, Roedel N, Mather IH, Artzt K, Lindahl KF, Dautigny A (1993) Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7990-4.
- Pirollet F, Derancourt J, Haiech J, Job D, Margolis RL (1992) Ca(2+)-calmodulin regulated effectors of microtubule stability in bovine brain. *Biochemistry* 31:8849-55.

- Popot JL, Pham Dinh D ,Dautigny A (1991) Major Myelin proteolipid: the 4-alpha-helix topology [published erratum appears in J Membr Biol 1991 Sep;123(3):278]. J Membr Biol 120:233-46.
- Prasad K, Barouch W, Martin BM, Greene LE ,Eisenberg E (1995) Purification of a new clathrin assembly protein from bovine brain coated vesicles and its identification as myelin basic protein. J Biol Chem 270:30551-6.
- Pribyl TM, Campagnoni C, Kampf K, Handley VW ,Campagnoni AT (1996) The major myelin protein genes are expressed in the human thymus. J Neurosci Res 45:812-9.
- Price DL, Sisodia SS ,Borchelt DR (1998) Genetic neurodegenerative diseases: the human illness and transgenic models. Science 282:1079-83.
- Raff MC (1989) Glial cell diversification in the rat optic nerve. Science 243:1450-5.
- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y ,Jacobson MD (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. Science 262:695-700.
- Raine CS (1984) On the association between perinodal astrocytic processes and the node of Ranvier in the C.N.S. J Neurocytol 13:21-7.
- Ranvier L (1871) Contributions à l'histologie et à physiologie des nerfs périphériques. C.R. Acad.Sci 73:1168-1171.
- Readhead C, Popko B, Takahashi N, Shine HD, Saavedra RA, Sidman RL ,Hood L (1987) Expression of a myelin basic protein gene in transgenic shiverer mice: correction of the dysmyelinating phenotype. Cell 48:703-12.
- Readhead C, Schneider A, Griffiths I ,Nave KA (1994) Premature arrest of myelin formation in transgenic mice with increased proteolipid protein gene dosage. Neuron 12:583-95.
- Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM ,Rossant J (1995) Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43 [see comments]. Science 267:1831-4.
- Regueiro P, Monreal J, Diaz RS ,Sierra F (1996) Preparation of giant myelin vesicles and proteoliposomes to register ionic channels. J Neurochem 67:2146-54.
- Richter-Landsberg C ,Gorath M (1999) Developmental regulation of alternatively spliced isoforms of mRNA encoding MAP2 and tau in rat brain oligodendrocytes during culture maturation. J Neurosci Res 56:259-70.
- Rietveld A ,Simons K (1998) The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. Biochim Biophys Acta 1376:467-79.
- Roach A, Boylan K, Horvath S, Prusiner SB ,Hood LE (1983) Characterization of cloned cDNA representing rat myelin basic protein: absence of expression in brain of shiverer mutant mice. Cell 34:799-806.
- Roach A, Takahashi N, Pravtcheva D, Ruddle F ,Hood L (1985) Chromosomal mapping of mouse myelin basic protein gene and structure and transcription of the partially deleted gene in shiverer mutant mice. Cell 42:149-55.
- Robertson JD (1959) Preliminary observations on the ultrastructure of nodes of Ranvier. Z. Zellforsch 50:553-560.
- Robertson EJ (1987) Teratocarcinomas and embryonic stem cells; a practical approach, Oxford, Washington, D.C.
- Robertson EJ (1991) Using embryonic stem cells to introduce mutations into the mouse germ line. Biol Reprod 44:238-45.
- Rosenbluth J (1980) Peripheral myelin in the mouse mutant Shiverer. J Comp Neurol 193:729-39.
- Rosenbluth J, Stoffel W ,Schiff R (1996) Myelin structure in proteolipid protein (PLP)-null mouse spinal cord. J Comp Neurol 371:336-44.
- Rougon G, Deagostini-Bazin H, Hirn M ,Goridis C (1982) Tissue- and developmental stage-specific forms of a neural cell surface antigen linked to differences in glycosylation of a common polypeptide. Embo J 1:1239-44.
- Saccomanno L, Loushin C, Jan E, Punkay E, Artzt K ,Goodwin EB (1999) The STAR protein QKI-6 is a translational repressor. Proc Natl Acad Sci U S A 96:12605-10.
- Sapirstein VS, Nolan CE, Stern R, Gray-Board G ,Beard ME (1992) Identification of plasmalipin as a major constituent of white matter clathrin-coated vesicles. J Neurochem 58:1372-8.
- Sapirstein VS, Durrie R, Berg MJ ,Marks N (1994) Amyloid precursor protein is enriched in axolemma and periaxolemmal-myelin and associated clathrin-coated vesicles. J Neurosci Res 37:348-58.
- Sasahara A, Kott JN, Sasahara M, Raines EW, Ross R ,Westrum LE (1992) Platelet-derived growth factor B-chain-like immunoreactivity in the developing and adult rat brain. Brain Res Dev Brain Res 68:41-53.
- Schafer BW ,Heizmann CW (1996) The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. Trends Biochem Sci 21:134-40.
- Schaich M, Budzinski RM ,Stoffel W (1986) Cloned proteolipid protein and myelin basic protein cDNA. Transcription of the two genes during myelination. Biol Chem Hoppe Seyler 367:825-34.

- Scherer PE, Lederkremer GZ, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF (1996) Cab45, a novel (Ca²⁺)-binding protein localized to the Golgi lumen. *J Cell Biol* 133:257-68.
- Schliess F, Stoffel W (1991) Evolution of the myelin integral membrane proteins of the central nervous system. *Biol Chem Hoppe Seyler* 372:865-74.
- Schneider A, Montague P, Griffiths I, Fanarraga M, Kennedy P, Brophy P, Nave KA (1992) Uncoupling of hypomyelination and glial cell death by a mutation in the proteolipid protein gene. *Nature* 358:758-61.
- Schneider AM, Griffiths IR, Readhead C, Nave KA (1995) Dominant-negative action of the jimpy mutation in mice complemented with an autosomal transgene for myelin proteolipid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4447-51.
- Schreiber J, Enderich J, Sock E, Schmidt C, Richter-Landsberg C, Wegner M (1997) Redundancy of class III POU proteins in the oligodendrocyte lineage. *J Biol Chem* 272:32286-93.
- Scolding NJ, Frith S, Lington C, Morgan BP, Campbell AK, Compston DA (1989) Myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) is a surface marker of oligodendrocyte maturation. *J Neuroimmunol* 22:169-76.
- Scott DA, Greinwald JH, Jr., Marietta JR, Drury S, Swiderski RE, Vinas A, DeAngelis MM, Carmi R, Ramesh A, Kraft ML, Elbedour K, Skworak AB, Friedman RA, Srikumari Srisailapathy CR, Verhoeven K, Van Gamp G, Lovett M, Deininger PL, Batzer MA, Morton CC, Keats BJ, Smith RJ, Sheffield VC (1998) Identification and mutation analysis of a cochlear-expressed, zinc finger protein gene at the DFNB7/11 and dn hearing-loss loci on human chromosome 9q and mouse chromosome 19. *Gene* 215:461-9.
- Shafit-Zagardo B, Kress Y, Zhao ML, Lee SC (1999) A novel microtubule-associated protein-2 expressed in oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. *J Neurochem* 73:2531-7.
- Shamraj OI, Lingrel JB (1994) A putative fourth Na⁺,K⁺-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12952-6.
- Sheng JG, Mrak RE, Bales KR, Cordell B, Paul SM, Jones RA, Woodward S, Zhou XQ, McGinness JM, Griffin WS (2000) Overexpression of the neurotrophic cytokine S100beta precedes the appearance of neuritic beta-amyloid plaques in APPV717F mice. *J Neurochem* 74:295-301.
- Shi J, Marinovich A, Barres BA (1998) Purification and characterization of adult oligodendrocyte precursor cells from the rat optic nerve. *J Neurosci* 18:4627-36.
- Simpson PB, Armstrong RC (1999) Intracellular signals and cytoskeletal elements involved in oligodendrocyte progenitor migration. *Glia* 26:22-35.
- Sinoway MP, Kitagawa K, Timsit S, Hashim GA, Colman DR (1994) Proteolipid protein interactions in transfectants: implications for myelin assembly. *J Neurosci Res* 37:551-62.
- Skou JC, Esmann M (1992) The Na⁺,K⁺-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 24:249-61.
- Snipes GJ, Suter U, Welcher AA, Shooter EM (1992) Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). *J Cell Biol* 117:225-38.
- Solly SK, Thomas JL, Monge M, Demerens C, Lubetzki C, Gardinier MV, Matthieu JM, Zalc B (1996) Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. *Glia* 18:39-48.
- Sommer B, Kohler M, Sprengel R, Seeburg PH (1991) RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67:11-9.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies [letter]. *Nature* 388:839-40.
- Spray DC, Dermietzel R (1995) X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease and other potential gap-junction diseases of the nervous system [see comments]. *Trends Neurosci* 18:256-62.
- Stamm S, Casper D, Lees-Miller JP, Helfman DM (1993) Brain-specific tropomyosins TMBr-1 and TMBr-3 have distinct patterns of expression during development and in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9857-61.
- Staugaitis SM, Smith PR, Colman DR (1990) Expression of myelin basic protein isoforms in nonglial cells. *J Cell Biol* 110:1719-27.
- Stecca B, Southwood CM, Gragerov A, Kelley KA, Friedrich VL, Jr., Gow A (2000) The Evolution of Lipophilin Genes from Invertebrates to Tetrapods: DM-20 Cannot Replace Proteolipid Protein in CNS Myelin. *J Neurosci* 20:4002-4010.
- Stemple DL, Anderson DJ (1992) Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* 71:973-85.
- Stewart CL, Schuetze S, Vanek M, Wagner EF (1987) Expression of retroviral vectors in transgenic mice obtained by embryo infection. *Embo J* 6:383-8.
- Stoffel W, Hillen H, Schroeder W, Deutzmann R (1982) Primary structure of the C-terminal cyanogen bromide fragments II, III and IV from bovine brain proteolipid-apoprotein. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 363:855-64.

- Stoffel W, Hillen H, Schroder W ,Deutzmann R (1982) Lipophilin (proteolipid apoprotein) of brain white matter. Purification and amino acid sequence studies of the four tryptophan fragments. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 363:1397-407.
- Stoffel W, Schroder W, Hillen H ,Deutzmann R (1982) Analysis of the primary structure of the strongly hydrophobic brain myelin proteolipid apoprotein (lipophilin). Isolation and amino acid sequence determination of proteolytic fragments. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 363:1117-31.
- Stoffel W, Hillen H, Schroder W ,Deutzmann R (1983) The primary structure of bovine brain myelin lipophilin (proteolipid apoprotein). Hoppe Seylers Z Physiol Chem 364:1455-66.
- Stoffel W, Hillen H ,Giersiefen H (1984) Structure and molecular arrangement of proteolipid protein of central nervous system myelin. Proc Natl Acad Sci U S A 81:5012-6.
- Stoffel W (1990) Die Myelinmembran des ZNS - essentielle makromolekulare Strukturen und Funktion. Angew. Chem. 102:987-1005.
- Stoffel W, Boison D ,Bussow H (1997) Functional analysis in vivo of the double mutant mouse deficient in both proteolipid protein (PLP) and myelin basic protein (MBP) in the central nervous system. Cell Tissue Res 289:195-206.
- Stoffel W ,Bosio A (1997) Myelin glycolipids and their functions. Curr Opin Neurobiol 7:654-61.
- Stoll G, Meuller HW, Trapp BD ,Griffin JW (1989) Oligodendrocytes but not astrocytes express apolipoprotein E after injury of rat optic nerve. Glia 2:170-6.
- Suter U ,Snipes GJ (1995) Peripheral myelin protein 22: facts and hypotheses. J Neurosci Res 40:145-51.
- Takahashi N, Roach A, Teplow DB, Prusiner SB ,Hood L (1985) Cloning and characterization of the myelin basic protein gene from mouse: one gene can encode both 14 kd and 18.5 kd MBPs by alternate use of exons. Cell 42:139-48.
- Takamatsu K ,Tatemoto K (1990) Isolation and characterization of a novel peptide amide from porcine brain. Biochem Biophys Res Commun 172:1167-74.
- Tamura T ,Mikoshiba K (1991) Demonstration of a transcription element in vitro between the capping site and translation initiation site of the mouse myelin basic protein gene. FEBS Lett 280:75-8.
- Timsit S, Martinez S, Allinquant B, Peyron F, Puelles L ,Zalc B (1995) Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression. J Neurosci 15:1012-24.
- Ting-Beall HP, Lees MB ,Robertson JD (1979) Interactions of Folch-Lees proteolipid apoprotein with planar lipid bilayers. J Membr Biol 51:33-46.
- Trapp BD, Bernier L, Andrews SB ,Colman DR (1988) Cellular and subcellular distribution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'- phosphodiesterase and its mRNA in the rat central nervous system. J Neurochem 51:859-68.
- Trapp BD, Andrews SB, Cootauco C ,Quarles R (1989) The myelin-associated glycoprotein is enriched in multivesicular bodies and periaxonal membranes of actively myelinating oligodendrocytes. J Cell Biol 109:2417-26.
- Trapp BD (1990) Myelin-associated glycoprotein. Location and potential functions. Ann N Y Acad Sci 605:29-43.
- Travis J (1993) New piece in Alzheimer's puzzle [news; comment]. Science 261:828-9.
- Tropak MB, Johnson PW, Dunn RJ ,Roder JC (1988) Differential splicing of MAG transcripts during CNS and PNS development. Brain Res 464:143-55.
- Tsukahara F, Hattori M, Muraki T ,Sakaki Y (1996) Identification and cloning of a novel cDNA belonging to tetratricopeptide repeat gene family from Down syndrome-critical region 21q22.2. J Biochem (Tokyo) 120:820-7.
- Tu PH, Galvin JE, Baba M, Giasson B, Tomita T, Leight S, Nakajo S, Iwatsubo T, Trojanowski JQ ,Lee VM (1998) Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble alpha-synuclein. Ann Neurol 44:415-22.
- Tzeng SF, Deibler GE ,DeVries GH (1999) Myelin basic protein and myelin basic protein peptides induce the proliferation of Schwann cells via ganglioside GM1 and the FGF receptor. Neurochem Res 24:255-60.
- Uschkureit (2000) Dissertation.
- Usui H, Morii K, Tanaka R, Tamura T, Washiyama K, Ichikawa T ,Kumanishi T (1997) cDNA cloning and mRNA expression analysis of the human neuronatin. High level expression in human pituitary gland and pituitary adenomas. J Mol Neurosci 9:55-60.
- Vale RD, Schnapp BJ, Mitchison T, Steuer E, Reese TS ,Sheetz MP (1985) Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. Cell 43:623-32.
- van der Putten H, Botteri FM, Miller AD, Rosenfeld MG, Fan H, Evans RM ,Verma IM (1985) Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors. Proc Natl Acad Sci U S A 82:6148-52.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B ,Kinzler KW (1995) Serial analysis of gene expression [see comments]. Science 270:484-7.

- Veres G, Gibbs RA, Scherer SE, Caskey CT (1987) The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science* 237:415-7.
- Verkade P, Simons K (1997) Robert Feulgen Lecture 1997. Lipid microdomains and membrane trafficking in mammalian cells. *Histochem Cell Biol* 108:211-20.
- Virchow R (1854) Über das ausgedehnte Vorkommen einer dem Nervenmark analogen Substanz in den tierischen Geweben. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 6:562-572.
- Viskochil D, Cawthon R, P OC, Xu GF, Stevens J, Culver M, Carey J, White R (1991) The gene encoding the oligodendrocyte-myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene. *Mol Cell Biol* 11:906-12.
- Vogel G (1997) Gene discovery offers tentative clues to Parkinson's [news; comment]. *Science* 276:1973.
- Vouyiouklis DA, Brophy PJ (1995) Microtubule-associated proteins in developing oligodendrocytes: transient expression of a MAP2c isoform in oligodendrocyte precursors. *J Neurosci Res* 42:803-817.
- Vouyiouklis DA, Barrie JA, Griffiths IR, Thomson CE (2000) A proteolipid protein-specific pre-mRNA (Ppm-1) contains intron 3 and is up-regulated during myelination in the CNS. *J Neurochem* 74:940-8.
- Waehneltd TV (1990) Phylogeny of myelin proteins. *Ann N Y Acad Sci* 605:15-28.
- Wang S, Sdrulla AD, diSibio G, Bush G, Nofziger D, Hicks C, Weinmaster G, Barres BA (1998) Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* 21:63-75.
- Watts AG, Sanchez-Watts G, Emanuel JR, Levenson R (1991) Cell-specific expression of mRNAs encoding Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase alpha- and beta-subunit isoforms within the rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7425-9.
- Webb BL, Proud CG (1997) Eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B). *Int J Biochem Cell Biol* 29:1127-31.
- Weimbs T, Dick T, Stoffel W, Boltshauser E (1990) A point mutation at the X-chromosomal proteolipid protein locus in Pelizaeus-Merzbacher disease leads to disruption of myelinogenesis. *Biol Chem Hoppe Seyler* 371:1175-83.
- Weimbs T, Stoffel W (1992) Proteolipid protein (PLP) of CNS myelin: positions of free, disulfide-bonded, and fatty acid thioester-linked cysteine residues and implications for the membrane topology of PLP. *Biochemistry* 31:12289-96.
- Wight PA, Dobretsova A, Macklin WB (1997) Regulation of murine myelin proteolipid protein gene expression. *J Neurosci Res* 50:917-27.
- Willard HF, Riordan JR (1985) Assignment of the gene for myelin proteolipid protein to the X chromosome: implications for X-linked myelin disorders. *Science* 230:940-2.
- Wilson R, Brophy PJ (1989) Role for the oligodendrocyte cytoskeleton in myelination. *J Neurosci Res* 22:439-48.
- Wrabetz L, Shumas S, Grinspan J, Feltri ML, Bozyczko D, McMorris FA, Pleasure D, Kamholz J (1993) Analysis of the human MBP promoter in primary cultures of oligodendrocytes: positive and negative cis-acting elements in the proximal MBP promoter mediate oligodendrocyte-specific expression of MBP. *J Neurosci Res* 36:455-71.
- Wu M, Chen DF, Sasaoka T, Tonegawa S (1996) Neural tube defects and abnormal brain development in F52-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2110-5.
- Yakolev PI, Lecours, A.-R., Minkowsky, A. (1967) Regional development of the brain in early life. Blackwell, Oxford.
- Yamada M, Ivanova A, Yamaguchi Y, Lees MB, Ikenaka K (1999) Proteolipid protein gene product can be secreted and exhibit biological activity during early development. *J Neurosci* 19:2143-51.
- Yamaguchi Y, Ikenaka K, Niinobe M, Yamada H, Mikoshiba K (1996) Myelin proteolipid protein (PLP), but not DM-20, is an inositol hexakisphosphate-binding protein. *J Biol Chem* 271:27838-46.
- Yamamori C, Terashima M, Ishino H, Shimoyama M (1994) ADP-ribosylation of myelin basic protein and inhibition of phospholipid vesicle aggregation. *Enzyme Protein* 48:202-12.
- Yamamoto Y, Mizuno R, Nishimura T, Ogawa Y, Yoshikawa H, Fujimura H, Adachi E, Kishimoto T, Yanagihara T, Sakoda S (1994) Cloning and expression of myelin-associated oligodendrocytic basic protein. A novel basic protein constituting the central nervous system myelin. *J Biol Chem* 269:31725-30.
- Yamamoto Y, Yoshikawa H, Nagano S, Kondoh G, Sadahiro S, Gotow T, Yanagihara T, Sakoda S (1999) Myelin-associated oligodendrocytic basic protein is essential for normal arrangement of the radial component in central nervous system myelin. *Eur J Neurosci* 11:847-55.
- Yan Y, Lagenaur C, Narayanan V (1993) Molecular cloning of M6: identification of a PLP/DM20 gene family. *Neuron* 11:423-31.
- Yandava BD, Billingham LL, Snyder EY (1999) "Global" cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: evidence from the dysmyelinated shiverer mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7029-34.

- Yin X, Peterson J, Gravel M, Braun PE, Trapp BD (1997) CNP overexpression induces aberrant oligodendrocyte membranes and inhibits MBP accumulation and myelin compaction. *J Neurosci Res* 50:238-47.
- Yin X, Crawford TO, Griffin JW, Tu P, Lee VM, Li C, Roder J, Trapp BD (1998) Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci* 18:1953-62.
- Yoshida M, Colman DR (1996) Parallel evolution and coexpression of the proteolipid proteins and protein zero in vertebrate myelin. *Neuron* 16:1115-26.
- Young PR, Vacante DA, Waickus CM (1987) Mechanism of the interaction between myelin basic protein and the myelin membrane; the role of arginine methylation. *Biochem Biophys Res Commun* 145:1112-8.
- Yuan X, Eisen AM, McBain CJ, Gallo V (1998) A role for glutamate and its receptors in the regulation of oligodendrocyte development in cerebellar tissue slices. *Development* 125:2901-14.
- Zahler R, Brines M, Kashgarian M, Benz EJ, Jr., Gilmore-Hebert M (1992) The cardiac conduction system in the rat expresses the alpha 2 and alpha 3 isoforms of the Na⁺,K⁺-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:99-103.
- Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W (1995) The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* 37:417-29.
- Zinn K, DiMaio D, Maniatis T (1983) Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human beta-interferon gene. *Cell* 34:865-79.
- Zoidl G, Blass-Kampmann S, D DU, Schmalenbach C, Muller HW (1995) Retroviral-mediated gene transfer of the peripheral myelin protein PMP22 in Schwann cells: modulation of cell growth. *Embo J* 14:1122-8.

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen - , die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W.Stoffel betreut worden.

Köln, den 30. Mai 2000

Carsten Pössel

Teilpublikationen: keine

Lebenslauf

Name: Carsten Poggel
Geboren: 19.04.1970 in Werl
Eltern: Theo Poggel
Heidi Poggel, geb. Reinecke
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: römisch-katholisch

Schulbildung:

1976-1980 Städt. Kath. Walburgisgrundschule, Werl
1981-1989 Städt. Mariengymnasium, Werl
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Bundeswehr:

Juni 1989-September 1990 Grundwehrdienst in Northeim

Hochschulbildung:

Oktober 1990-August 1995 Studium der Chemie an der Universität zu Köln
November 1994-Juli 1995 Diplomarbeit im Institut für Biochemie (Med. Fakultät) unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Dr. hc. W. Stoffel; Thema:
„Molekulare Grundlagen der Wechselwirkungen in homomeren Aggregaten sowie der Glykostruktur des Glutamattransporters nGLAST-1 des Zentralnervensystems“
September 1995-Juli 2000 Promotionsarbeit im Institut für Biochemie (Med. Fakultät) unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Dr. hc. W. Stoffel; Thema:
„Genexpressions-Profil einer dysmyelinisierenden Doppel *knock out*-Mausmutante (*mbp*^{-/-} *plp*^{-/-}) und *Rescue*-Versuch des normalen Phänotyps“
Juni 1996-Mai 1999 Stipendiat im Graduiertenkolleg
„Molekularbiologische Grundlagen pathophysiologischer Vorgänge“

Köln, den 30. Mai 2000

Carsten Poggel