

JOANNA SYPECKA

PLEJOTROPOWE ODDZIAŁYWANIE MUTACJI GENU PLP  
U KRÓLIKA *PT*

Praca doktorska



LS 232

H 3028

Promotor:

Doc. dr hab. med.

Krystyna Domańska-Janik

PRACOWNIA NEUROLOGII MOLEKULARNEJ -

ZAKŁAD NEUROCHEMII

INSTYTUT CENTRUM MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ PAN

WARSZAWA 1996



Wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie zostały częściowo opublikowane w następujących pracach:

- Sypecka J., Tosić M., Dolivo M., Domańska-Janik K., Matthieu J.-M. (1993): Developmental expression of major myelin specific proteins in hypomyelinated *pt* mutant rabbit. *Acta Neurobiol. Exp.* 53, 281-284.
- Sypecka J., Domańska-Janik K. (1995): Expression of myelin specific proteins during development of normal and hypomyelinated *pt* mutant rabbits: studies on the brain homogenates. *Mol.Chem.Neuropathol.* 26: 53-66
- Sypecka J., Domańska-Janik K. (1995): Expression of myelin specific proteins during development of normal and hypomyelinated *pt* mutant rabbits: studies of the purified myelin. *Mol.Chem.Neuropathol.* 26: 67-78
- Sypecka J., Gajkowska B., Domańska-Janik K. (1995): Oligodendrocyte development in plp *pt* mutant rabbits: Glycolipid antigens and plp gene expression. *Metabolic Brain Disease* Vol. 10, No.4 : 321-333
- Sypecka J. (1996): Pt point mutation in plp gene results in hyperexpression of MOG in hypomyelinated rabbit. *Acta Neurobiol.Exp.* 56: 9-14.
- Sypecka J., Domańska-Janik K.: Hypomyelinated *pt* mutant rabbit as a new model of Pelizaeus-Marzbacher disease. *Neurochir.Pol.* (w druku).
- Sypecka J. Domańska-Janik K.: Major myelin specific genes expression in *pt* plp gene mutant rabbit. *Proceed.11th Gen. Meeting ESN* (w druku).
- Sypecka J.: Phenotypic diversity resulting from a point mutation in a plp gene in *pt* rabbit. (zgłoszone do druku).
- Domańska-Janik K., Sypecka J., Taraszewska A.: Immunohistochemical study of myelin-specific proteins in *pt* rabbits. (zgłoszone do druku).



## SPIS TREŚCI

<b>I. INDEKS SKRÓTÓW .....</b>	<b>6</b>
<b>II. WSTĘP.....</b>	<b>7</b>
1. MIELINA .....	7
1.1. BUDOWA I FUNKCJA MIELINY .....	7
1.2. SKŁAD MIELINY .....	9
1.2.1. Lipidy .....	9
1.2.2. Białka .....	10
2. OLIGODENDROCYTY .....	13
2.1. ZNACZNIKI FAZ RÓŻNICOWANIA SIĘ OLIGODENDROCYTÓW ....	14
2.2. RÓŻNICOWANIE SIĘ OLIGODENDROCYTÓW.....	15
3. CHARAKTERYSTYKA MUTACJI <i>PT</i> .....	16
3.1. KLINICZNY OBRAZ CHOROBY .....	16
3.2. NEUROATOLOGICZNY OBRAZ CHOROBY .....	17
3.3. BADANIA BIOCHEMICZNE .....	19
3.4. MOLEKULARNE PODŁOŻE MUTACJI <i>PT</i> .....	20
4. INNE MUTACJE GENÓW GŁÓWNYCH BIAŁEK MIELINOWYCH (PLP i MBP) .....	21
4.1. MUTACJE WYSTĘPUJĄCE U ZWIERZĄT.....	21
4.2. MUTACJE GENU PLP A CHOROBA PELIZAEUSA-MERZBACHERA	25
<b>III. CEL PRACY .....</b>	<b>26</b>
<b>IV. MATERIAŁY I METODY .....</b>	<b>28</b>
1. ZWIERZĘTA .....	28
2. MATERIAŁ BIOLOGICZNY .....	29
2.1. HOMOGENIZACJA .....	29
2.2. IZOLACJA FRAKCJI MELINOWEJ .....	29
2.3. IZOLACJA FRAKCJI LIPIDOWEJ .....	30
2.4. IZOLACJA CYTOPLAZMATYCZNEGO RNA .....	30



3. METODYKA BADAŃ WYIZOLOWANEGO MATERIAŁU .....	31
3.1. BADANIE BIAŁEK MIELINOWYCH .....	31
3.1.1. Oznaczanie stężenia białka.....	31
3.1.2. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE).....	31
3.1.3. Przenoszenie białek na membrany metodą immunoblottingu.....	32
3.1.4. Immunodetekcja metodą Western blot (immunoblotting).....	32
A. Źródła, charakterystyka, stężenia przeciwciał .....	32
B. Wykonanie .....	32
3.1.5. Immunodetekcja metodą ELISA.....	33
A. Metoda .....	33
B. Immunodetekcja MBP .....	34
3.1.6. Oznaczanie aktywności enzymatycznej CNPazy.....	34
3.2. BADANIE GLIKOLIPIDOWEJ FRAKCJI MIELINY .....	35
3.2.1. Chromatografia cienkowarstwowa .....	35
3.2.2. Immunodetekcja glikolipidowych antygenów oligodendrocytów.....	36
3.3. OZNACZANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH .....	36
3.3.1. Rozdział elektroforetyczny i transfer kapilarny cytoplazmatycznego RNA .....	36
3.3.2. Powielanie sond molekularnych.....	37
A. Używane sondy molekularne.....	37
B. Przygotowanie bakterii kompetentnych.....	37
C. Transformacja bakteryjna.....	38
D. Izolacja plazmidowego DNA.....	38
E. Trawienie sond enzymami restrykcyjnymi.....	39
F. Izolacja fragmentów restrykcyjnych DNA z żeli agarozowych.....	40
G. Detekcja fragmentów restrykcyjnych DNA metodą ECL .....	40
3.3.3. Znakowanie sond molekularnych P <sup>32</sup> .....	40
3.3.4. Hybrydyzacja typu Northern blot i autoradiografia .....	41
3.3.5. Hybrydyzacja metodą in situ (ISH) .....	41
4. DENSYTOMETRIA .....	42
5. ANALIZA STATYSTYCZNA .....	42
6. NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANE ROZTWORY I ICH SKŁAD .....	42
7. SPIS ODCZYNNIKÓW .....	43
<b>IV. WYNIKI</b> .....	44
1. OCENA CZĘŚCI BIAŁKOWEJ MIELINY KRÓLIKÓW KONTROLNYCH I MUTANTÓW <i>PT</i> .....	44
1.1. EKSPRESJA BIAŁEK MIELINOWYCH W ROZWOJU OSOBNICZYM KRÓLIKA ZDROWEGO .....	44



1.2. EKSPRESJA BIAŁEK MIELINOWYCH W ROZWOJU OSOBNICZYM KRÓLIKA <i>PT<sub>II</sub></i> .....	48
1.3. BILANS BIAŁEK MIELINOWYCH W ROZWOJU OSOBNICZYM <i>PT<sub>II</sub></i> .....	51
1.4. SKŁAD BIAŁKOWY MIELINY <i>PT<sub>II</sub></i> W RÓŻNYCH GRUPACH WIEKOWYCH .....	52
1.5. RÓŻNORODNOŚĆ FENOTYPOWA A NIEDOBÓR BIAŁEK MIELINOWYCH U MUTANTÓW <i>PT</i> .....	55
1.6. RÓŻNORODNOŚĆ FENOTYPOWA A SKŁAD BIAŁKOWY MIELINY.....	57
 2. OCENA CZĘŚCI GLIKOLIPIDOWEJ MIELINY KRÓLIKÓW KONTROLNYCH I MUTANTÓW <i>PT</i> .....	 60
2.1. RÓŻNICE W ZAWARTOŚCI GLIKOLIPIDÓW W MÓZGU KRÓLIKA KONTROLNEGO I MUTANTA <i>PT<sub>II</sub></i> .....	60
2.2. EKSPRESJA GLIKOLIPIDOWYCH MARKERÓW OLIGODENDROCYTARNO-MIELINOWYCH .....	60
 3. OCENA EKSPRESJI mRNA WYBRANYCH GENÓW BIAŁEK MIELINOWYCH W MÓZGU KRÓLIKÓW KONTROLNYCH I MUTANTÓW <i>PT</i> .....	 64
3.1. EKSPRESJA GENU PLP W MÓZGU KRÓLIKA <i>PT<sub>II</sub></i> W TRAKCIE ROZWOJU OSOBNICZEGO .....	64
3.2. ZALEŻNOŚĆ MIĘDZY EKSPRESJĄ GENÓW BIAŁEK PLP, MBP I CNP A FENOTYPEM KRÓLIKA <i>PT</i> .....	67
 <b>VI. DYSKUSJA</b> .....	 69
 <b>VII. WNIOSKI</b> .....	 87
 <b>VIII. PIŚMIENNICTWO</b> .....	 88



## I. INDEKS SKRÓTÓW:

<b>A2B5</b>	- przeciwciało rozpoznające gangliozydy o wysokiej zawartości kwasu sialowego w cząsteczce
<b>CNP, CNPaza</b>	- 2'3'-cykliczna nukleotydowa fosfodiesteraza
<b>D</b>	- dni życia post partum, wiek badanych zwierząt
<b>ECL</b>	- (enhanced chemiluminescence): wzmocniona chemiluminescencja
<b>ELISA</b>	- (enzyme-linked immunosorbent assay): enzymatyczny test immunologiczny
<b>ISH</b>	- in situ hybrydyzacja
<b>GalC</b>	- galaktozylcerebrozydy
<b>MAG</b>	- (myelin associated glycoprotein): glikoproteina mielinowa
<b>MBP</b>	- (myelin basic protein): białko zasadowe mieliny
<b>MGDG</b>	- monogalaktozyduglicerydy
<b>MOG</b>	- (myelin/oligodendrocyte glycoprotein): glikoproteina występująca w oligodendrocytach i błonach mielinowych
<b>O1</b>	- przeciwciało rozpoznające galaktozylcerebrozydy, psychozynę i monogalaktozyduglicerydy
<b>O4</b>	- przeciwciało rozpoznające sulfatydy, seminolipidy oraz POA
<b>OL</b>	- oligodendrocyty
<b>PLP</b>	- (proteolipid protein): białko proteolipidowe
<b>PM</b>	- (Pelizaeus-Merzbacher): choroba Pelizaeusa-Merzbachera
<b>POA</b>	- (prooligodendroblast antigen) biochemicznie niezidentyfikowany antygen prooligodendroblastów
<b>pt</b>	- (paralytic tremor): drżączka porażna
<b>pt<sup>II</sup>, pt<sup>IV</sup></b>	- mutant <b>pt</b> o fenotypie odpowiednio <b>II</b> lub <b>IV</b>
<b>RE</b>	- restrykcyjny enzym
<b>R-mAB</b>	- przeciwciało rozpoznające sulfatydy, galaktocerebrozydy, seminolipidy oraz monogalaktozyduglicerydy
<b>Sulf</b>	- sulfatydy
<b>w.m.</b>	- wilgotna masa



## II. WSTĘP

Fenotypowo wiodącą cechą królików *pt* (ang. paralytic tremor) jest dysmielinizacja ośrodkowego układu nerwowego (OUN) (Taraszewska, 1979; Taraszewska i Zelman, 1985, 1986) spowodowana mutacją genu *plp* (Tosic et al., 1994), która wywiera plejotropowy (wielokierunkowy) wpływ na proces mielinogenezy. Tak więc przedstawione zagadnienia skoncentrowane będą przede wszystkim na charakterystyce procesu mielinizacji OUN oraz na wybranych jego zaburzeniach zarówno u zwierząt jak i u ludzi.

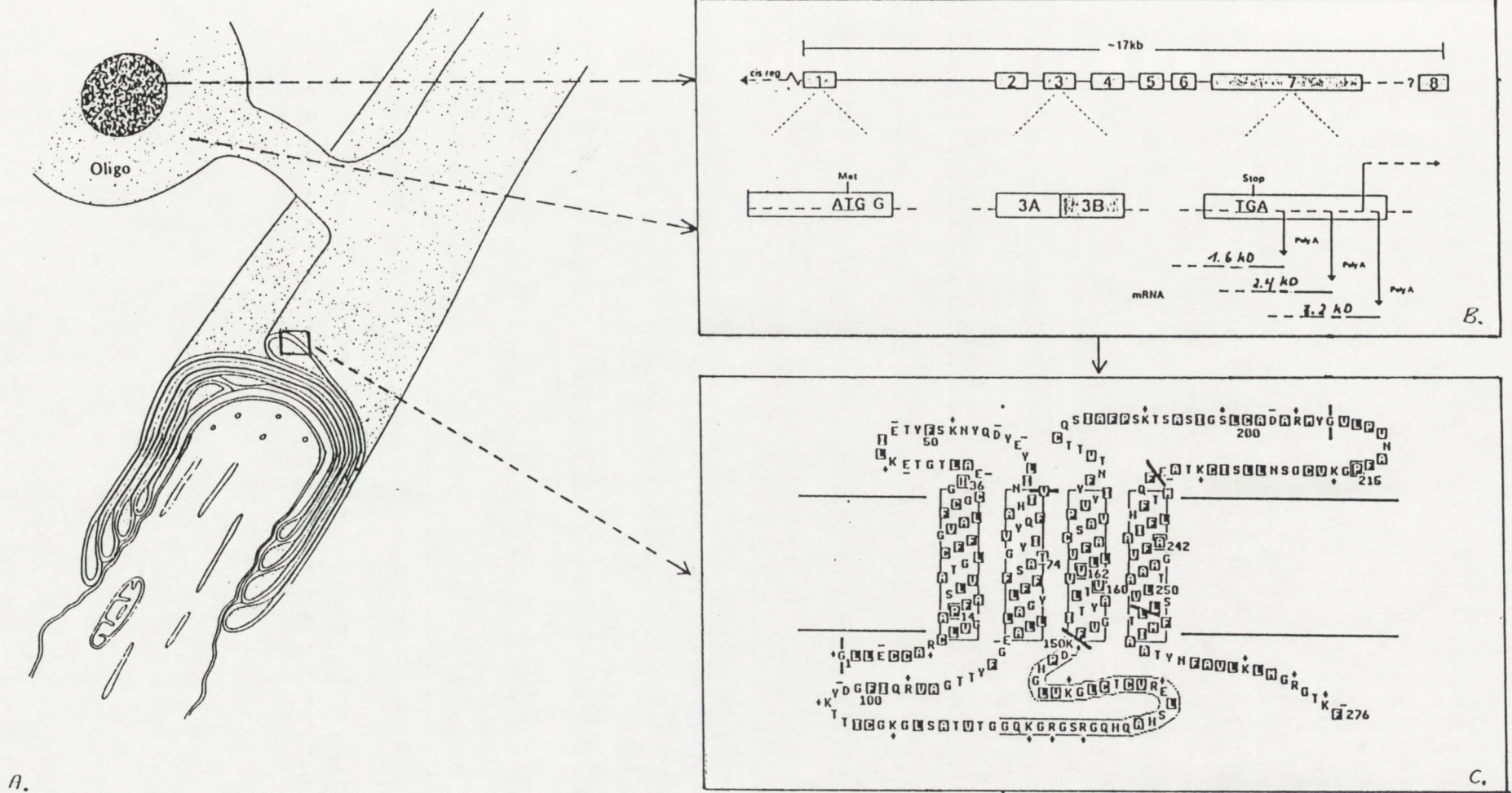
### 1. MIELINA

#### 1.1. BUDOWA I FUNKCJA MIELINY

Mielina, wielowarstwowa struktura błonowa, stanowi osłonkę włókien osiowych komórek nerwowych. Grubość osłonki oraz długość składających się na nią segmentów zależy od kalibru włókna. Odstępy między poszczególnymi segmentami, noszące nazwę przewężeń (węzłów) Ranviera, umożliwiają depolaryzację błony neuronalnej i skokowe przewodzenie impulsu nerwowego. Podczas gdy szybkość przewodzenia przez nieosłonięte włókna nerwowe jest proporcjonalna do kwadratu ich średnicy, to dzięki "izolacyjnym" właściwościom mieliny staje się ona wprost proporcjonalna do średnicy aksonu (Mossakowski, 1981; Morell et al. 1989).

Mielina wytwarzana jest przez wyspecjalizowane komórki glikowe: oligodendrocyty (OL) w ośrodkowym i komórki Schwanna w obwodowym układzie nerwowym. Podczas gdy pojedyncza komórka Schwanna mielinizuje jedno włókno osiowe, to oligodendrocyt jest zdolny do jednoczesnej mielinizacji kilku aksonów (Raine, 1989). Proces ten rozpoczyna się, gdy sąsiadująca z aksonem wypustka oligodendrocytarna najpierw otacza go podkowiasto, a następnie owija się wielokrotnie wokół niego, tworząc wielowarstwową otoczkę (Schemat 1.A). Przylegające do siebie wewnętrzne warstwy cytoplazmatyczne dwóch błon wypustki oligodendrocytarnej





Schemat 1. PLP jako białko strukturalne mielinowej osłonki oligodendrocytu: A) Przekrój przez włókno osiowe wraz z otaczającą je osłonką mielinową wytwarzaną przez sąsiadujący oligodendrocyt; B) struktura genu *plp*; C) uproszczony model białka PLP.



tworzą charakterystyczną ciemną linię, widoczną w mikroskopie elektronowym i nazywaną główną blaszką ciemną (ang. *major dense line*). Natomiast stykające się ze sobą zewnętrzne powierzchnie błon sąsiadujących ze sobą warstw otoczki mielinowej stanowią tzw. blaszkę pośrednią (ang. *intraproduct line*). Na oddzielającą obie blaszki warstwę o mniejszej gęstości elektronowej składają się w przeważającej mierze węglowodorowe łańcuchy lipidów błonowych. Wielowarstwowa struktura ściśle do siebie przylegających błon występuje prawie na całej długości segmentu mieliny, z wyjątkiem jego skrajnych odcinków (Morell et al., 1989). Mianowicie w części przylegającej do przewężeń Ranviera (tzw. rejon paranodalny) spotyka się rozwarstwienie głównej blaszki ciemnej i inkluzje cytoplazmy. Cechą charakterystyczną prawidłowej mieliny jest nie tylko jej specyficzna budowa, ale również skład biochemiczny.

## 1.2. SKŁAD MIELINY

### 1.2.1. Lipidy

Jak wykazano, około 70-80 % suchej masy mieliny stanowią lipidy. Wśród nich wyróżnić można cholesterol (25-30%), sfingomielinę (~8-10%) oraz glicerofosfolipidy, stanowiące do 45% całkowitej ilości lipidów, w tym m.in. plazmalogeny (12-15%), fosfatydyloserynę, fosfatydyloinozytol, lecytynę i fosfatydyloetanolaminę. Natomiast spośród glikolipidów najliczniej reprezentowane są specyficzne dla mieliny galaktocerebrozydy (GalC) (~30% lipidów mielinowych) oraz niewielkie ilości sulfatydów (~4%). Również niewielki procent stanowią gangliozydy, przy czym o ile w innych plazmatycznych błonach komórek nerwowych występują głównie gangliozydy o wysokiej zawartości kwasu sialowego w cząsteczce, to mielina jest szczególnie bogata w monosialogangliozydy typu GM<sub>1</sub> i GM<sub>4</sub> (Morell et al., 1989). Tak więc mielina charakteryzuje się nie tylko wyższą niż w innych błonach plazmatycznych proporcją lipidów do białek, lecz również ich skład jest znacząco różny i związany prawdopodobnie z ich szczególną rolą czynnościową.



### 1.2.2. Białka

Na pozostałe 30% suchej masy mieliny składają się różnorodne białka, w tym wysoko specyficzne dla mieliny białka strukturalne oraz enzymy. Jako najistotniejsze należy wymienić dwa proteolipidy: PLP (ang. *proteolipid protein*) i DM-20 oraz grupę małych białek zasadowych MBP (ang. *myelin basic proteins*). Wymienione białka stanowią około 80% całej puli białek mielinowych.

Białka proteolipidowe (**PLP, DM-20**) są głównymi białkami mieliny OUN. Gen *plp*, sklonowany w 1987 roku równolegle przez Macklin i Nave (Macklin et al., 1987; Nave et al., 1987), ma wielkość ponad 17 kb, ulokowany jest na chromosomie X i składa się z 7 egzonów (Schemat 1.C) kodujących dwa proteolipidy: PLP o masie cząsteczkowej ~ 30 kD oraz krótszy o około 10 kD DM-20. Dzięki możliwości różnego (alternatywnego) składania pierwotnego transkryptu (ang. *alternative splicing*), w tym przypadku pominięcia egzonu 3B (105 nukleotydów), powstaje białko PLP lub różniące się od niego delecją 35 aminokwasów (w pozycji 115-150 łańcucha białkowego) DM-20 (Schemat 1.B.) (Macklin et al., 1987; Nave et al., 1987; Lemke, 1993). Oba białka są silnie hydrofobowe, jako że w ~60% składają się z aminokwasów niepolarnych. Dodatkowo są one acylowane na treoninie w pozycji 198 łańcucha białkowego dla PLP, głównie kwasami: palmitynowym (~55%), olejowym (~26%) lub stearynowym (~19%) (Campagnoni i Macklin, 1988). Kwasy tłuszczowe stanowią w sumie 2-4% wagi cząsteczki i powodują dodatkowy wzrost jej hydrofobowości. Sądzi się, że najbardziej hydrofobowe rejony łańcucha białkowego tworzą cztery domeny przesywające błonę plazmatyczną (Popot et al., 1991; Inouye i Kirschner, 1994). Natomiast fragmenty zewnątrz błonowe obu proteolipidów są prawdopodobnie zaangażowane w odbiór bodźców środowiskowych tworząc, wraz z hydrofobowymi domenami transbłonowymi, potencjalny układ przenoszący informację przez błonę plazmatyczną (Schemat 1.B.). Inną podstawową funkcją PLP i DM-20 jest tworzenie mielinowej blaszki pośredniej poprzez łączenie sąsiadujących ze sobą powierzchni błon i utrzymywanie między nimi odpowiedniej odległości (Timsit, 1992 b; Sinoway et al., 1994; Boison et al., 1995).



W szczególności DM-20 mogłoby regulować prawidłowe odkładanie się kolejnych warstw otoczki mielinowej, ze względu na brak w swej cząsteczce największej domeny hydrofilowej (Nave et al., 1987). Z kolei tendencja omawianych białek do spontanicznej agregacji mogłaby wskazywać na ich potencjalny udział w tworzeniu kanałów przepuszczalnych dla jonów (Diaz et al., 1990).

Wzajemny stosunek ilościowy obu proteolipidów zmienia się w trakcie rozwoju ontogenetycznego: podczas embriogenezy czasowo pojawia się DM-20 (Ikenaka et al., 1992; Timsit et al., 1992 a; Timsit et al., 1995) i jego ilość maleje po urodzeniu, natomiast PLP syntetyzowane jest dopiero przez dojrzałe oligodendrocyty i jego zawartość systematycznie wzrasta wraz z postępem procesu mielinizacji (Macklin et al., 1990; LeVin et al., 1990, Schindler et al., 1990). Ponadto, o ile występowanie PLP jest ograniczone do OUN (choć transkrypt tego proteolipidu wykryto również w obwodowym układzie nerwowym), to DM-20 spotykane jest również w komórkach Schwanna i miocytach serca (Griffiths et al., 1995 a). Jak się obecnie sądzi, oba proteolipidy mogą odgrywać bliżej nieokreśloną rolę w migracji lub funkcjonowaniu komórek glejowych w trakcie ich dojrzewania i różnicowania (Gow et al., 1994 a, b; Timsit et al., 1995).

Zasadowe białko mielinowe (**MBP**) - jest to nazwa grupy niewielkich, silnie zasadowych (punkt izoelektryczny powyżej 10) białek, stanowiących ~30% wszystkich białek mielinowych ośrodkowego i 5-18% obwodowego układu nerwowego. Grupę tę tworzą 4 podstawowe izoformy białka MBP o masach cząsteczkowych odpowiednio 14, 17, 18,5 oraz 21,5 kD, wywodzące się ze wspólnego genu *mbp* na zasadzie różnego składania jego pierwotnego transkryptu (Lemke, 1988). Ilość poszczególnych izoform, a także występowanie niewielkich ilości izoform o innych masach cząsteczkowych, zależy od gatunku oraz okresu rozwoju osobniczego. Na przykład u gryzoni zawartość izoform 21,5 kD oraz 17 kD zmniejsza się wraz z wiekiem, zaś relatywnie wzrasta ilość izoform 18 kD i 14 kD (Campagnoni i Macklin, 1988). Heterogenność MBP wynika nie tylko z posttranskrypcyjnej obróbki RNA (*alternative splicing*), ale również z licznych



modyfikacji posttranslacyjnych, takich jak metylacja, dezaminacja i fosforylacja (Smith, 1992). Białka MBP występują po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej i wiążą się z lipidami głównie na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych, biorąc udział w stabilizacji struktury mieliny, szczególnie głównej blaszki ciemnej.

Spośród pozostałych ważnych białek mielinowych należy wymienić następujące białka:

Fosfodwuesteraza 2'3'-cyklicznych nukleotydów (**CNP**, EC.3.1.4.37) czyli tzw. białko Wolfgrama, występuje jako dublet o masie cząsteczkowej 46 i 48 kD i stanowi ~4% puli białkowej mieliny. Obecność CNP w OUN ograniczona jest do oligodendrocytów (w których zlokalizowana jest w sąsiedztwie F-aktyny i mikrotubul) oraz do paranodalnych odcinków osłonki mielinowej (Vogel i Thompson, 1988; Sprinkle, 1989). Taka lokalizacja oraz występowanie w cząsteczce CNP domen charakterystycznych dla białek G wiążących guanozynotrójfosforan (GTP), sugerują jej potencjalną rolę w regulacji syntezy i/lub wewnątrzkomórkowego transportu składników mielinowych. Dodatkowym argumentem przemawiającym za aktywnym udziałem tego białka w przenoszeniu sygnałów wewnątrzkomórkowych może być jego występowanie, poza mielina, w błonach plazmatycznych innych komórek o dużej reaktywności (np. komórki siatkówki czy niektóre komórki wchodzące w skład układu odpornościowego) (Braun et al., 1990). Z drugiej strony przy braku znanego fizjologicznego substratu dla aktywności enzymatycznej tego białka, jego topograficzny związek z aktyną i mikrotubulami sugeruje prawdopodobny udział w formowaniu cytoszkieletu oligodendrocytów. CNP ulega ekspresji we wczesnych stadiach rozwoju osobniczego i jest uznanym znacznikiem świadczącym o przekształceniu się prooligodendrocytów w niedojrzałe, lecz już postmitotyczne i mielinizujące oligodendrocyty (patrz strona 15).

#### **Specyficzne dla mieliny glikoproteiny:**

**MAG** (ang. *myelin associated glycoprotein*)-stanowi mniej niż 1% białek mielinowych i jest glikoproteina występującą w dwóch izoformach (67 i 72 kD), o pozornej masie



cząsteczkowej około 100 kD, która wynika z wysokiego stopnia glikozylacji cząsteczki (Arquint et al., 1987; Brady i Quarles, 1988). Analiza składu aminokwasowego wskazuje na istnienie jednej domeny transmembranowej, zaś specyfika glikozylacji pozwala zaliczyć MAG do nadrodziny immunoglobulin uczestniczących w interakcjach międzykomórkowych (Burger et al., 1992). Szczególnie obecność epitopu HNK-1 (Pedraza et al., 1995) wskazuje na przypuszczalną rolę w adhezji komórkowej (Martini i Schachner, 1986; Williams i Baclay, 1988; Schachner, 1989). Również fakt, że MAG jest zlokalizowany przede wszystkim po wewnętrznej, otaczającej akson, stronie otoczki mielinowej wskazuje na możliwość jego udziału w rozpoznawaniu aksonu przez wypustkę oligodendrocytarną (Poltorak et al., 1987; Bartsch et al., 1989).

**MOG** (*myelin/oligodendrocyte glycoprotein*)-glikoproteina o masie 25 kD, stanowiąca jedynie ~0,05% ogólnej puli białek mielinowych, jednak wysoko specyficzna dla oligodendrocytów i błon mielinowych. Podobnie jak MAG, zalicza się do nadrodziny immunoglobulin (Gardinier et al. 1992, Pham-Dinh et al. 1993) i posiada epitop L2/HNK-1 (Burger et al. 1992, 1993), świadczący o jej potencjalnej roli w adhezji komórkowej. MOG ulega ekspresji później niż PLP i MBP i jak się sądzi, jego pojawienie się stanowi sygnał do zakończenia procesu mielinizacji aksonu. Glikoproteina ta zlokalizowana jest głównie w zewnętrznej części otoczki mielinowej. Jej dodatkową interesującą właściwością jest wykazana przez wielu badaczy silna immunogenność i sugerowany związek z patogenezą stwardnienia rozsianego (Linnington i Lassmann, 1987; Suchanek i Lassmann, 1996).

## 2. OLIGODENDROCYTY

Oligodendrocyty są to wysoce wyspecjalizowane komórki glejowe zdolne do aktywnej syntezy składników mieliny: jak obliczono, masa wytwarzanych przez nie błon jest średnio około tysiąc razy większa niż masa ciała komórki bez wypustek (perikarionu) (Raine, 1989). Do powstania tak wyspecjalizowanych komórek prowadzi ściśle określony proces różnicowania i dojrzewania pierwotnych komórek glejowych,



tw. glioblastów. Bipotencjalne komórki typu O-2A w zależności od nie do końca poznanych bodźców środowiskowych, takich jak np. czynniki wzrostowe, przekształcają się w astrocyty typu II lub oligodendrocyty (Raff et al., 1983; Levi et al., 1987; Pfeiffer et al., 1990; Skoff i Knapp, 1991).

## 2.1. ZNACZNIKI FAZ RÓŻNICOWANIA SIĘ OLIGODENDROCYTÓW

Kolejne etapy różnicowania się i dojrzewania oligodendrocytów określane są na podstawie pojawiania się różnych lipidowych i białkowych znaczników określonych faz rozwojowych, wykrywanych za pomocą specyficznych przeciwciał.

Do takich typowych przeciwciał wyznaczających szlak rozwojowy oligodendrocytów należą:

- przeciwciało A2B5-rozpoznające gangliozydy o wysokiej zawartości kwasu sialowego w cząsteczce (Eisenbarth, 1979; Raff et al., 1983)
- przeciwciało R-mAb rozpoznające sulfatydy, galaktocerebrozydy (GalC), seminolipidy, monogalaktozydługlicerydy (Ranscht et al., 1982; Bansal i Pfeiffer, 1992 a)
- przeciwciało O4-rozpoznające sulfatydy, seminolipidy oraz niezidentyfikowany biochemicznie antygen nazwany POA (ang. ProOligodendroblast Antigen) (Sommer i Schacher, 1981; Bansal et al., 1989, 1992 b)
- przeciwciało O1-reagujące z GalC, monogalaktozydługlicerydami i psychozyną (Sommer i Schachner, 1981)

Reakcje krzyżowe pomiędzy ostatnimi trzema z wymienionych przeciwciał sprawiają, że jedynie ich łączne użycie do kolejnych etapów immunodetekcji umożliwia precyzyjne określenie stadium rozwoju oligodendrocytów (Gard i Pfeiffer, 1989; Warrington i Pfeiffer, 1992).



Do wykrywania dalszych faz rozwojowych mielinizujących oligodendrocytów wykorzystuje się również przeciwciała skierowane przeciwko głównym białkom mielinowym (CNP, MBP, PLP i DM-20), które to białka, często przejściowo, pojawiają się również w ciałach komórek oligodendrocytarnych w określonych stadiach ich rozwoju.

## 2.2. RÓŻNICOWANIE SIĘ OLIGODENDROCYTÓW

Kolejne stadia różnicowania się OL z komórek macierzystych i ich dojrzewania do postaci komórek wysoko wyspecjalizowanych w tworzeniu mieliny charakteryzują się określonym obrazem morfologicznym i sekwencyjnym pojawianiem się wyżej wymienionych znaczników glikolipidowych i białkowych. Uproszczony schemat przekształcania się glioblastów w dojrzałe OL przedstawia się następująco (Pfeiffer et al., 1990; Asou et al, 1995):

- komórki macierzyste (cechujące się dodatnią reakcją na obecność wimentyny, a także odpowiadające na przeciwciało A2B5) przekształcają się w
- komórki dwubiegunowe (prooligodendroblasty), które zdolne są do proliferacji i migracji oraz do ekspresji m.in. gangliozydów (identyfikowanych za pomocą przeciwciał A2B5, LB1, anti-G<sub>D3</sub>) oraz biochemicznie niezidentyfikowanego antygeny POA
- kolejnym stadium jest postać przejściowa (R-mAB<sup>+</sup>O4<sup>-</sup>), wiążąca się z pojawieniem się sulfatydów, seminolipidów i monogalaktozydylwuglicerydów na błonach plazmatycznych OL; są to wielobiegunowe komórki, zachowujące ciągle (przynajmniej częściowo) zdolność do proliferacji
- powstawaniu prooligodendrocytów reagujących z przeciwciałem O4 (R-mAb<sup>+</sup>O4<sup>+</sup>GalC<sup>-</sup>) towarzyszy wyraźny spadek reaktywności na przeciwciała A2B5, anti-VIM i anti-G<sub>D3</sub> i tworzenie pierwszych wypustek mielinowych; prooligodendrocyty w tym stadium ulegają selekcji w mechanizmie programowanej śmierci (apoptozie), a pozostałe przekształcają się w



- post-mitotyczne, stacjonarne, lecz nie w pełni dojrzałe oligodendrocyty, charakteryzujące się rozbudowanymi wypustkami komórkowymi oraz obecnością GalC i CNP, ale jeszcze nie syntetyzujące głównych białek strukturalnych mieliny (PLP-MBP<sup>-</sup>)
- końcowe stadium dojrzewania OL identyfikowane jest na podstawie zdolności do pełnej ekspresji wszystkich składników mieliny, w tym MBP i PLP oraz mielinizacji włókien osiowych dzięki licznym wypustkom komórkowym.

### 3. CHARAKTERYSTYKA MUTACJI *PT*

#### 3.1. KLINICZNY OBRAZ CHOROBY

Dziedziczne, neurologiczne schorzenie królików nazwane *pt* (z angielskiego paralytic tremor-drżączka porażna) pojawiło się w 1964 roku, w stadzie rasy szynszyl w Łomnej, hodowanym następnie w Ośrodku Doświadczalnym Neurologii Porównawczej CMDiK PAN (Mińsk Maz.) i zostało opisane przez prof. Osetowską i współpr. (Osetowska, 1967; Osetowska et al., 1975). Nazwa schorzenia pochodzi od głównych objawów neurologicznych, pojawiających się około 10-14 dnia życia. Należą do nich m.in.: "zrytmizowane drobno- i grubofaliste drżenia głowy i tułowia nasilające się przy ruchach i podnieceniu, napady drgawkowe oraz niedowład często przekształcające się w bezwład spastyczny z klonicznymi odruchami ścięgowymi" (Osetowska et al, 1975). Przyjmując za kryterium nasilenie symptomów neurologicznych wyodrębniono kilka postaci choroby *pt* różniących się swym przebiegiem: od całkowicie bezobjawowej, poprzez formę przewlekłą, aż do najcięższych przypadków silnych zaburzeń neurologicznych, takich jak całkowity niedowład kończyn. Badania dziedziczności fenotypu *pt* wykazały jego recesywny charakter i sprzężenie z chromosomem X. Króliki *pt* są zwykle mniejsze i słabsze niż równe im wiekowo króliki kontrolne, a czas ich życia osobniczego szczególnie w ciężkich przypadkach może ulec znacznemu skróceniu, głównie z powodu towarzyszących schorzeniu powikłań ogólnych.



### 3.2. NEUROPATHOLOGICZNY OBRAZ CHOROBY

Badania prowadzone w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych dostarczyły obszernego materiału na temat morfologicznego obrazu choroby *pt*. Wykazały one przede wszystkim istnienie poważnych nieprawidłowości w mielinizacji OUN przy jednocześnie prawidłowo zmielinizowanym obwodowym układzie nerwowym (Taraszewska, 1979; Zelman i Taraszewska, 1984). Jak zaobserwowano, nieliczne duże aksony o średnicy  $\geq 1 \mu\text{m}$ , których ilość wzrasta wraz z wiekiem królika, są zmielinizowane w około 90 procentach. Jednakże tylko około połowy aksonów o przekroju  $0,5-1 \mu\text{m}$ , które przeważają w systemie nerwowym królika, jest otoczonych osłonką mielinową. Natomiast praktycznie całkowicie niezmielinizowane są najmniejsze aksony o średnicy  $\leq 0,5 \mu\text{m}$  (Taraszewska i Zelman, 1985, 1986).

Oprócz istotnie obniżonej liczby zmielinizowanych małych i średnich włókien nerwowych, stwierdzono również występowanie zmniejszonej ilości blaszek w już wytworzonych osłonkach mielinowych. Podczas gdy u normalnego królika średnia liczba blaszek wzrasta z 4-7 w 5 tygodniu życia do 20-30 pod koniec trzeciego miesiąca, to u mutantu *pt* jest ich na ogół o połowę mniej. Ponadto zamiast tworzyć charakterystyczną, gęsto upakowaną, blaszkowatą strukturę, są one luźno ułożone, z widocznymi sporadycznymi inkluzjami cytoplazmatycznymi. Jak wynika z badań na poziomie różnych struktur mózgu oraz rdzenia kręgowego, hipomielinizacja OUN ma charakter pierwotnie uogólniony i wydaje się być szczególnie nasiloną u królików *pt* z ostrym przebiegiem choroby (Taraszewska i Zelman, 1981; Zelman i Taraszewska, 1984).

Nieprawidłowościom w strukturze mieliny towarzyszą pewne zmiany w otaczającym gleju. I chociaż liczba komórek glejowych wydaje się być normalna lub nawet nieznacznie zwiększona, to są one rozproszone i nieuporządkowane, zaś glej mielinizacyjny tworzy nieregularne skupienia (Zelman i Taraszewska, 1988). Inną typową cechą jest znacznie wydłużona w czasie glejoza mielinizacyjna u mutantu,



obserwowana jeszcze przez kilka tygodni po ustaniu tego procesu u królika normalnego (Taraszewska i Zelman, 1981). Ze zjawiskiem przedłużonej glejozy związane jest prawdopodobnie występowanie niedojrzałych form oligodendrocytów, których morfologia wskazuje na wysoką aktywność metaboliczną (Taraszewska, 1979; Zelman i Taraszewska, 1984; 1988). Charakteryzują się one obecnością licznych wolnych rybosomów rozproszonych w cytoplazmie, słabo wykształconą ziarnistą siateczką śródplazmatyczną, a często także silnie rozwiniętym lub poszerzonym aparatem Golgiego (Taraszewska i Zelman, 1987). Ziarnistości o strukturze pęcherzykowej, związane prawdopodobnie z transportem lipidów przed ich wbudowaniem w błony mielinowe, widoczne są w OL u królików *pt* nawet w trzecim miesiącu życia, podczas gdy u królika normalnego zanikają pod koniec 4 tygodnia (Zelman i Taraszewska, 1984). Morfologia oligodendrocytów sugerująca znacznie dłuższy niż normalnie okres aktywacji metabolicznej wskazuje jednocześnie na opóźnienie procesu ich dojrzewania. Sporadycznie występujące figury podziałowe obserwowane nawet w 3 miesiącu życia mutantu mogą wskazywać na rekrutację niedojrzałych komórek glejowych, które zasilają pulę oligodendrocytów mielinizujących. Ma to przypuszczalnie wpływ na znaczne przedłużenie procesu mielinizacji u mutantu *pt*, która u normalnego królika kończy się między 40 a 50 dniem życia (Dąbska i Danielewicz, 1978).

Pewne cechy odróżniające królika *pt* od kontroli zaobserwowano również w astrocytach. Podczas gdy u królika normalnego ilość astrocytów włóknistych wzrasta wraz z postępowaniem mielinogenezy, to u królika *pt* zjawisko to występuje z pewnym istotnym wyprzedzeniem (Zelman i Taraszewska, 1988). Ponadto, w cytoplazmie astrocytów *pt* obserwuje się wyraźnie zwiększoną obecność złogów sudanofilnych, świadczących najprawdopodobniej o ich aktywnym udziale w spichrzaniu i katabolizmie lipidowym, związanym być może z eliminacją patologicznych osłonek mielinowych (Taraszewska, 1986). Zjawisko spichrzania lipidów zaobserwowano także w komórkach mikrogleju królika *pt* (Taraszewska i Zelman, 1987).



### 3.3. BADANIA BIOCHEMICZNE

Badania biochemiczne potwierdziły znaczny niedobór mieliny u królików *pt*, lecz jednocześnie wykazały, że zdolność do syntezy podstawowych jej składników (lipidów i białek) nie ulega zasadniczemu upośledzeniu (Domańska-Janik et al., 1986, 1987; Wikeł et al., 1988). Następuje natomiast znaczne zahamowanie przejścia nowo zsyntetyzowanych związków do oczyszczonej frakcji mielinowej i zwiększona ich retencja w tzw. błonach premielinowych. Te wczesne obserwacje zyskały potwierdzenie w doświadczeniach na komórkach cos-7, transfekowanych genem  $plp_{pt}$  (Tosic et al., 1996). Wykazały one brak wbudowywania się białka  $PLP_{pt}$  do błon cytoplazmatycznych i jego zatrzymanie na poziomie aparatu Golgiego i lizosomów transfekowanych komórek. To z kolei koresponduje z zaobserwowaną wcześniej zwiększoną aktywnością metaboliczną oligodendrogleju i znacznie przyspieszonym katabolizmem nowo zsyntetyzowanych składników mieliny (MBP, glikolipidów) (Domańska-Janik et al., 1987). Łączy się to z aktywacją niektórych enzymów proteolitycznych (np. wapniowo-zależnej, obojętnej proteinyazy, tzw. kalpainy) związanych z frakcją zarówno premielinową jak i mielinową, a także większej podatności głównych białek mielinowych (w tym szczególnie  $PLP$  oraz 21,5 kD izoformy MBP) na spontaniczną jak i sterowaną enzymatycznie proteolizę (Domańska-Janik et al., 1992).

Wynikiem zaburzonego metabolizmu oligodendrocytów u królika *pt* jest zmiana typowej proporcji lipidów do białek w mózgach królików chorych. Analiza zawartości poszczególnych klas lipidów zarówno w homogenatach jak i we frakcji mielinowej, wykazała obniżenie średnio o 30 % ogólnej ilości galaktolipidów. W tym poziom monogalaktozydługlicerydów odpowiadał wartościom kontrolnym, zaś największy niedobór cechował cerebrozydy i sulfatydy, chociaż wzajemne proporcje tych ostatnich nie odbiegały od normy. Zaobserwowane wśród nich zmniejszenie puli cząsteczek zawierających kwasy  $\alpha$ -hydroksytłuszczowe na rzecz wzrostu puli związków posiadających kwasy tłuszczowe niehydroksylowane przemawia za istotnym zaburzeniem metabolizmu lipidów (Domańska-Janik et al., 1986, 1988).



Większa redukcja zawartości galaktolipidów (typowych składników błon mielinowych) niż fosfolipidów (stałych komponentów błon biologicznych) jest przyczyną spadku współczynnika ich wzajemnej proporcji, który może służyć jako indeks postępu procesu mielinizacji (Bauman et al., 1972). Jego obniżenie u królików *pt* wskazuje na co najmniej kilkutygodniowe opóźnienie mielinogenezy. Zaobserwowano ponadto wyraźnie podwyższony poziom gangliozydów, zwłaszcza typowego dla niedojrzałych oligodendrocytów monosialogangliozydu GM<sub>1</sub>, którego zawartość przekraczała prawie o 150% wartości kontrolne (Domańska-Janik et al., 1988).

Podsumowując, badania biochemiczne, zgodnie z wynikami neuropatologicznymi, wskazywały na dwa podstawowe skutki mutacji *pt*:

1. Opóźnienie procesu mielinizacji.
2. Zmniejszoną produkcję prawidłowych błon mielinowych i zwiększony ich katabolizm.

### 3.4. MOLEKULARNE PODŁOŻE MUTACJI *PT*

Ostatnie lata przyniosły wyjaśnienie molekularnego podłoża fenotypu *pt*, wpisując go w szerokie spektrum chorób neurologicznych spowodowanych mutacjami w genie *plp*. Mutacja genu *plp* u królika *pt* ma charakter punktowy i występuje w jego 2 egzonie (Schemat 1B.). Polega ona na zastąpieniu tymidyny przez adeninę w kodonie CAT kodującym histydyne w pozycji 36 łańcucha białkowego i podstawieniu jej przez glutaminę (CAA). Innym efektem zmiany nukleotydu jest brak występującej w tym rejonie genu *plp* sekwencji (CATG) rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny NLA III (Tosic et al., 1994). Ma to duże znaczenie dla badań nad mutacją, ponieważ umożliwia szybką i stosunkowo prostą genetyczną identyfikację jej nosicieli z niewielkiej ilości materiału biologicznego (np. krwi).



## 4. INNE MUTACJE GENÓW GŁÓWNYCH BIAŁEK MIELINY OUN (PLP I MBP)

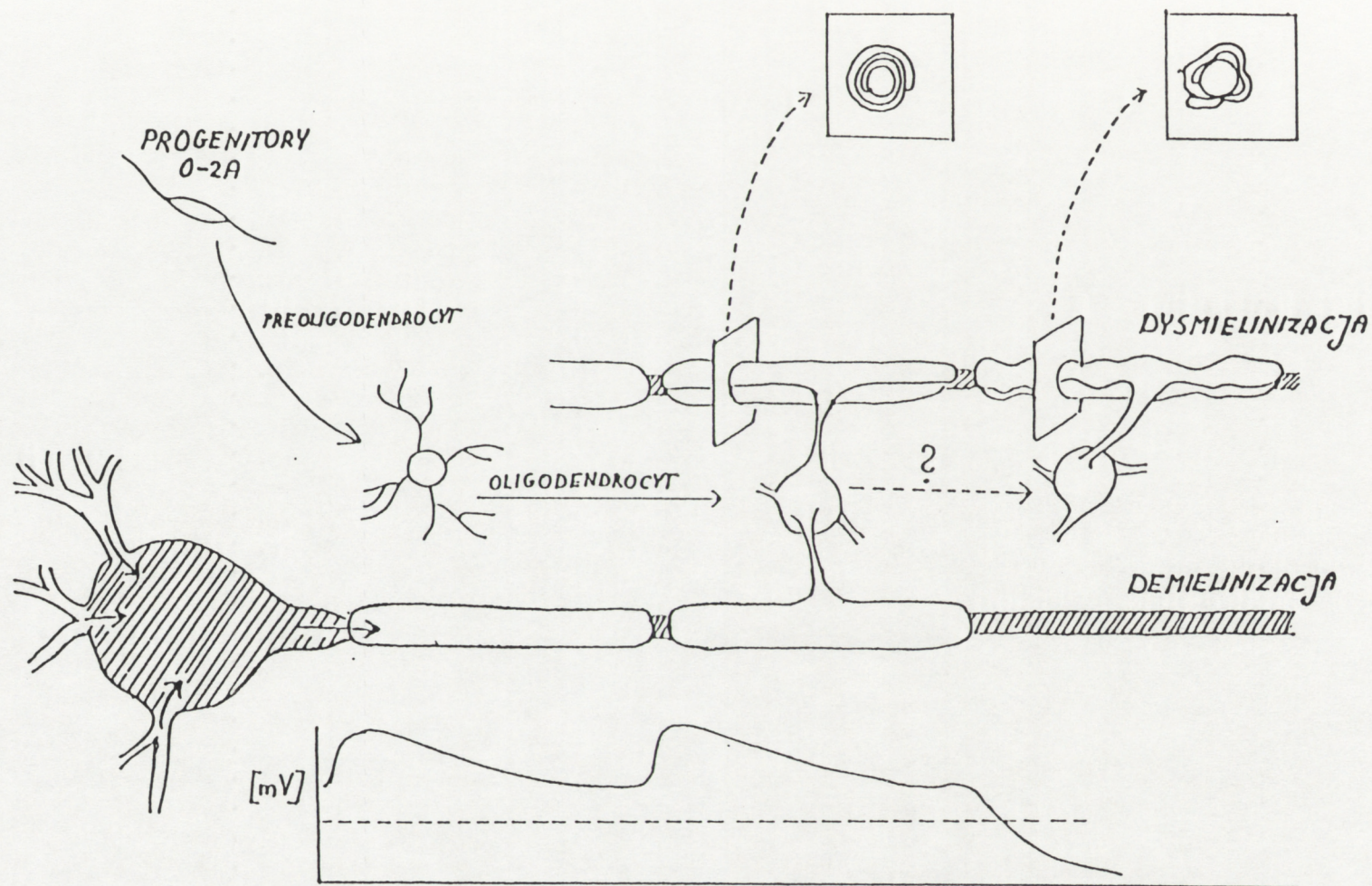
### 4.1. MUTACJE WYSTĘPUJĄCE U ZWIERZĄT

Mutacje w genach *plp* oraz *mbp* kodujących główne białka mielinowe OUN są przedmiotem intensywnych badań naukowych ze względu na ciężki przebieg wywoływanych przez nie schorzeń. Ponieważ białka wywodzące się z obu genów zaliczane są do tzw. białek strukturalnych i stanowią prawie 80 % wszystkich białek mielinowych, to wydawało się, że upośledzenie ich syntezy prowadzi w pierwszym rzędzie do zaburzeń struktury i funkcji samej blaszki mielinowej, dysmielinizacji włókien neuronalnych, a co za tym idzie do nieprawidłowości w przepływie impulsów nerwowych (Schemat 2). W efekcie występują typowe objawy neurologiczne, przede wszystkim takie jak drżenia i niedowłady.

Do najlepiej poznanych i scharakteryzowanych mutacji genu *mbp* należą występujące u myszy mutacje *shiverer* (*shi*) i *myelin deficient* (*mld*). Pierwsza z nich polega na delecji w genie *mbp* egzonów od 3 do 7 (fragment wielkości ~20 kb), zaś druga na duplikacji i inwersji prawie całego genu. Skutkiem obu mutacji jest prawie całkowity brak białka MBP (1-5% kontroli), a także towarzyszące drastyczne obniżenie ilości innych białek mielinowych, takich jak m.in. PLP, MAG i CNP.

Wśród mutacji genu *plp* do najwcześniej poznanych i neurologicznie najcięższych należy mutacja *jimpy* (*jp*) występująca u myszy. Jest to mutacja punktowa (A→G) w kodonie rozpoczynającym egzon 5 i powodująca, że jest on w całości usuwany z pierwotnego transkryptu genu. Oprócz pominięcia egzonu 5 (wielkości 74 bp), następuje ponadto przesunięcie ramki odczytu, co z kolei prowadzi do syntezy innych niż w kontroli aminokwasów: w efekcie sekwencja pierwszych 206 aminokwasów łańcucha białkowego cząsteczki jest prawidłowa, zaś następnych zmieniona i skrócona z 70 do liczby 36. Mutacji towarzyszy niemal całkowity brak osłonek mielinowych i obniżona o połowę liczba oligodendrocytów, wśród których przeważa ich niedojrzała postać. Jak się





Schemat 2. Kolejne fazy dojrzewania oligodendrocytów prowadzą do powstania wysoce wyspecjalizowanej komórki wytwarzającej mielinę, która ułatwia przewodzenie impulsów nerwowych. Różnorodne, nie do końca poznane zaburzenia funkcji oligodendrocytów oraz czynniki środowiskowe mogą wywoływać takie procesy patologiczne jak dysmielinizacja lub demielinizacja, zmieniając normalny przepływ impulsu nerwowego.



obecnie przyjmuje, nieprawidłowa budowa zmutowanej cząsteczki PLP (lub produktów jej degradacji) wywiera toksyczny wpływ na oligodendrocyty, przyczyniając się do ich obumierania. Istotne nieprawidłowości zaobserwowano również w astrocytach, np. przerost ich cytoplazmy czy tworzenie nadmiernie rozbudowanych wypustek otaczających aksony jeszcze przed ich mielinizacją.

Inne poznane u zwierząt mutacje genu *plp* również mają charakter mutacji punktowych polegających na zmianie pojedynczego nukleotydu, jednak ich konsekwencją jest zmiana tylko jednego aminokwasu w łańcuchu białkowym cząsteczki PLP. Należą do nich następujące mutacje (nomenklatura angielska w/g Hogan i Greenfield, 1984; Schneider et al., 1992; Konat, Wiggins, 1992):

- myelin synthesis-deficient (*msd*) u myszy (C→T w egzonie 6), polegająca na zastąpieniu waliny przez alaninę w pozycji 242 łańcucha białkowego, w obszarze czwartej potencjalnej domeny transbłonowej;
- rumpshaker (*rsh*) u myszy (T→C w egzonie 4), w której izoleucyna w pozycji 186 łańcucha białkowego (trzecia domena transbłonowa) jest zamieniona na treoninę;
- myelin deficient (*md*) u szczurów (A→C w egzonie 3), gdzie zamiast treoniny w pozycji 74 łańcucha występuje prolina (druga domena transbłonowa);
- shaking pups (*shp*) u psów rasy spaniel (A→C w egzonie 2), polegająca na zastąpieniu histydyny przez prolinę w pozycji 36, na granicy łańcucha zewnątrzłonowego cząsteczki i jej pierwszej domeny hydrofobowej.

Z wyjątkiem *rsh*, wszystkie inne poznane naturalnie występujące mutacje zwierzęce genu *plp* prowadzą zarówno do drastycznego obniżenia zawartości głównych białek mielinowych (Quarles, 1990), jak i do ogromnego niedoboru mieliny, któremu towarzyszy znacznie obniżona ilość oligodendrocytów (Knapp et al., 1986; Hudson, 1990; Ducan, 1990; Skoff, 1995). Wszystkie mają charakter letalny. Zbliżoną do kontroli ilość OL obserwuje się jedynie w mutacji *rsh*, która generalnie ma łagodniejszy charakter: stopień hipomielinizacji oraz niedoboru białek mielinowych (w tym PLP) jest znacznie mniejszy niż w pozostałych mutacjach (Mitchel et al, 1990). Również przeżywalność zwierząt jest w tym schorzeniu znacznie wyższa. Niestety charakterystyka



mutacji *rsh* jest niekompletna, zaś sama naturalna mutacja u myszy obecnie już nie istnieje.

Porównanie mutacji *pt* z wyżej opisanymi prowadzi do wniosku, że fenotypowo różni się ona zasadniczo od pozostałych poznanych mutacji genu *plp* u zwierząt, wykazując jedynie pewne podobieństwa do *rsh* (np. większa przeżywalność mutantów czy brak redukcji liczby oligodendrocytów). Co ciekawe, występuje ona dokładnie w tym samym miejscu łańcucha białkowego (36-y aminokwas), co mutacja *shp*, w której histydyna zamieniona jest na prolinę, zaś w *pt* na glutaminę. Fenotyp obu mutacji jest jednak zupełnie odmienny, ponieważ *shp* jest typową mutacją letalną, w której prawie całkowitej dysmielinizacji OUN towarzyszy obniżenie liczby i degeneracja oligodendrocytów.

W ostatnich latach badanie efektów zmian w genie *plp* stało się możliwe nie tylko na skutek odkrycia szeregu naturalnie występujących mutacji u ludzi i zwierząt, ale również dzięki doświadczeniom na myszach transgenicznym. Wyniki prowadzonych badań często były zaskakujące, rzucając nowe światło na zagadnienia wewnątrzkomórkowego transportu i funkcji białek PLP i DM-20 oraz samego procesu mielinogenezy. Stwierdzono m.in., że wprowadzenie do komórki dodatkowej kopii prawidłowego genu *plp* i zwiększenie tym samym dwukrotnie poziomu jego ekspresji (przy zachowaniu normalnej proporcji PLP/DM-20), prowadzi do hipomielinizacji (Schemat 2), której towarzyszą typowe objawy neurologiczne, takie jak drżenia i niedowłady (Griffiths et al., 1995 b; Ikenaka i Kagawa, 1995). Z kolei dwukrotne zwiększenie ilości białka DM-20, przy normalnym poziomie PLP, wywoływało u myszy transgenicznym wtórną demielinizację (Schemat 2) i zaburzenia behawioralne. Ostatnio natomiast uzyskano szczep myszy transgenicznym cechujących się całkowitym brakiem białek PLP i DM-20 (Boison i Stoffel, 1994; Boison et al., 1995), oraz znaczną hipomielinizacją OUN. Większość małych i średnich aksonów nie ulegała mielinizacji, zaś mielina otaczająca większe aksony charakteryzowała się brakiem blaszek pośrednich. Zobserwowano również nietypową morfologię oligodendrocytów, które były znacznie powiększone z widoczną silnie rozbudowaną siateczką śródplazmatyczną i aparatem



Golgiego, co najprawdopodobniej odzwierciedla ich wysoką aktywność metaboliczną. Co ciekawe, u zwierząt tych nie obserwowano poważniejszych objawów neurologicznych i zachodziła wręcz potrzeba stosowania skomplikowanych testów behawioralnych do wykrywania różnic między myszami transgenicznymi i normalnymi (Boison et al., 1995).

#### 4.2. MUTACJE GENU PLP A CHOROBA PELIZAEUSA-MERZBACHERA

Objawy schorzenia, obecnie nazywanego chorobą Pelizaeusa-Merzbachera (PM), zostały po raz pierwszy opisane przez Pelizaeusa w 1885 roku, który również zwrócił uwagę na recesywny, związany z chromosomem płci, dziedziczny jego charakter. Natomiast w roku 1910 Merzbacher podczas autopsji mózgu pacjenta, zmarłego na tę chorobę, zaobserwował ewidentny niedobór mieliny i jej nieprawidłową budowę. Badania innych przypadków potwierdziły patologiczną mielinizację OUN przy prawidłowo wykształconych osłonkach mielinowych w obwodowym układzie nerwowym. Wyróżnia się 4 podstawowe typy schorzenia przyjmując za kryterium czas jego wystąpienia (wczesne dzieciństwo, okres młodzieńczy) i stopień nasilenia objawów neurologicznych (najczęściej: oczopląs, dystonię, upośledzenie psychomotoryczne i niedowłady). Na podstawie obecności tych objawów i przebiegu klinicznego opisano klasyczną, wrodzoną, przejściową i dorosłą postać choroby PM (Seitelberger, 1995).

Jak badania ostatnich lat wykazały, podłożem molekularnym choroby Pelizaeusa-Merzbachera są różnorodne mutacje w genie plp typu delecji, duplikacji czy inwersji różnej wielkości fragmentów genu, a także całe spektrum mutacji punktowych zarówno w odcinkach kodujących (egzonach) jak i niekodujących (intronach) tego genu (Hodes et al., 1994). Jest to prawdopodobnie jedną z przyczyn zróżnicowanego obrazu klinicznego tego schorzenia. Z drugiej strony dużą różnorodność fenotypową obserwuje się nawet w obrębie pojedynczej rodziny, gdzie zachodzi pewność co do identycznej mutacji genu plp, a możliwość dodatkowego wpływu środowiska lub innych czynników epigenetycznych jest poważnie zmniejszona (Hodes et al., 1994; Seitelberger, 1995).



### III. CEL PRACY

Jak wynika z wyżej przedstawionych danych, mutacje genu *plp* kodującego główny proteolipid wchodzący w skład mieliny OUN, prowadzą do występowania zarówno u ludzi jak i u zwierząt schorzeń, którym towarzyszą ciężkie objawy neurologiczne i duża śmiertelność. Nawet pojedyncze zmiany aminokwasów w sekwencji białkowej cząsteczki PLP wiążą się z istotnymi zmianami neuropatologicznymi. Jednakże pozostaje otwarte pytanie o mechanizm leżący u podstawy tej szczególnej wrażliwości OUN na uwarunkowane genetycznie anomalie białek proteolipidowych: PLP i DM-20. Coraz więcej danych wydaje się wskazywać, że nie jest to wyłącznie zaburzenie formowania blaszki mielinowej spowodowane niedoborem czy nieprawidłowością jej podstawowego białka strukturalnego, ale że transkrypty genu *plp* pełnią istotną rolę czynników regulujących dojrzewanie i funkcję samych oligodendrocytów, a przez to wpływają na ich zdolność do produkcji mieliny.

Celem pracy było zbadanie niektórych zagadnień związanych z procesem mielinogenezy w OUN królików zdrowych i obarczonych cechą *pt*. Wybrane zagadnienia dotyczyły:

- \* Oceny przebiegu mielinizacji poprzez określenie sekwencji pojawiania się wybranych białek charakterystycznych dla mieliny (PLP, MBP, MAG, CNP i MOG) w rozwoju królików w obu grupach zwierząt.
- \*\* Porównania z normą ekspresji genów tych białek mielinowych, które wykazywały istotne zmiany pod wpływem mutacji *pt*.



- \*\*\* Określenia dynamiki pojawiania się antygenów dojrzałości oligodendrocytów (POA, O1, O4) w mózgach królików zdrowych i *pt*.
- \*\*\*\* Oceny składu mieliny u mutantów *pt*, a szczególnie stopnia wykorzystania białka PLP<sub>pt</sub> do formowania blaszek mielinowych.
- \*\*\*\*\* Próby korelacji oznaczanych zmian molekularnych z różnorodnym obrazem klinicznym choroby wywołanej mutacją *pt*.

Obserwacje te mogą prowadzić do odpowiedzi na podstawowe pytanie o mechanizm dysmielinizacji spowodowanej przez mutację punktową w białku PLP<sub>pt</sub>.



## IV. MATERIAŁY I METODY

### 1. ZWIERZĘTA

Wszystkie badania doświadczalne prowadzone były na królikach rasy szynszyl hodowanych w Ośrodku Doświadczalnym Neurologii Porównawczej CMDiK PAN w Mińsku Mazowieckim. Homo(hemi)zygotyczne mutanty (samice i samce), wywodzące się ze stada "Łomna", podlegały ścisłej selekcji pod kątem nosicielstwa cechy *pt*.

Ze względu na zróżnicowane nasilenie objawów neurologicznych wywoływanych przez chorobę oraz czas ich pojawiania się w rozwoju osobniczym, wyróżniono umownie cztery główne fenotypy odzwierciedlające genotyp *pt*:

- *ptI*: całkowicie bezobjawowy
- *ptII*: początkowo bezobjawowy, około 10 dnia życia zwierzęcia można zaobserwować drżenia głowy i tułowia, a po kilku dniach dodatkowo pojawiają się niedowłady; po paru tygodniach objawy częściowo lub całkowicie ustępują
- *ptIII*: przebieg choroby jak wyżej, objawy neurologiczne nasilają się w trakcie rozwoju osobniczego
- *ptIV*: najcięższa postać choroby, paraliż kończyn (początkowo tylnych, a wkrótce również przednich) następuje bardzo szybko, długość życia porażonych zwierząt znacznie krótsza niż normalnie.

Do badań nad efektami mutacji *pt* w rozwoju królika wybrano najczęściej występujący *ptII* i zgromadzono następujące grupy wiekowe zwierząt: 1, 5, 10, 14, 18, 22, 28, 42, 56, 80, i 120 dni. Natomiast do badania związku między mutacją *pt* a obserwowaną różnorodnością fenotypową wybrano *ptII* i *ptIV* (jako najbardziej charakterystyczne dla mutacji) i grupy złożone ze zwierząt odpowiednio 28, 42, 68 i 80 dniowych. Każda grupa wiekowa składała się przynajmniej z dwóch zwierząt kontrolnych i dwóch mutantów *pt*.



## 2. MATERIAŁ BIOLOGICZNY

Materiał do badań stanowiły półkule mózgu wraz z rdzeniem przedłużonym, lecz bez mózdzku, pobierane po szybkiej dekapitacji i dzielone na 2 części wzdłuż linii strzałkowej (określane w dalszej części pracy jako mózg), następnie natychmiast mrożone w ciekłym azocie (czas trwania procedury 2-3 min.) i przechowywane w  $-70^{\circ}\text{C}$ . Jedna część mózgu wykorzystywana była do badań biochemicznych, zaś druga służyła do izolacji RNA.

### 2.1. HOMOGENIZACJA

Materiał poddawano łagodnej homogenizacji w szklanym homogenizatorze Pottera w 0,32 M sacharozie (1 g w.m. materiału/ 18 ml sacharozy), w  $4^{\circ}\text{C}$ . Następnie 1/5 końcowej objętości homogenatu wirowano przez 20 min przy 12000xg i temp.  $4^{\circ}\text{C}$ . Uzyskany osad zawieszano w 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  z inhibitorami proteaz (A). Pozostałą część homogenatu natychmiast wykorzystywano do izolacji frakcji mielinowej.

**2.2. IZOLACJA FRAKCJI MIELINOWEJ** prowadzona była według metody Nortona i Poduslo (1973). Homogenat (18 ml) nakładano na 15 ml 0,85 M sacharozy i wirowano przez 30 min. przy 75000 x g (ultrawirówka typu L8-60M, głowica uchylna SW 2820, Beckman). Wszystkie czynności przeprowadzane były w  $4^{\circ}\text{C}$ ; tę samą temperaturę miały stosowane odczynniki. Do zebranej interfazy dodawano 30 ml  $\text{H}_2\text{O}$  destylowanej (szok osmotyczny) i ponownie przez 30 min. odwirowywano przy 75000 xg. Osad dwukrotnie zawieszano w 30 ml  $\text{H}_2\text{O}$  i odwirowywano przez 15 min., przy 13000 x g. Następnie osad homogenizowano w 15 ml 0,32 M sacharozy, delikatnie nakładano na 15 ml 0,85 M roztworu sacharozy i powtarzano wirowanie jak na wstępie. Otrzymaną frakcję mielinową zawieszano w 2-5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  z inhibitorami proteaz (A) i rozpipetowywano do probówek po  $\sim 0,5$  ml. Część materiału liofilizowano, zaś próby wykorzystywane w bieżących doświadczeniach przechowywano w  $-20^{\circ}\text{C}$ .



### 2.3. IZOLACJA FRAKCJI LIPIDOWEJ

Z prób homogenatów mózgowych zawierających po 1mg białka ekstrahowano lipidy metodą Folcha (1957). Na wstępie próby poddawano ekstrakcji 20 objętościami chloroformu/metanolu (2:1 v/v) w 4°C, a następnie 20-minutowemu wirowaniu przy 12000 xg, 4°C. Po odrzuceniu fazy górnej, fazę dolną reekstrahowano mieszaniną 0,2 objętości metanolu i 0,2 objętości 0,2% KCl. Dolną fazę ekstraktu zawierającą m.in. glikolipidy suszono w strumieniu azotu i poddawano dalszemu oczyszczaniu metodą chromatografii (3.2.1.).

### 2.4. IZOLACJA CYTOPLAZMATYCZNEGO RNA

Części mózgów przechowywanych w -70°C łagodnie homogenizowano (20% w/v) w szklanym homogenizatorze Pottera w buforze zawierającym 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM NaCl i 20 mM Tris pH 8,4. Po rozcieńczeniu taką samą objętością buforu zawierającego 3% SDS i 40 mM EDTA o pH 8,0, homogenat wirowano 5 min. przy 5000xg, 4°C. Nadsącz wykorzystywano do izolacji cytoplazmatycznej puli RNA standardową metodą ekstrakcji fenolowo-chloroformowej (Sambrook et al., 1989) aż do zaniku interfazy (patrz też: 3.3 2.D.). Następnie zbierano górną fazę, dodawano 1/10 objętości 3 M octanu sodu o pH 4,8 oraz 2,5 objętości 100% alkoholu etylowego, dokładnie mieszano próbę i precypitowano kwasy nukleinowe przez 1 godz. w temp. -70°C lub przez noc w temp. -20°C. Po 30 minutowym wirowaniu przy 10000xg, w 4°C, nadsącz odrzucano, zaś osad zawieszano w 300-500 µl buforu o składzie 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 7 mM MgCl<sub>2</sub> i 10 mM Tris pH 7,4. Po dodaniu DNazy I (Sigma) w ilości 10 U/100 µl próby i 15 minutowej inkubacji w 37°C, ponownie dodawano DNazę I w ilości 5 U/100 µl próby i inkubowano przez dalsze 10 min. w 37°C. Następnie prowadzono trzykrotną ekstrakcję fenolem i dwukrotną chloroformem, zbierano górną fazę i dodawano po 1/10 objętości 3 M octanu sodu o pH 4,8 oraz 2,5 objętości 100% alkoholu etylowego. Po precypitacji w suchym lodzie, próby poddawane były wirowaniu przez 30 min. przy 10000xg i temp. 4°C. Uzyskany osad przemywano 70 % alk.



etylowym, liofilizowano w Speed-Vacu (JW Electronics) i zawieszano w 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Następnie dokonywano pomiaru absorbancji ekstraktu w UV przy dwóch długościach fal: 260 nm (dla kwasów nukleinowych) i 280 nm (dla białek). Jeśli współczynnik OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> był  $\geq 2,0$ , to uznawano dostateczną czystość próby, którą dzielono następnie na dwie porcje po 50  $\mu$ l i liofilizowano. Zarówno próby liofilizowane, jak i wodne roztwory RNA przechowywane były w temp. -70 °C.

### 3. METODYKA BADAŃ WYIZOLOWANEGO MATERIAŁU

#### 3.1. BADANIE BIAŁEK MIELINOWYCH

**3.1.1. Oznaczanie stężenia białka** w homogenatach mózgowych i frakcjach mielinowych prowadzono w/g metody opisanej przez Lowry i współ. (1951).

#### 3.1.2. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE)

Do prób homogenatu zawierających po 100  $\mu$ g białka dodawano po 1/5 końcowej objętości 5x zatężonego buforu (62,5 mM Tris-HCl o pH 6,8; 10% glicerol, 2% SDS, 1,5%  $\beta$ -merkaptoetanol, 0,05% błękit bromofenolowy) i umieszczano na 5 min w łaźni wodnej w temp. 100°C. Natomiast próby mieliny (zawierające odpowiednio 40, 80 lub 160  $\mu$ g białka) z buforem j.w. ogrzewano w temp. 65°C przez 20 min. Po schłodzeniu, próby nanoszono w całości do studzienek elektroforetycznych w żelu poliakrylamidowym (4% żel zagęszczający, 12% żel rozdzielający) w/g metody Laemmli (1970). Elektroforezę z chłodzeniem prowadzono około 16 godz. przy stałym natężeniu prądu: 10 mA dla żelu zagęszczającego i 16 mA dla żelu rozdzielającego. Po elektroforezie żele były poddawane elektroblottingowi (3.1.3.) lub wybarwiane roztworem błękitu Coomassie (B). Wartości współczynnika rf mierzone były względem wzorców masy cząsteczkowej z zakresu 9-200 kD (Amersham).



### 3.1.3. Przenoszenie białek na membrany metodą elektroblottingu

Rozdzielone próby białkowe przenoszone były z żeli poliakrylamidowych metodą elektroblottingu (Towbin et al., 1979) na błony nitrocelulozowe Hybond-ECL (Amersham). Czas elektroblottingu wynosił 3 godz. przy stałym natężeniu prądu 220 mA. Dodatek 0,01% SDS do buforu (25 mM Tris-HCl o pH 8,3; 192 mM glicyna, 20% metanol) podnosił znacząco efektywność przenoszenia białek, którą po transferze sprawdzano poprzez wybarwienie żeli (błękitem Coomassie, B) i błon nitrocelulozowych (czerwienią Ponceau, C). Szczelnie opakowane membrany przechowywano w -20 °C.

### 3.1.4. Immunodetekcja metodą Western blot (immunoblotting).

#### A. Źródła, charakterystyka, stężenia przeciwciał:

- Poliklonalne przeciwciało anti-PLP/DM20, uzyskane w lab. Dr. J.-M. Matthieu (Lozanna, Szwajcaria), stosowane było w rozcieńczeniu 1:200.
- Poliklonalne przeciwciało anti-MBP, j.w.
- Monoklonalne przeciwciało anti-MOG 8-18C5 (Linington et al., 1984), uzyskane w lab. Dr. J.-M. Matthieu (Lozanna, Szwajcaria), stosowane w rozcieńczeniu 1:200.
- Monoklonalne przeciwciało anti-MAG (Quarles et al., 1981) otrzymane od Dr. R.H. Quarlesa, używane po rozcieńczeniu 1:500.
- Monoklonalne przeciwciało anti-CNP (SIGMA Immunochemicals, St. Louis, MO), rozcieńczane 1:200.

#### B. Wykonanie:

- Białka PLP/DM-20 oraz MBP w homogenatach mózgowych uwidaczniano po transferze na błony nitrocelulozowe poprzez kolejne inkubacje z pierwszorzędowymi przeciwciałami oraz białkiem A znakowanym I<sup>125</sup> (NEN, Boston). Autoradiografię na kliszach Kodak X-Omat uzyskiwano poprzez



ekspozycję membran przez 1-24 godz. w temp.  $-70^{\circ}\text{C}$ . Membrany użyte do detekcji PLP/DM-20 wykorzystywano do wykrywania MBP w/g tej samej metody.

-Białka PLP/DM-20 oraz MBP w próbach mielinowych wykrywane były metodą wzmocnionej chemiluminescencji (ang. enhanced chemiluminescence-ECL) (Amersham). Jako przeciwciało drugorzędowe stosowano kozie antykrólicze przeciwciała typu IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową i rozcieńczone 1:16000 (Sigma Immunochemicals). Czas naświetlania klisz Hyperfilm<sup>TM</sup>-ECL (Amersham) wynosił 0,5-15 min.

- Do detekcji białek CNP, MAG i MOG zarówno w próbach z homogenatów mózgowych, jak i w próbach mielinowych stosowano metodę ECL. W tym przypadku wykorzystywano sprzężone z peroksydazą chrzanową drugorzędowe owcze anty-mysie przeciwciała rozcieńczone 1:4000 (Amersham), zaś czas naświetlania klisz wynosił 10-40 min.

We wszystkich przypadkach do wstępnego blokowania trwającego 1-2 godz. jak i kolejnych inkubacji stosowano 5% roztwór odłuszczonego mleka w buforze TPBS (D). Bufor TPBS (D) służył również do płukania (2x20 min.) membran po kolejnych inkubacjach.

### 3.1.5. Immunodetekcja metodą ELISA

**A. Metoda.** Analizę porównawczą glikolipidowych antygenów oligodendrocytów oraz MBP u królika normalnego i mutanta *pt* prowadzono w/g podręcznika Vollera et al. (1979). Próby homogenatów mózgowych rozcieńczano 1:1 przy użyciu 100 mM buforu węglanowego o pH 9,6, sonifikowano i nakładano na płytki z polichlorku winylu w ilości 0,1-10  $\mu\text{g}$  białka/ studzienkę, w zależności od badanego antygeny i wieku zwierzęcia. Po wstępnym unieruchomieniu badanych antygenów w zagłębieniach płytek (suszenie przez noc w temp. pokojowej), po którym następowała inkubacja przez 1 godz. z roztworem 5% odłuszczonego mleka w buforze PBS (E). W takim samym



buforze rozcieńczano pierwszo- i drugorzędowe przeciwciała. Do płukań po każdej inkubacji używano buforu TPBS (D). Specyficzne dla badanego antygeny przeciwciała pierwszorzędowe rozpoznawane było przez sprzężone bezpośrednio z peroksydazą chrzanową przeciwciała drugorzędowe bądź przez kompleks biotyna/awidyna/peroksydaza chrzanowa. Do przeprowadzenia reakcji barwnej stosowano zestaw Bioradu (TMB Peroxidase EIA Substrat Kit), zawierający substraty peroksydazy (3, 3', 5, 5'-tetrametylbenzydyna i nadtlenek wodoru), w/g przepisu producenta. Otrzymana reakcja barwna odczytywana była w aparacie Microplate Reader 450 (Bio-Rad) przy  $\lambda=655$  nm wobec prób ślepych poddawanych całej procedurze eksperymentalnej, lecz z pominięciem pierwszo- bądź drugorzędowego przeciwciała. W celu wystandaryzowania metody, wykonano serię rozcieńczeń i sporządzono krzywą standardową wskazującą optymalny przedział stężeń dla każdego badanego antygeny.

## **B. Immunodetekcja MBP**

Próby homogenatów mózgowych rozpuszczane były przy użyciu SDS do końcowego stężenia 1% w wodzie. Po 5 min. ogrzewania w temp. 100°C, nierozpuszczony materiał był odwirowywany przez 20 min przy 10000 x g. Zebrany nadsącz dializowano przez noc wobec wody destylowanej w temp. 4°C. Próby służyły jako źródło antygeny (od 0,1 do 10  $\mu$ g białka homogenatu na studzienkę). Jako pierwszorzędowych używano mysich przeciwciał anti-MBP (Sigma Immunochemicals) w rozcieńczeniu 1:500. Drugorzędowe owcze anti-mysie przeciwciała IgG bezpośrednio sprzężone z peroksydazą chrzanową (BioRad) rozcieńczano 1:5000.

### **3.1.6. Oznaczanie aktywności enzymatycznej CNPazy**

Aktywność enzymatyczną CNPazy w próbach z homogenatów mózgowych i mieliny oznaczano w/g metody opisanej przez Domańską-Janik i współpr. (1988). W skrócie, do prób zawierających 1-10  $\mu$ g białka dodawano substrat (cykliczny adenozyno-2'3'-monofosforan) w stężeniu 10 mM i prowadzono inkubację przez 15 min. w 37°C.



Szybkość hydrolizy (powstawanie adenozy-2'-fosforanu) jest wprost proporcjonalna do stężenia enzymu do około 50-procentowego wyczerpania substratu. Reakcję zatrzymywano poprzez szybkie schłodzenie mieszaniny reakcyjnej, którą następnie nakładano na płytki krzemowe do chromatografii cienkowarstwowej z fluoroforem Alurolle Silica Gel F<sub>254</sub> (Merck). Chromatogramy rozwijano w układzie octan etylu/propanol/amoniak/woda (90:60:40:30 v/v). Plamy odpowiadające substratowi i produktowi reakcji lokalizowano przy użyciu lampy UV w długości światła  $\lambda=260$  nm, wycinano i eluowano do 4 ml 0,01 M HCl. Absorbencję nadsącza odczytywano na spektrofotometrze (Beckman) przy  $\lambda=260$  nm wobec próby ślepej oraz próby standardowej zawierającej odpowiednie stężenie substratu, nie poddanego działaniu enzymu. Aktywność specyficzną enzymu oznaczano jako ilość  $\mu$ moli produktu wytwarzanego w ciągu 1 min. w temp. 37°C przez 1 mg białka badanej frakcji.

### **3.2. BADANIE GLIKOLIPIDOWEJ FRAKCJI MIELINY**

#### **3.2.1. Chromatografia cienkowarstwowa**

Ekstrakt lipidowy homogenatów mózgu (2.3.) rozpuszczano w chloroformie i nanoszono na kolumny krzemowe (Unisil) równoważone chloroformem. Dalszą procedurę oparto na metodzie Esselmana i wsp. (1972). Kolumny przemywano chloroformem w ilości równej 5-krotnej objętości złoza, a następnie eluowano glikolipidy w 3 ml acetonu/metanolu (9:1 v/v). Próby suszono w strumieniu azotu a następnie rozpuszczano w chloroformie i nanoszono ilościowo na płytki do TLC pokryte żelem krzemionkowym typu G (Merck). Chromatografię rozwijano w następującym układzie: chloroform / metanol / aceton / kw. octowy / woda (10:2:4:2:1 v/v). Rozdzielone glikolipidy uwidaczniano poprzez spryskanie roztworem orcynolowym (200 mg orcynolu/100 ml roztworu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i H<sub>2</sub>O w proporcji 3:1 v/v) i ogrzewanie przez 15 min. w temp. 100° C.



### **3.2.2. Immunodetekcja glikolipidowych antygenów oligodendrocytów metodą ELISA**

Immunodetekcję opartą na metodzie ELISA prowadzono w/g procedury opisanej w punkcie 3.1.5.A. Przeciwciała przeciwko antygenom O1 oraz O4 stosowano po rozcieńczeniu 1:200 w 1% BSA-PBS, zaś kozia anty-mysia biotynylowana frakcja IgM specyficzna dla łańcucha  $\mu$  (Sigma Immunochemicals), w rozcieńczeniu 1:200 służyła jako przeciwciała drugorzędowe. W celu oznaczenia ilości tzw. antygeny POA, próby najpierw inkubowane były z przeciwciałem R-mAb (rozcieńczonym 1:50) w celu zablokowania specyficznej dla tego przeciwciała reakcji z sulfatydami i seminolipidami. Przeciwciało R-mAb należy do klasy IgG immunoglobulin i nie jest rozpoznawane przez skoniugowane z biotyną drugorzędowe przeciwciało IgM. Tak więc immunoreaktywność z przeciwciałem O4 po zablokowaniu sulfatydów i seminolipidów odpowiada immunoreaktywności dodatkowego antygeny POA, charakterystycznego dla prooligodendrocytów (Bansal et al. 1992). Jak już wspomniano, drugorzędowe przeciwciało sprzężone z biotyną i należące do klasy IgM rozpoznawano stosując kozie przeciwciała skierowane przeciwko biotynie, sprzężone z peroksydazą chrzanową i rozcieńczone 1:1000 (Sigma Immunochemicals). Reakcję barwną TBM opisano poprzednio (3.1.5.A.).

## **3.3. OZNACZANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH**

### **3.3.1. Rozdział elektroforetyczny i transfer kapilarny cytoplazmatycznego RNA**

Próby zawierające po 15  $\mu\text{g}$  zliofilizowanego RNA rozpuszczano w 4  $\mu\text{l}$  schłodzonej do 4°C H<sub>2</sub>O, dodawano po 15  $\mu\text{l}$  buforu (mieszanina 0,72 ml formamidu, 0,16 ml 10-krotnie zatężonego MOPS (F), 0,26 ml formaldehydu, 0,18 ml 0,2% błękitu bromofenolowego oraz 0,1 ml 80% glicerolu) i poddawano 15 min. inkubacji w 65°C. Po schłodzeniu prób w łaźni lodowej, do każdej z nich dodawano po 1  $\mu\text{l}$  roztworu



bromku etydyny o stęż. 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  i nakładano do studzienek elektroforetycznych denaturującego żelu agarozowego, jak opisano przez Sambrook et al. (1989). Jako bufor elektroforetyczny stosowano MOPS (F) o pH 7,0. Rozdział prowadzono przez około 8 godz. przy stałym napięciu prądu równym 40 V, jego przebieg sprawdzano w świetle UV (UV-transilluminator, JW Electronics). Transfer kapilarny rozdzielonego RNA na membrany nylonowe Zeta-Probe (Bio-Rad) prowadzono w/g metody opisanej przez Sambrook et al. (1989). Po transferze membrany zapiekano przez 2 godz. w 80°C.

### 3.3.2. Powielanie sond molekularnych

#### A. Używane sondy molekularne:

- p27 dla mRNA PLP (Milner et al., 1985).
- pMBP1 dla mRNA MBP (Roach et al., 1983).
- pMAG dla mRNA MAG (Arquint et al., 1987).
- WG7 dla mRNA CNP (Bernier et al., 1987).
- pAL-41 dla mRNA aktyny (Minty et al., 1983).

#### B. Przygotowanie bakterii kompetentnych.

W celu uzyskania większej ilości plazmidowego DNA służącego jako wektor dla poszczególnych sond molekularnych, stosowano namnażanie transformowanych określonym plazmidem komórek *E.coli*. W tym celu 1 ml nocnej hodowli *Escherichia coli* HB 101 (Sambrook et al., 1989) inokulowano do 100 ml płynnego podłoża LB. Hodowlę prowadzono przez ok. 4 godz. z łagodnym wytrząsaniem (220 rpm) w temp. 37°C aż do osiągnięcia przez zawiesinę  $\text{OD}_{600} \leq 0.5$  ( $10^7$ - $10^8$  komórek/ml). Po 5 min. schłodzeniu na lodzie, hodowlę odwirowywano przez 5 min przy 4000xg. Nadsącz odrzucano, zaś osad zawieszano w 50 ml zimnego 75mM  $\text{CaCl}_2$  i prowadzono inkubację w lodzie przez 15 min. Następnie zawiesinę ponownie odwirowywano przez 5 min przy 4000xg, odrzucano nadsącz, zaś osad zawieszano w 10 ml zimnego 75 mM  $\text{CaCl}_2$ . Do



tak otrzymanych komórek kompetentnych dodawano glicerol do końcowego stężenia 25% i przechowywano w temp.  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **C. Transformacja bakteryjna**

Do 3 probówek zawierających po 50  $\mu\text{l}$  zawiesiny komórek kompetentnych dodawano 10  $\mu\text{l}$  75 mM  $\text{CaCl}_2$  oraz 100 ng w 1  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  odpowiedniego plazmidu niosącego daną sondę molekularną i, po lekkim wymieszaniu, inkubowano przez 30 min. w lodzie. Po inkubacji, probówki przenoszono na 2 min. do łaźni wodnej o temp.  $42^{\circ}\text{C}$  (szok termiczny). Następnie do probówek dodawano po 0,5 ml płynnego podłoża LB i przez dalsze 60 min. prowadzono hodowlę w  $37^{\circ}\text{C}$  bez wytrząsania w celu uzyskania ekspresji genów kodujących odporność na antybiotyki. Niewielkie objętości (30, 60, 120  $\mu\text{l}$ ) hodowli wysiewano następnie na stałe podłoża agarowe z ampicyliną (50  $\mu\text{l}/\text{ml}$  podłoża) w celu selekcji ztransformowanych komórek z równoległym posiewem redukcyjnym na podłoża bez antybiotyku jako kontrolę doświadczenia. Dodatkową kontrolę uzyskano również przez posiew bakterii kompetentnych, którym nie podano plazmidu, na podłoża zawierające bądź nie zawierające ampicyliny.

### **D. Izolacja plazmidowego DNA**

Z podłoża pobierano pojedynczą kolonię bakterii niosących żądany plazmid, przenoszono do 200 ml płynnego podłoża LB z ampicyliną (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) i prowadzono całonocną hodowlę w temp.  $37^{\circ}\text{C}$  z wytrząsaniem (ok. 220 rpm). Hodowlę następnie wirowywano przez 15 min. w  $4^{\circ}\text{C}$  przy 5000xg. Odrzucano nadsącz, zaś osad zawieszano w 6 ml zimnego buforu do lizy o składzie: 25 mM Tris-HCl o pH 8,0, 10 mM EDTA i 50 mM glukoza. Po 10-minutowej inkubacji w lodzie, do prób dodawano 12 ml roztworu o składzie: 0.1 M NaOH i 1% SDS. Po łagodnym wymieszaniu, próby inkubowano przez dalszych 10 min. w lodzie. Następnie do każdej próby dodawano po 7,5 ml 3M octanu sodu o pH 4,6, mieszano i kontynuowano inkubację w lodzie przez 20 min. Po inkubacji próby odwirowywano przez 15 min. przy 12000xg. Nadsącz ostrożnie przenoszono do nowych probówek i dodawano roztwór RNAzy (wolny od DNAzy



dzięki 5 min. inkubacji w temp. 100°C) do końcowego stężenia 20 µg/ml i przez 20 min. prowadzono inkubację w temp. 37°C. Fragmenty strawionego RNA oraz zanieczyszczenia białkowe usuwano z prób poprzez dwukrotną ekstrakcję roztworem fenol/chloroform/alkohol izoamylowy (24:24:1 v/v) i dwukrotną ekstrakcję chloroformem/alkoholem izoamylowym (24:1 v/v) Po każdej ekstrakcji próby były wirowane przez 5 min. przy 12000xg w temp. 4°C, zbierano górną fazę i prowadzono dalszą ekstrakcję aż do zniknięcia interfazy. Następnie dodawano dwie objętości 96% alkoholu etylowego, dokładnie mieszano i umieszczano na 1godz. w temp. -20°C. Po inkubacji, próby odwirowywano przez 30 min. przy 12000xg, łagodnie zlewano nadsącz, zaś osad DNA zawieszano w 1,6 ml H<sub>2</sub>O. Następnie dodawano 0,4 ml 4M octanu sodu o pH 4,8 i dokładnie mieszano. Kolejno do każdej próby dodawano po 2 ml 13% roztworu glikolu polietylenowego, mieszano i umieszczano w łaźni lodowej na 60 min. Następnie próby wirowano przez 20 min. w 12000xg, nadsącz zlewano, zaś osad przemywano 70% alkoholem etylowym i liofilizowano (Speed-Vac). Otrzymane DNA zawieszano w 100 µl buforu TE, z czego pobierano 2x 1 µl do pomiaru gęstości optycznej (OD) przy  $\lambda = 260$  i 280 nm. Jeśli współczynnik OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> był  $\geq 2,0$ , to oznaczało, że wyizolowane DNA jest w zadowalającym stopniu wolne od zanieczyszczeń białkowych. Próbę rozpipetowywano po 20 µl do nowych probówek i liofilizowano lub bezpośrednio używano do dalszych doświadczeń.

### **E. Trawienie sond enzymami restrykcyjnymi**

Próby zawierające po 10 µg DNA trawione były odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi (RE) (Boehringer Mannheim) w celu oddzielenia wektora plazmidowego od właściwej sondy molekularnej czyli cDNA dla fragmentów wybranych genów: p27/Bam HI, pMBP1/Eco RI, pMAG/Eco RI, CNP/Hind III, WG7/Hind III, AL-41/Pvu II.



## **F. Izolacja fragmentów restrykcyjnych DNA z żeli agarozowych**

Substraty (sondy wyjściowe) i produkty amplifikacji (1-2  $\mu\text{g}$ ), rozdzielano elektroforetycznie w 1,2% żelu agarozowym w buforze TBE (120 mM Tris pH 8,7; 90 mM kw. borowy, 0,75mM EDTA), przez około 4-5godz., przy stałym napięciu prądu 50V wobec wzorca jakim było DNA faga  $\lambda$  trawione RE Hind III. Widoczne w UV dzięki wyznakowaniu bromkiem etydydy prążki DNA fotografowano. Rozdzielone fragmenty DNA przenoszone były na membrany Hybond-N+ (Amersham) metodą transferu kapilarnego (Sambrook et al., 1989).

## **G. Detekcja fragmentów restrykcyjnych DNA metodą ECL.**

Fragmenty DNA znakowane były bezpośrednio peroksydazą chrzanową za pomocą glutaraldehydu przy użyciu zestawu ECL<sup>TM</sup> (#RPN 3000, Amersham) jako metody polecanej do hybrydyzacji typu Southern blot. Do buforu hybrydyzacyjnego dodawano czynnik blokujący do końcowego stężenia 5% (oba odczynniki zawarte w zestawie) oraz NaCl do stężenia 0,2 M. Prehybrydyzacja przebiegała w 42°C z łagodnym mieszaniem i trwała około 1 godz., a następnie dodawano znakowane DNA i prowadzono hybrydyzację w tych samych warunkach przez dalszych 12-14 godz. Płukania membran prowadzono w/g schematu: 2 x 20 min. w buforze o temp. 42°C zawierającym 6M mocznik, 0,4% SDS oraz 0,5xSSC (G) oraz 2 x 5 min. w buforze 20xSSC (G) o temp. pokojowej. Następnie wywoływano chemiluminescencję związanego z membraną DNA poprzez odczynniki z zestawu ECL<sup>TM</sup> zawierające substraty peroksydazy chrzanowej (3, 3', 5, 5'-tetrametylbenzydyna i nadtlenek wodoru), utrwalaną na kliszach Hyperfilm-ECL (Amersham).

### **3.3.3. Znakowanie sond molekularnych P<sup>32</sup>**

Sondy molekularne służące do hybrydyzacji typu Northern blot (DNA-RNA) znakowano radioaktywnie metodą losowego wbudowywania (ang. random priming) dATP<sup>32</sup> (Amersham). Wykorzystywano odczynniki z zestawu, w skład którego wchodziły: dCTP, dTTP, dGTP, mieszanina heksamerów, DNA polimeraza I (fragment



Klenowa) i bufor reakcyjny. Sondę molekularną (1  $\mu\text{g}$  DNA) denaturowano (5 min. w temp.  $100^{\circ}\text{C}$ ), znakowano przez 2 godz. w  $37^{\circ}\text{C}$ , a następnie oczyszczano z nie wbudowanych nukleotydów na kolumnie Sephadex G-50 (Pharmacia). Radioaktywność wyznakowanej sondy mierzono w liczniku scyntylicyjnym (Beckman). Efektywność znakowania wahała się w granicach  $3 \times 10^7$ - $8 \times 10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$  DNA.

### 3.3.4. Hybrydyzacja typu Northern blot i autoradiografia

Przenoszenie prób RNA na membrany oraz hybrydyzację z sondami molekularnymi prowadzono w warunkach standardowych (Sambrook et al., 1989). Membrany z próbami RNA poddawano najpierw prehybrydyzacji w buforze o składzie: 50% formamid, 1 mM EDTA, 0,25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  o pH 7,0; 0,25M NaCl, 7% SDS oraz ssDNA [10 mg/ml], w woreczkach plastikowych przez około 2 godz. w temp.  $42^{\circ}\text{C}$ . Następnie do buforu dodawano uprzednio zdenaturowaną wybraną sondę molekularną wyznakowaną  $\text{P}^{32}$  i prowadzono właściwą hybrydyzację przez 12-14 godz. w temp.  $42^{\circ}\text{C}$ . Po hybrydyzacji membrany płukano w/g schematu: jednokrotne płukanie w 2xSSC (G) przez 5 min., dwukrotne w 2xSSC (G) + 0,1% SDS po 10 min., jednokrotne w 0,5xSSC (G) + 0,1 % SDS przez 30 min. w temp.  $65^{\circ}\text{C}$  oraz końcowe w roztworze 0,1xSSC (G) + 0,1% SDS przez 5 min. Autoradiografię uzyskiwano eksponując membrany przez 1-3 dni wobec klisz Hyperfilm<sup>TM</sup>-MP (Amersham) w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.5. Hybrydyzacja metodą *in situ* (ISH)

Hybrydyzację na skrawkach mózgu (preparaty przodomózgowia) i rdzenia kręgowego 14-dniowych królików *ptII* i kontrolnych metodą *in situ* (ISH) przeprowadzono przy użyciu znakowanej digoksygeniną sondy molekularnej cRNA ("antysense") dla PLP, ściśle w/g metody opisanej przez Breitschopf i współpr. (Breitschopf et al., 1992). Doświadczenia wykonano w Research Unit for Experimental Neuropathology (Uniwersytet Wiedeński), gdzie technika ta została opracowana i jest rutynowo wykorzystywana.



**4. DENSYTOTOMETRIA.** Do oceny densytometrycznej autoradiogramów i immunoblotów (klisz ECL) wykorzystywano densytometr laserowy (UltraScan XL, Pharmacia LKB) i program komputerowy GelScan XL (Pharmacia LKB).

**5. ANALIZĘ STATYSTYCZNĄ** wyników prezentowanych w pracy (każdy eksperyment wykonany na dwóch grupach zwierząt co najmniej w trzech powtórzeniach) przeprowadzano przy użyciu programu Excel 4.0 (t-test dla wartości niesparowanych). Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  odchylenia standardowe (SD). Znamienność statystyczną oznaczono odpowiednio \* $p \leq 0,01$  oraz \*\* $p \leq 0,001$ .

#### **6. NAJCZĘŚCIEJ UŻYWANE ROZTWORY I ICH SKŁAD:**

- A. H<sub>2</sub>O z inhibitorami proteaz: 0,1 mM PMSF, 2 mM EDTA, 2mM EGTA, 10  $\mu$ l/ml antipaina, 5  $\mu$ l/ml leupeptyna, 5  $\mu$ l/ml pepstatyna.
- B. Błękit Coomassie: 0,2% Coomassie Brilliant Blue R-250, 25% metanol, 7% kwas octowy.
- C. Czerwień Ponceau: 3% TCA, 0,2% czerwień Ponceau.
- D. Bufor TPBS: PBS z dodatkiem 0,05% Tween 20
- E. Bufor: PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCL; 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,3
- F. Bufor MOPS: 2 M MOPS [kwas 3-(N-morfolino)propanosulfonowy], 0,5 M octan sodu i 100 mM EDTA; pH 7.0
- G. Bufor SSC: 150 mM NaCl, 15 mM cytrynian sodu



## 7. SPIS ODCZYNNIKÓW:

**Amersham:** anty-mysie przeciwciało sprzężone z peroksydazą chrzanową, białkowe wzorce masy cząsteczkowej (9-200kD), dATP<sup>32</sup>, zestaw ECL do znakowania białek, zestaw ECL do znakowania kwasów nukleinowych.

**BioRad:** akrylamid, APS (nadsiarazan amonu), bis-akrylamid, kwas aminooctowy,  $\beta$ -merkaptioetanol, owcze anty-mysie przeciwciała sprzężone z peroksydazą chrzanową, PMSF (fluorek fenylometanosulfonowy), TEMED (N, N, N', N'-tetrametylenodiamina), zestaw TMB Peroxidase EIA Substrat.

**Boehringer Mannheim:** enzymy restrykcyjne (Bam HI, Eco RI, Hind III, Pvu II), zestaw do znakowania kwasów nukleinowych (dCTP, dTTP, dGTP, mieszanina heksamerów, polimeraza DNA, bufor reakcyjny).

**Gibco BRL:** agar, Bacto-Pepton, ekstrakt drożdżowy.

**Pharmacia:** Sephadex G-50.

**Sigma:** adenozy-no-2'-monofosforan, agaroz, ampicylina, CaCl<sub>2</sub>, Coomassie Brilliant Blue R-250, cykliczny adenozy-no-2'3'-monofosforan, czerwień Ponceau, DNAza I, fenol, formaldehyd, formamid, glicerol, KCl, leupeptyna, MOPS [kwas 3-(N-morfolino)propanosulfonowy], NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pepstatyna A, przeciwciała (anty-CNP, anty-MBP, przeciwciało sprzężone z biotyną, przeciwciało sprzężone z peroksydazą chrzanową skierowane przeciwko biotynie), RNAza A, Tris-HCl oraz inne odczynniki używane w metodach służących do oznaczania kwasów nukleinowych, oznaczone symbolem "molecular biology grade".

Źródła pozostałych odczynników zostały wymienione w tekście przy opisie poszczególnych metod lub pochodziły z firmy POCh (cz.d.a.).



## V. WYNIKI

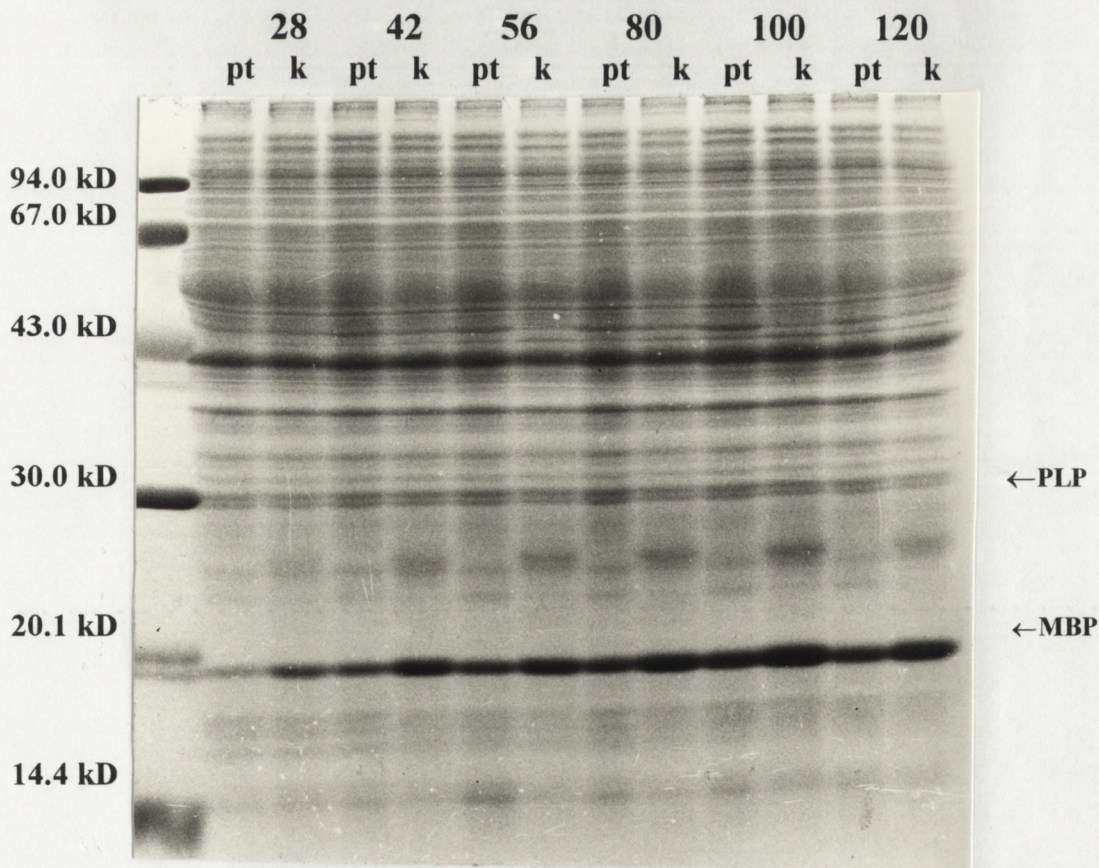
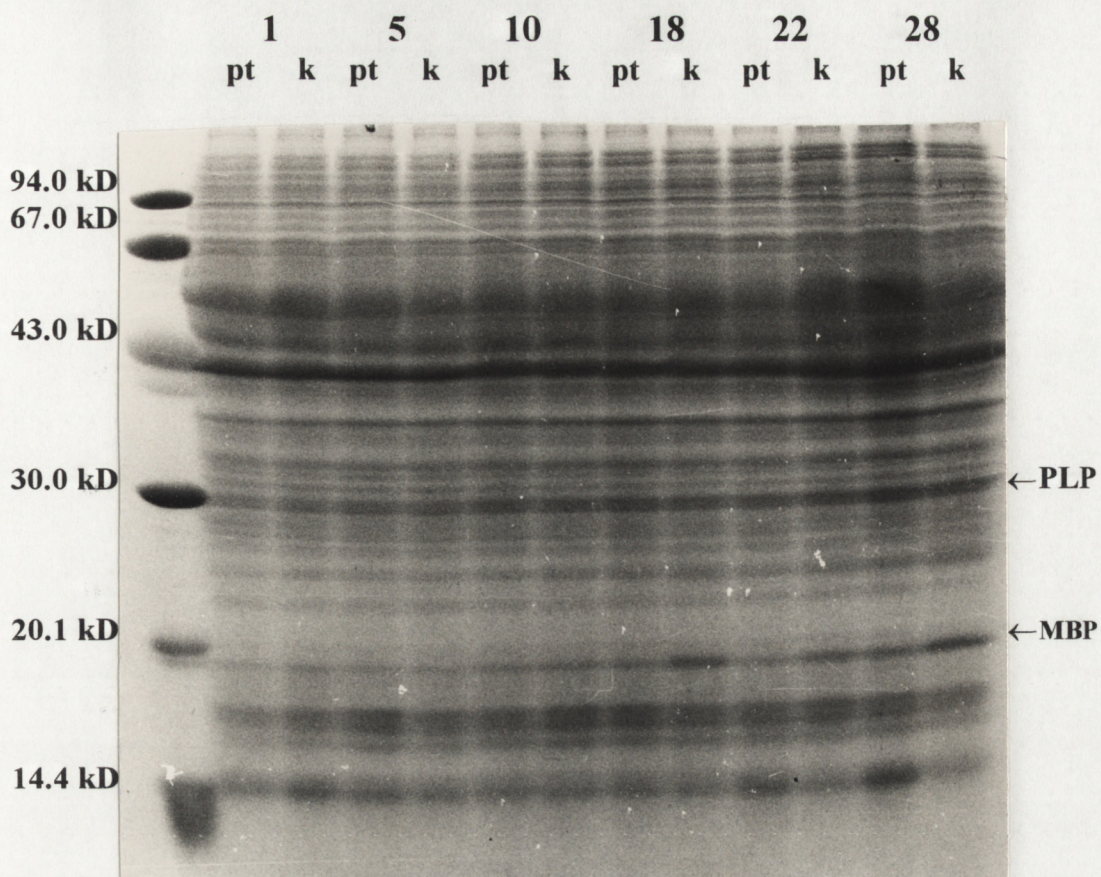
### 1. OCENA CZĘŚCI BIAŁKOWEJ MIELINY KRÓLIKÓW KONTROLNYCH I MUTANTÓW *PT*

#### 1.1. Ekspresja białek mielinowych w rozwoju osobniczym królika zdrowego

Rozdział elektroforetyczny białek homogenatów mózgowych w żelach poliakrylamidowych, wybarwionych następnie błękitem Coomassie, pozwolił dostrzec wyraźną tendencję do wzrostu zawartości niektórych białek w mózgu królika w trakcie rozwoju osobniczego, t.j. między 1 a 120 dniem życia (Ryc. 1). Porównanie współczynników ruchliwości elektroforetycznej (*rf*) białek ze wzorcami masy cząsteczkowej (widocznymi po lewej stronie żelu), umożliwiło stwierdzenie, że białka charakteryzujące się najbardziej dynamicznym przyrostem ilości mieściły się w przedziale mas cząsteczkowych między ~18 a 30 kD, wielkością odpowiadając głównym białkom mielinowym, takim jak PLP i MBP (Ryc.1). Identyfikacja tych jak i innych charakterystycznych białek mielinowych w homogenatach mózgowych prowadzona była za pomocą immunodetekcji na błonach nitrocelulozowych (Western blot). Analiza densytometryczna uzyskanych immunoblotów wykazała, że ilość wszystkich badanych białek mielinowych (PLP, MBP, MAG, CNP i MOG) stopniowo wzrastała podczas rozwoju osobniczego królika osiągając maksymalną wartość ~100-ego dnia życia (Ryc. 2, 3). Obraz ekspresji poszczególnych białek mielinowych w trakcie rozwoju przedstawiono zatem jako procenty wartości cechujących króliki w wieku 100 dni.

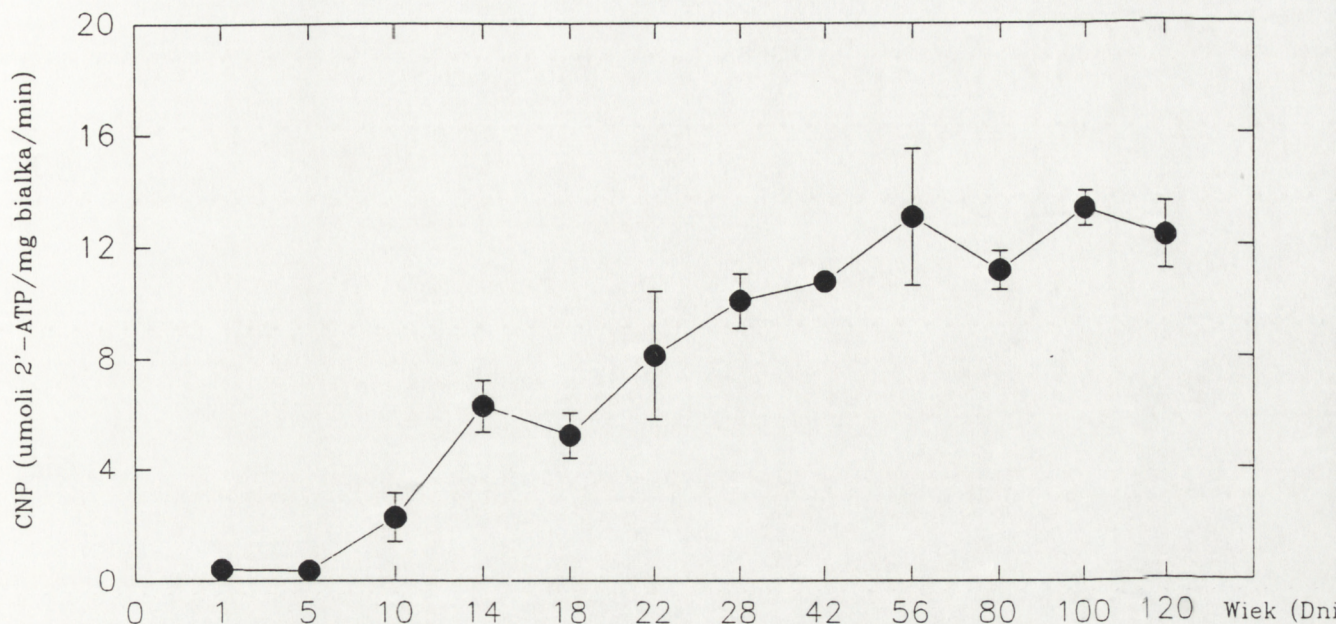
Mimo wspólnej tendencji wzrostowej stężeń wszystkich badanych białek mielinowych, które osiągały swój punkt kulminacyjny około setnego dnia życia, poszczególne białka ulegały ekspresji w różnym czasie.





Ryc.1. Rozdział elektroforetyczny (SDS-PAGE) białek homogenatów mózgu królika kontrolnego i mutantu *ptII*, po wybarwieniu błękitem Coomassie. Białka, których ilość zmienia się wyraźnie w trakcie rozwoju osobniczego, zidentyfikowano na podstawie wzorców masy cząsteczkowej (widocznych z lewej strony żelu) i zaznaczono strzałką.





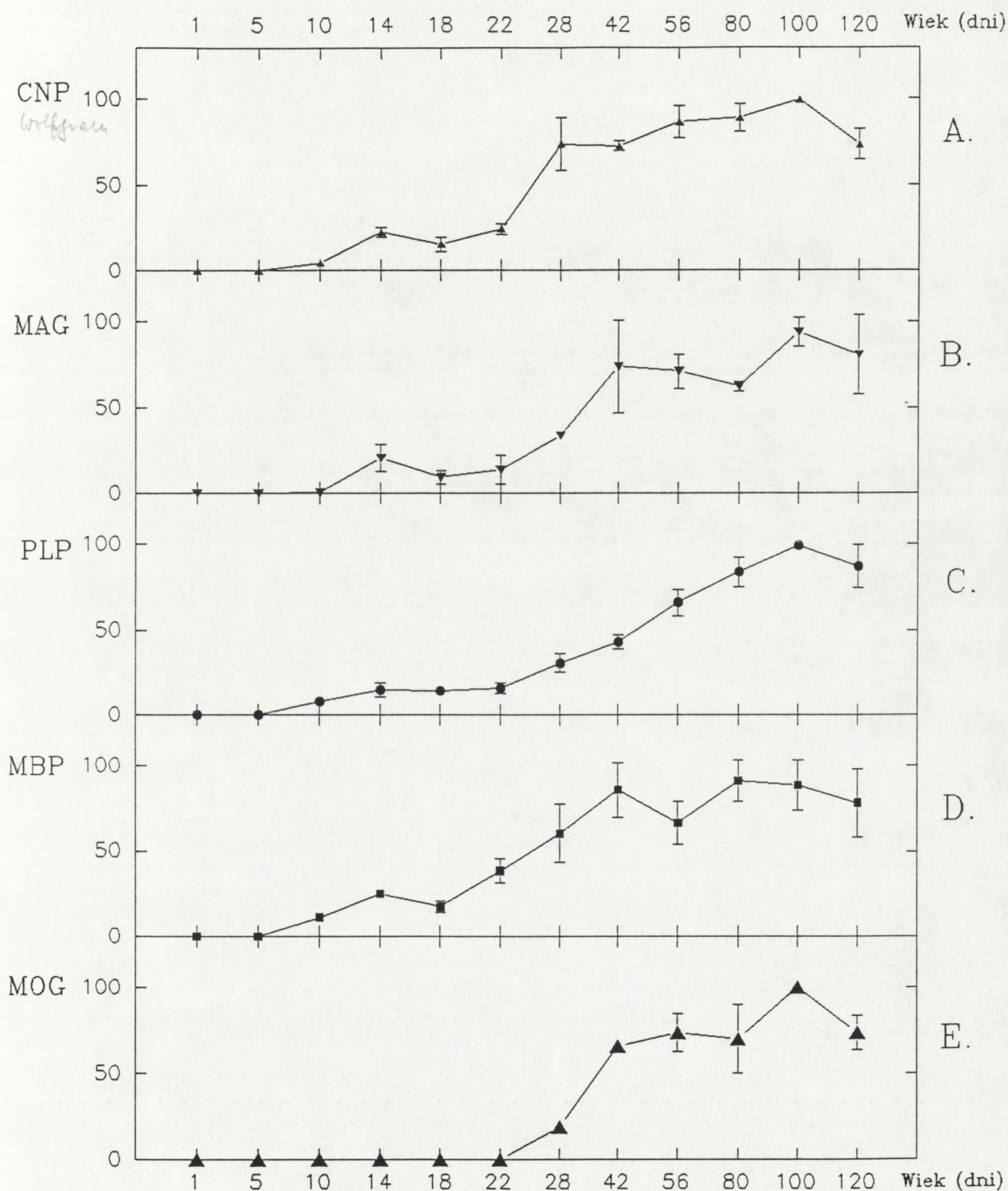
Ryc.2. Zmiany aktywności specyficznej CNPazy w homogenatach mózgu królika kontrolnego w trakcie rozwoju osobniczego. Wyniki podane jako średnie  $\pm$ SD z 3 oznaczeń.

CNPaza była pierwszym spośród badanych białek mielinowych, pojawiających się w trakcie rozwoju osobniczego. Wyniki uzyskane metodą immunoblottingu potwierdzone zostały poprzez pomiar jej specyficznej aktywności enzymatycznej w homogenatach mózgu. Zestawienie wyników uzyskanych za pomocą tych dwóch metod wskazuje, że obecność CNPazy w mózgu wykrywana była już od pierwszego dnia życia królika przy zastosowaniu metody enzymatycznej (Ryc.2), zaś jej reaktywność immunologiczną z użytym przeciwciałem obserwowano dopiero od 10-go dnia (Ryc. 3A).

Białkiem wykrywanym bardzo wczesnie w rozwoju osobniczym metodą immunoblottingu był również MAG- jego śladową ekspresję wykryto już w 1-yim dniu (Ryc.3B).

Obecność głównych białek strukturalnych mieliny OUN, tj. obu proteolipidów (PLP i DM-20) oraz białek zasadowych (18,5 kD oraz 21,5 kD izoformy MBP) wykrywano dopiero w grupie zwierząt 10-dniowych, co sugeruje, że pojawiają się one w mózgu królika w przedziale między 5 a 10 dniem życia królika (Ryc.3 C, D).





Ryc.3. Obraz ekspresji wybranych białek mielinowych w rozwoju osobniczym królika kontrolnego. Przedstawione wyniki (średnie  $\pm$ SD) otrzymano dzięki analizie densytometrycznej immunoblotów (co najmniej 4), przy czym za 100% przyjęto wartości uzyskane w grupie zwierząt 100-dniowych.



Białko MOG ulegało ekspresji jako ostatnie spośród badanych białek, było ono wykrywalne za pomocą użytych przeciwciał dopiero od 28 dnia życia (Ryc. 3E).

Wyniki uzyskiwane za pomocą immunoblottingu weryfikowane były w przypadku białka MBP w późniejszych doświadczeniach poprzez zastosowanie innej techniki immunodetekcji, a mianowicie metody ELISA, zaś w przypadku CNPazy, jak wspomniano poprzednio, poprzez pomiary jej aktywności enzymatycznej. Stwierdzono dużą zbieżność wyników otrzymywanych przy zastosowaniu wymienionych różnych metod detekcji białek mielinowych w homogenatach mózgu.

### **1.2. Ekspresja białek mielinowych w rozwoju osobniczym królika *ptII***

Porównanie wyników badań homogenatów mózgowych królika zdrowego i mutantu *ptII* jednoznacznie wykazało obniżenie ilości wszystkich badanych białek pod wpływem mutacji, chociaż stopień ich niedoboru był zróżnicowany w zależności od rodzaju białka i wieku zwierzęcia. Analiza densytometryczna immunoblotów, wyrażona w procentach wartości kontrolnych charakteryzujących daną grupę wiekową, ujawniła przede wszystkim drastyczny niedobór białka PLP (Tab.1). Największy deficyt tego białka obserwowano w początkowym okresie rozwoju osobniczego, tj. do ~42 dnia życia; ilość PLP kształtowała się wówczas na poziomie 10-20% kontroli. Po zakończeniu okresu intensywnej mielinizacji, między 42 a 120 dniem życia zawartość PLP w mózgu mutata *ptII* stopniowo wzrastała, osiągając jednak tylko 30-40% wartości poziomu kontrolnego.

Średnia zawartość pozostałych białek mielinowych również była obniżona o około 10-30 % w stosunku do kontroli, przy czym większy stopień niedoboru poszczególnych białek obserwowano w początkowym okresie ich ekspresji, która wydawała się być opóźniona w stosunku do kontroli (Tab.1). Wyniki analizy densytometrycznej (Tab.1A) zilustrowane zostały zdjęciami reprezentatywnych immunoblotów (Tab. 1B), wyraźnie pokazujących istnienie różnic w ekspresji białek mielinowych u królika kontrolnego i mutantu *ptII*.



BIĄŁKO	1	5	10	14	18	22	28	42	56	80	100	120
CNPenz.	86.0±2.9**	83.8±1.54**	32±7.28**	43.6±6.7**	53.0±6.5**	40.5±12.1**	54.3±5.1**	64.1±2.0**	57.7±6.7**	75.7±10.3*	75.0±6.0**	96.0±9.8
CNP	nw	nw	nw	41,8±0,86**	83,3±18,4	—	44,2±18,9**	64,0±21,2*	61,6±11,5**	67,9±7,1*	86,9±15,5*	83,1±17,9*
MAG	nw	nw	7,1±3,0**	37,8±1,9**	70,1±9,8*	72,0±7,1	64,9±35,0	82,3±15,8	78,7±21,6	98,7±19,4	73,4±7,2	93,7±20,8
MBP	nw	nw	nw	63,3±21,4*	66,8±25,7*	50,1±15,6*	80,6±18,2	95,5±7,1	94,5±9,4	77,0±21,3	94,6±9,4	92,5±12,9
PLP	nw	nw	nw	11.3±3.7**	26.0±2.9**	18.3±5.5**	11.8±2.4**	40.6±6.4**	31.5±3.9**	20.2±6.9**	42.1±14.0**	43.8±12.6**
MOG	nw	nw	nw	nw	nw	—	—	39,6±24,0*	76,8±37,8	61,0±6,8*	76,5±2,1	61,6±7,8*

nw-nie wykryto

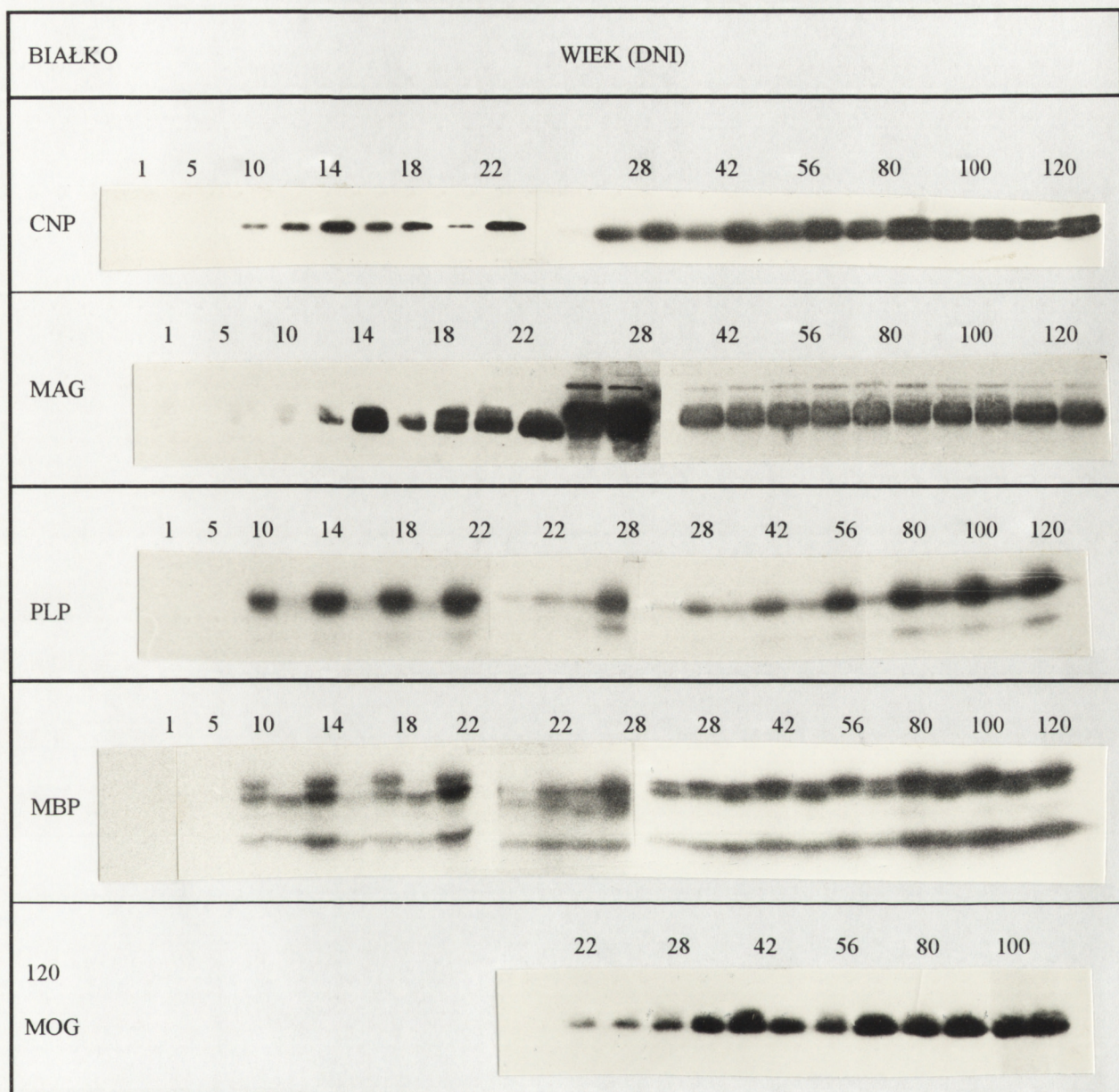
**A.**

Tab.1. Względna zawartość wybranych białek mielinowych w homogenatach mózgu w trakcie rozwoju osobniczego mutantu *ptII* :

A) wyniki analizy densytometrycznej uzyskanych immunoblotów (co najmniej 4) wyrażone w procentach poziomu kontrolnego (średnie ±SD) w danej grupie wiekowej; różnice znamienne względem grupy kontrolnej zaznaczono jako \* $p \leq 0,01$  oraz \*\* $p \leq 0,001$ .

B) zdjęcia najbardziej reprezentatywnych immunoblotów.

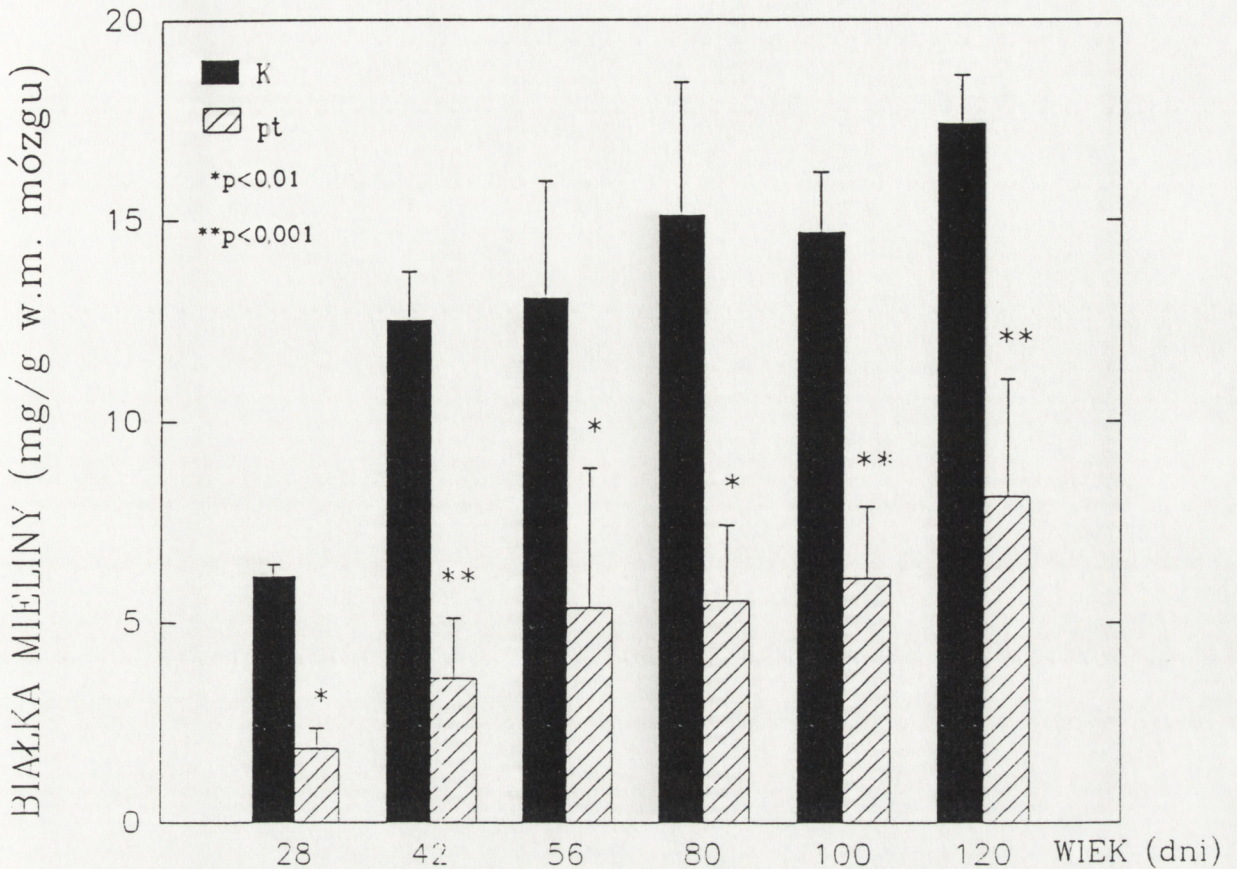




## B.

Tab.1. Względna zawartość wybranych białek mielinowych w homogenatach mózgu w trakcie rozwoju osobniczego mutantu *ptII*: A) wyniki analizy densytometrycznej uzyskanych immunoblotów (co najmniej 4) wyrażone w procentach poziomu kontrolnego (średnie  $\pm$ SD) w danej grupie wiekowej; różnice znamienne względem grupy kontrolnej zaznaczono jako \* $p \leq 0,01$  oraz \*\* $p \leq 0,001$ . B) zdjęcia najbardziej reprezentatywnych immunoblotów.





Ryc. 4. Porównanie przyrostu białek frakcji mielinowej w trakcie rozwoju osobniczego królika kontrolnego i mutanta *ptII*. Wyniki przedstawione jako średnie  $\pm$ SD z 4 oznaczeń. Różnice znamienne względem grupy kontrolnej zaznaczono jako \* $p \leq 0,01$  oraz \*\* $p \leq 0,001$ .

### 1.3. Bilans białek mielinowych w rozwoju osobniczym królika *ptII*

Wyraźnie zaznaczony spadek ilości badanych białek mielinowych w homogenatach mózgowych królika *ptII* nasuwał pytanie, czy obserwowany niedobór odzwierciedla wpływ na efektywność wytwarzania błon mielinowych i/lub ich zmieniony skład białkowy. W tym celu z homogenatów mózgowych królików *ptII* i kontrolnych wyizolowano frakcję mielinową, a następnie dokonano pomiaru jej całkowitego stężenia białka. Ponieważ u królika największy przyrost ilości mielinu następuje w 3-4 tygodniu życia, do badań wybrano zwierzęta w wieku od 28 do 120 dnia życia. Wykazano, że w trakcie rozwoju osobniczego zawartość mielinu wyraźnie wzrasta w obu grupach zwierząt (Ryc. 4). Jednocześnie obserwowano znamienne obniżenie (o ~50-70%) tego



przyrostu w mózgu mutantu *ptII*, co świadczy o znaczącym niedoborze mieliny. Stopień hipomielinizacji był mniej więcej stały podczas całego badanego okresu rozwoju osobniczego i nie wykazywał tendencji do wyrównania do poziomu kontrolnego (Ryc.4).

#### 1.4. Skład białkowy mieliny *ptII* w różnych grupach wiekowych

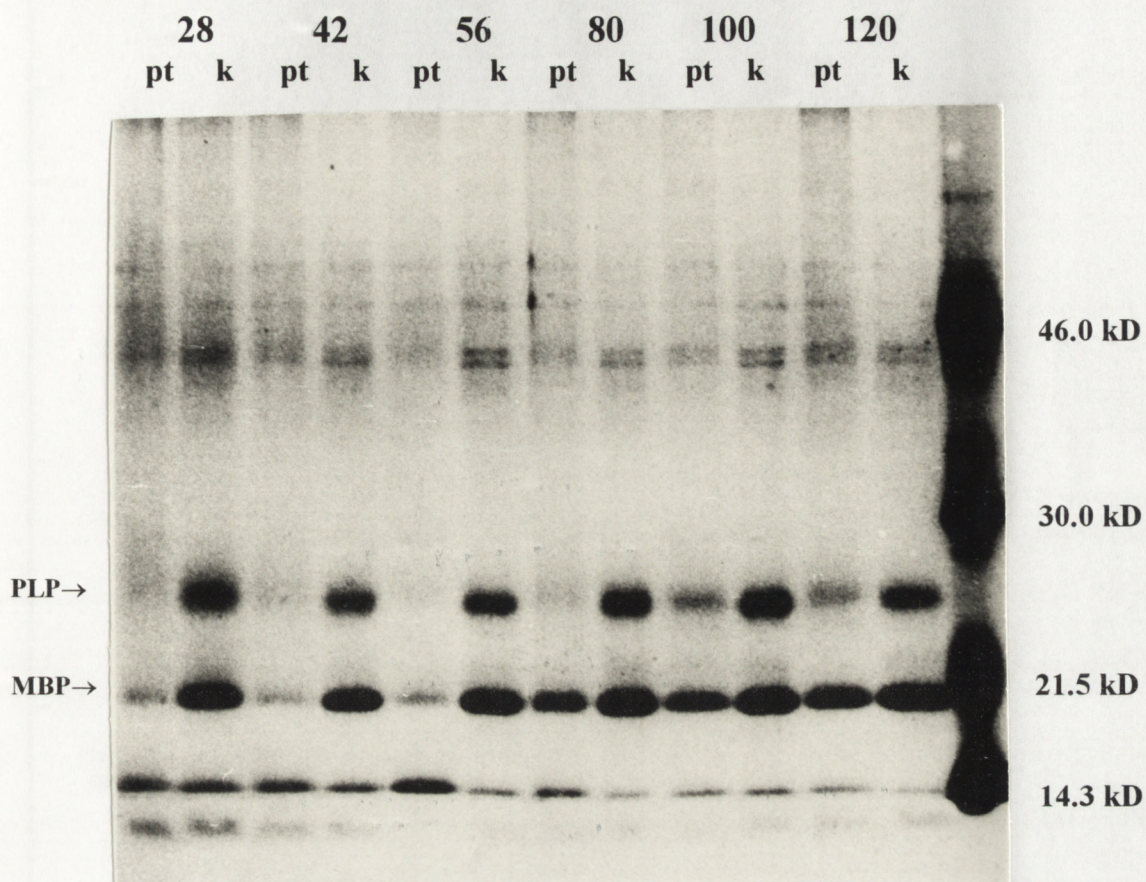
Rozdział elektroforetyczny białek frakcji mielinowych w żelu polyakrylamidowym, wybarwionym następnie błękitem Coomassie, wykazał istnienie wyraźnych różnic nie tylko w ilości, ale również w składzie białkowym mieliny kontrolnej i *ptII* (Ryc.5).

Dzięki porównaniu współczynników ruchliwości elektroforetycznej tych białek, których zawartość jest wyraźnie zaburzona, ze wzorcami masy cząsteczkowej ustalono, że zaburzenia dotyczą głównych białek mielinowych o masie między 18 a 30 kD.

Różnice między białkowym składem mieliny kontrolnej i *ptII* były następnie badane za pomocą metody immunoblottingu. Wyniki analizy densytometrycznej wyrażone w procentach wartości kontrolnych cechujących daną grupę wiekową (Tab.2) przedstawiały się następująco:

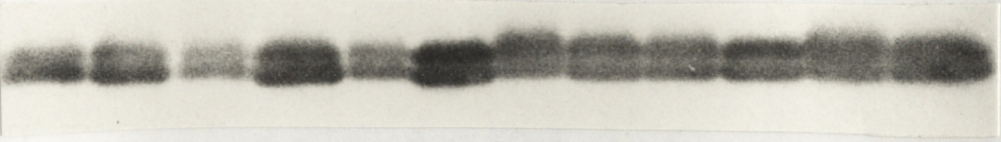
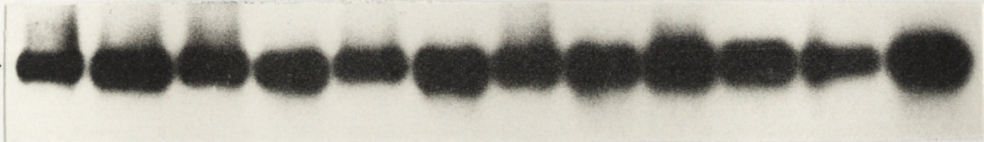
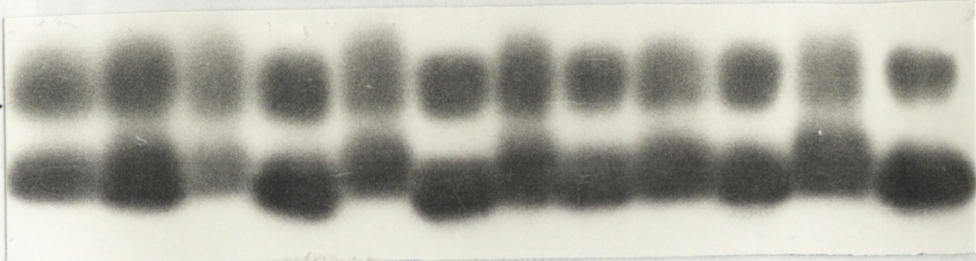
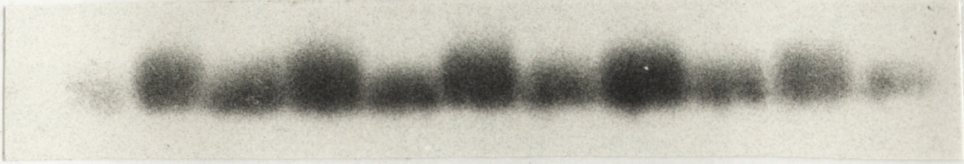
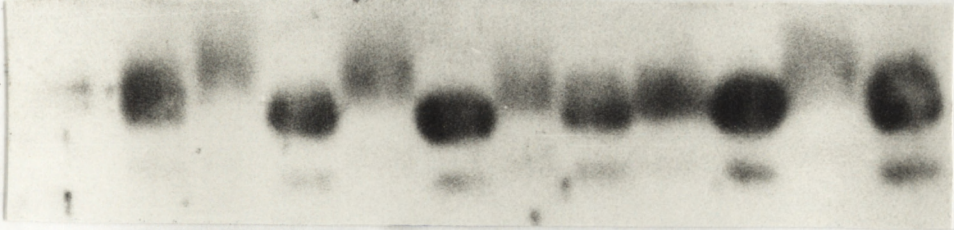
- stwierdzono znamienne niedobór produktów białkowych zmutowanego genu, tj. proteolipidów PLP i DM-20, sięgający 80% w grupach zwierząt 28 i 42 dniowych i stopniowo zmniejszający się do średnio 55% u zwierząt 120 dniowych,
- obserwowano również 10-40 % obniżenie zawartości białek CNP i MBP oraz odchylenia od normy w poziomie CNPazy występujące w równoległych oznaczeniach aktywności enzymatycznej,
- najmniej zaburzona była ilość białka MAG (80-97% kontroli),
- zaobserwowano ponadto istotny nadmiar białka MOG - jego zawartość w mielinie charakteryzowała się co prawda dużym rozrzutem osobniczym, niemniej jednak jego ilość we wszystkich przypadkach znacznie przekraczała poziom kontrolny (o 50 do 300 procent).





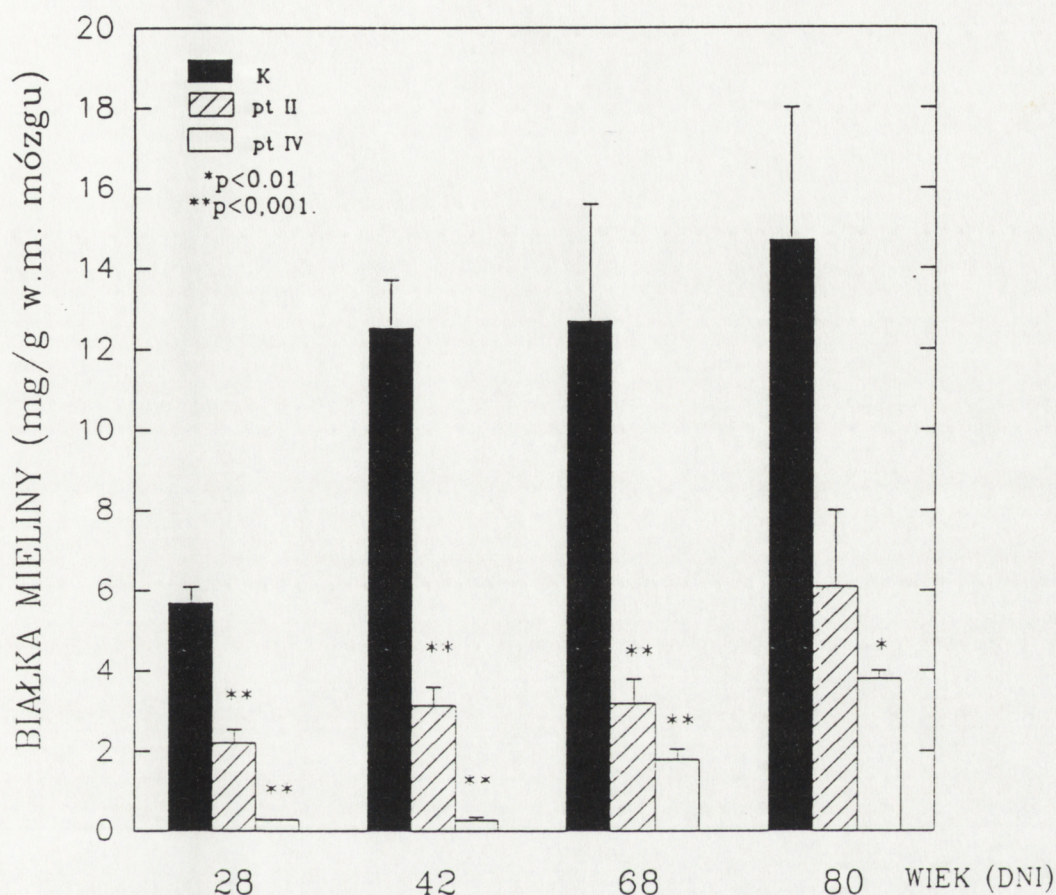
Ryc. 5. Rozdział elektroforetyczny (SDS-PAGE) białek frakcji mielinowych królika kontrolnego oraz mutantu *ptII* wobec wzorców masy cząsteczkowej, po wybarwieniu błękitem Coomassie. Obniżenie zawartości niektórych białek w mielinie *ptII* w trakcie rozwoju osobniczego zaznaczono strzałką.



BIAŁKO	WIEK (DNI)					
	28	42	56	80	100	120
CNP(enzym.)	92.2±16	70.5±25*	77.2±25.7	74.6±19.1*	97.5±20	86.2±22.6
CNP(immunol.)	75.5±11.5*	69.2±2.5**	67.1±11.7*	89.6±1.8**	85.2±9.4*	77.5±5.6*
						
MAG	90.9±2.8*	97.1±7.2	80.8±4.8*	90.3±5.1*	98±2.5	80.4±3.8**
						
MBP	89.5±8.5*	60.5±5.5**	91.2±4.8*	90.4±7.2*	88.9±4.6*	91.5±6.1
						
MOG	205±11.1 **	110±8.7*	149±29.8*	244.3±77*	368.5±156*	308.5±50**
						
PLP	22.8±11.3**	26.3±10.2**	33.6±7.1 **	43.2±10.7 **	37.4±20 *	55.4±10.8 **
						

Tab. 2. Względna zawartość wybranych białek we frakcji mielinowej w trakcie rozwoju osobniczego mutantu *ptII*. Wyniki uzyskane za pomocą analizy densytometrycznej (co najmniej 4 immunoblotów) wyrażono w procentach wartości kontrolnych (wartości średnie ±SD) charakteryzujących daną grupę wiekową i zilustrowano zdjęciami najbardziej ościreprezentatywnych immunoblotów. Różnice znamienne względem grupy kontrolnej zaznaczono jako \* $p \leq 0,01$  oraz \*\* $p \leq 0,001$ .



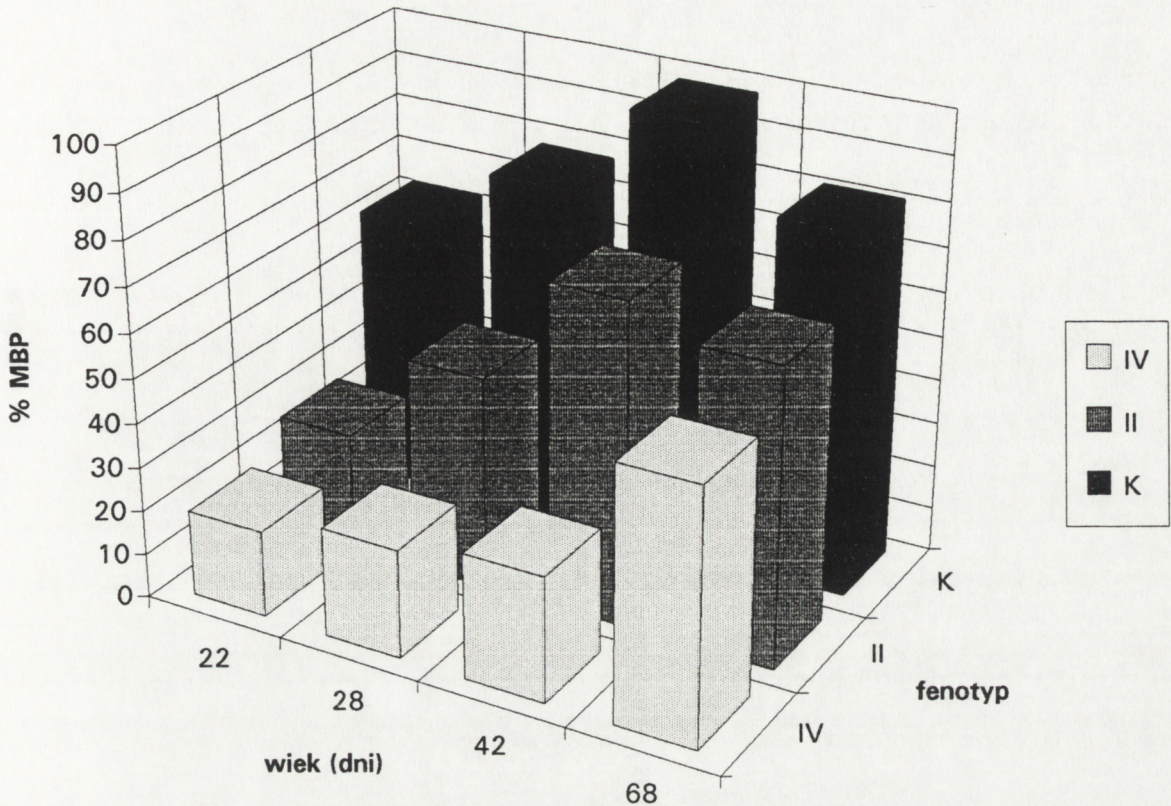


Ryc. 6. Porównanie całkowitej ilości białek frakcji mielinowej w trakcie rozwoju osobniczego mutantów *ptII* oraz *ptIV*. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$ SD z 4 oznaczeń. Różnice znamienne względem grupy kontrolnej zaznaczono jako \* $p \leq 0,01$  oraz \*\* $p \leq 0,001$ .

### 1.5. Różnorodność fenotypowa a niedobór białek mielinowych u mutantów *pt*

Porównanie całkowitego stężenia białek w wyizolowanych frakcjach mielinowych przypadających na świeżą masę mózgu mutantów *ptII* i *ptIV*, wykazało istnienie wyraźnego związku między wielkością ich niedoboru, a stopniem nasilenia objawów neurologicznych. Podczas gdy u mutantów *ptII* występowało około 70-procentowe obniżenie ilości białek, to u mutantów *ptIV* obserwowano deficyt sięgający aż 90% (Ryc.6).

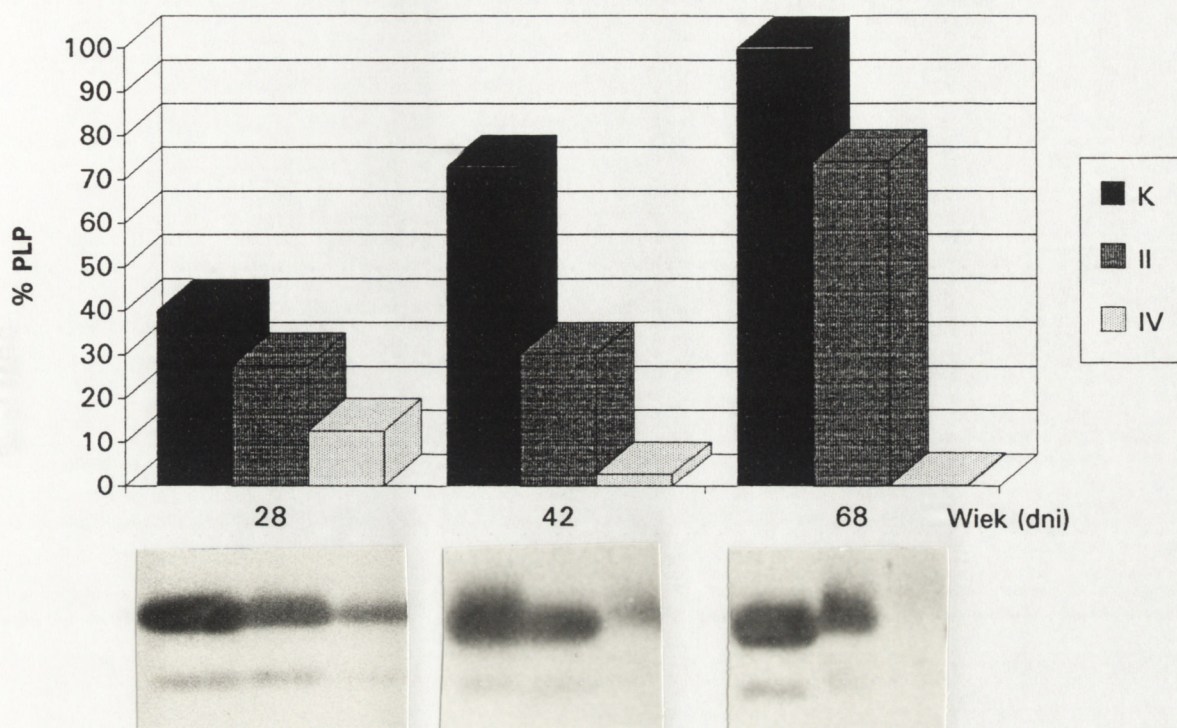




Ryc. 7. Względna zawartość białka MBP w homogenatach mózgu w trakcie rozwoju osobniczego królika kontrolnego oraz mutantu *ptII* i *ptIV*. Wyniki uzyskane za pomocą metody ELISA wyrażono w procentach ilości MBP u 42-dniowych królików kontrolnych. Zaznaczone punkty odpowiadają średnim wartościom z trzech eksperymentów przeprowadzonych dla każdej z dwóch grup zwierząt. SD nie przekraczało 10% wartości średniej i zostało pominięte.

Poza stwierdzonym obniżeniem ogólnej ilości białek mielinowych, oznaczono w obu grupach doświadczalnych zawartość białka MBP, uważanego za charakterystyczny znacznik mieliny. Wyniki otrzymane w/g metody ELISA i wyrażone w procentach wartości uzyskanych dla 42-dniowych królików kontrolnych (maksymalna wartość), wykazały największy niedobór białka MBP w mielinie mutantu *ptIV*, potwierdzając istnienie zależności między stopniem hipomielinizacji a nasileniem objawów chorobowych (Ryc.7).



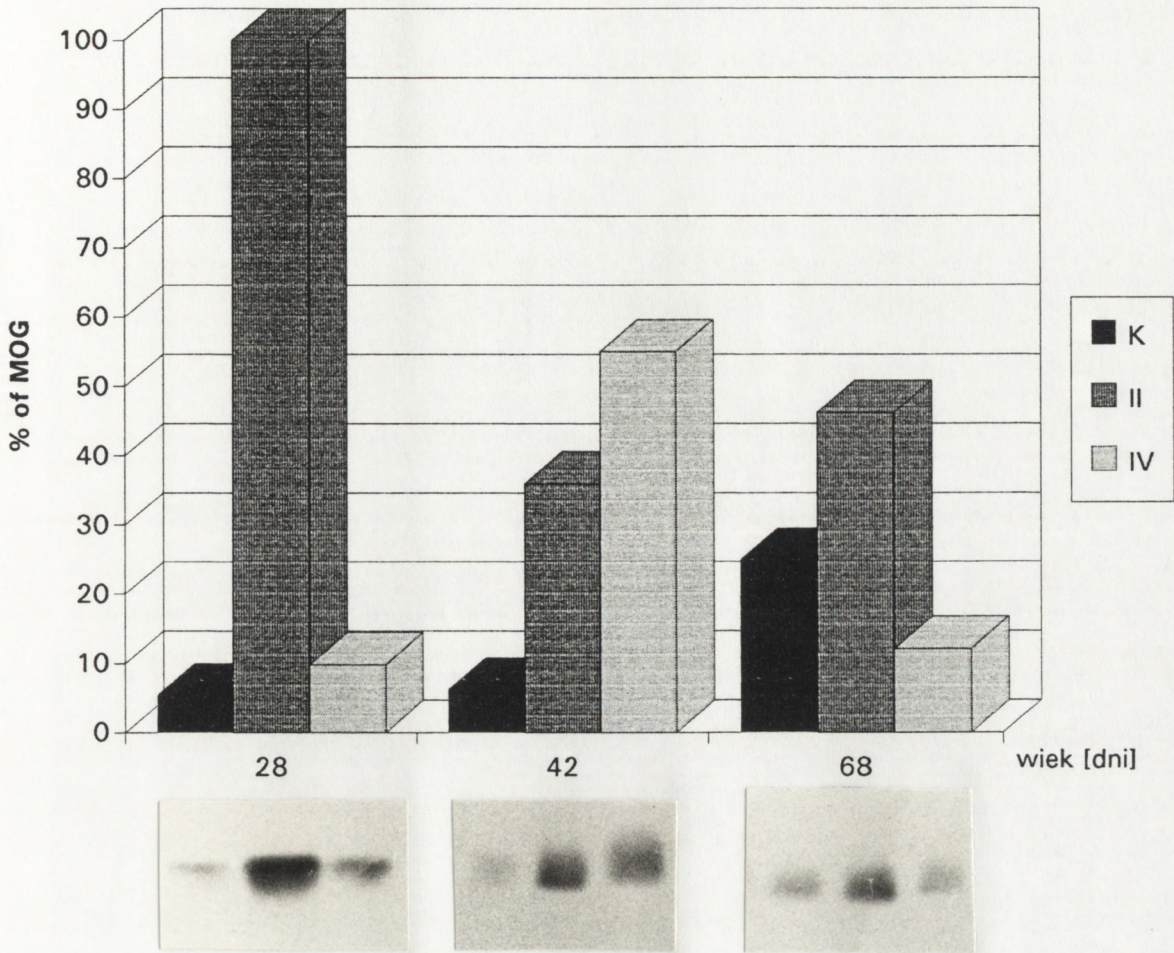


Ryc. 8. Porównanie względnej zawartości białka PLP we frakcji mielinowej w trakcie rozwoju osobniczego królika kontrolnego oraz mutantów *ptII* oraz *ptIV*. Wykres przedstawia wyniki densytometrii reprezentatywnych immunoblotów (wartości średnie  $\pm$ SD), których zdjęcia zamieszczono poniżej. Za 100 % przyjęto wartości uzyskane dla 68-dniowej kontroli.

### 1.6. Różnorodność fenotypowa a skład białkowy mieliny

Zawartość poszczególnych białek w oczyszczonych frakcjach mielinowych mutantów *ptII* i *ptIV* określano za pomocą immunoblottingu ze specyficznymi przeciwciałami. Wyniki analizy densytometrycznej, przedstawione w procentach wartości cechujących 68-dniowe króliki kontrolne, ujawniły istnienie ścisłej zależności między niedoborem białka PLP a fenotypem badanych zwierząt (Ryc.8). W mielinie mutantu *ptIV* deficyt PLP sięgał prawie 100%, podczas gdy jego zawartość w mielinie mutantu *ptII* obniżona była o 60-70% w stosunku do kontroli.





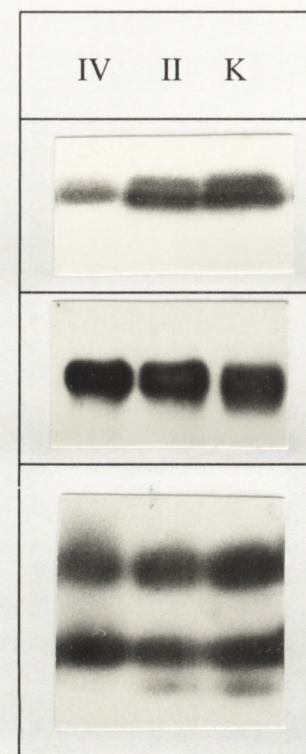
Ryc. 9. Porównanie względnej zawartości białka MOG we frakcji mielinowej w trakcie rozwoju osobniczego królika kontrolnego oraz mutantów *ptII* oraz *ptIV*. Wykres przedstawia wyniki densytometrii reprezentatywnych immunoblotów, których zdjęcia zamieszczono poniżej. Za 100 % przyjęto wartości uzyskane dla 68-dniowej kontroli.

Wyniki analizy densytometrycznej immunoblotów otrzymanych przy użyciu przeciwciała anti-MOG i wyrażone w procentach wartości uzyskanych dla 68-dniowych zwierząt kontrolnych pokazały, że ekspresja tego białka zależała zarówno od badanego fenotypu jak i od wieku zwierzęcia (Ryc.9). W najmłodszej i najstarszej badanej grupie (28D i 68D) nadmiar MOG jest największy w mielinie *ptII*, zaś w grupie zwierząt 42-dniowych w mielinie *ptIV*.

Zanotowano również większy niedobór CNPazy oraz 18,5 kD izoformy MBP w mielinie mutantu *ptIV* niż u *ptII*, jednak różnice w ilości obu białek między obydwoma fenotypami nie były statystycznie znamienne (Tab.3).



BIAŁKO	FENOTYP IV	FENOTYP II
CNP	67,0±15,6*	86,7± 8,1
MAG	89,3± 14,3	90,1± 8,3
MBP 21,5 kD	94,4± 11,6	95,7± 13,6
MBP 18,5 kD	66,8± 12,1*	71,5± 17,0*



A.

B.

Tab. 3. Względna zawartość wybranych białek we frakcji mielinowej mutantów *ptII* i *ptIV*. A) wyniki analizy densytometrycznej (nie mniej niż 4 immunoblotów) wyrażone w procentach wartości kontrolnych (wartości średnie ±SD), różnice znamienne względem grupy kontrolnej zaznaczono jako \* $p \leq 0,01$  oraz \*\* $p \leq 0,001$ . B) zdjęcia reprezentatywnych immunoblotów.



## 2. OCENA CZĘŚCI GLIKOLIPIDOWEJ MIELINY KRÓLIKÓW KONTROLNYCH I MUTANTÓW *Pt*

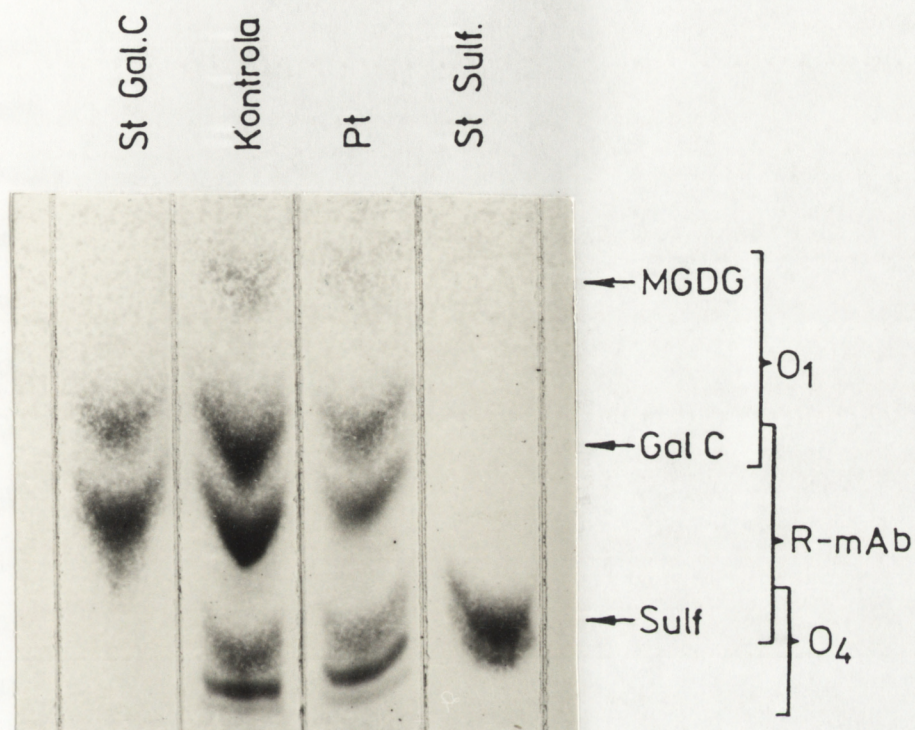
### 2.1. Różnice w zawartości glikolipidów w mózgu królika kontrolnego i mutantu *PtII*

Chromatografia cienkowarstwowa lipidów wyekstrahowanych z homogenatów mózgowych 22-dniowych królików, po wybarwieniu odczynnikiem orcynolowym, wykazała wyraźne obniżenie ilości glikolipidów u mutantu *PtII*. Porównanie ze standardami pozwoliło zidentyfikować poszczególne subklasy glikolipidów jako cerebrozydy, sulfatydy i dwuglicerydy monogalaktozylowe (Ryc.10). Otrzymane wyniki wskazywały na zaburzenie nie tylko białkowej, lecz również glikolipidowej części składowej mieliny *PtII*, związanej najprawdopodobniej z hipomielinizacją towarzyszącą chorobie.

### 2.2. Ekspresja glikolipidowych markerów oligodendrocytarno-mielinowych

Immunoreakcję homogenatów mózgu z przeciwciałami rozpoznającymi wybrane antygeny glikolipidowe, będące znacznikami różnicowania się oligodendrocytów oraz formowania mieliny, oznaczano za pomocą immunodetekcji metodą ELISA. Uzyskane wyniki wyrażone w procentach wartości otrzymanych dla 22-dniowych królików kontrolnych ujawniły, że ilość antygeny reagującego z przeciwciałem O1, identyfikowanego z obecnością galaktocerebrozydów i dwuglicerydów monogalaktozylowych, intensywnie wzrastała w mózgu królika między 10 a 30 dniem życia, a następnie utrzymywała się na w przybliżeniu stałym poziomie aż do ostatniej badanej grupy wiekowej (68 D) (Ryc.11A). Natomiast u królika *PtII* skokowy wzrost ekspresji tego antygeny następował z kilkudniowym opóźnieniem i wcześniej osiągał swe "plateau", na poziomie odpowiadającym mniej więcej połowie poziomu kontrolnego.



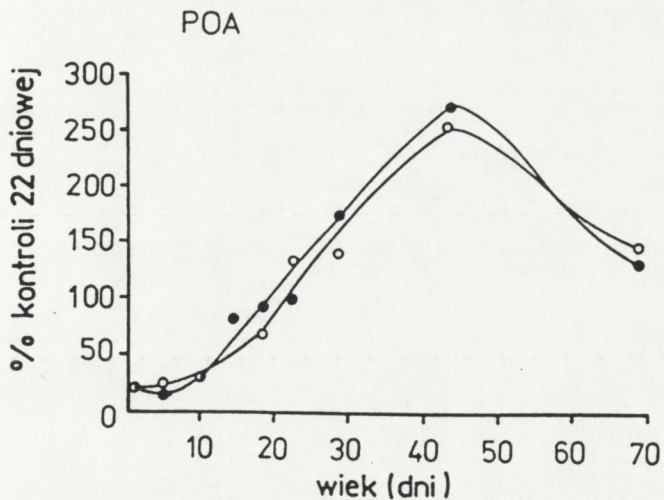
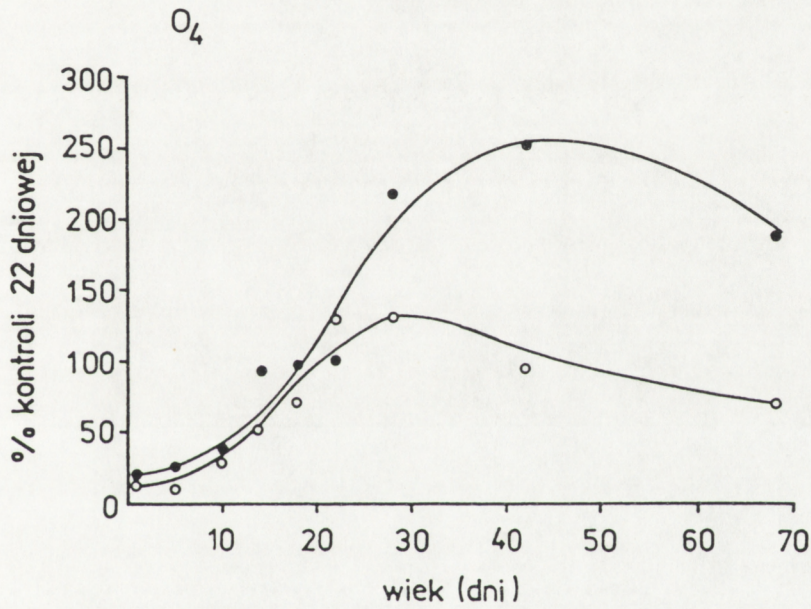
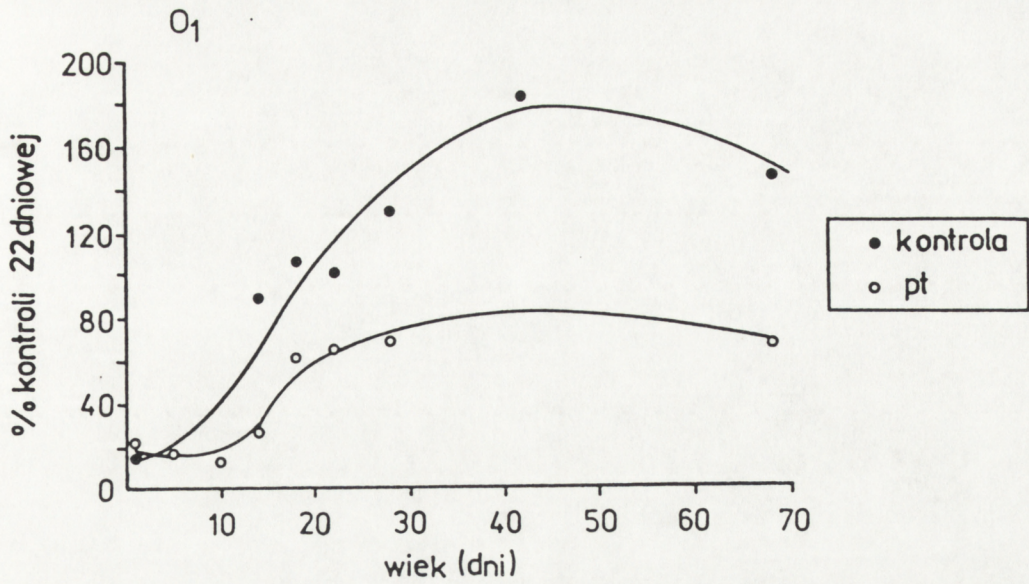


Ryc. 10. Obraz chromatografii cienkowarstwowej glikolipidów z homogenatów mózgow 22-dniowego królika kontrolnego oraz *ptII*, po wybarwieniu odczynnikiem orcynolowym. Poszczególne glikolipidy zidentyfikowano na podstawie standardów i opisano na załączonym zdjęciu; zaznaczono również przeciwciała rozpoznające poszczególne lipidy.



Podobnie przedstawiał się związany z wiekiem wzrost zawartości antygenów reagujących z przeciwciałem O4, rozpoznającym zarówno sulfatydy jak i galaktocerebrozydy. Jedynie w początkowym okresie rozwoju osobniczego, tj. między 1 a 22 dniem życia, obserwowane wyniki reakcji ELISA u mutantu *ptII* i kontroli były niemal identyczne (Ryc. 11B). Sugerowało to możliwość istnienia dodatkowego antygeny występującego zasadniczo tylko we wczesnych stadiach różnicowania się OL, który rozpoznawany był również przez przeciwciało O4. Mniejsza rozbieżność między krzywymi reaktywności O4 w kontroli i u królika *ptII* u młodszych zwierząt pozwalałaby wówczas sądzić, że ilość owego hipotetycznego antygeny jest u mutantu zbliżona do normy, modyfikując w ten sposób przebieg krzywej. To przypuszczenie zweryfikowano, wykorzystując do zablokowania immunoreaktywności prób przypadającej na sulfatydy i galaktocerebrozydy (a więc podstawowe znane lipidy reagujące z przeciwciałem O4) przeciwciało R-mAb, które reaguje z tymi samymi antygenami glikolipidowymi. Oparto się tutaj na różnicy w klasie odpowiednich immunoglobulin, jako że przeciwciało O4 należy do IgG, zaś przeciwciało R-mAb znajduje się we frakcji IgM. Dzięki temu, reakcja immunologiczna z przeciwciałem O4, poprzedzona blokującą inkubacją z przeciwciałem R-mAb i następnie identyfikowana przy zastosowaniu wtórnego przeciwciała anti-IgG, odpowiada dodatkowej immunoreaktywności biochemicznie niezidentyfikowanego antygeny rozpoznawanego przez O4, którego istnienie zakładano przystępując do eksperymentu. Ze względu na swą wczesną ekspresję jest on uważany za charakterystyczny dla prooligodendroblastu (POA). Jego ilość w homogenatach mózgu liniowo wzrastała w trakcie rozwoju osobniczego królika zarówno zdrowego, jak i mutantu, aż do 40 D, po czym spadała do około połowy swego maksymalnego stężenia w grupie zwierząt 68-dniowych (Ryc. 11C). Nie wykazano różnic w jego ekspresji pomiędzy grupą kontrolną a mutantami *pt*.





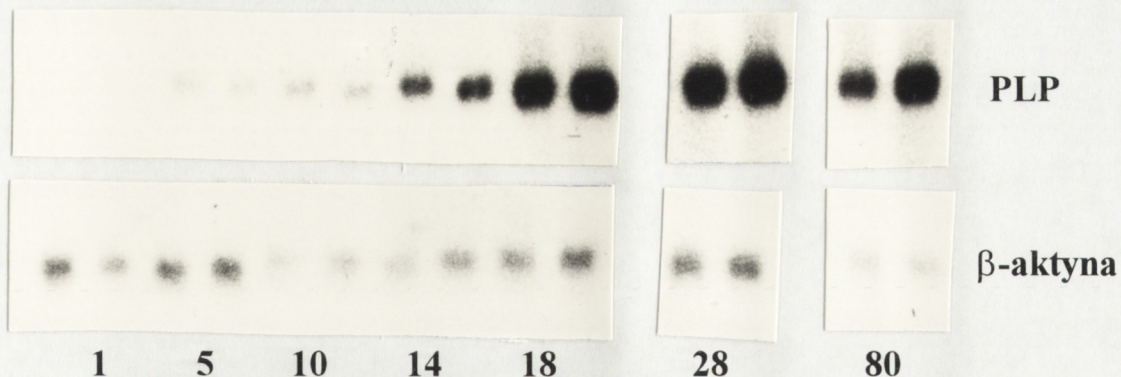
Ryc. 11. Ekspresja antygenów glikolipidowych w homogenatach mózgu w trakcie rozwoju osobniczego królika kontrolnego oraz mutanta *ptII*. Wyniki otrzymane metodą ELISA wyrażono w procentach wartości uzyskanych dla 22-dniowej kontroli. Zaznaczone punkty odpowiadają średnim wartościom z trzech eksperymentów przeprowadzonych dla każdej z dwóch grup zwierząt. SD nie przekraczało 10% wartości średniej i zostało pominięte.



### 3. OCENA EKSPRESJI mRNA WYBRANYCH GENÓW BIAŁEK MIELINOWYCH W MÓZGU KRÓLIKÓW KONTROLNYCH I MUTANTÓW *PT*

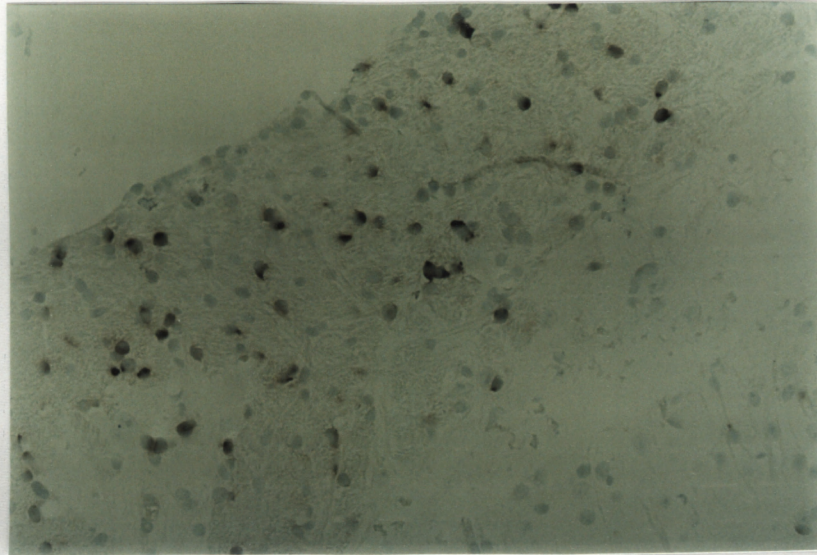
#### 3.1. Ekspresja genu *plp* w mózgu królika *ptII* w trakcie rozwoju osobniczego

Ekspresja genu *plp* w rozwoju osobniczym królika kontrolnego i *ptII* badana była metodą Northern blot (Ryc.12). Jako wewnętrzną kontrolę zastosowano sondę molekularną dla mRNA  $\beta$ -aktyny. Pomimo mutacji, poziom mRNA genu *plp* u królika *ptII* w początkowym okresie rozwoju osobniczego nieznacznie odbiegał od kontroli, a wyraźnie obniżał się dopiero począwszy od 28 D. W tym późniejszym okresie rozwoju, niedobór mRNA u królika *pt* sięgał średnio 50% wartości kontrolnej.

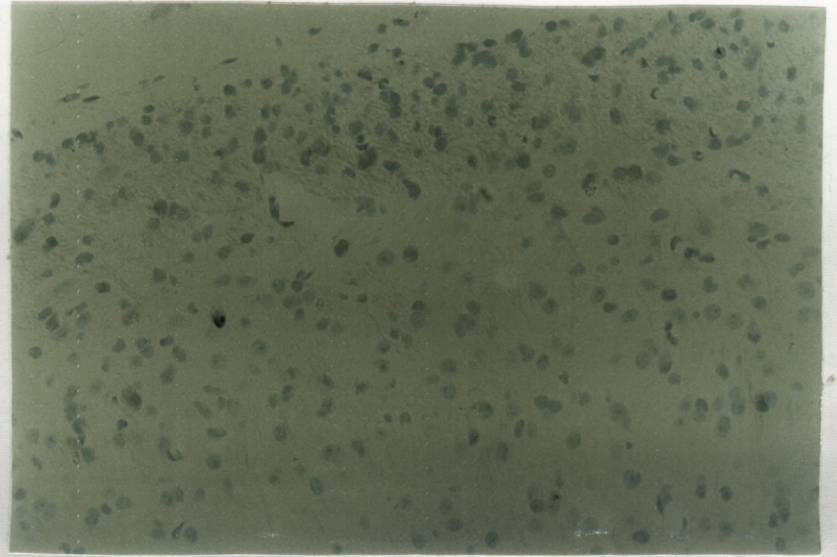


Ryc. 12. Porównanie ekspresji mRNA genu *plp* w trakcie rozwoju osobniczego królika kontrolnego i mutantu *ptII*. Zdjęcie przedstawia reprezentatywny Northern blot dla *plp* i  $\beta$ -aktyny użytej jako standard wewnętrzny.

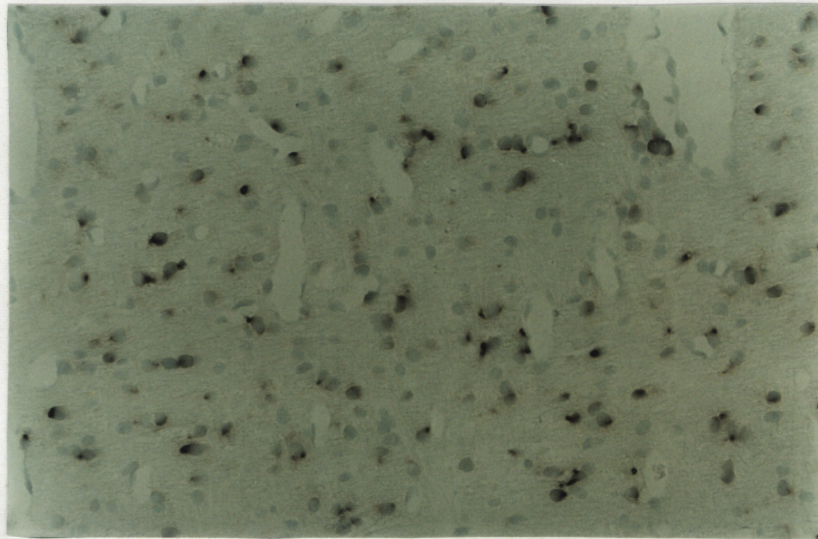




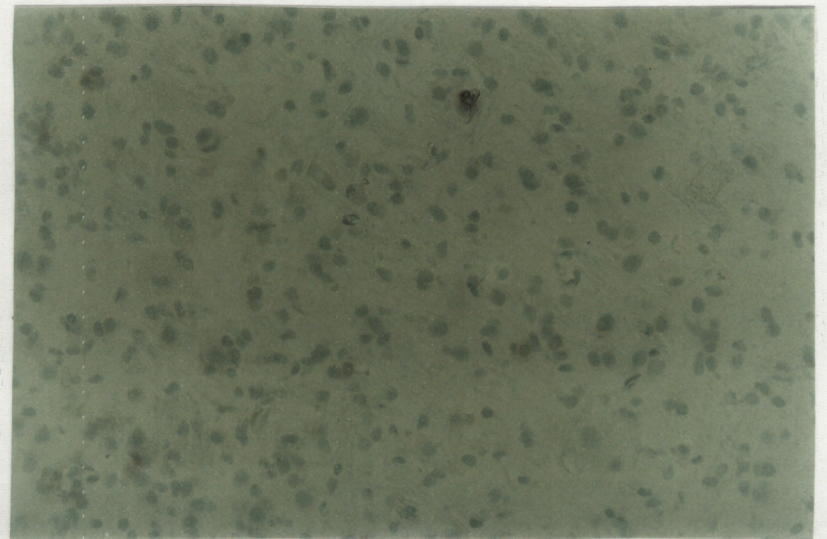
A.



B.

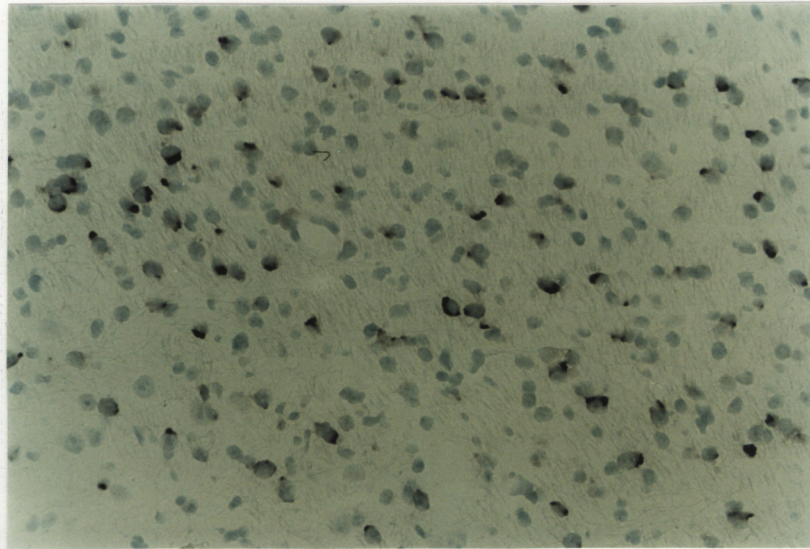


C.

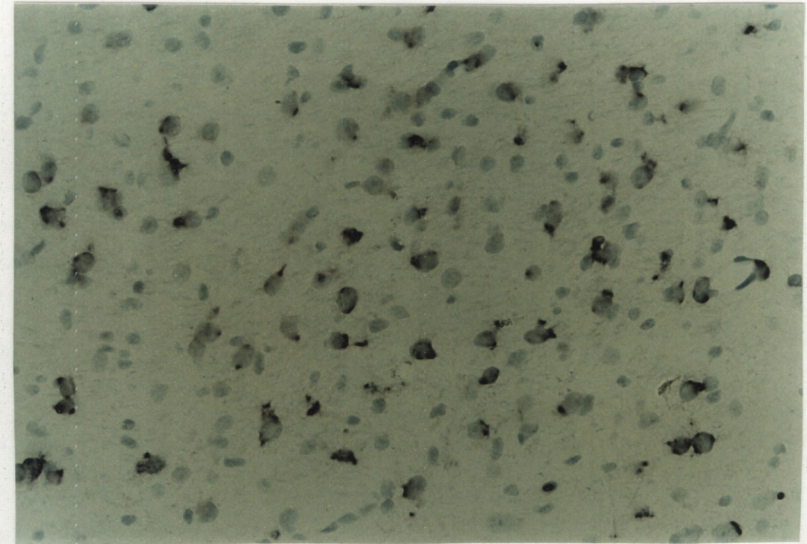


D.





E.



F.

Ryc. 13. Porównanie ekspresji mRNA genu *p1p* w oligodendrocytach mózgu 14-dniowego królika kontrolnego oraz *pt II*. Wyniki uzyskane metodą *in situ* hybrydyzacji, powiększenie x200:

A.) przekrój poprzeczny na poziomie rdzenia kręgowego, kontrola;

B.) przekrój poprzeczny na poziomie rdzenia kręgowego, *ptII*, w polu widzenia pojedyncza komórka wykazuje reakcję dodatnią na sondę molekularną;

C.) przekrój podłużny na poziomie rdzenia kręgowego, kontrola;

D.) przekrój podłużny na poziomie rdzenia kręgowego, *ptII*;

E.) podkorowa istota biała, kontrola;

F.) podkorowa istota biała, *ptII*;



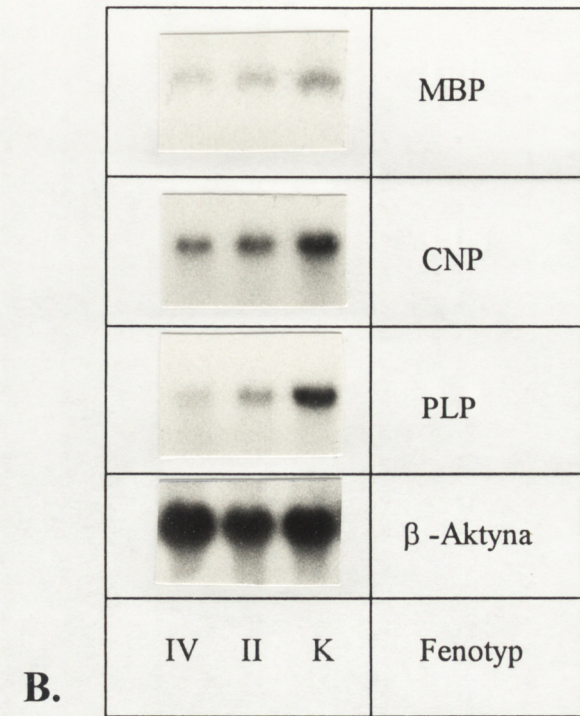
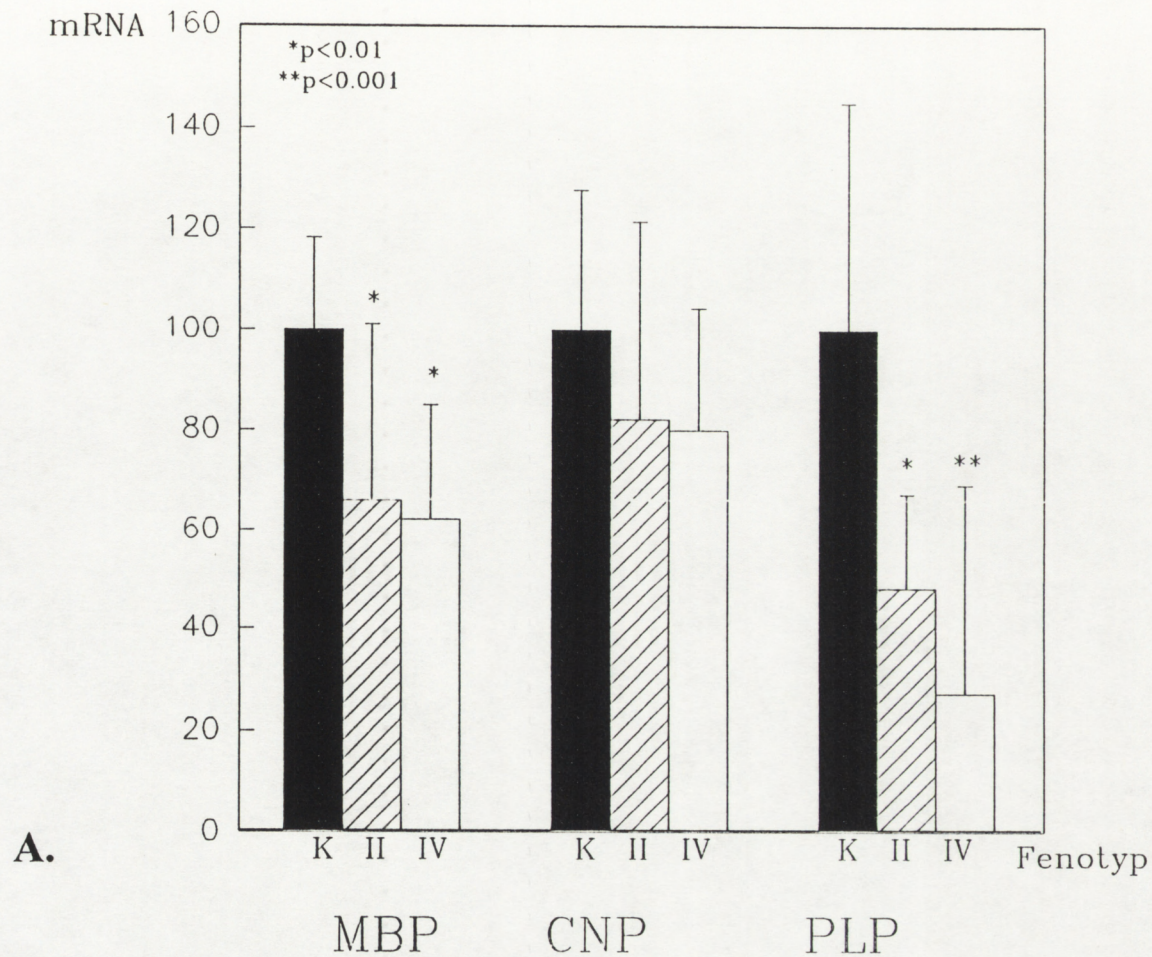
Zdolność do pierwotnie niezaburzonej transkrypcji zmutowanego genu *plp<sub>pt</sub>* została potwierdzona w badaniach ISH przeprowadzonych na skrawkach mózgu i rdzenia kręgowego zwierząt 14-dniowych (Ryc. 13). W strukturach rdzenia kręgowego obserwowano negatywną reakcję OL<sub>pt</sub> (Rys. 13 B, D) przy jednoczesnej silnej reakcji dodatniej widocznej na skrawkach kontrolnych (Ryc. 13 A, C). Natomiast w preparatach przodomózgowia liczba oligodendrocytów królika *pt<sub>II</sub>* pozytywnie reagujących na sondę molekularną była podobna jak u kontroli (Rys. 13 E, F).

### **3.2. Zależność między ekspresją genów białek PLP, MBP i CNP a fenotypem królika *pt***

Wyniki analizy densytometrycznej Northern blotów uzyskanych po zastosowaniu specyficznych sond molekularnych, wyrażone w procentach wartości kontrolnych, wykazały, że w starszych grupach wiekowych ekspresja genu *plp* na poziomie mRNA była wyraźnie skorelowana z nasileniem objawów neurologicznych badanych zwierząt. Największy deficyt w poziomie mRNA PLP w grupach zwierząt 42 i 68-dniowych występował u mutantu *pt<sub>IV</sub>* i sięgał on aż 70%, podczas gdy u mutantu *pt<sub>II</sub>* obserwowano około 50-procentowy niedobór (Ryc. 14). Tak więc różnica w poziomie ekspresji zmutowanego genu między obydwoma fenotypami jest bardzo wyraźna i znamienna statystycznie.

Stwierdzono ponadto statystycznie istotne obniżenie (~40%) poziomu mRNA genu białka MBP, nie uzależnione jednak od nasilenia zmian fenotypowych charakterystycznych dla mutantu *pt* (Ryc.14). Nieznaczny, około 10-20% deficyt w poziomie mRNA CNPazy występował w obu grupach doświadczalnych (*pt<sub>II</sub>* i *pt<sub>IV</sub>*) i nie był statystycznie znamienny w stosunku do kontroli (Ryc.14).





Ryc. 14. Porównanie ekspresji mRNA wybranych genów białek mielinowych u mutantów *ptII* i *ptIV*. A) wyniki analizy densytometrycznej (nie mniej niż 3 autoradiogramów) wyrażone w procentach poziomu kontrolnego (wartości średnie  $\pm$ SD), różnice znamienne względem grupy kontrolnej zaznaczono jako \* $p \leq 0,01$  oraz \*\* $p \leq 0,001$ . B) zdjęcia reprezentatywnych Northern blotów.



## VI. DYSKUSJA

Głównym celem podjętych badań była charakterystyka oraz próba wyjaśnienia mechanizmu wielokierunkowych (plejotropowych) oddziaływań mutacji punktowej genu *plp*, w wyniku której pojawia się fenotyp *pt* z całą swoją złożonością obrazu klinicznego i neuropatologicznego. Co prawda na opis choroby składa się wiele zaobserwowanych odstępstw od normy, poczynając od najbardziej ogólnych, jak np. mniejsza wielkość i waga mutantów, charakterystyczne objawy neurologiczne czy zwiększona podatność na choroby, aż do bardziej specyficznych, takich jak np. zmiany w systemie adrenergicznym czy odporności antyoksydacyjnej tkanki nerwowej (Kowalczuk et al., 1995). Tak więc mutacja *pt* wywiera niewątpliwie pewien wpływ na ogólny rozwój całego organizmu, wywołując w nim liczne odchylenia od stanu prawidłowego. Jednakże, sądząc z sekwencji chronologicznej występowania tych zaburzeń, są one wtórne w stosunku do upośledzenia procesu mielinizacji i pojawiają się, wraz z charakterystycznymi objawami neurologicznymi, nie wcześniej niż w 2 tygodniu życia. Natomiast rozważając sam proces mielinizacji, można postawić pytanie o to, w jaki sposób i dlaczego niewielka zmiana w genie prowadząca do wymiany jednego aminokwasu (Tosic et al., 1994) wpływa na supresję całego programu wytwarzania mieliny, dotykając wszystkich badanych jego elementów. Ten plejotropizm oddziaływań mutacji genu *plp* na poziomie mielinogenezy prowadzący bezpośrednio do hipomielinizacji OUN królików obarczonych cechą *pt* będzie dalej dyskutowany w świetle uzyskanych wyników.

Jak powszechnie wiadomo, mielinogeneza przebiega w dokładnie zdefiniowanym okresie rozwoju osobniczego organizmu i według ściśle określonego programu, na który składa się między innymi sekwencyjna ekspresja różnorodnych składników stanowiących budulec tworzącej się błony mielinowej. Dla niektórych gatunków zwierząt proces ten jest dostatecznie poznany. Wiadomo m.in., że liczba oraz wzajemne proporcje izoform białka MBP znacznie różnią się między badanymi gatunkami zwierząt. Dla przykładu, u myszy wraz z rozwojem spada ilość izoform o masach cząsteczkowych 17 i 21,5 kD na rzecz wzrostu zawartości izoform 14 i 18,5 kD (Campagnoni i Macklin, 1988; Kalwy i



Smith, 1994). W mózgach szczurów zidentyfikowano dodatkowo występowanie izoformy 23 kD (Campagnoni i Macklin, 1988). Jeżeli chodzi o ekspresję tego jednego z najważniejszych białek mielinowych u królika, to wiadomo jedynie, że przy pomocy dostępnych przeciwciał wykryto jego izoformy o masach cząsteczkowych 18 oraz 21,5 kD (Gilbert et al., 1982). I chociaż wiele aspektów przebiegu mielinogenezy w mózgu królika zostało dobrze poznanych, to - jak już wspomniano we Wstępie - istnieje brak dokładnych danych literaturowych na temat sekwencyjnej ekspresji białkowych składników mieliny. Wypełnienie tej luki było szczególnie istotne w przypadku podjęcia badań nad mutacją *pt*.

W tym celu określono sekwencję i przebieg ekspresji wybranych podstawowych białek mielinowych w rozwoju królika, poczynając od pierwszego dnia aż do ukończenia czwartego miesiąca życia. Jako metodę z wyboru do badań białek, zarówno w homogenatach mózgowych jak i w oczyszczonej frakcji mielinowej, przyjęto ich rozdział elektroforetyczny (SDS-PAGE) i immunodetekcję za pomocą specyficznych przeciwciał metodą Western blot (immunoblotting). Ponieważ jest to z założenia metoda półilościowa, zastosowano również dodatkowe, równoległe metody badawcze. Wyniki uzyskiwane za pomocą immunoblottingu weryfikowane zatem były w przypadku białka MBP poprzez zastosowanie innej techniki immunodetekcji, a mianowicie metody ELISA, zaś w przypadku CNP poprzez pomiar jej aktywności enzymatycznej. Zbieżność wyników uzyskiwanych przy użyciu wymienionych metod świadczy o ich skuteczności oraz pozwalała uzyskać wiarygodny obraz ekspresji poszczególnych białek w trakcie rozwoju osobniczego królika.

Stwierdzono, że jako pierwsze spośród badanych, już w pierwszych dniach życia królika, ekspresji ulegają białka CNP i MAG. Pierwsze z wymienionych najprawdopodobniej bierze udział w regulacji syntezy i transportu innych składników mielinowych (Braun et al., 1990), zaś drugie odpowiada za kontakt między oligodendrocytem a aksonem i jest wbudowywane w pierwszą warstwę błony mielinowej (tzw. mezoakson) (Poltorak et al., 1987). Następnie na początku drugiego tygodnia życia



masywnej syntezie ulegają główne białka strukturalne mieliny OUN, t.j. stanowiące blisko 80% wszystkich jej białek PLP i MBP. Natomiast pod koniec 4 tygodnia, na który również przypada największe nasilenie procesu mielinizacji u królika (Dąbska i Danielewicz, 1978; Taraszewska i Zelman, 1981), pojawia się białko MOG, sygnalizujące prawdopodobnie koniec mielinizacji włókna nerwowego po odłożeniu żądanej ilości blaszek mielinowych (Scolding et al., 1989).

Porównanie wyników badań przeprowadzonych na homogenatach mózgowych królika zdrowego i obarczonego cechą *pt* wskazuje na wyraźne opóźnienie i obniżenie ekspresji praktycznie wszystkich wyżej wymienionych białek u mutantu. Stopień obserwowanego niedoboru jest największy w przypadku zmutowanego białka PLP, zaś najniższy dla białka MAG.

Jak wykazały dalsze badania, wyraźny spadek zawartości w mózgu królika *pt* charakteryzuje nie tylko wybrane białkowe, lecz również lipidowe składniki błony mielinowej. Oczyszczenie i rozdział chromatograficzny pozwolił zaobserwować widoczne obniżenie ilości niektórych glikolipidów, w tym cerebrozydów, sulfatydów i monogalaktozydylwuglicerydów, co jest zgodne z wcześniejszymi badaniami (Domańska-Janik et al., 1986). Wymienione glikolipidy stanowią nie tylko część składową błon mielinowych, lecz znane są również jako powierzchniowe markery oligodendrocytów, a ich detekcja przy użyciu specyficznych przeciwciał (R-mAb, O1, O4) pomaga w identyfikacji stadium rozwoju OL (Pfeiffer et al., 1990; Asou et al., 1995). Ich wyraźnie obniżona zawartość w homogenatach mózgowych może być zatem skutkiem zarówno efektu hipomielinizacji, jak i zaburzeń w dojrzewaniu oligodendrocytów. Stwierdzony niedobór w mózgu królików *pt* białkowych i lipidowych budulców mieliny stawiał pytanie o efektywność jej wytwarzania oraz o jej skład u mutantu.

Jak już wspomniano, proces mielinizacji OUN u zdrowego królika najintensywniej przebiega między 14 a 42 dniem życia, zaś u mutantu *pt* jest on znacznie opóźniony i obniżony w trakcie całego badanego okresu rozwoju osobniczego, t.j. między 4 a 16 tygodniem życia. Skutkiem tego jest utrzymujący się znaczący deficyt



mieliny, co przy braku oznak wtórnej demielinizacji, obrazuje niewydolność funkcjonalną oligodendrocytów. Zaobserwowano przy tym zależność między wielkością hipomielinizacji a stopniem nasilenia objawów neurologicznych. Najbardziej znamienne niedobór mieliny cechuje zwierzęta najciężej dotknięte chorobą. Wy tłumaczenia tego zjawiska dostarcza sama funkcja mieliny, polegająca na ułatwianiu przepływu bodźców nerwowych. Jej miejscowy brak lub patologiczna budowa wynikająca ze zmiany składu prowadzą do zaburzenia prawidłowego przepływu impulsu nerwowego (Schemat 2), co w dalszej konsekwencji wywołuje zaburzenia natury neurologicznej.

Analiza składu białkowego frakcji mielinowych wykazała nierównomierny spadek ilości białek, nie będący jednak wprost proporcjonalnym odzwierciedleniem ich zawartości w homogenatach mózgowych. Największy, zależny od fenotypu, spadek zawartości zaobserwowano w przypadku białek PLP i DM-20, kodowanych przez gen *plp*, w którym u królika *pt* zaszła mutacja punktowa.

Pomimo mutacji, oba białka proteolipidowe ulegają syntezie (choć jest ona upośledzona, szczególnie u zwierząt wykazujących większe nasilenie objawów chorobowych) i mogą być wykorzystywane do tworzenia błon mielinowych. Widać to wyraźnie u mutantów *ptI* (bezobjawowych), jak również w badaniach morfologicznych pozostałych fenotypów, włącznie z *ptIV*. Nawet przy największych nieprawidłowościach i ubytkach wytwarzanej mieliny spotyka się aksony otoczone pozornie niezmiennymi osłonkami. Pojawia się zatem pytanie, dlaczego w takim razie dochodzi do hipomielinizacji i dlaczego jej wielkość jest u królików *pt* tak bardzo zróżnicowana.

Przyczyną takiego stanu rzeczy, obok prawdopodobnie wtórnych zaburzeń na poziomie translacji (wymuszonych np. mniejszą ilością dostępnego transkryptu, którą obserwowano w starszych grupach wiekowych), może być na przykład pierwotnie skrócony półokres trwania cząsteczek białek PLP i DM-20. Ponieważ mutacja *pt* występuje tuż przed pierwszą domeną hydrofobową cząsteczki, to według proponowanych modeli topologicznych jest ona zlokalizowana na granicy fragmentu



zewnątrzbłonowego i  $\alpha$ -helisy przesywającej błonę (Popot et al., 1991; Inouye i Kirshner, 1994), a zatem w miejscu niezwykle istotnym dla uzyskania prawidłowej konformacji białka. Histydyna (zastąpiona u królika *pt* przez glutaminę) odgrywa rolę w stabilizacji  $\alpha$ -helisy (Armstrong i Baldwin, 1993). Jak wykazała analiza porównawcza sekwencji aminokwasowej PLP, od rekina do człowieka (Kitagawa et al., 1993), rejon ten jednocześnie należy do najbardziej konserwatywnych ewolucyjnie. Odpowiednia konformacja cząsteczki ma najprawdopodobniej kluczowe znaczenie dla jej transportu i inkorporacji do powstającej błony mielinowej. Ponieważ synteza proteolipidu zachodzi w szorstkiej siateczce śródplazmatycznej (Hartman et al., 1982), to powstałe białka muszą być przy udziale pomocniczych białek transportujących (ang. *chaperons*), prawdopodobnie w procesie przypominającym egzocytozę (Huber et al., 1994), dostarczone w rejon tworzącej się błony (Nussbaum i Roussel, 1983; Timsit et al., 1992 b; Gow et al., 1994 a). Określona konformacja cząsteczki może być zatem istotna dla układu transportującego, co wyjaśniałoby jej ogromny konserwatyzm ewolucyjny. Taka zachowawczość sekwencji nie jest spotykana wśród innych głównych białek mielinowych, lecz trzeba uwzględnić, że np. białko MBP ulega translacji dopiero w ścisłej bliskości powstającej błony mielinowej, zaś przez cytoplazmę przemieszcza się jego transkrypt (Colman et al., 1982; Trapp et al., 1987; Amur-Umarjee et al., 1993). Mechanizm ten pozwala być może na uniknięcie interakcji silnie zasadowego białka z wewnętrznymi strukturami komórkowymi (Smith, 1992), a jednocześnie wyjaśnia brak tak silnych restrykcji co do konformacji cząsteczki MBP.

Zmutowane białka PLP i DM-20 o zmienionej konformacji nie mogłyby zatem być efektywnie transportowane, lecz częściowo zalegałyby w siateczce śródplazmatycznej. Wymuszona akumulacja białek powinna wiązać się z ich proteolizą, jako mechanizmem adaptacyjnym komórki. I rzeczywiście, u królika *pt* obserwuje się podwyższoną aktywność niektórych enzymów proteolitycznych (np. kalpajny), a także większą podatność PLP zarówno na spontaniczną, jak i ukierowaną proteolizę (Domańska-Janik et al., 1992). Również przeprowadzone ostatnio badania na



komórkach linii cos-7, transfekowanych genem  $plp_{pt}$  (Tosic et al., 1996) wykazały zahamowanie wbudowywania się  $PLP_{pt}$  do błon cytoplazmatycznych i jego zatrzymanie w strukturach aparatu Golgiego i lizosomach transfekowanych komórek.

Oprócz drastycznego niedoboru białek PLP i DM-20, mielina *pt* odbiega składem od kontroli również pod względem zawartości innych badanych białek (MBP, CNP i MAG). Różnice te nie są jednak tak duże jak w przypadku obu proteolipidów i są prawdopodobnie wypadkową kilku nakładających się zjawisk. Można do nich zaliczyć np. obniżenie ich zawartości w homogenatach mózgowych na skutek zaburzenia transportu wewnątrzkomórkowego w wyniku "zatorów" powstających za przyczyną retencji produktów genu  $plp_{pt}$  i wtórnego zwiększenia katabolizmu czy też zmienionego metabolizmu lipidowego. Jak wykazały badania ostatnich lat, inkorporacja jednego z głównych białek strukturalnych mieliny, MBP, do formujących się blaszek odbywa się na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych z określonymi grupami lipidów. I chociaż proces ten nie został jeszcze do końca poznany, to wiadomo jednak, że istotną rolę odgrywa tu wzajemna proporcja między ilością moli białka MBP a niektórymi glikolipidami, szczególnie gangliozydami typu  $GM_1$  oraz  $GM_4$  (Smith, 1992; Kalwy i Smith, 1994). W mózgu królika *pt* z jednej strony zachodzi zjawisko niedoboru białka MBP, zaś z drugiej strony obserwowano jednocześnie znacznie podwyższony poziom niektórych gangliozydów, zwłaszcza z frakcji  $GM_1$  (około 150% wartości kontrolnych) (Domańska-Janik et al., 1988). Jak już wcześniej wspomniano, zmiany zawartości w mózgu królika *pt* zanotowano również w przypadku wielu innych lipidów (Domańska-Janik, 1986, Wikieł et al., 1986). Ponieważ lipidy stanowią ponad 70% masy mieliny, to pewnych pośrednich oznak zwiększonej eliminacji patologicznej mieliny możnaby jedynie doszukać się w astrogleju, gdzie obserwuje się obecność złogów sudanofilnych (Taraszewska, 1986). Obecność takich złogów może świadczyć o aktywnym metabolizmie lipidowym. Podobne zjawisko spichrzania lipidów obserwowano ponadto w mikrogleju królika *pt* (Taraszewska i Zelman, 1987). Zmiana typowych proporcji lipidów i białek ma najprawdopodobniej wpływ na ich wzajemne interakcje, decydując,



przynajmniej w pewnym stopniu o ich wbudowywaniu w tworzącą się błonę mielinową. Ma to z kolei swoje odbicie w jej zmienionej strukturze.

Innym stwierdzonym w niniejszej pracy fenomenem mieliny *pt* jest wbudowywanie do błon mielinowych większych niż normalnie ilości białka MOG. Stopień nadmiaru białka MOG w mielinie *pt* zależy zarówno od fenotypu, jak i od wieku zwierzęcia. Pomimo około 30 % obniżenia jego całkowitej ilości (występowanie białka MOG w OUN jest ograniczone wyłącznie do mieliny i oligodendrocytów), jego zawartość w mielinie znacznie przekracza wartości kontrolne i wykazuje ogromną zmienność osobniczą. Jest to białko ulegające ekspresji stosunkowo późno w mielinogenezie (u królika mniej więcej w 4 tygodniu życia), zlokalizowane jest głównie na zewnętrznej powierzchni ostatniej blaszki osłonki mielinowej (Brunner et al., 1989) i jak się obecnie przyjmuje, stanowi sygnał do zakończenia mielinizacji (Scolding et al., 1989). Ponieważ cały proces mielinizacji jest u królika *pt* opóźniony, zwiększona ekspresja białka MOG może być odpowiedzialna m.in. za obserwowane występowanie mniejszej ilości blaszek mielinowych, ze względu na przedwczesne zakończenie ich odkładania się (Taraszewska i Zelman, 1981; Zelman i Taraszewska, 1984). Pojawia się także przypuszczenie, że ze względu na niedobór PLP i zbliżoną masę cząsteczkową, częściowo wykorzystywane jest ono w jego zastępstwie. Mimo odmiennej topologii (Amiguet et al., 1992), która sprawia, że MOG nie może funkcjonować jako białko strukturalne, to fragmenty zewnątrzłonowe obu białek wykazują podobne właściwości adhezywne. W przypadku białka PLP są one wykorzystywane głównie do stabilizacji blaszki pośredniej (Boison et al., 1995), zaś w MOG do interakcji międzykomórkowych (Burger et al., 1993), jednak przy niedoborze PLP, prawdopodobnie mogłyby częściowo przejmować jego funkcję.

Innym aspektem jest stwierdzona w licznych badaniach *in vitro* (Kerlero de Rosbo et al., 1990) i *in vivo* (Linington i Lassmann, 1987) silna immunogenność białka MOG i jego postulowany udział w patogenezie chorób o podłożu autoimmunoagresji, m.in. w stwardnieniu rozsianym (Xiao et al., 1991). Przy znacznie podwyższonej



zawartości tego białka w mielinie *pt* zachodzi zatem możliwość patologicznie zwiększonej immunogenności tak zmienionej mieliny. Jednakże podczas obserwacji obszernego materiału mikroskopowego nie wykryto istnienia typowych dla tego rodzaju procesów nacieków komórkowych czy ognisk demielinizacji, które nakładałyby się na pierwotnie występującą dysmielinizację.

Jak już wspomiano, białka proteolipidowe PLP i DM-20, dzięki adhezywnym własnościom ich pętli zewnątrzłonowych, najprawdopodobniej odgrywają kluczową rolę w odkładaniu kolejnych warstw błony mielinoj (tworzenie blaszki pośredniej), a także w utrzymywaniu między nimi odpowiedniej, niezwykle regularnej odległości (Boison et al., 1995). Białko MBP natomiast, zlokalizowane po wewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej, odpowiedzialne jest m.in. za stabilizację głównej blaszki ciemnej (Campagnoni i Macklin, 1988). Odpowiednie proporcje poszczególnych białek w normalnej mielinie decydują o jej niezwykle regularnej, gęsto upakowanej strukturze niezbędnej przy spełnianiu jej funkcji. Liczba ściśle przylegających do siebie blaszek tworzących charakterystyczną strukturę mieliny również podlega regulacji. Jak się od niedawna sądzi, decyduje o niej wbudowywanie do ostatniej warstwy błonowej białka MOG, którego obecność (zwłaszcza określonej frakcji o szczególnym typie glikozylacji cząsteczki) odczytywana jest jako sygnał do zakończenia mielinizacji włókna nerwowego (Scolding et al., 1989).

Wyniki szeroko zakrojonych badań nad poznanymi, naturalnie występującymi mutacjami, dotyczącymi zwłaszcza głównych białek strukturalnych mieliny OUN, wskazują na utratę zdolności do wytwarzania prawidłowej mieliny (Hogan i Greenfield, 1984; Konat i Wiggins, 1992). Różnorodne typy mutacji, zachodzące zarówno w białku PLP, jak i MBP, zawsze wiążą się z patologią mieliny. Obserwuje się ją przede wszystkim jako rozluźnienie struktury z częstymi inkluzjami cytoplazmy i znacznie mniejszą niż normalnie otoczką mielinoj lub wręcz jej brakiem (Duncan et al., 1987; Duncan, 1990). Jak pierwotnie sądzono, za hipomielinizację w badanych mutacjach odpowiedzialny jest przede wszystkim drastyczny niedobór produktów zmutowanych



genów, zwłaszcza, gdy kodują one główne białka strukturalne mieliny (Hudson, 1990). Jednak najświeższe doniesienia z badań nad myszami transgenicznymi, u których osiągnięto całkowitą eliminację ekspresji genu *plp* dowodzą, że nawet zupełny brak podstawowego białka mieliny OUN nie musi prowadzić do utraty zdolności do jej tworzenia (Boison i Stoffel, 1994; Boison et al., 1995). Jak się okazuje, u myszy tych zachowana została zdolność prawie normalnej mielinizacji włókien nerwowych, pomimo że w strukturze wytwarzanej osłonki brakuje blaszki pośredniej. Co więcej, zwierzęta transgeniczne nieznacznie tylko różniły się pod względem klinicznym od kontroli. Skutki poszczególnych naturalnych, jak i niesionych przez zwierzęta transgeniczne mutacji, dotyczą nie tyle architektury osłonki mielinowej, co wpływają na funkcję samego oligodendrocytu (Griffiths et al., 1995; Ikenaka i Kagawa, 1995; Skoff, 1995). Także badania mutacji w hodowlach komórkowych (Gow et al. 1994, a, b; Sinoway et al., 1994) pozwala na pełniejsze poznanie złożonego procesu mielinogenezy.

Również wyniki badań nad mutacją *pt* w świetle wyżej przytoczonych obserwacji wskazują, że nie tyle sam brak prawidłowego białka PLP jest czynnikiem limitującym wytwarzanie błon mielinowych, co cała kaskada wywieranych przez mutację efektów wtórnych, do których należy m.in. zmiana metabolizmu białkowo-lipidowych składników mieliny, mająca swe odzwierciedlenie w jej zmienionym składzie i patologicznej budowie. Proces tworzenia błon mielinowych przypomina proces egzocytozy, w trakcie którego powstają pęcherzyki wydzielnicze połączone z aparatem Golgiego, regulowane w skomplikowanym mechanizmie sygnałów wewnątrzkomórkowych (Rothman, 1994; Rothman i Orci, 1996). Zarówno w oligodendrocytach, jak i w mielinie, wykryto występowanie niskocząsteczkowych białek wiążących GTP i charakterystycznych dla procesu egzocytozy (Rab 3a, 4, 5, 6, 7, 9, 11 oraz Rap2) (Huber et al., 1994; Madison et al., 1996). Ten wysoce specyficzny proces może ulec zaburzeniu poprzez retencję PLP w aparacie Golgiego, a jego niewydolność odbijałaby się wtórnie na całym procesie mielinogenezy u królika *pt*. Poparcia tej hipotezy dostarczają badania morfologiczne w mikroskopie elektronowym, wykazujące obecność nieprawidłowych, wewnątrzkomórkowych struktur pęcherzykowych, często



wypełnionych materiałem przypominającym warstwową strukturę błony mielinowej (Sypecka et al., 1996).

Powstaje pytanie, na ile ten zmieniony skład mieliny jest skutkiem wyłącznie opisanych powyżej posttranslacyjnych zaburzeń metabolizmu poszczególnych komponentów, a na ile może wynikać również ze zmiany regulacji transkrypcji odpowiednich genów, włączanych kolejno i współzależnie w proces mielinogenezy.

Wykazano, że ilość cytoplazmatycznego RNA powstającego w procesie transkrypcji ze zmutowanego genu *plp* maleje w wyraźny sposób wraz z postępem procesu mielinizacji. Największy spadek ilości mRNA PLP zanotowano w starszych grupach wiekowych, t.j. u 10-12 tygodniowych królików *pt*, czyli w tym okresie życia osobniczego, kiedy proces mielinizacji słabnie i ustala się na pewnym określonym poziomie. Wprawdzie u królika koniec najaktywniejszej fazy mielinogenezy normalnie przypada na około 6 tydzień życia, lecz - jak to już wykazano zarówno wcześniej, jak i w obecnej pracy (Domańska-Janik et al., 1988, Tosic et al., 1993, Sypecka i Domańska-Janik, 1995 b) - cały ten proces jest u mutantu znacznie opóźniony i przedłużony. Co więcej, wielkość deficytu transkryptu genu *plp* jest zróżnicowana i uzależniona nie tylko od wieku zwierzęcia, ale również od ciężkości danego przypadku choroby.

Częściowo może się to łączyć z wysoką zmiennością osobniczą w poziomie ekspresji mRNA genu *plp*, zaznaczającą się nawet u królików kontrolnych, a szczególnie u bardzo młodych zwierząt (Sypecka et al., 1996). W tej grupie, czyli królików w wieku do około 20 dnia życia, zmiany poziomu mRNA PLP nie wykazują znamiennych różnic pod wpływem mutacji. Dla uściślenia tego wyniku i ze względu na stosunkowo małą ilość transkryptu należałoby jednakże zastosować bardziej czułe techniki, oparte np. na łańcuchowej reakcji polimerazy (RT-PCR). Brak wczesnych różnic w poziomie transkryptu genu *plp* między królikiem kontrolnym a *pt* wykazano również w skrawkach mózgow 2-tygodniowych zwierząt, badanych metodą hybrydyzacji *in situ*. W półkulach mózgu liczba oligodendrocytów pozytywnie reagujących na zastosowaną sondę



molekularną była zbliżona w obu grupach (Sypecka et al., 1996). Natomiast hybrydyzacja przeprowadzona na preparatach rdzenia kręgowego tych samych zwierząt, w których to strukturach mielinizacja wyprzedza przodomózgowie o ok. 2-3 tygodnie wykazała brak pozytywnej reakcji w OL<sub>pt</sub> przy wyraźnej reaktywności kontroli. Można więc przyjąć, że transkrypcja genu *plp<sub>pt</sub>* jest pierwotnie tylko nieznacznie zaburzona, a jej wyraźną supresję obserwuje się dopiero wraz z zaawansowaniem procesu mielinizacji.

Zaburzenie transkrypcji zmutowanego genu wiąże się u królika *pt* ze spadkiem ilości mRNA zarówno PLP, jak i DM-20 (Tosic et al, 1994). Prawidłowość tę obserwuje się u wszystkich naturalnie występujących mutantów *plp*, chociaż wzajemna proporcja mRNA obu proteolipidów w każdym przypadku jest nieco inna. Co ciekawe, nawet u myszy transgenicznych z dodatkową kopią prawidłowego genu *plp*, zwiększającą dwukrotnie ilość transkryptów obu proteolipidów, stwierdzono dysmielinizację i występowanie charakterystycznych zaburzeń neurologicznych, takich jak drżenia i niedowłady. Również eksperymenty ze zwiększeniem ilości samego DM-20 przy prawidłowym poziomie PLP w komórce powodowały wystąpienie u myszy chorób demielinizacyjnych (Griffiths et al., 1995; Ikenaka i Kagawa, 1995). Wskazuje to, że nie tylko bezwzględna ilość obu białek jest istotna zarówno dla metabolizmu oligodendrocytów, jak i w dalszej konsekwencji dla mielinogenezy, ale również wzajemne proporcje obu proteolipidów. Rezultaty badań na komórkach linii *cos-7* transfekowanych odpowiednio zmienionym genem *plp* odwzorowującym dotąd poznane, naturalnie występujące mutacje, dostarczają dodatkowych dowodów, że praktycznie jakakolwiek zmiana wzajemnej proporcji obu proteolipidów upośledza ich transport i powoduje w efekcie retencję w systemach błonowych komórki (Gow et al., 1994, a, b).

Jak należy sądzić na podstawie wciąż pojawiających się coraz to nowych doniesień, różnorodne mutacje genu *plp*, w tym nawet te zachodzące w jego niekodujących fragmentach (intronach) są podłożem choroby Pelizaeusa-Merzbachera u ludzi. Z obserwacji tych naturalnie występujących u ludzi, a także zarówno spontanicznych jak i sztucznie generowanych u zwierząt mutacji genu *plp* wynika, że



różnorodne błędy genetyczne w różnych jego rejonach - typu mutacji punktowych, inwersji, delecji, przesunięcia ramki odczytu czy też zwiększenia ilości kopii genu - prowadzą do chorób dys/demielinizacyjnych, którym towarzyszy całe spektrum zaburzeń neurologicznych, często o charakterze letalnym. Przyczyną tak znacznej nietolerancji zmian w sekwencji tego genu jest najprawdopodobniej jego wcześniej dyskutowana ogromna konserwatywność ewolucyjna i mały stopień swobody w budowie białka PLP, prowadzące do niezwykle ścisłej selekcji prawidłowych wariantów.

Jak wiadomo, mielinogeneza, przebiegająca w ściśle zdefiniowanym dla danego gatunku okresie rozwoju osobniczego, wiąże się z zsynchronizowaną i masywną syntezą makromolekuł wchodzących w skład intensywnie powstającej błony mielinowej. Przyrost ilości mieliny wytwarzanej przez pojedynczy oligodendrocyt w najaktywniejszej fazie mielinizacji sięga 5 000  $\mu\text{m}^2$  dziennie (Pfeiffer et al., 1990). Wiąże się to ze ścisłą regulacją sekwencyjnej ekspresji specyficznych białek, która w przypadku mielinogenezy wydaje się przebiegać przede wszystkim na poziomie transkrypcji ich genów (Armstrong et al., 1995). W rejonach promotorowych kilku z nich (m. in. genów *plp* i *mbp*) stwierdzono występowanie homologicznych sekwencji cis-regulatorowych (Nave i Lemke, 1991; Berndt et al., 1992; Wrabetz et al., 1993), co sugeruje możliwość kontroli ich ekspresji przez te same czynniki transkrypcyjne. Jednym z nich np. wydaje się być tzw. "mielinowy czynnik transkrypcyjny I (MyTI)", należący do grupy białek mających w swej strukturze tzw. palce cynkowe (ang. zinc fingers). Obecność kilku oddzielnych domen wiążących MyTI jednocześnie w kilku punktach odcinka promotorowego, stwarza możliwość lokalnych zmian w konformacji łańcucha DNA (np. jego lokalne rozwijanie), ułatwiając w ten sposób dostęp innym czynnikom kompleksu transkrypcyjnego (Armstrong et al., 1995).

Wśród innych związków koordynujących ekspresję genów białek mielinowych (w tym głównie *plp* i *mbp*), wyróżnić można również regulatory komórkowych procesów oksydo-redukcyjnych (Laszkiewicz et al., 1992), ligandy receptorów jądrowych takie jak retinoidy (Zhu et al., 1992) czy transferyna (de Vellis, 1990;



Espinosa de los Monteros i de Vellis, 1996), hormony sterydowe (de Vellis, 1990; Zhu et al., 1994) a także wtórne przekaźniki przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych, w tym m.in. cAMP (Ye et al., 1992) oraz kinazę proteinową C (Asotra et al., 1993; Anderson i Miskimins, 1994). Wybiórczość działania tych modulatorów przemawia na korzyść teorii istnienia wspólnych elementów transkrypcyjnych, regulujących funkcjonowanie całych grup genów, włączonych w dany proces biologiczny (w tym przypadku mielinogenezę) i umożliwiających ich wysoki stopień koordynacji. Pozwala to zrozumieć, dlaczego zaburzenia w funkcjonowaniu jednego genu wiążą się z modyfikacją ekspresji innych genów białek mielinowych. W chorobie *pt* stwierdzono obniżenie ilości mRNA MBP i CNP. Podobne zjawisko obserwowano w szeregu innych poznanych mutacji genów *plp* i *mbp*, gdzie obniżeniu ulega ilość transkryptu nie tylko zmutowanego genu, lecz również tych pochodzących z genów nie dotkniętych mutacją (Duncan, 1990). Jak już wspomniano, na prawdopodobnie wtórny efekt obniżenia poziomu transkryptu *plp<sub>pt</sub>* w późniejszym okresie mielinogenezy ma wpływ nieprawidłowa dystrybucja zmutowanego proteolipidu i jego spichrzanie wewnątrzkomórkowe, przyczyniając się do uruchomienia mechanizmu(ów) prowadzących do supresji genu lub eliminacji jego transkryptu. Ze względu na koordynację funkcjonowania innych genów mielinowych, mechanizm ten oddziałuje również w sposób mniej specyficzny na ekspresję genu *mbp* oraz genu kodującego CNP.

Oligodendrocyty, zanim osiągną zdolność do tworzenia błon mielinowych, przechodzą określony, wieloetapowy proces dojrzewania. Komórki dające im początek rekrutują się z puli tzw. glioblastów, które różnicują się, przechodząc wiele etapów pośrednich rozpoznawanych na podstawie określonej morfologii i obecności charakterystycznych znaczników biochemicznych (Pfeiffer et al., 1990; Asou et al., 1995). Na proces ten ma wpływ szereg określonych czynników wzrostowych, takich jak np. czynnik pochodzący z płytek krwi (PDGF), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF), transformujący czynnik  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), czynnik insulinopodobny-1 (IGF-1), czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), neutrofina-3 (NT-3) a także wiele innych (Ida



et al., 1993; de Vellis, 1990; de Vellis et al., 1996). Również wcześniej wymienione czynniki oddziałujące na ekspresję genów (retinoidy, transferyna, cAMP, glukokortykoidy itd.) oraz mniej poznane bodźce środowiskowe mają wpływ na dalszy rozwój komórek macierzystych oligodendrocytów. Ich selekcja, dokonująca się w trakcie tego procesu, polega na eliminacji części komórek na drodze apoptozy i promocji innych do dalszego rozwoju. Znacznikiem biochemicznym jednego ze wczesnych etapów różnicowania się OL jest tzw. antygen POA, którego pojawienie się, badane głównie *in vitro* na hodowlach oligodendrocytów, umownie przypisywane jest tzw. oligodendroblastom (Sommer i Schacher, 1981; Bansal et al., 1989, 1992 a). W badaniach nad mutacją *pt* szczyt ekspresji tego antygeny przypada na 42 dzień życia królika i pokrywa się z okresem aktywnej mielinizacji, której towarzyszy tzw. oligodendroglioza mielinizacyjna. Ekspresja tego antygeny w mózgu królika *pt* nie odbiega praktycznie od kontroli, wskazując na w przybliżeniu jednakową dynamikę rekrutacji prekursorów komórek oligodendrocytarnych u mutantu i u królika zdrowego w tym okresie mielinizacji OUN. Jest to zgodne z obserwacjami morfologicznymi wskazującymi na normalną lub nawet lekko podwyższoną liczbę oligodendrocytów w mózgu *pt* (Zelman i Taraszewska, 1988). Natomiast reakcja na przeciwciała O1 i O4, znakujące zarówno skąpowypustkowe, ostatecznie zróżnicowane komórki glejowe, jak i wytwarzane przez nie błony mielinowe, jest znacznie obniżona u mutantu. Zjawisko to może odzwierciedlać funkcjonalne upośledzenie oligodendrocytów w tym końcowym stadium ich rozwoju.

Obniżenie zdolności do tworzenia prawidłowych błon mielinowych (dysmielinizacja) może być wypadkową zaburzeń co najmniej kilku procesów, u podłoża których leży mutacja punktowa w genie *plpp<sub>pt</sub>*. Jak wskazują dane literaturowe, zmiany normalnego poziomu (jego wzrost lub spadek) produktów genu *plp* prowadzą do zaburzeń mechanizmu ich wewnątrzkomórkowego transportu, co odzwierciedlane jest m.in. przez zaburzenia typowej morfologii oligodendrocytów (Gow et al. 1994 a, b;). Zmiany o podobnym charakterze obserwowano również w mutacji *pt* (Sypecka et al., 1996; Tosic et al., 1996). Ponieważ w komórce oligodendrocytarnej zachodzi synteza i



transport białek z intensywnością około  $10^5$  molekuł na minutę (Ikenaka i Kagawa, 1995), zaś białko PLP stanowi blisko połowę masy białek mielinowych, to zaburzenia jego transportu prawdopodobnie wywołują swojego rodzaju "zator", utrudniający przemieszczanie się również innych makromolekuł. Takie "przeładowanie" systemu transportującego może prowadzić do wtórnego obniżenia ekspresji niektórych genów mielinowych (w tym przede wszystkim  $plp_{pt}$ ) i w konsekwencji do spadku ilości białek oraz innych składników błon mielinowych. Przebudowa metabolizmu białkowo-lipidowego komórki oligodendrocytarnej na skutek zaistnienia wymienionych procesów patologicznych prowadzi do upośledzenia jej funkcji i wtórnej degeneracji. Przemawiają za tym obserwacje morfologiczne, wskazujące na istnienie w oligodendrocytach takich zmian jak wakuolizacja cytoplazmy, spichrzanie materiału sudanofilnego czy charakterystycznie "rozdęte" systemy błonowe komórki (Taraszewska i Zelman, 1987; Sypecka et al. 1996). Towarzyszące temu obrazowi zmiany w astrocytach (Zelman i Taraszewska, 1988) i sąsiadującym mikrogleju (Taraszewska i Zelman, 1987) sugerują możliwość występowania aktywnej eliminacji patologicznych osłonek mielinowych.

Jednocześnie w mózgu królika *pt* obserwowano zjawisko przedłużonej glejozy mielinizacyjnej (Taraszewska i Zelman, 1981). Jak wykazano również w niniejszej pracy, proces mielinogenezy jest znacznie opóźniony i wydłużony w czasie. Może to być skutkiem opóźnionego dojrzewania oligodendrocytów, jak również wskazuje na możliwość rekrutacji nowych prekursorów OL, nabywających zdolność do wytwarzania mieliny. Jest to zgodne z przedstawionymi w niniejszej pracy wynikami badań biochemicznych markerów różnych stadiów rozwojowych OL, jak również z podkreślanym przez innych autorów występowaniem ich form podziałowych w późniejszych fazach rozwojowych (Taraszewska i Zelman, 1981; Zelman i Taraszewska, 1988).

Nowo rekrutowane oligodendrocyty mogłyby przejmować funkcję tych ulegających degeneracji i w ten sposób przyczyniać się do częściowej kompensacji efektu hipomielinizacji. Mnogość i złożoność czynników regulujących ten proces (jak wcześniej wspomniane czynniki wzrostowe, związki modulujące ekspresję genów czy bodźce



środowiskowe) w pewien sposób tłumaczyłoby istnienie wśród mutantów różnorodności fenotypowej, w której nasilenie objawów neurologicznych wiąże się ze zróżnicowaną wielkością deficytu mieliny. Mogłoby to odpowiedzieć na pytanie, dlaczego u niektórych zwierząt kompensacja skutków mutacji *pt* może zachodzić na tyle efektywnie, że pojawia się tzw. *ptI* czyli fenotyp całkowicie bezobjawowy. Z drugiej strony obserwuje się skrajne przypadki reprezentowane przez fenotyp *ptIV*, w którym nasilenie zaburzeń neurologicznych wraz z towarzyszącymi powikłaniami ogólnymi wywierają skutek letalny. Ewentualny wpływ określonego nieprawidłowego, a dotąd nieznanego czynnika genetycznego bądź środowiskowego można tutaj pominąć, jako że krzyżówkom podlegają z konieczności mutanty *ptI* lub *ptII* o dobrym stanie ogólnym. Tak więc na skutek licznych krzyżówek na przestrzeni wielu lat dziedziczna cecha zaostrzająca proces chorobowy uległaby naturalnej selekcji. Charakterystyczną różnorodność fenotypową obserwuje się często u zwierząt w obrębie jednego miotu, zaś warunki środowiskowe w warunkach laboratoryjnych wydają się być zasadniczo znormalizowane.

Jednocześnie istnienie tej tak dużej różnorodności fenotypowej, utrzymującej się w stadzie królików *pt* od 30 lat, wyróżnia je od innych poznanych, naturalnie występujących mutacji genu *plp*. Ze względu na występowanie fenotypów *ptI* oraz *ptIII*, bezpośrednie efekty mutacji punktowej wydają się być znacznie łagodniejsze niż w pozostałych mutacjach (*jp*, *msd*, *shp*) (Duncan, 1990). Odzwierciedla się to w wysokiej przeżywalności zwierząt, umiarkowanym stopniu hipomielinizacji OUN, obrazie neuropatologicznym oraz poziomie ekspresji głównych białek mielinowych. W fenotypach tych (*ptI* oraz *ptIII*), weryfikowanych pod względem cechy *pt* za pomocą analizy restrykcyjnej *Nla III*, mutacja wykazuje wiele cech wspólnych z nieistniejącą już mutacją *rsh* (Mitchell et al., 1990; Schneider et al., 1992), która była szeroko badana przede wszystkim właśnie ze względu na swe stosunkowo umiarkowane skutki. Interesujące jest również porównanie mutacji *pt* i *shp*, które zachodzą dokładnie w tym samym miejscu łańcucha białkowego (36-ty aminokwas) cząsteczki PLP/DM-20. Mimo niewielkiej różnicy, dotyczącej jednego tylko aminokwasu, w dodatku dokładnie w tym



samym miejscu łańcucha białkowego, mutacja *shp* jest typową mutacją letalną, w której obserwuje się prawie całkowity brak mieliny i wczesne obumieranie oligodendrocytów (Yanagisawa et al., 1987; Nadon et al., 1990). Podkreśla to wagę różnic gatunkowych w ekspresji mutacji typu *pt/shp*. Warto dodać, że nie tylko różnorodność fenotypowa, ale również nadmiar białka MOG (uzależniony dodatkowo od fenotypu i wieku zwierzęcia) wyróżnia mutację *pt* od innych, występujących u zwierząt mutacji genu *plp*.

Należy podkreślić, że wyróżniająca genotyp *pt* różnorodność fenotypowa naśladuje w wielu przypadkach różnorodność obrazu klinicznego choroby PM. Chociaż, jak wynika z wciąż nowych doniesień, podłożem tej choroby są liczne typy mutacji w różnych częściach genu, to różnorodność obrazu klinicznego (klasyfikowana jako odmienne postaci choroby) jest obserwowana nawet w obrębie jednej rodziny, gdzie zachodzi pewność co do identycznego podłoża genetycznego (Hodes et al., 1994; Seitelberger, 1995). Różny stopień penetracji uwarunkowanej genetycznie cechy chorobowej jest charakterystyczny również dla wielu innych chorób o przypuszczalnym lub stwierdzonym podłożu genetycznym, w których nawet model dziedziczenia nie zawsze odwzorowuje prosty rozkład mendlowski. Odzwierciedla to, tak jak i w mutacji *pt*, potencjalny udział wielu czynników biologicznych, które dzięki różnym sprzężeniom zwrotnym uwarunkowanym działaniem rozmaitych genów (a których ekspresję dodatkowo modyfikują czynniki środowiskowe), wpływają często w sposób przypadkowy na fenotyp choroby. Dlatego, jak się wydaje, królik *pt* przedstawia sobą dobry model zwierzęcy do badań nad epigenetycznymi uwarunkowaniami ekspresji mutacji PLP w chorobie Pelizaeusa-Merzbachera, a tym samym dostarczyć może wskazań co do postępowania terapeutycznego.

Podsumowując, mutacja genu *plp<sub>pt</sub>* oddziałuje plejotropowo na proces mielinogenezy u królika. Na podstawie uzyskanych wyników oraz wcześniejszych obserwacji choroby *pt*, a także danych literaturowych można zaproponować następujący prawdopodobny schemat sekwencji zdarzeń. Mutacja punktowa w genie *plp<sub>pt</sub>*, prowadząca do zmiany jednego tylko aminokwasu w łańcuchu białkowym kodowanych przezeń proteolipidów i będąca najprawdopodobniej przyczyną ich zmienionej



konformacji, prowadzi do zaburzeń ich prawidłowego transportu i retencji w aparacie Golgiego i lizosomach. Zatrzymanie białek PLP/DM-20 w strukturach błonowych komórki najprawdopodobniej jest przyczyną ich zwiększonego katabolizmu. Wywiera to wtórny, nasilający się wraz z wiekiem (postępem procesu mielinizacji) hamujący wpływ na ekspresję genu *plp<sub>pt</sub>*. Ze względu na ściśle zdefiniowany program mielinogenezy, którego częścią jest skoordynowana ekspresja genów mielinowych, mutacja *pt* powoduje dalszą zmianę ekspresji innych genów (MBP, CNP), czego skutkiem jest przebudowa metabolizmu białkowych i lipidowych składników mieliny. Drastyczny spadek ilości białek PLP/DM-20 oraz MBP uniemożliwia wytworzenie z dostępnych składników mieliny o prawidłowej, gęsto upakowanej strukturze, ze względu na wynikający stąd brak możliwości wykształcenia głównej blaszki ciemnej (brak MBP) oraz blaszki pośredniej (brak PLP i DM-20). Jednocześnie zmiana wzajemnych proporcji poszczególnych składników mieliny (ze względu na spadek ilości niektórych z nich i wzrost poziomu innych) zaburza dodatkowo ich normalne wbudowywanie się do tworzonej mieliny, powiększając pulę molekuł ulegających retencji w cytoplazmie oligodendrocytów. Zatem z jednej strony ze względu na zmienione proporcje niektórych składników mielina nie może być wystarczająco efektywnie wytwarzana, niedobór niektórych białek uniemożliwia wykształcenie jej prawidłowej struktury, zaś nadmiar wbudowywania białka MOG decyduje o przedwczesnym zakończeniu mielinizacji danego włókna. Z drugiej zaś strony retencja niewykorzystanych budulców mieliny, w tym przede wszystkim zmutowanego białka PLP, prowadzi do pogłębiającej się supresji transkrypcji niektórych genów (w tym przede wszystkim *plp<sub>pt</sub>*) i upośledzenia funkcji oligodendrocytów. Dysfunkcja OL i eliminacja patologicznych osłonek mielinowych są u mutantu *pt* częściowo rekompensowane przez rekrutację nowych oligodendrocytów. Zjawiska te, podlegające wpływom potencjalnych czynników regulujących (np. czynniki wzrostowe i związki modulujące działanie genów), zachodzą prawdopodobnie z odmienną intensywnością u różnych osobników, przyczyniając się do wystąpienia różnorodności fenotypowej, charakterystycznej dla mutacji *pt* i wynikającej z jej plejotropowego oddziaływania.



## VII. WNIOSKI

1. Wykazany plejotropizm oddziaływań mutacji punktowej genu  $PLP_{pt}$  na praktycznie wszystkie badane składowe procesu mielinogenezy wskazuje, że zaburzony zostaje jeden z podstawowych jego mechanizmów.
2. Badania własne jak i współczesne dane literaturowe pozwalają sądzić, że pierwotnemu uszkodzeniu ulega wewnątrzkomórkowy transport nieprawidłowego białka  $PLP_{pt}$ , a następnie innych białek i lipidów koniecznych do formowania mieliny.
3. Prowadzi to do wtórnego wzrostu katabolizmu białka  $PLP_{pt}$  a następnie zróżnicowanej supresji całego programu mielinizacyjnego, tak na poziomie transkrypcji genów jak i ekspresji białek mielinowych, narastającej dysfunkcji OL przejawiającej się spadkiem specyficznych znaczników lipidowych oraz do kompensacyjnej odpowiedzi tkanki, polegającej m.in. na rekrutacji nowych oligodendroblastów i włączania ich w proces przedłużonej mielinizacji.
4. Złożone współzależności pomiędzy licznymi czynnikami genetycznymi i epigenetycznymi kontrolującymi mielinogenezę są odpowiedzialne za zmienność fenotypowej ekspresji subletalnej cechy *pt* u królików.



## VII. PIŚMIENICTWO

- Amiquet P., Gardinier M.V, Zanetta J.-M., Matthieu J.-M. (1992) Purification and partial structural and functional characterization of mouse myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *J.Neurochem.* 58: 1676-1682.
- Amur-Umarjee S., Phan T., Campagnioni A.T. (1993) Myelin basic protein mRNA translocation in oligodendrocytes is inhibited by astrocytes in vitro. *J.Neurosci.Res.*, 36: 99-110.
- Anderson S., Miskimins R. (1994) Involvement of protein kinase C in cAMP regulation of myelin basic protein gene expression. *J. Neurosc. Res.*, 37: 604-611.
- Armstrong K.M., Baldwin R.L. (1993) Charged histidine affects  $\alpha$ -helix stability at all positions in the helix by interaction with the backbone charges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 11337-11340.
- Armstrong R.C., Kim J.G., Hudson L.D. (1995) Expression of myelin transcription factor I (MyTI), a "Zinc-Finger" DNA-binding protein, in developing oligodendrocytes. *GLIA*, 14: 303-321.
- Arquint M., Roder J., Chia L.S., Down J., Wilkinson D., Bayley H., Brawn P., Dunn R. (1987) Molecular cloning and primary structure of myelin associated glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 600-604.
- Asotra K., Macklin W.B. (1993) Protein kinase C activity modulates myelin gene expression in enriched oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.*, 34: 571-588.
- Asou H., Murakami K., Toda M., Uyemura K. (1995) Development of oligodendrocyte and myelination in the central nervous system. *Keio J. Med.* 44 (2): 47-52.
- Bansal R., Warrington A.E., Gard A.L., Pfeiffer S.E. (1989) Multiple and novel specificities of monoclonal antibodies 01, 04 and R-mAb used in the analysis of oligodendrocyte development. *J. Neurosci. Res.*, 24: 548-557.
- Bansal R., Pfeiffer S.E. (1992 a) Novel stage in the oligodendrocyte lineage defined by reactivity of progenitors with R-mAb prior to 01 anti-galactocerebroside. *J. Neurosci. Res.*, 32: 309-316.
- Bansal R., Stefansson K., Pfeiffer S.E. (1992 b). Proligodendroblast Antigen (POA), a developmental antigen expressed by A007/04- positive oligodendrocyte progenitors prior to the appearance of sulfatide and galactocerebroside. *J. Neurochem.* 58: 2221-2229.
- 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 in mice. *J. Comp. Neurol.* 284: 451- 462.



- Baumann, N. A., Bourre J. M., Jacque C., and Pollet S. (1972) Genetic disorders of myelination, w: *Lipids, Malnutrition and the Developing Brain*. A Ciba Foudation Symposium Elsevier Excerpta Medica , North Holand, pp. 91 - 100.
- Benjamins J., Iwata R., Hazlett J. (1978). Kinetics of entry of protein into the myelin membrane. *J. Neurochem.* 3: 1077-1085.
- Berndt J.A., Kim J.G., Hudson L.D. (1992) Identification of cis-regulatory elements in the myelin proteolipid protein (PLP) gene. *J.Biol.Chem.*, 267: 14730-1477.
- Bernier L., Norgard E., Raible D.W., Mentaberry A., Schembri J.G., Sabatini D.D., Colman D.R. (1987) Moleculr cloning of a 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: mRNAs with different 5' ends encode the same set of proteins in nervous and lymphoid tissues. *J. Neurosci.*, 7: 2703-2710.
- Boison D., Bussow H., D'Urso D., Muller H-W, Stoffel W. (1995) Adhesive properties of proteolipid protein are responsible for compaction of CNS myelin sheaths. *J. Neurosci.*, 15: 5502-5513.
- 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. USA*, 91: 11709-11713.
- Brady R.O. and Quarles R.H. (1988) Developmental and pathophysiological aspects of the myelin associated glycoprotein. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 8: 139-148.
- Braun P.E., Bambric L.L., Edwards A.M., Bernier L. (1990) 2',3' cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase has characteristic of cytoskeletal proteins. A hypothesis for its function. *Ann. N. Y. Sci.*, 605: 55-65.
- Breitschopf H., Suchanek G., Gould R.M., Coleman D.R., Lassman H. (1992). In situ hybridization with digixygenin-labelled probes: sensitive and reliable method applied to myelinating rat brain. *Acta Neuropathol.* (Berl.) 84: 581-587
- Brunner C., Lassman H., Waehneltd T.V., Matthieu J.-M., 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.
- Burger D., Perruisseau G., Simon M., Steck A.J. (1992) Comparison of the N-linked oligosaccharide structures of the two major human myelin glycoproteins MAG and P<sub>0</sub>: Assessment and relative occurrence of oligosaccharide structure by serial lectin affinity chromatography of <sup>14</sup>C-glycolipids. *J.Neurochem.*, 58: 845-853.
- Burger D., Steck A.J., Bernard C.C.A., Kerlero de Rosbo N. (1993) Human myelin/oligodendrocyte glycoprotein: a new member of the L2/HNH-1 family. *J.Neurochem.*, 61: 1822-1827.
- Campagnioni A.T., Macklin W.B. (1988) Cellular and molecular aspects of myelin protein gene expression. *Mol. Neurobiol.*, 2: 41-89.



- Colman D.R., Kreibich G., Frey A.B., Sabatini D.D. (1982) Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J. Cell Biol.*, 95: 598-608.
- Dąmbska M., Danielewicz-Kotowicz A. (1978) Morphological study on myelination of some structures of rabbit brain. *Neuropat. Pol.*, 16: 203-209.
- Diaz R.S., Monreal J., Lucas M. (1990) Calcium movements mediated by proteolipid protein and nucleotides in liposomes prepared with the endogenous lipids from brain white matter. *J. Neurochem.*, 55: 1304-1309.
- Domańska-Janik K., Wikieł H., Zelman I., Strosznajder J. (1986) Brain lipids of a myelin-deficient rabbit mutant during development. *Neurochem. Pathol.*, 4: 135-151.
- Domańska-Janik K., de Nechaud B., Inomata M., Kawashima S., Zalewska T. (1992) Calcium-activated neutral protease (CANP) in normal and dysmyelinating paralytic tremor mutant rabbit myelin. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 16: 283-288.
- Domańska-Janik K., Gajkowska B., de Nechaud B., Bourre J.M. (1988) Myelin composition and activities of CNPase and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in hypomyelinated "pt" mutant rabbit. *J. Neurochem.*, 50: 122-129.
- Domańska-Janik K., Gajkowska B., Strosznajder J., Zalewska T. (1987) Metabolic studies on dysmyelinating mutant pt rabbit brain in vitro. *Neurochem. Pathol.*, 7: 233-250.
- Duncan I.D. (1990) Dissection of phenotype and genotype of the X-linked myelin mutants. *Ann. New York Acad. Sci.*, 605: 110-121.
- Duncan I.D., Hammang J.P., Trapp B.T., (1987) Abnormal compact myelin in the myelin deficient rat: absence of proteolipid protein correlates with a defect in the intraperiodic line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 6287-6291.
- Eisenbarth G.S., Walsh F.S., Nirenberg W. (1979) Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 76: 4913-4917.
- Espinosa de los Monteros A., de Vellis J. (1996) Glial cell interactions in culture models of injury. *Int. J. Devl. Neuroscience*, 14: 66.
- Esselman W.J., Laine R.A., Sweeley C.C. (1972). Isolation and characterization of glycosphingolipids. W: Colowick S.P., Kaplan N.O., Ginsburg V.,(eds) *Methods in Enzymology*. XXVIII B: pp.140-143.
- Folch- Pi J., Lees M., Sloane- Stanlej G. H. ( 1957 ). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 226: 497- 509.
- Gard A.L., Pfeiffer S.E. (1989) Oligodendrocyte progenitors isolated directly from developing telencephalon at a specific phenotypic stage: myelinogenic potential in a defined environment. *Development*, 106: 119-132.



- Gardinier M.V., Amiquet P., Linington C., Matthieu J.-M. (1992) Myelin/oligodendrocyte glycoprotein cDNA analysis reveals a unique member of the immunoglobulin gene superfamily. *J.Neurosci.Res.*, 33: 177-187.
- Gilbert W.R., Garwood M.M., Agrawal D., Schmidt R.E., Agrawal H.C. (1982) Immunoblot identification of phosphorylated basic proteins of rat and rabbit CNS and PNS myelin: Evidence for four phosphorylated basic proteins and P<sub>2</sub> in rat PNS myelin. *Neurochem. Res.*, 7 (12): 1495-1506.
- Gow A., Friedrich V.L. Jr, Lazzarini R.A. (1994 a) Intracellular transport and sorting of the oligodendrocyte transmembrane proteolipid protein. *J.Neurosci.Res.*, 37: 563-573.
- Gow A., Friedrich V.L. Jr, Lazzarini R.A. (1994 b) Many naturally occurring mutations of myelin proteolipid protein impair its intracellular transport. *J.Neurosci.Res.*, 37: 574-583.
- Griffiths I.R., Dickinson P., Montague P. (1995 a) Expression of the proteolipid protein gene in glial cells of the postnatal peripheral nervous system of rodents. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 21: 7 - 110.
- Griffiths I.R., Montague P., Dickison P. (1995 b) The proteolipid protein gene. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 21: 85-96.
- Hartman B.K., Agrawal H.C., Agrawal D., Kalbach S. (1982) Development and maturation of central nervous system myelin: comparison of immunohistochemical localization of proteolipid protein and basic protein in myelin and oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4217-4220.
- Hodes M.E., Pratt V.M., Dlouhy S.R. (1994) Genetics of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Dev.Neurosci.*, 15, 383-394.
- Hogan E., Greenfield S. (1984) Animal models of genetic disorders of myelin. W: *Myelin*, Morell P.(ed), pp. 489-534 Plenum Press, New York .
- Huber L.A., Madison D.L., Simons K., Pfeiffer S.E. (1994) Myelin membrane biogenesis by oligodendrocytes. Developmental regulation of low molecular weight GTP-binding proteins. *FEBS Letters*, 347: 273-278.
- Hudson L.D. (1990) Molecular genetics of X-linked mutants. *Ann. N.Y.Acad. Sci.*, 605: 155-165.
- Ida J.A. Jr., Dubois-Dalcq M., McKinnon R.D. (1993) Expression of the receptor tyrosine kinase c-kit in oligodendrocyte progenitor cells. *J. Neurosc. Res.*, 36: 596-606.
- 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: 2248-2253.



- Ikenaka K., Kagawa T. (1995) Transgenic systems in studying myelin gene expression. *Dev. Neurosci.* 17: 127 - 136.
- Inouye H., Kirschner D. A. (1994) Membrane topology of PLP in CNS myelin: evaluation of models. *Neurochem. Res.*, 19 (8): 975 - 981.
- Kalwy S.A., Smith R. (1994) Mechanisms of myelin basic protein and proteolipid protein targeting in oligodendrocytes. *Molecular Membrane Biology*, 11, 2: 67-78.
- Kitagawa K., Sinoway M. P., Yang C., Gould R.M., and Colman D. R. (1993). A proteolipid protein gene family: expression in sharks and rats and possible evolution from an ancestral gene encoding a pore - forming polypeptide. *Neuron*, 11: 433 - 448.
- Knapp P.E., Skoff R.P., Redstone D.W. (1986) Oligodendroglial cell death in jimpy mice: an explanation for the myelin deficit. *J. Neurosci.*, 6: 2813-2822.
- Konat G., Wiggins R.C. (1992) Genetic Dysmyelination Models. A key to the mechanisms and regulation of myelination. W: A. Boulton, G. Baker, R. Butterworth (eds) *Neuromethods, Animal Models of Neurological Disease*, 21: 175-203.
- Kowalczyk K., Stryjecka-Zimmer M., Sanecka-Obacz M. (1995) Antioxidant enzyme activities in different brain areas of the neurological mutant- Pt rabbit. *Folia Neuropathol.*, 33: 169-254.
- Laszkiewicz I., Wiggins R.C., Konat G. (1992) Ascorbic acid upregulates myelin gene expression in C6 glioma cells. *Met.Brain Disease*, 7: 157-164,
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lemke G. (1988) Unwrapping the genes of myelin. *Neuron*, 1: 545-543.
- Lemke G. (1993) The molecular genetics of myelination, an update. *Glia*, 7: 263-271.
- Levi G., Aloisi F., Wilkin G.P. (1987) : Differentiation of cerebral biopotential glial precursors into oligodendrocytes in primary culture: Developmental profile of surface antigens and mitotic activity. *J. Neurosci. Res.* 18: 407- 417.
- LeVine S.M., Wond D., Macklin W.B. (1990) Developmental expression of proteolipid protein and DM20 mRNAs and proteins in the rat brain. *Dev. Neurosci.*, 12: 235-250.
- Linington C. and 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: 61-69.
- Linington C., Webb M., Woodhams P. (1984) A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *J.Neuroimmunol.*, 6: 387-396.



- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Macklin W.B., Gardinier M.V., King K.D., Kampf K. (1987) An AG-AC transition at a splice site in the myelin proteolipid protein gene in jimpy mice results in the removal of an exon. *FEBS Lett.*, 223: 417-421.
- Macklin W.B., Gardinier M.V., Obeso Z.O. (1990) structure and expression of the mouse proteolipid protein gene. *Ann. NY Acad. Sci.*, 605: 183-193.
- Madison D., Kruger W., kim T., Joly E., Yamaguchi Y., Pfeiffer S.E. (1996) Is myelin biogenesis an exocytic event? Expression of the secretory pathway associated, small GTP-binding protein rab3a and other SNARE components in oligodendroglia and myelin. *Int. J. Devel. Neuroscience*, 14: 26.
- 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: 2439-2448.
- Merzbacher L (1910) Eine eigenartige familiäre Erkrankungsform (Aplasia axialis extracorticalis congenita). *Z. ges Neurol. Psychiat.*, 3: 1-138.
- Milner R.J., Lai C., Nave K.- A., Lenoir D.S., Ogata J., Sutcliffe J.G, (1985) Nucleotide sequence of mRNAs for rat brain myelin proteolipid protein. *Cell*, 42: 931- 939.
- Minty A.J., Alonso S., Guenet J.- L., Buckingham M. E. (1983) Number and organization of actin - related sequences in the mouse genome. *J. Mol. Biol.*, 167: 77 - 101.
- Mitchell L.S., Griffiths I.R., Brophy P.J. (1990) Rumpshaker mouse. A probable mutation of the PLP gene. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 605: 394-397.
- Morell P., Quarles R.H., Norton W.T. (1989) Formation, structure, and biochemistry of myelin. W: *Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*, 4th Ed. (G.J. Siegel et al., ed.) Raven Press, Ltd., New York, 1989.
- Mossakowski M.J. (1981) Struktura ośrodkowego układu nerwowego. W: *Podstawy neuropatologii* pod red. Mossakowski M.J., Dymecki J., i Wender M., PZWL (1981).
- Nadon N.L., Duncan I.D., Hudson L.D. (1990) A point mutation in the proteolipid protein gene of the "shaking pup" interrupts oligodendrocyte development. *Development*, 110: 529-537.
- Nave K.-A., Lai C., Bloom F.E., Milner R.J. (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. USA*, 84: 5665-5669.



- Nave K.-A., Lemke G. (1991) Induction of the myelin proteolipid protein (PLP) gene in C6 glioblastoma cells: functional analysis of the PLP promoter. *J. Neurosci.*, 11: 3060-3069.
- Norton W.T., Poduslo S.E. (1973) Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J. Neurochem.*, 21: 749-757.
- Nussbaum J.L., Roussel G. (1983) Immunocytochemical demonstration of the transport of myelin proteolipids through the Golgi apparatus. *Cell Tissue Res.*, 234, 547-559.
- Osetowska E. (1967) Nouvelle maladie hereditaire du lapin de laboratoire. *Acta Neuropathol.*, 8: 331-344.
- Osetowska E., Luszawski F., Taraszewska A. (1975) Badania doświadczalne nad chorobą dziedziczną ośrodkowego układu nerwowego na modelu królika pt. Obraz kliniczny w pokoleniach I-X. *Neur. Neurochir. Pol.* IX (XXV), 5: 469-578.
- Pedraza L., Spagnol G., Latov N., Salzer J.L. (1995) Biosynthesis and regulation of expression of the HNK-1 epitope on myelin-associated glycoprotein in a transfected cell model system. *J. Neurosc. Res.*, 40: 716-727.
- Pelizaeus F. (1885) Über eine eigentümliche Form spastischer Lähmung mit zerebralen Erscheinungen auf hereditärer Grundlage (multiple Sklerose). *Arch. Psychiat. Nervenkr.*, 16: 698-710.
- Pfeiffer S.E., Bansal R., Gard A.L., Warrington A.E., (1990) Regulation of oligodendrocyte progenitor development: antibody-perturbation studies. NATO ASI Series, Vol. H 43., w: *Cellular and Molecular Biology of Myelination*., Edited by G. Jeserich et al. Springer - Verlag Berlin Heidelberg 1990.
- Pham-Dinh D., Mattei M.-G., Nussbaum J.-L., Roussel G., Pontarotti P., Roedel N., Mather I.H., Artzt K., Lindhal K., Dautigny A. (1993) Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7990-7994.
- Poltorak M., Sadoul R., Keilhauer G., Landa C., Fahrid T., Schachner M., (1987) : Myelin associated glycoprotein, a member of the L2/HNK-1 family of neutral cell adhesion molecules, is involved in neuron- oligodendrocyte interaction. *J. Cell Biol.*, 105: 1893- 1899.
- Popot J.-L., Pham-Dinh D., Dautigny A. (1991) Major myelin proteolipid: the 4- $\alpha$ -helix-topology. *J. Membrane Biol.*, 120: 233-246.
- Quarles R.H. (1990) The biochemistry of myelin in X-linked mutants. *Ann. New York Acad. Sci.* 605: 135-145.
- Quarles R.H., Johnson D., Brady R.O., Sternberger N.H. (1981) Preparation and characterization of antisera to the myelin-associated glycoprotein. *Neurochem. Res.*, 6: 115-127.



- Raff M.C., Miller R.H., Noble M. (1983) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on the culture medium. *Nature*, 303: 389-396.
- Raine C. S. (1989) Neurocellular Anatomy. w *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*, 4th Ed., (G.J. Siegel et al.), Raven Press, Ltd., New York.
- Ranscht B., Clapshaw P.A., Noble M., Seifert W. (1982) Development of oligodendrocytes and Schwann cells studied with a monoclonal antibody against galactocerebroside. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 79: 2709-2713.
- Roach A., Boylan K., Horvath S., Prusiner S.B., Hood L. (1983) Characterization of cloned cDNA representing rat myelin basic protein: absence of expression in brain of shiverer mutant mice. *Cell* 34: 799 - 806.
- Rothman J.E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, 372: 55-62.
- Rothman J.E., Orci L. (1996) Pączkowanie pęcherzyków w komórkach. *Świat Nauki*, 8: 56-61.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schachner M. (1989) Families of neural adhesion molecules. W: *Carbohydrate recognition in cellular function*. Ciba Foundation Symposium 145, pp 156-168. John Willey, Chichester.
- Schindler P., Luu B., Sorokine O., Trifilieff E., Dorselaer A.V. (1990) Developmental study of proteolipids in bovine brain: a novel proteolipid and DM-20 appear before proteolipid protein (PLP) during myelination. *J. Neurochem.*, 55: 2079-2085.
- Schneider A., Montague P., Griffiths I., Fanarraga M., Kennedy P., Brophy P., Nave K.-A. (1992) Uncoupling of hypomyelination and glial cell death by a point mutation in the proteolipid protein gene. *Nature*, 358:758-760.
- Scolding N.J., Frith S., Linington C., Morgan B.P., Campbell A.K., Compston D.A. (1989) Myelin-oligodendrocyte glycoprotein is a surface marker of oligodendrocyte maturation. *J. Neuroimmunol.*, 22: 169-176.
- Seitelberger F. (1995) Neuropathology and genetic of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain Pathology*, 5: 267-273.
- Sinoway M.P., Kitagawa K., Timsit S., Hashim G.A., Colman D.R. (1994) Proteolipid protein interactions in transfectans: implications for myelin assembly. *J. Neurosci. Res.*, 37: 551-562.
- Skoff R.P. (1976) Myelin deficit in the jimpy mouse may be due to cellular abnormalities in astroglia. *Nature*, 264: 560-562.



- Skoff R.P. (1995) Programmed cell death in the dysmyelinating mutants. *Brain Pathology*, 5: 283-288.
- Skoff R.P., Knapp P. (1991) Division of astroblasts and oligodendrocytes in postnatal rodent brain: evidence for separate astrocyte and oligodendrocyte lineages. *Glia*, 4, 165-174.
- Smith R. (1992) The basic protein of CNS myelin: its structure and ligand binding. *J. Neurochem.*, 59 (5): 1589-1608.
- Sommer I., Schachner M. (1981) Monoclonal antibodies (01 and 04) to oligodendrocyte cell surfaces: An immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol.* 83: 311-327.
- Sprinkle T.J. (1989) 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, an oligodendrocyte-Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervous system. *CRC Crit. Rev. Neurobiol.*, 4, 235-301.
- Sternberger N.,H. (1984) Patterns of oligodendrocyte function seen by immunocytochemistry. W: *Oligodendroglia*, Ed. by W.T. Norton, Plenum Press, N. York.
- Suchanek G., Lassmann H. (1996) Oligodendrocyte lineage - immunocytochemistry and in situ hybridization applied to human and experimental disease. *Int. J. Devl. Neuroscience*, 14: 57.
- Sypecka J., Domańska-Janik K. (1995 a) Expression of myelin specific proteins during development of normal and hypomyelinated *pt* mutant rabbits: studies on the brain homogenates. *Mol.Chem.Neuropathol.*, 26: 53-66.
- Sypecka J., Domańska-Janik K. (1995 b) Expression of myelin specific proteins during development of normal and hypomyelinated *pt* mutant rabbits: studies of the purified myelin. *Mol.Chem.Neuropathol.*, 26: 67-78.
- Sypecka J., Gajkowska B., Domańska-Janik K. (1995) Oligodendrocyte development in *plp pt* mutant rabbits: Glycolipid antigens and *plp* gene expression. *Metabolic Brain Disease*, 10 ( 4): 321-333.
- Taraszevska A. (1979) Zmiany ultrastrukturalne w rdzeniu kręgowym u królika *pt* w okresie objawowym choroby. *Neuropat. Pol.*, XVII (1):19-37.
- Taraszevska A. (1986) Morfologiczna charakterystyka złogów sudanofilnych występujących w przebiegu nieprawidłowej mielinizacji u królika *pt*. *Neuropat. Pol.*, 24 ( 2): 183-194.
- Taraszevska A., Zelman I.B. (1981) Charakterystyka topografii zmian w mózgu królika *pt* w okresie rozwoju objawów klinicznych i w przewlekłym przebiegu choroby. *Neuropat. Pol.*, XIX (4): 442-459.



- Taraszewska A., Zelman I.B. (1985) Morfometryczna ocena procesu mielinizacji w mózgu królika. *Neuropat. Pol.*, 23 (2):219-227.
- Taraszewska A., Zelman I.B. (1986) Morfometryczna ocena procesu mielinizacji w mózgu królika pt. II. Spoidło wielkie. *Neuropat. Pol.*, 24 (4): 443-454.
- Taraszewska A., Zelman I.B. (1987) Electron microscopic study of glia in pt rabbit during myelination. *Neuropat. Pol.*, 25 (4):351-368.
- Timsit S.G., Bally-Cuif L., Colman D.R., Zalc B. (1992 a) DM-20 mRNA is expressed during the embryonic development of the nervous system of the mouse. *J. Neurochem.*, 58: 1172-1175.
- Timsit S.G., Sinoway M.P., Levy L., Allinquant B., Stempak J., Staugaitis S.M., Colman D.R. (1992 b) The DM20 protein of myelin: intracellular and surface expression patterns in transfectants. *J. Neurochem.*, 58: 1936-1942.
- 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 (2): 1012- 1024.
- Tosic M., Dolivo M., Domańska-Janik K., Matthieu J.-M. (1994) Paralytic tremor (*pt*): a new allele of proteolipid protein gene in rabbits. *J. Neurochem.*, 63: 2210-2216.
- Tosic M., Gow A., Dolivo M., Domańska-Janik K., Lazzarini R.A., Matthieu J.-M. (1996) Proteolipid PLP/DM-20 proteins bearing the Paralytic Tremor mutation in peripheral nerves and transfected Cos-7 cells. *Neurochem. Res.*, 21 (4): 423-430.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon A. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4350-4354.
- Trapp B.D., Moench T., Pulley M., Barbarosa E., Tennekoon G., Griffin J. (1987) Spatial segregation of mRNA encoding myelin-specific proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7773-7777.
- de Vellis J. (1990) Developmental and hormonal regulation of gene expression in oligodendrocytes. *Ann. NY Acad. Sci.*, 605: 81-89.
- de Vellis J., Kahn M., Kumar S. (1996) Regulation of injury response in glia. *Int. J. Dev. Neuroscience*, 14: 74.
- Vogel U.S., Thompson R.J. (1988) Molecular structure, localization and possible function of the myelin associated enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. *J. Neurochem.*, 50: 1667-1677.
- Voller A., Bidwell D.E., Bartlett A. (1979). The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Alexandria, VA, Dynatech Labs.



- Warrington A. E., Pfeiffer S.E. (1992) Proliferation and differentiation of O4+ oligodendrocytes in postnatal rat cerebellum: analysis in unfixed tissue slices using anti-glycolipid antibodies. *J. Neurosci. Res.*, 33: 338-353.
- Wikieł H., Domańska-Janik K., Strosznajder J. (1988) Lipid composition of myelin and protein-lipid complex in a neurological rabbit mutant. *Neurochem. Pathol.*, 8: 109-119.
- Williams A.F., Barclay A.N. (1988) The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Ann. Rev. Immunol.*, 6: 381-405.
- Wrabetz L., Shumas S., Grinspan J., Feltri M.L., Bozyczko D., McMorris F.A., 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: 455-471.
- Xiao B.-G., Linington C., Link H. (1991) Antibodies to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and controls. *J. Neuroimmunol.*, 31: 91-96.
- Yanagisawa K., Moller J.R., Duncan I.D., Quarles R.H. (1987) Disproportional expression of proteolipid protein and DM-20 in the X-linked, dysmyelinating shaking pup mutant. *J. Neurochem.*, 49: 1912-1917.
- Ye P., Kanoh M., Zhu W., Laszkiewicz I., Royland J.E., Wiggins R.C., Konat G. (1992) Cyclic AMP-induced upregulation of proteolipid protein and myelin associated glycoprotein gene expression in rat glioma C6 cells. *J. Neurosci. Res.*, 31: 578-583.
- Zelman I., Taraszewska A. (1984) Patologia mieliny u królika pt. *Neuropat. Pol.*, 22: 205-218.
- Zelman I., Taraszewska M. (1988) Histologiczna ocena gleju w procesie mielinizacji u królika pt. *Neuropat. Pol.*, 26 (1): 27-37.
- Zhu W., Kanoh M., Ye P., Laszkiewicz I., Royland J., Wiggins R.C., Konat G. (1992) Retinoic acid regulation of proteolipid protein and myelin associated glycoprotein gene expression in C6 glioma cells. *J. Neurosci. Res.*, 31: 745-750.
- Zhu W., Wiggins R.C., Konat G. (1994) Glucocorticoid-induced upregulation of proteolipid protein and myelin-associated glycoprotein genes in C6. *J. Neurosci. Res.*, 37: 208-212.