

Die Myelinmembran des Zentralnervensystems – essentielle makromolekulare Strukturen und Funktion

Von Wilhelm Stoffel *

Die Markscheiden der Nervenfasern (Axone) werden von den Oligodendrozyten im Zentralnervensystem (CNS) und den Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem (PNS) aus myelin-spezifischen komplexen Lipiden und Proteinen in der Myelinisierungsphase gebildet. Die mehrschichtigen Myelinmembranen isolieren die Axone und machen eine schnelle saltatorische Erregungsleitung möglich und bewirken einen verminderten Axondurchmesser im Vergleich zu nichtisolierten Axonen. Somit ist die Myelinisierung *das Ereignis* in der Evolution, das entscheidend zur Miniaturisierung des Zentralnervensystems (Gehirn und Rückenmark) beitrug. Die Myelinmembran ist morphologisch vor allem elektronenmikroskopisch detailliert studiert worden. Biochemisch wurde sie in den letzten Jahren sowohl durch die Analyse der Lipidkomponenten (Cholesterin, Phospholipid- und Sphingolipidklassen) als auch die der Proteinbausteine auf der molekularen Ebene weitgehend aufgeklärt. Eine charakteristische Periodizität zeichnet das multilamellare System aus. Sie ist bedingt durch myelin-spezifische Lipide, die eine 5 nm dicke Doppelschicht aufbauen. Diese tritt mit dem Basischen Myelinprotein (MBP) der cytosolischen Seite der Plasmamembranausstülpung in Wechselwirkung, während das integrale Membranprotein Proteolipidprotein (PLP) hydrophile Domänen sowohl auf der cytosolischen als auch der extracytosolischen Oberfläche der Doppelschicht exponiert. Eine Vielzahl von proteinchemischen wie immunochemischen Befunden wurde in einem Myelinmembranmodell zusammengefaßt. Molekularbiologische Untersuchungen führten zur Aufschlüsselung der Genstrukturen der Myelinproteine und ihrer Chromosomenlokalisierung. Der Prozeß der Myelogenese, die zeitliche und ortsspezifische Expression der Myelinprotein-Gene im Gehirn, kann nun mit molekular- und zellbiologischen Techniken analysiert werden. Mit gentechnischen Methoden wurden die Mutationen an den Modellen jimpy-Maus und myelin-defizierte Ratte bestimmt. Dabei handelt es sich um Tiermodelle, die genetisch bedingten Myelindefekten (Dysmyelinosen) beim Menschen entsprechen. Damit wird es möglich sein, auf der molekularen Ebene den Zelltod der Oligodendrozyten zu erforschen, der als Folge der Expression mutierter Myelinproteine eintritt und mit dem Leben nicht vereinbar ist. Oligodendrozyten und die von ihnen synthetisierten Myelinstrukturen sind Zielstrukturen cytotoxischer Lymphocyten (Tc), die im Verlauf des demyelinisierenden Geschehens bei der Multiplen Sklerose in schubhaft auftretenden Entzündungsherden den Abbau der Myelin-scheiden einleiten. Tc-Lymphocyten erkennen Myelinstrukturen als Epitope und zerstören sie. Das sich nun abrundende Bild über den molekularen Aufbau der Myelinmembran wird auch zu einem besseren Verständnis der Demyelinisierung auf der molekularen Ebene und damit zu therapeutischen Ansätzen führen.

1. Einleitung

Im Verlauf der Evolution, die zu einer ständig wachsenden Komplexität der Organismen führte, entwickelte sich eine Reihe von Mechanismen, die es ermöglichen, rasch auf Umwelteinflüsse zu reagieren und selbst zu agieren. Dabei kommt dem zentralen und dem peripheren Nervensystem (CNS bzw. PNS) größte Bedeutung zu, da sie Informationen zwischen Nervenzellen (Neuronen) und Erfolgsorganen über Nervenfasern (Axone) mit hoher Geschwindigkeit übertragen. Neben den Neuronen entwickelte sich die Neuroglia, ein Stützgewebe für die Neuronen, zu dem die Astroglia und die Oligodendroglia zählen. Ein entscheidender Sprung in der Evolution bestand in der Entwicklung eines elektrischen Isoliersystems für die Nervenfasern in Form der Myelinscheide, die von den Oligodendrozyten gebildet wird. Die Geschwin-

digkeit der Erregungsleitung ist proportional dem Durchmesser des Axons im Falle der nackten Axone. In myelinisierten Axonen verläuft diese bis zu 100mal schneller als in Abwesenheit des Myelins, der Querschnitt eines Axons kann also für die gleiche Leistung erheblich reduziert werden. Neben der Erhöhung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit ermöglicht die Myelinisierung die Unterbringung einer weit höheren Zahl von Axonen. Das wiederum macht die äußerst kompakte Struktur des CNS möglich. Wären die Axone der Bahnen des Rückenmarks nicht myelinisiert, so müßten sie zur Erfüllung der gleichen Leistung den Durchmesser einer mehrere hundert Jahre alten Eiche aufweisen; der Sehnerv (Nervus opticus) müßte statt 2–4 mm einen Durchmesser von 10–15 cm aufweisen.

Die fettrichen Umhüllungen der Axone des CNS, die besonders in der weißen Substanz, den Marklagern, im Ausschnitt eines Gehirns deutlich werden (Abb. 1), wurden von Virchow 1854^[1] erstmals mit dem Namen Myelin (griech. *myelos*, Mark) bezeichnet. 1871 beobachtete Ranyvier^[2] im Lichtmikroskop Unterbrechungen der Myelinscheiden in 1–

[*] Prof. Dr. Dr. W. Stoffel
Institut für Biochemie
Medizinische Fakultät der Universität
Joseph-Stelzmann-Straße 52, D-5000 Köln 41

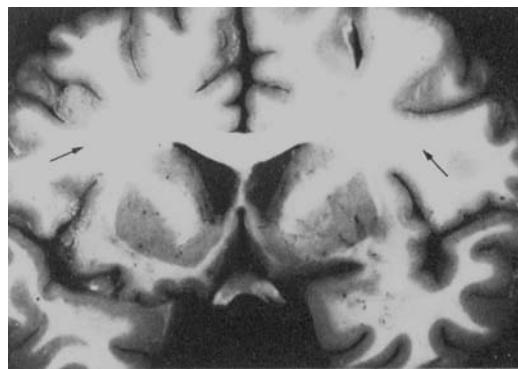


Abb. 1. Makroskopischer Querschnitt eines menschlichen Gehirns. Der Cortex und die weiße Substanz (Pfeile) sind deutlich zu erkennen.

2 µm Abständen, die heute als Ranviersche Schnürringe bezeichnet werden. Hier liegen die Axone nackt vor und sind die K⁺/Na⁺-Pumpen konzentriert, die für die Wiederherstellung des Aktionspotentials verantwortlich sind. Die hohe Geschwindigkeit der Erregungsleitung wird nicht wie in nackten Axonen durch kontinuierliche Depolarisation erreicht, sondern sprunghaft von einem Schnürring über die internodalen Abstände zum anderen. Man bezeichnet dies nach A. L. Hodgkin und A. F. Huxley^[3] als saltatorische Erregungsleitung. Die nur an den Schnürringen lokal auftretende Depolarisation führt bei der Repolarisierung zu einer erheblichen Energieeinsparung.

2. Myelinisierung

Myelinartige Nervenscheiden traten erstmals im Evolutionsschritt auf, der zu den Vertebraten (Knochenfischen) führte^[4]. Durch die Ausbildung der Myelinscheiden um die Axone wurden drei Vorteile erlangt: rascher Informationsfluß, kompakte Organisation des CNS und Energieeinsparung bei der Wiederherstellung und Aufrechterhaltung des Ruhepotentials.

Die Myelinisierung (Myelogenese) im CNS verläuft zeitlich und räumlich streng programmiert ab. Das Programm wird in den sich aus den Vorläuferzellen vom O2A-Astrocyten-Typ differenzierenden Oligodendrozyten zu einem für jede Spezies charakteristischen Zeitpunkt gestartet, bei Maus und Ratte etwa am zehnten Tag nach der Geburt und beim Menschen nach dem sechsten Schwangerschaftsmonat. Die Ausbildung der Myelinscheiden um die Nervenfasern

des Gehirns und des Rückenmarks ist bei Ratte und Maus im wesentlichen um den 30. Tag nach der Geburt abgeschlossen, beim Menschen am Ende des zweiten bis vierten Lebensjahres^[5]. In dieser Phase synthetisiert der Oligodendrozyt täglich das Zwei- bis Dreifache seines Eigengewichtes an Myelinbausteinen, Lipiden und Proteinen^[6]. Die Oligodendrozyten des CNS bilden dabei Ausstülpungen ihrer Plasmamembranen (Abb. 2 A), die bis zu 50 Axone ansteuern, diese

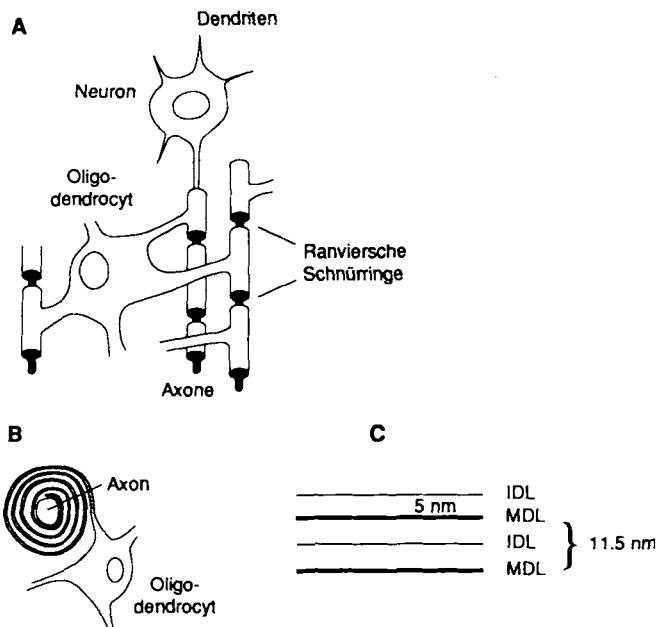


Abb. 2. Schematische Darstellung A) der von einem Oligodendrozyten zu vielen Axonen ausgehenden Plasmamembran-Fortsätze mit Bildung von Ranvierschen Schnürringen, B) des Spiralisierungsprozesses bei der Myelinisierung und C) der aus dem elektronenmikroskopischen Bild abgeleiteten Periodizität des Myelins (siehe auch Abb. 3).

spiraling umwickeln, wobei das Cytoplasma weitgehend aus den Fortsätzen abgepreßt wird. Die Innenseiten (cytoplasmatische Oberflächen der Fortsätze) lagern sich dicht aneinander und erscheinen im elektronenmikroskopischen Bild aufgrund ihrer hohen Elektronendichte als „main dense line“ (MDL). Auch die Außenflächen der Plasmamembran-Ausstülpungen (extracytosolische Seiten) treten im Verlauf der spiraligen Umwicklung in engen Kontakt. Die Kontaktzone stellt sich als „intraperiod dense line“ (IDL) dar. Abbildung 2 A veranschaulicht schematisch die Ausstülpung der Myelinmembranen aus der Plasmamembran des Oligoden-



Wilhelm Stoffel studierte von 1947–1952 Medizin in Köln und promovierte bei E. Klenk im Fach Physiologische Chemie in Köln. Ein Studium der Chemie in Bonn schloß sich an (1952–1957), die Diplomarbeit wurde bei B. Helferich, die Dissertation in Chemie bei L. Craig, Rockefeller University, New York, und E. Klenk, Köln, angefertigt. Nach einer Postdoktorandenzzeit bei L. Craig und E. H. Ahrens, Rockefeller University, New York, und bei C. Martius, ETH Zürich, folgte die Habilitation in Physiologischer Chemie 1962 in Köln. Seit 1967 hat er den Lehrstuhl für Physiologische Chemie (jetzt Biochemie) der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln inne. Derzeitige Forschungsschwerpunkte sind Neurochemie und Molekularneurobiologie, die Analyse der Atherogenese (Arterioskleroseforschung) sowie Struktur- und Funktionsanalyse der Serumapolipoproteine.

drocyten, Abbildung 2B den Spiralisierungsprozeß und Abbildung 2C die Periodizitäten der Myelinmembran, abgeleitet aus dem elektronenmikroskopischen Bild eines myelinisierten Axons (Ausschnitt in Abbildung 3).



Abb. 3. Elektronenmikroskopische Aufnahme des Querschnitts eines myelinisierten Axons. Neben der dem cytosolischen Spalt entsprechenden, hohe Elektronendichte aufweisenden „main dense line“ (MDL) und der „intraperiod dense line“ (IDL), dem Pendant der extracytoplasmatischen Seiten zweier aufeinander gepackten Myelinmembranschichten, sind die radialen Komponenten erkennbar.

Die Myelinmembran weist eine Periodizität von 11.5 nm auf. Jede Lipiddoppelschicht ist etwa 4–5 nm dick (Abb. 2C) und unterscheidet sich damit erheblich von der Dicke der Plasmamembran einer Leber- oder Bindegewebszelle (2.5–3 nm). In diesen Dimensionen schlagen sich die unterschiedlichen chemischen Strukturen der die Doppelschicht aufbauenden Lipide nieder, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

Die Funktion der Oligodendrozyten in der Myelogenese des CNS übernimmt im peripheren Nervensystems die Schwannsche Zelle. Obwohl das Myelin des PNS dem des CNS in seiner morphologischen Architektur (Periodizität) sehr ähnlich ist, ist es jeweils eine Schwannsche Zelle, die nur eine internodale Hülle bildet.

Im folgenden werden Biochemie und Molekularbiologie der makromolekularen Komponenten der Myelinmembran des Zentralnervensystems im Hinblick auf vier Hauptfragen behandelt:

1. Welche chemischen Strukturen sind für die kompakte Schichtung der Myelinlamellen und damit für die Funktion der Isolierung des Axons verantwortlich, und wodurch ist die außergewöhnliche Periodizität der Myelinmembranstruktur bedingt?
2. Wie können wir uns die Aufwicklung der Oligodendrozyten-Plasmamembranfortsätze um die Axone vorstellen?
3. Wie führen durch Mutationen verursachte geringste Veränderungen der Proteinstrukturen zum vollständigen Defekt des Myelins und Tod des Individuums?
4. Welche Bedeutung hat die Kenntnis der Myelinstrukturen für das pathogenetische Verständnis der dys- und demyelinisierenden Erkrankungen?

3. Die Lipiddoppelschicht der Myelinmembran

Einfache Zentrifugationsschritte führen zur Isolierung des Myelins in einheitlicher Form und machen es damit der Analyse zugänglich. Die Myelinmembran ist die lipidreichste Membran des tierischen Organismus. Etwa 80% seines Trockengewichts bestehen aus Cholesterin und komplexen Sphingo- und Phospholipiden und nur 20% aus Proteinen.

Tabelle 1. Vergleich der Bausteine der Oligodendrozyten-Plasmamembran mit denen des isolierten Myelins.

Komponente	Oligodendrozyten-Plasmamembran [Mol-%]	Myelin [Mol-%]
Proteine	54	21
Lipide	46	79
Cholesterin	36.4	40.9
Cerebrosid	9.4	15.7
Sulfatide	3.0	4.0
Sphingomyelin	5.4	4.7
Phosphatidylcholin	25.4	10.9
Phosphatidylethanolamin	7.3	13.6
Phosphatidylinositol(di)phosphat	7.1	4.7
Phosphatidylserin	5.1	5.0
Ganglioside	0.9	0.5

Tabelle 1 faßt eine Komponentenanalyse des Myelins zusammen und erlaubt den Vergleich mit der der Plasmamembran des Oligodendrozyten. Die Lipiddoppelschicht weist insoweit eine sehr spezielle Zusammensetzung auf, als sie mit 40 Mol-% einen außergewöhnlich hohen Cholesteringehalt hat. So entfällt auf jedes Phospholipid (Sphingomyelin wird hier zu den Phospholipiden gezählt, weil es die gleiche zwittrionische polare Kopfgruppe enthält wie die Phosphatidylcholine) ein Molekül Cholesterin. Zu den Sphingolipiden Cerebrosid und Sulfatid steht es im Molverhältnis 1:2.

Eine vollständige Extraktion der Myelinlipide aus dem Myelin gelingt nur mit saurem Chloroform-Methanol (z. B. Chloroform-Methanol-Essigsäure 2:1:0.1), da die sauren Phospholipide und Sulfatide eine starke ionische Bindung an die Myelinproteine eingehen. Die amphiphilen komplexen Lipide bestehen aus den hydrophoben Gruppen der Alkanketten der Fettsäuren und des Sphingosins sowie der Alkenylethergruppen der Plasmalogene, die die zentrale oder Core-Region der Lipiddoppelschicht aufbauen, und den polaren Kopfgruppen, die die Oberfläche bilden und damit dem wäßrigen Milieu zugekehrt sind (Abb. 4, 5).

Die hydrophoben Anteile der Sphingolipide (Cerebrosid und Sulfatid) setzen sich aus sehr langen Fettsäuren von C_{18} (Stearinsäure) bis C_{24} (Lignocerinsäure) als gesättigte α -D-Hydroxy- oder ungesättigte ω -9-Monoensäuren zusammen, die amidartig mit dem Sphingosin (Sphingenin, (2S, 3R, 4E)-2-Amino-1,3-dihydroxy-4-octadecen) zum Ceramid verknüpft sind. Der Alkankettenanteil von Fettsäuren und Sphingosinbasen ist daher im Ceramid von unterschiedlicher Länge. Die all-trans-Struktur der langkettingen Acylreste ($> C_{24}$) bedingt eine Länge von 3.6–4.0 nm. Dies erklärt die ungewöhnliche Dicke der Doppelschicht der hydrophoben Core-Region von 4.5–5.0 nm, wobei „sticky ends“ der Alkanketten im fluiden Zentrum der Doppelschicht überlappen.

An der Grenze zur hydrophilen Kopfgruppe befinden sich freie Hydroxygruppen der langkettingen α -Hydroxyfettsäuren und des Sphingosins, die zusammen mit der des Cholesterins und der Amidogruppe des Ceramids Wasserstoffbrückenbindungen mit den Carbonylgruppen der Phospho- und Sphingolipide bilden können. Wasserstoffbrückenbindungen verkürzen den Abstand zwischen den bindenden Gruppen. Die Summe der freien für die Wasserstoffbrückenbindung zur Verfügung stehenden Protonen ermöglicht die Quervernetzung aller Carbonylgruppen der Lipiddoppelschicht und damit deren Stabilisierung durch eine flächen-

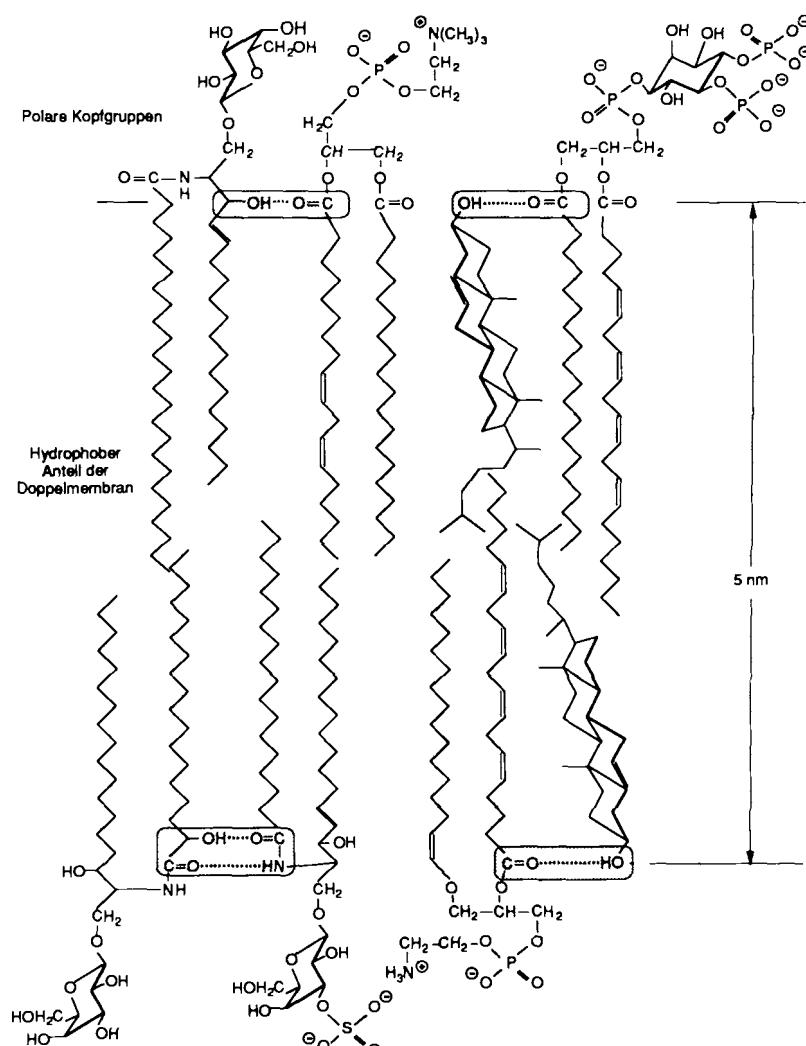


Abb. 4. Darstellung einer Modell-Lipiddoppelschicht mit Cholesterin, den myelinspezifischen Sphingolipiden Cerebroid und Sulfatid und den sauren Phospholipiden. Die vier Typen der möglichen Wasserstoffbrückenbindungen sind hervorgehoben. Die chemischen Strukturen der Myelinlipidspezies sind in Abbildung 5 nochmals deutlicher dargestellt.

hafte Wasserstoffbrücken-Sperrsicht (Abb. 4). Die Acylgruppen der Ceramide – Sphingomyelin enthält nur Spezies mit langkettigen gesättigten C_{18} - und C_{24} -Fettsäuren – würden bei 37°C als kristalline Verbindung vorliegen, werden aber durch die Intercalation der Cholesterinmoleküle und die zum Teil hochungesättigten Acylgruppen der Phospholipide in eine fluide Phase überführt. Erwähnenswert, wenn auch in ihrer Funktion unbekannt, ist die Gruppe der 1-Alkenylether in der Klasse der Phosphatidylethanolamine.

Bei den polaren Kopfgruppen der Myelinmembranlipide an der Wasser-Interphase treten neben den ubiquitären Membranphospholipiden Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin besonders reichhaltig die sauren Phospholipide Phosphatidylserin und Phosphatidylinosit auf. Dies führt dazu, da auch noch Sulfatide vorhanden sind, daß durchschnittlich jede vierte polare Kopfgruppe der komplexen Phospho- und Sphingolipide eine anionische Gruppe auf der Membranoberfläche ist. Die als Spurenlipide auch in der Myelinmembran vorkommenden Ganglioside sind dabei nicht berücksichtigt.

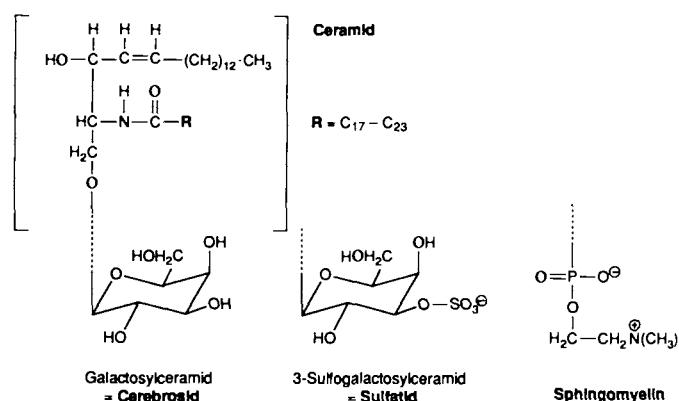
Wir wissen heute nur wenig über die Symmetrie/Asymmetrie der Lipidanordnung in der Doppelschicht. Die Markierung der Oligodendrocyten-Plasmamembran und der Myelinmembran mit Anti-Galaktosylceramid- und Anti-Sulfatid-Antikörpern weist jedoch ihre dichte Verteilung in

der äußeren Schicht der Sandwichstruktur der Membran nach. Die Oberflächen der Myelinmembran-Doppelschicht besitzen aufgrund der zwitterionischen Kopfgruppen der Phospholipide, der hydrophilen, ungeladenen Galaktoseste der Cerebroside und vor allem der anionischen Gruppen mannigfache Möglichkeiten zur Wechselwirkung mit komplementären Molekülen auf der cytosolischen und extracytoplasmatischen Seite der Membran, denen möglicherweise für die kompakte Packung und auch für den Spiralfaltungsprozeß bei der Myelinisierung einige Bedeutung zukommen dürfte. Völlig ungeklärt ist die Bedeutung des relativ hohen Gehalts an Phosphatidylinositen im Myelin, vor allem im Hinblick auf deren Bedeutung als „Second Messenger“-System.

4. Myelinproteine des Zentralnervensystems

Während die Myelinlipide des PNS und CNS eine sehr ähnliche Zusammensetzung aufweisen, treten bei den Myelinproteinen erhebliche Unterschiede auf. Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE) trennt das Proteingemisch des Myelins in wenige Bestandteile auf (Abb. 6).

Sphingolipide



Phospholipide

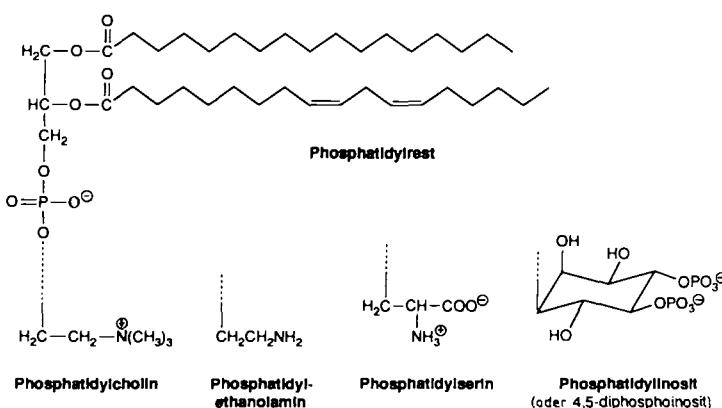


Abb. 5. Strukturformeln der wichtigsten Lipidklassen der Myelinmembran.

Die Banden sind dem Proteolipidprotein (PLP), auch Lipophilin genannt, und einem von ihm abgeleiteten Isoprotein, dem DM 20, sowie dem Basischen Myelinprotein (MBP) und seinen Isoformen zuzuordnen. Das sind Formen

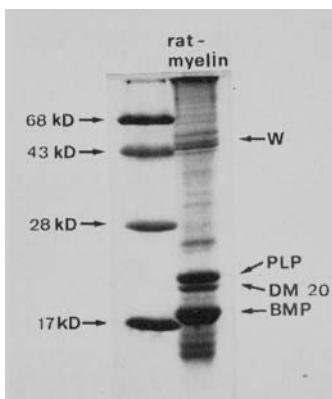


Abb. 6. SDS-Polyacrylamideelektrophorese von Ratten-Myelinproteinen (rechts) und Standards (links); W: Wolfgram-Proteine; PLP: Proteolipidprotein; DM 20: Isoform des PLPs; BMP: Basisches Myelinprotein (in diesem Beitrag sonst als MBP abgekürzt).

des MBPs mit niedrigerer Molekülmasse, die durch alternatives Spleißen entstehen (siehe Abschnitt 5, Abb. 7). Die restlichen Banden verteilen sich auf Glycoproteine, die Wolfgram-Proteine (W) und das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG). PLP und MBP machen zusammen etwa 90% des Gesamtproteins aus.

4.1. Basische Myelinproteine (MBPs)

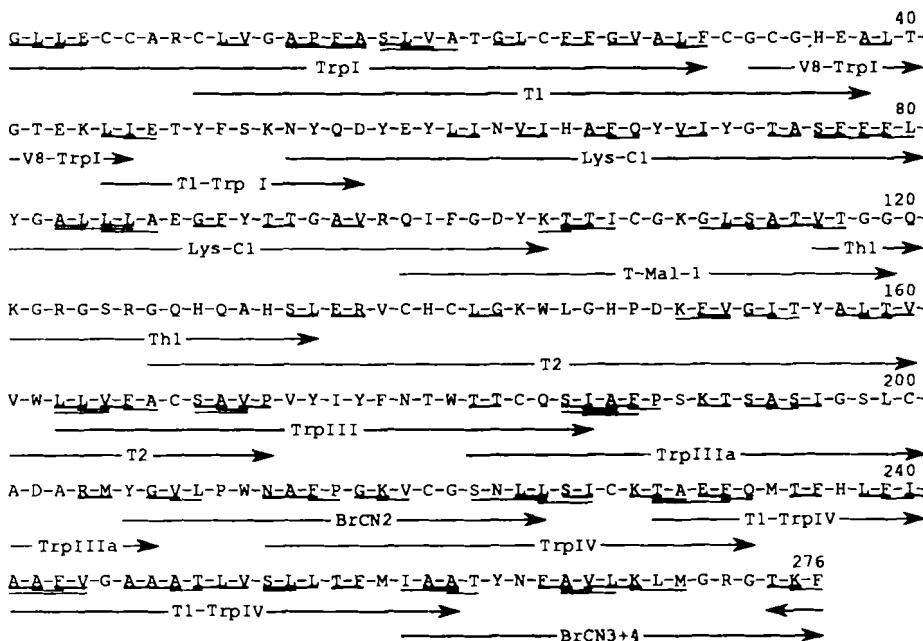
Basische Myelinproteine stellen einen Anteil von 30–40 % des Gesamtproteins des Myelins und können durch saure Extraktion des Myelins und anschließende Ionenaustausch-chromatographie und Gelfiltration gewonnen werden^[17]. Mensch und Rind enthalten als Hauptkomponente ein 18.5-kDa-MBP mit 170 bzw. 169 Aminosäuren^[18] (davon 24 % basische Aminosäuren^[19]). Beim Menschen treten zwei Isoformen auf (17.2 kDa und 21.5 kDa)^[10, 11], bei Nagetieren vier (14, 17, 18.5 und 21.5 kDa). Diese entstehen hier^[10, 11] wie beim Menschen^[12] durch alternatives Spleißen des *einen* Primärtranskripts des MBP-Gens^[11], auf das bei der Beschreibung der MBP-Genstruktur eingegangen wird (Abschnitt 5). MBP weist alle Eigenschaften eines peripheren Membranproteins auf. Seine Lokalisation im cytoplasmatischen Spalt (elektronenmikroskopisch als MDL erscheinend) gelang mit Hilfe von spezifischen Antikörpern^[13] und durch enzymatischen Abbau der Myelinproteine^[14]. Aufgrund seiner hohen Basizität tritt es in ionische Wechselwirkung mit den sauren polaren Kopfgruppen der Lipide auf der cytoplasmatischen Seite der Lipiddoppelschichten und bewirkt deren kompaktes Zusammenlagern.

MBP hat in wäßriger Lösung überwiegend Knäuelstruktur, wie Circular dichroismus-Messungen ergaben^[15]. Stöner^[16] hingegen postulierte eine Sekundärstruktur mit Faltblatt-Strukturen. Diese Aussage beruht auf der Gewichtung der Sekundärstrukturparameter bei der computerunterstützten Berechnung.

4.2. Proteolipidproteine (PLPs)

Die Proteolipidproteinfraktion wurde erstmals 1951 von Folch und Lees aus einem Chloroform-Methanol-Extrakt der weißen Substanz des Gehirns gewonnen^[17]. Mit 50–55 % des Trockengewichts ist sie die größte Proteinfraktion des Myelins. Mit SDS-PAGE kann sie in zwei Banden von 26 kDa (PLP) und 20 kDa (DM 20) getrennt werden. PLP und DM 20 sind Isoproteine, die aufgrund ihrer großen Hydrophobie wasserunlöslich sind. Der wesentliche Grund dafür, daß die Aufklärung der Primärstruktur erst 30 Jahre nach ihrer Entdeckung in meinem Kölner Arbeitskreis gelang (1982–1983), war die Entwicklung neuer Trennmethoden für hydrophobe Peptide, die durch chemische Spaltung (Bromcyan an Methioninresten und Bromsuccinimid-Dimethylsulfoxid (DMSO) an Tryptophanresten der Polypeptidkette) und durch enzymatischen Abbau aus dem PLP freigesetzt wurden, woran sich der Edman-Abbau dieser gereinigten Peptide anschloß.

Wir untersuchten das menschliche und das Rinder-Hirn. PLP besteht aus 276 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 29 891 Da. Überraschend war der Befund, daß sich die Sequenzen des menschlichen und des Rinder-PLP nur in zwei Positionen unterscheiden: Ala¹⁸⁸ und Thr¹⁹⁸ des Rinder- sind durch Phe¹⁸⁸ und Ser¹⁹⁸ im Menschen-PLP ausgetauscht (Abb. 7 oben). Die Sequenz ist streng gegliedert in eine kurze und vier lange hydrophobe Sequenzen, die durch hydrophile Schleifen („Loops“) verbunden sind. Ordnet man diese Domänen getrennt an (Abb. 7 unten) und berechnet ihre räumliche Ausdehnung, so werden die für ein integrales Membranprotein typischen Strukturen deutlich:



G-L-L-E-C-C-A-R-

27 Aminosäuren, 7.5 Ganghöhen, 4.05 nm

10 20 30
C-L-V-G-A-P-F-A-S-L-V-A-T-G-L-C-F-F-G-V-A-L-F-C-G-C-G-

+ - 40 - + - 50 + - -
H-E-A-L-T-G-T-E-K-L-I-E-T-Y-F-S-K-N-Y-Q-D-Y-E-

29 Aminosäuren, 8 Ganghöhen, 4.35 nm

60 (+) 70 80
Y-L-I-N-V-I-H-A-F-Q-Y-V-I-Y-G-T-A-S-F-F-F-L-Y-G-A-L-L-A-
- 90 + 100 ~ + + 120+
E-G-F-Y-T-T-G-A-V-R-Q-I-F-G-D-Y-K-T-T-I-C-G-K-G-L-S-A-T-V-T-G-G-Q-K-
+ + (+) 130 (+) - + (+) 140 + (+) - +
G-R-G-S-R-G-Q-H-Q-A-H-S-L-E-R-V-C-H-C-L-G-K-W-L-G-H-P-D-K-

40 Aminosäuren, 11 Ganghöhen, 6.00 nm

160 170
F-V-G-I-T-Y-A-L-T-V-V-W-L-L-V-F-A-C-S-A-V-P-V-
180 190
Y-I-Y-F-N-T-W-T-T-C-Q-S-I-A-F-F-P-S-
+ 200 - +
K-T-S-A-S-I-G-S-L-C-A-D-A-R-

12 Aminosäuren, 3 Ganghöhen, 1.65 nm

210
M-Y-G-V-L-P-W-N-A-F-P-G-

+ 220 + 230- (+)
K-V-C-G-S-N-L-L-S-I-C-K-T-A-E-F-Q-M-T-F-H-

30 Aminosäuren, 8.3 Ganghöhen, 4.50 nm

240 250 260
L-F-I-A-A-F-V-G-A-A-A-T-L-V-S-L-L-T-F-M-I-A-A-T-Y-N-F-A-V-L-
+ 270 + +
K-L-M-G-R-G-T-K-F

drei Domänen haben genau die Größe, um die 5-nm-Doppelschicht zu durchspannen (*trans*-Helices), während zwei in *cis*-Anordnung vorliegen, da die eine Domäne (40 Aminosäuren) zu lang, die andere (12 Aminosäuren) zu kurz für die Durchspannung der Membran ist. Zudem weisen beide im

Abb. 7. Oben: Aminosäuresequenz und Strategie für die Sequenzierung des menschlichen Proteolipidproteins des Zentralnervensystems. Trp: Tryptophanbruchstücke I-JV; V8: V8-Staphylococcus-Protease; Lys C: Lys-C-Protease; T-Mal: Trypsinfragment nach Maleolylierung; Th: Thermolysin-Fragment; T: Trypsinspaltstücke; BrCN: Bromcyanfragmente. Unten: Hydrophobe (halbfett) und hydrophile Domänen des Proteolipidproteins. Über den Sequenzen sind die Aminosäuren-Positionen, die Ganghöhen der aus ihnen bestehenden α -Helix (3.6 Aminosäuren pro Ganghöhe) und die resultierende Länge der Helix angegeben (0.54 nm pro Ganghöhe).

Zentrum der Sequenz Prolinreste auf, die α -Helix-Brecher sind und zu einem Knick und einer Umkehr der Laufrichtung der α -Helix führen. PLP enthält 14 Cysteinreste, vier von ihnen liegen als freie Cysteine vor. Zwischen Cys²²⁷ und dem N-terminalen Cys⁵ besteht eine Disulfidbindung. Die Hydrophobie des Polypeptids wird durch Acylierung mit einer langkettigen Fettsäure am Thr¹⁹⁸ noch erhöht.

4.2.1. Anordnung des Proteolipidproteins in der Myelinmembran

Die strenge Gliederung der PLP-Polypeptidkette in hydrophobe und hydrophile Domänen führte zu einer Modellvorstellung über deren Integration in die Myelin-Lipiddoppelschicht, die dann durch biochemische und immuntopochemische Analysen bestätigt wurde. Abbildung 8 veranschaulicht im oberen Teil unsere derzeitige Vorstellung: Auf der extracytoplasmatischen Seite liegt eine kurze hydrophile N-terminale Sequenz, die sich in die erste transmembranäre α -Helix fortsetzt, auf der cytosolischen Seite in eine hydrophile Domäne mit zwei überschüssigen negativen Ladungen übergeht und sich zurück in die zweite transmembranäre Helix faltet. Die größte, stark positiv geladene hydrophile Sequenz (Arg⁹⁷ bis Arg¹⁵⁰) befindet sich auf der extrazellulären Oberfläche. Die beiden *cis*-membranalen Domänen tauchen ebenfalls von dieser Seite in die Lipiddoppelschicht, während die C-terminale hydrophobe Domäne sie wieder durchspannt und so das C-terminale, stark positiv geladene Ende der Sequenz zum cytosolischen Spalt hin orientiert ist. Die hydrophoben Segmente werden durch anionische oder kationische Aminosäureseitenketten oder als Zwitterion angeordnete ionische Seitenketten begrenzt.

In unserem Modell sind zehn Cysteinreste in den hydrophilen Domänen auf der extracytoplasmatischen Oberfläche angeordnet, vier befinden sich in α -helicalen Domänen. Aufgrund der Disulfidbrücke zwischen Cys⁵ und Cys²²⁷ und möglichen Disulfidbrücken auf der extracytoplasmatischen Oberfläche, aber auch zwischen den *trans*- und *cis*-membranalen Helices nehmen wir eine zylindrische Aggregation der

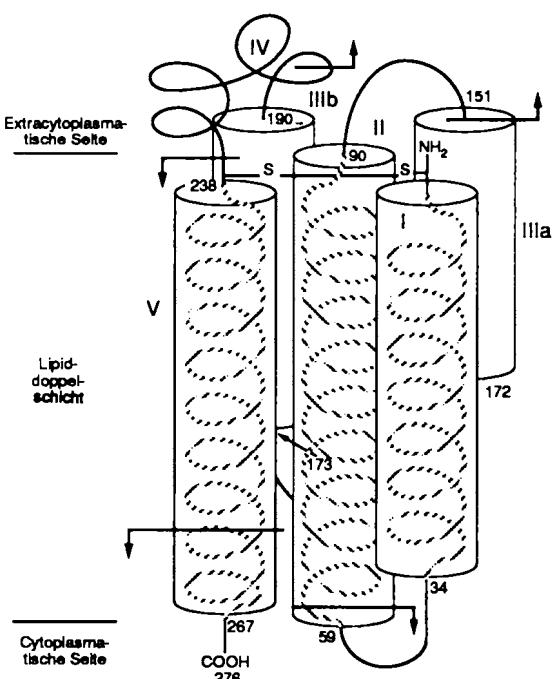
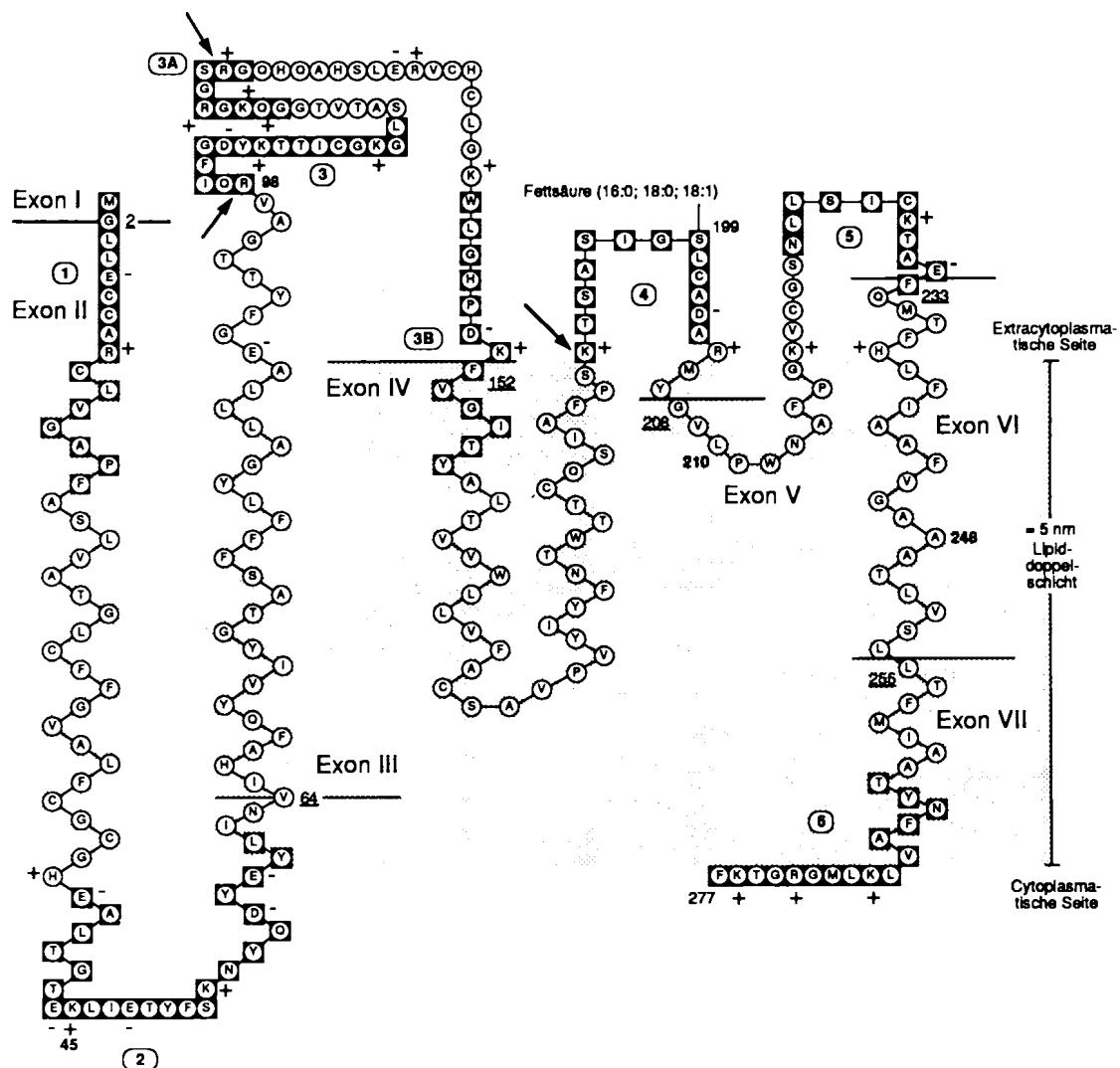


Abb. 8. Oben: Modell zur Membranintegration des Proteolipidproteins aufgrund seiner hydrophoben und hydrophilen Domänen und der biochemischen und immunochemischen Evidenz. Die schwarz umrandeten Peptidsequenzen (1, 2, 3, 3A, 3B, 4, 5 und 6) sind Epitope, die durch Festphasensynthese gewonnen und gegen die Antikörper produziert wurden; Querstriche kennzeichnen die Begrenzungen der Exons (Abschnitt 5). Pfeile die proteolytischen Angriffspunkte des Trypsins am intakten Myelin, dessen kompakte Schichtung durch hypotonische Behandlung gelockert wurde. Unten: Vorschlag zur Assoziation der Intramembran- α -Helices innerhalb der Lipiddoppelschicht durch extracytoplasmatische Disulfidbrücken. Die Pfeile deuten den Beginn eines neuen Exons an.

hydrophoben Helices an, wie sie in Abbildung 8 unten schematisch dargestellt ist. Durch begrenzte Proteolyse der Myelinmembran wird die kleine hydrophile Domäne zwischen Arg²⁰⁴ und Lys²¹⁷ leicht freigesetzt. Es ist durchaus möglich, daß sie eine Flipflop-Bewegung zu einer eng benachbarten Myelinmembran durchführt und somit ähnlich wie die langkettige Acylgruppe durch Intercalation in die Lipiddoppelschicht zur Fixierung und engen Apposition der benachbarten Membran beiträgt. Diese beiden Strukturelemente könnten auch für die Dynamik der Spiralisierung von Bedeutung sein.

Diese Modellvorstellung wurde auf zweierlei Weise experimentell untermauert:

a) Durch Trypsinverdauung der durch osmotischen Schock dissozierten Myelinmembranschichten und anschließende Auf trennung von drei größeren Polypeptiden und deren Sequenzierung konnten wir feststellen, daß die Endoprotease an den durch Pfeilen in Abbildung 8 oben gekennzeichneten Positionen des PLPs angegriffen hatte, also diese dem Enzym, das die Lipiddoppelschicht nicht durchdringen kann, an der äußeren Oberfläche zugängig waren. Abbildung 9 zeigt das Resultat der SDS-PAGE des Pro-

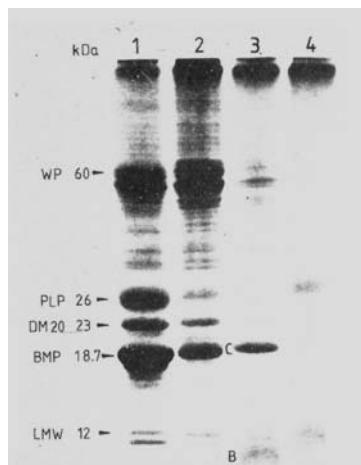


Abb. 9. SDS-Polyacrylamidgelektrophorese der Myelinproteine nach Trypsin-Behandlung der intakten Myelinmembran. Die PLP-Bande ist zugunsten von Proteolyse-Fragmenten verschwunden. Die Spaltstellen sind in Abbildung 8 oben durch Pfeile angedeutet.

dukts der proteolytischen Behandlung des Myelins. Die PLP-Bande ist zugunsten der Banden kleinerer Polypeptide zwischen 7 und 10 kDa verschwunden. Hingegen ist das MBP offenbar völlig geschützt vor der Proteolyse, was nur durch seine Lokalisation im cytosolischen Spalt, abgeschirmt durch die Lipiddoppelschichten, erklärbar ist. Dieser Befund ist ein biochemischer Beweis für die Anordnung des MBPs im Myelin.

b) Ausgehend von der Möglichkeit, Antikörper gegen synthetische Peptidsequenzen aus den verschiedenen Domänen der PLP-Sequenz, die in Abbildung 8 oben als schwarze Kästchen hervorgehoben sind, zu gewinnen und als Marker auf die nicht permeabilisierte Membran einwirken zu lassen, sollte die Seitenorientierung des PLPs histologisch bestimmbar sein. Wir verwendeten hierzu Primärkulturen von Rattenhirn-Oligodendrocyten, die sich 18 Tage nach der Geburt in Primärkultur befanden. In diesen läuft die Expression der Proteine des Myelins ähnlich wie bei der myelinisierenden

Ratte ab. Das PLP sollte in der Plasmamembran seine endgültige Orientierung einnehmen, bevor es in den Wachstumskonus des Oligodendrocyten und weiter in den Myelinfortsatz segregiert.

Abbildung 10 links zeigt, daß nur Antikörper gegen Peptide aus dem hydrophilen Loop Arg⁹⁷-Arg¹⁵⁰ eine Immun-

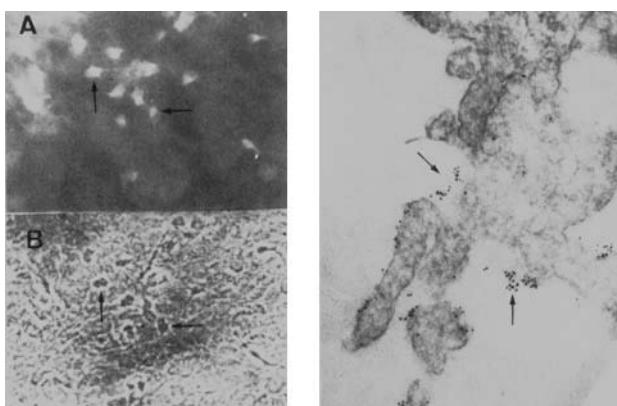


Abb. 10. Immuncytochemische Lokalisation der PLP-Domänen mit Hilfe von Antipeptid-Antikörpern. Links: A Fluoreszenzmarkierung, B Phasenkontrastbild; rechts: Goldmarkierung der Plasmamembran-Fortsätze von Oligodendrocyten in Gewebekultur (8150fache elektronenmikroskopische Vergrößerung).

fluoreszenzmarkierung der Oligodendrocyten-Plasmamembranen ergaben. Das gleiche Ergebnis wurde mit goldmarkierten Antikörpern gegen dieses Peptid erzielt (Abb. 10 rechts). Somit stehen beide Befunde in Einklang mit dem vorgeschlagenen Modell zur Anordnung des PLPs in der Myelinmembran.

Erweiterte Sekundärstrukturbestimmungen nach den Regeln von Chou und Fasman, Nagano und anderen ergaben überraschenderweise, daß die hydrophilen Domänen alle bis auf das erste Drittel der großen Domäne (Arg⁹⁷-Lys¹²⁰) als amphipathische Helices gefaltet sind. In Abbildung 11 sind diese zusätzlichen Sekundärstrukturen schematisch eingebracht. Dieser Befund könnte von großer Bedeutung für die Packung der Myelinmembranschichten sein.

4.3. Wolfram- und andere Proteine

Als weitere Proteinkomponenten, die in sehr geringer Konzentration vorliegen, sind die Wolfram-Proteine und das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG) zu erwähnen (siehe auch Abb. 6). 1966 isolierte *Wolfram*^[18] aus dem sauren Chloroform-Methanol-Extrakt bei pH 5 eine aus drei Banden in der SDS-PAGE bestehende Proteinfraktion mit Molekulmassen zwischen 45 und 55 kDa. Von diesen ist die 55-kDa-Komponente α -Tubulin, das mit spezifischen Anti- α -Tubulin-Antikörpern im Western-Blot reagiert, während die 45- und 50-kDa-Banden dem Enzym 2',3'-cyclische Nucleotid-3'-phosphodiesterase zuzuordnen sind.

MAG ist ein Glycoprotein mit einer Molekulmasse von etwa 100 kDa und liegt als Spurenprotein vor (1 % des Gesamt-Myelinproteins). Seine Aminosäuresequenz wurde erst vor kurzem über die cDNA aufgeklärt: 626 Aminosäuren mit 69.3 kDa bilden die Sequenz, die in vielen Bereichen homolog zum neuralen Zelladhäsionsmolekül (N-CAM)

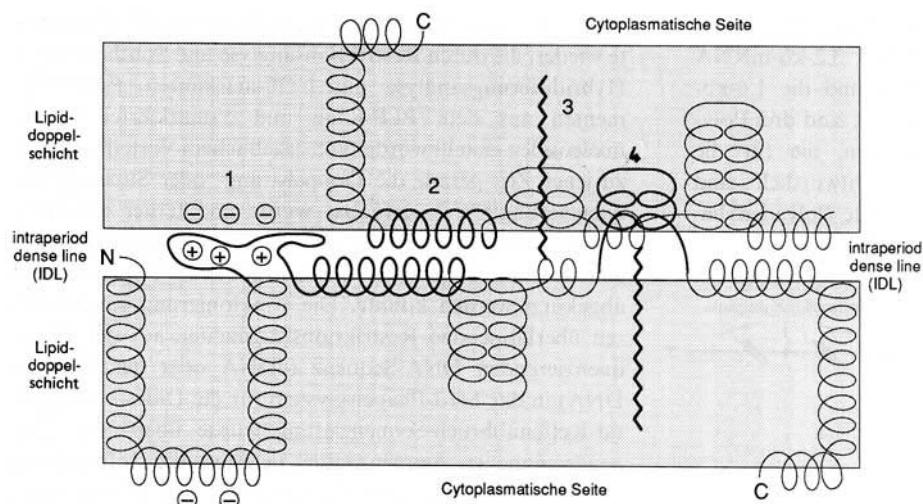


Abb. 11. Beitrag der Wechselwirkung von geladenen Sequenzen (1), der amphipatischen Helices der extracytoplasmatischen hydrophilen Domänen (2), der Fettsäureketten (3) und des hydrophoben flip-flop-Loops des PLPs (4) zur Spiralisierung und kompakten Packung der Myelinlagen.

ist^[19]. Die Lokalisation in der periaxonalen Region des Myelins der erwachsenen Ratte weist auf eine mögliche Wechselwirkung von Neuron und Oligodendrocyt in der Myelogenese hin.

5. Molekularbiologie der Myelinproteine

5.1. Erstellung von cDNA-Banken aus mRNA myelinisierender Rattengehirne und Isolierung MBP- und PLP-spezifischer cDNA-Klone

Die Synthese der Myelinproteine und -lipide ist um den 18. Tag nach der Geburt am größten^[20]. Wir isolierten Hirn-RNA von 18 Tage alten Ratten und reicherten die poly(A)⁺-RNA durch Affinitätschromatographie an Oligo(dT)-Cellulose^[21] an, die für die Synthese der cDNA (complementären oder copy DNA) mit Hilfe der Reversen Transkriptase nach einer modifizierten Gubler-Hoffmann-Methode^[22] benötigt wurde (Abb. 12). Größenfraktionierung durch Gelektrophorese in 1%iger Agarose ergab Kopien von 550 bis > 6000 bp doppelsträngiger cDNA, die in die *Pst*I-Schnittstelle des Vektors pBR322 kloniert wurden. Aus dieser Bank wurden Klone, die Spezifität für das Proteolipid- und das Basische Myelinprotein aufwiesen, durch Southern-Blot-Hybridisierung im Kolonien-Screening mit markierten Oligonukleotiden isoliert, die von unserer PLP-Aminosäuresequenz im N- und C-terminalen und im zentralen Bereich sowie dem C-terminalen Bereich des 18.5 kDa großen MBPs abgeleitet waren. Von diesen enthielt der MBP-spezifische cDNA-Klon von 612 bp die gesamte codierende Region des 14.5-kDa-MBP-Isoproteins, dem längsten PLP-spezifischen von 2585 bp fehlten etwa 310 bp der die N-terminale Region codierenden Sequenz^[23]. Die Schritte, die zu den PLP- und MBP-spezifischen Klonen führten, sind in einem Ablaufschema zusammengefaßt (Abb. 12).

Mit Hilfe dieser cDNA-Klone wurde die Größe der mRNA-Transkripte des PLPs und MBPs in der Northern-Blot-Hybridisierungsanalyse bestimmt. Zwei stärkere Bänder von 3.2 und 1.6 kb Länge wurden als PLP-spezifische RNA im Hirn von 18 Tage alten Ratten im Verhältnis 2:1 nachgewiesen, dazu eine schwache Bande bei 2.4 kb. Die mRNAs unterscheiden sich nicht im codierenden Bereich,

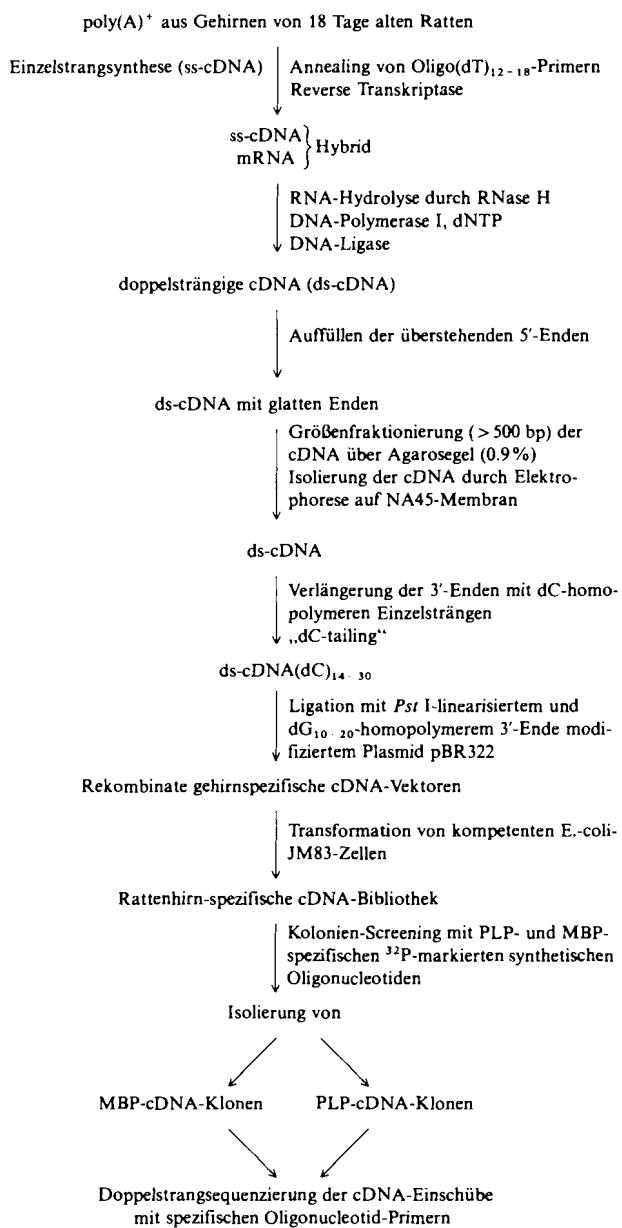


Abb. 12. Flußdiagramm der modifizierten hirnspezifischen cDNA-Synthese [22] ausgehend von Gehirn-poly(A)⁺-RNA 18 Tage alter Ratten sowie Isolierung der PLP- und MBP-spezifischen Klone für die DNA-Sequenzierung.

sondern enthalten am 3'-Ende drei unterschiedlich lange nichttranslatierte Sequenzen, die längere 3.2-kb-mRNA 2062 Basen, die 2.4-kb-mRNA 1319 bp und die 1.6-kb-mRNA 430 bp 3'-wärts vom Stopcodon. Es sind drei Polyadenylierungssignale AATAAA vorhanden, die für die unterschiedlich langen Transkripte verantwortlich sind (Abb. 13). Auch die zweite für die effiziente Polyadenylie-

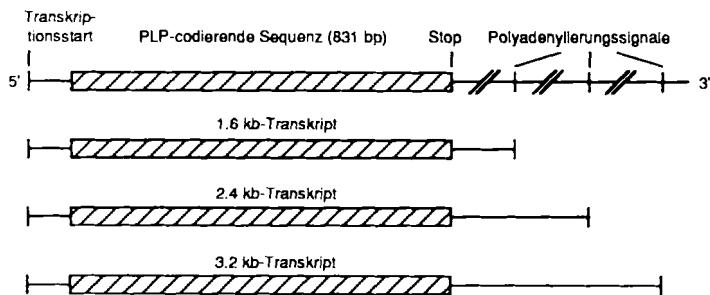


Abb. 13. Anordnung der drei PLP-spezifischen Transkripte. Die Polyadenylierungssignale (AATAAA) bei 430 bp (1.4 kb-Transkript), 1310 bp (2.4 kb) und 2062 bp (3.2 kb) 3'-wärts vom Stopcodon werden bei der posttranskriptionalen Modifikation verwendet.

rung erforderliche Sequenz, TGTGTCTT, etwa 30 bp hinter dem Polyadenylierungssignal, ist vorhanden^[24]. Beim Menschen werden nur die 3.2- und 1.6-kb-Transkripte gebildet.

5.2. Genstrukturen des menschlichen Proteolipidproteins und des Basischen Myelinproteins

Die PLP- und MBP-cDNA-Klone ermöglichten uns, die Organisation der beiden menschlichen Gene sowie deren Chromosomenlokalisierung zu untersuchen. Hierzu wurde ein Screening von Human-Genom-Banken in den Vektoren EMBL-3 und Charon 8 mit cDNA-Sonden und Oligonucleotiden eingesetzt, die die codierende Region und die 5'- und 3'-nichtcodierenden Enden in den Exons des PLPs und MBPs erfassen.

Die Analyse eines Gens und allgemein großer DNA-Abschnitte wird durch das Erstellen einer Restriktionskarte unter Verwendung von Typ-II-Endonukleasen, die spezifische (Hexa-)Nucleotidsequenzen als Restriktionsschnittstellen erkennen, eingeleitet. Mit Hilfe sowohl der aus der cDNA gewonnenen Hybridisierungssonden (Restriktionsfragmente) als auch synthetischer Oligonucleotide konnte die Lage der codierenden Sequenzen (Exons) und der dazwischenliegenden Abschnitte (Introns) bestimmt werden. Darüber hinaus gibt die Karte Auskunft über die Größe des gesuchten Gens, wenn 5'- und 3'-Ende der mRNA durch entsprechende Sonden erfaßt werden.

5.2.1. Exon-Intron-Struktur des PLPs^[25]

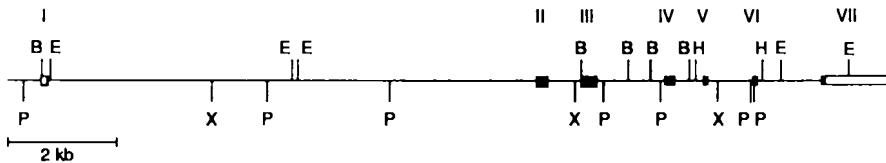
Es wurden zwei Klone mit überlappenden Sequenzen gefunden, die das gesamte humane PLP-Gen enthielten. Vollständige Restriktionen jeweils mit einzelnen und Kombinationen von zwei Enzymen ergaben charakteristische Fragmente, die durch logisches Zusammenfügen die Restriktionskartierung der beiden genomischen PLP-spezifischen λ-Phagen-EMBL3-Klone ergaben.

Abbildung 14 gibt die Restriktionskarte und die Fragmente wieder, die durch Restriktionsanalyse und Southern-Blot-Hybridisierungsanalyse mit [³²P]-markierten *Pst*I-Fragmenten aus dem PLP-Klon und 5'-markierten Oligonucleotiden erstellt wurde. Von erheblichem Vorteil war, daß zu jener Zeit gerade die Doppelstrang- oder Supercoil-Sequenzierung^[26, 27] verfügbar wurde und ferner mit Hilfe von synthetischen Primern nach den am Anfang erhaltenen genomischen Sequenzen die zeitraubende Sequenzierung abgekürzt werden konnte. Die Umklonierung von kleineren überlappenden Restriktionsfragmenten aus der zu sequenzierenden DNA-Sequenz (cDNA oder genomischen DNA) in das M13-Phagen-System für die Didesoxynucleotid-Kettenabbruch-Sequenzierung wurde überflüssig. Die neugewonnenen Sequenzdaten lieferten die Information für das als Sequenzierungsprimer benötigte Oligonucleotid.

Die Nucleotidsequenzen der codierenden Regionen und die abgeleitete Aminosäuresequenz stimmten vom Glycin in Position 2 des PLPs an überein. Vom Glycin lagen jedoch nur zwei der drei Nucleotide vor.

Die Ratten-cDNA-Sequenz weist am N-Terminus nur Met in Ergänzung zum reifen PLP auf^[28, 29]. Daraus folgte, daß für die Ein-Aminosäure-Präsequenz des PLP-Primärtranskripts ein weiteres Exon, das Exon I mit dem Met-Codon ATG und der ersten Base des Triplets für Glycin, vorhanden sein mußte. Stromabwärts sollte GT als Signal der 5'-Donor-Spleißsequenz des anschließenden Introns folgen. Aufgrund der ungewöhnlich hohen Homologie der PLP-Nucleotidsequenzen von Mensch und Ratte wurde ein 24er-Oligonucleotid mit 18 Basen der Ratten-cDNA und der Basensequenz ATGGGT synthetisiert und als Hybridisierungssonde verwendet. Mit dieser wurde das fehlende Exon I auf einem *Pst*I-*Eco* RI-Fragment 8.8 kb stromaufwärts von Exon II aufgespürt.

Die Sequenzierungsergebnisse zusammen mit der Restriktionskarte lassen sich zu folgendem Bild zusammenfassen: Das PLP-Gen des Menschen erstreckt sich über 16.5 kb, besteht aus sieben Exons und sechs Introns (Abb. 14 oben). Exon I umfaßt den 5'-nichttranslatierten Bereich, das Triplet der Präsequenz Met und die erste Base des Triplets von Glycin, dem N-Terminus des reifen Proteins. Aus den dem Startcodon folgenden Basen ist erkennbar, daß das Human-PLP keine Signalsequenz besitzt. Somit liegt eine interne Signalsequenz für den Primärschritt der Integration in die Membran des rauen endoplasmatischen Reticulums vor. Folgende regulatorischen Sequenzen liegen im 5'-Bereich vor (Abb. 14 unten): CAAT-Box bei - 174 bis - 170 (Met = + 1), Hogness-Box bei - 115 und der Transkriptionsstart bei - 80. Die Exons II-VII umfassen die Aminosäuren 1-63, 64-150, 151-206, 207-231, 232-253 sowie 254-276. Die Codons für die Aminosäuren 1, 63 und 207 enthalten Exon-Intron-Übergänge, sind also auf zwei Exons verteilt, wodurch die Möglichkeit des alternativen Spleißens sehr eingeschränkt wird. Bei einer Länge von ca. 17 kb des gesamten Gens und etwa 3 kb der aus der Transkription resultierenden mRNA ergibt sich ein Intron/Exon-Längenverhältnis von 4.7:1. Da nur 831 bp codierende Sequenzen enthalten, beträgt das Verhältnis 19:1. Auch im PLP-Gen sind die von *Breathnach* und *Chambon* beschriebenen Exon-Intron-Übergangssequenzen GT-AG streng konserviert erhalten^[30].



I	AAGAAAATGA AACATTGGC AGTGAAGGC AGAAAGAGAA GATGGGCC TTAGAGAAGG GAGTATCCCT GAGTAGGTGG GGAAAGGGG AGGAAAGGG GAGGAGGAGA GGAGGAGAGA	-205
	AGCAGGCCCTG TCCCTTAAG GGGTTGGCT <u>STCAATCAGA</u> AAGCCCTTT CATTGAGGA GAAGAGACA AAGATACTCA GAGGAAAAAA <u>GTAAAAGACC</u> GAAGAAGGAG GCTGGAGAGA	-85
	CCAGGATCCT <u>TCCAGCTGAA</u> CAAAGTCAGC CACAAAGCAG ACT <u>AGCCAGC</u> CGGCTACAAAT TGGAGTCAGA GTCCCCAAGA C ATG G gtaagtttcaaaaacttttag...	1
II	(G)ly Leu Leu Glu Cys Cys Ala Arg Cys Leu Val Gly Ala Pro Phe Ala Ser Leu Val Ala Thr Gly Leu Cys Phe Phe Gly Val Ala ...ttccccctttttttcccccag GC TTG TTA GAG TGC TGT GCA AGA <u>TGT CTG GTA GGG CCC CCC TTT GCT TCC CTG GTG CCC ACT GGA TTG TGT TTC TTT GGG GTG GCA</u>	+87
	Leu Phe Cys Gly Cys Gly His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile Asn Va(1) <u>CTG TTC TGT GGC TGT GGA</u> CAT GAA GCC CTC ACT GGC ACA GAA AAG CTA ATT GAG ACC TAT TTC TCC AAA AAC AAC TAC CAA GAC TAT GAG <u>TAT CTG ATC AAT GT</u> gtaaa	63
	gtacctgcccctccac...	+188
III	(Va)1 Ile His Ala Phe Gln Tyr Val Ile Tyr Gly Thr Ala Ser Phe Phe Leu Tyr Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Phe Tyr ...ttgtctacctgttaatgcag G ATC CAT GCC TTC CAG TAT GTC ATC TAT <u>GGA ACT</u> CCG TCT TTC TCC CTT TAT GGG GCC CTC CTG CTG GCT GAG CCC TTC TAC	91 +273
	75 Pro C Ava II	md
	DM-20	
	Thr Thr Gly Ala Val Arg Gln Ile Phe Gly Asp Tyr Lys Thr Ile Cys Gly Lys Gly Leu Ser Ala Thr Val Thr Gly Gly Gln Lys Gly Arg Gly Ser Arg	126
	ACC ACC CGC GCA GTC AGG CAG ATC TTT GGC GAC TAC AAG ACC ACC ATC TGC GGC AAG GGC CTG AGC GCA ACG <u>GTA ACA GGG GGC CAG AAG GGG AGG GGT TCC AGA</u>	+378
	Gly Gln His Gln Ala His Ser Leu Glu Arg Val Cys His Cys Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys	150
	GGC CAA CAT CAA GCT CAT TCT TTG GAG CGG CTG TGT CAT TGT TTG GGA AAA TGG CTA GGA CAT CCC GAC AAG gtgatcatcctcaggatttt...	+450
IV	Phe Val Gly Ile Thr Tyr Ala Leu Thr Val Val Trp Leu Leu Val Phe Ala Cys Ser Ala Val Pro Val Tyr Ile Tyr Phe Asn Thr ...accatgtcaatcatttttag TTT GTG GGC ATC ACC TAT GCC CTG ACC GTT GTG TGG CTC CTG GTG TTT GCC TGC TCT GCT GTG CCT CTG TAC ATT TAC TTC AAC ACC	179 +537
	Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr G(ly) <u>TGG ACC ACC TGC CAG TCT ATT GCC TTC CCC AGC</u> AAG ACC TCT GCC AGT ATA GGC AGT CTC TGT GCT GAT GCC AGA <u>ATG TAT G</u> gtgagttaggtaacgggtgc...	207 +619
V	(G)ly Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn Leu Leu Ser Ile Cys Lys Thr Ala Glu ...gctttttgttctacttag GT GTT CTC CCA TGG AAT GCT TTC CCT GGC AAG GTT TGT GGC TCC AAC CTT CTG TCC ATC TGC AAA ACA GCT GAG gtgagttgggttat... gggtt... ji / 9	231 +693
VI	Phe Gln Met Thr Phe His Leu Phe Ile Ala Ala Phe Val Gly Ala Ala Thr Leu Val Ser Leu Gly Pro Asn Asp Leu Pro Pro Val Tyr Cys Cys Ile Cys Gly Gly Cys Ser Tyr Thr Gly Phe Pro ...ctctttcatttccctgcag TTC CAA ATG ACC TTC CAC CTG TTT ATT GCT GCA TTT GTG GGG CCT GCA GCT ACA CTG GTT TCC CTG gtgagttgacttqaatgat...	253 +759
VII	Leu Thr Phe Met Ile Ala Ala Thr Tyr Asn Phe Ala Val Leu Lys Leu Met Gly Arg Gly Thr Lys Phe Stop Ser His Leu His Asp Cys His Leu Gln Leu Cys Arg Pro Stop	276

Abb. 14. Oben: Restriktionskarte und Exon-Intron-Organisation des menschlichen PLP-Gens. Die Exons sind durch Rechtecke gekennzeichnet. Ausgefüllte Rechtecke stehen für codierende Bereiche, offene für 5'- und 3'-nichttranslatierte Sequenzen. Unten: Nucleotidsequenz der PLP-Exons und der angrenzenden Intronbereiche. Das DM-20-Isoprotein und die beiden Mutationsstellen von ji-Maus und md-Ratte sind eingetragen. Restriktionsenzyme: B *Bam* HI, E *Eco* RI, H *Hind* III, P *Pst* I, X *Xba* I.

5.2.2. Korrelation zwischen Exons und Proteindomänen

Das interessanteste Ergebnis resultiert aus der Lage der von den Exons II–VII codierten Bereiche der Aminosäuresequenz des PLPs nicht zuletzt in bezug auf unser vorgeschlagenes Modell der Integration in die Lipiddoppelschicht. Jede *cis*- und *trans*-membranale Domäne und der anschließende hydrophobe Teilbereich sind in einem Exon codiert; lediglich die C-terminale Domäne macht eine Ausnahme, sie ist von zwei Exons (VI und VII) codiert. Diese Gliederung ist in der Abbildung 8 oben durch Pfeile angedeutet.

In der Evolution entstehen eine Vielzahl von Proteinen durch Rekombination von DNA-Sequenzen, die Domänen von anderen Proteinen codieren und zu neuen speziellen Funktionen führen („Exon Shuffling“)^[31]. Als Beispiel sei das Low Density Lipoprotein (LDL)-Rezeptorprotein angeführt^[32]. Bisher ist jedoch noch keine mit dem PLP stark homologe Polypeptidsequenz gefunden worden.

5.2.3. Alternatives Spleißen der PLP-mRNA

Alternatives Spleißen von Primärtranskripten trifft man im Oligodendrocyten sehr ausgeprägt an. Durch den hierbei

auftretenden Verlust von Exons entstehen Isoformen der Myelinproteine. Dies gilt auch für das PLP-Primärtranskript. Die DM 20-Isoform des PLPs ist um rund 4.5 kDa kleiner als das normale PLP. Der Nachweis spezifischer DM 20-mRNA im Mäusegehirn sowie die Sequenzierungsdaten der DM 20-mRNA weisen auf das Fehlen von 105 bp hin, die 35 Aminosäuren entsprechen^[33, 34]. Das 212 bp lange Exon III enthält eine kryptische Spleiß-Donorsequenz (GGTAAC, Abb. 14 unten). Ihre Aktivierung führt zur Deletion des 3'-Endes von Exon III und damit der Aminosäuren 115–150. Über die Regulation der Aktivierung dieser Spleißstelle ist noch nichts bekannt.

5.2.4. Lokalisierung des Human-PLP-Gens auf dem X-Chromosom

Die Zuordnung menschlicher Gene zu eukaryotischen Chromosomen wurde durch Fusion von menschlichen und Nager-Zellen (Maus, Hamster) zu somatischen Zellhybriden möglich. Sie enthalten den vollständigen Chromosomensatz des Nagers und zusätzlich menschliche Chromosomen (ganz oder als Bruchstück)^[35]. Die Humanchromosomen in jeder

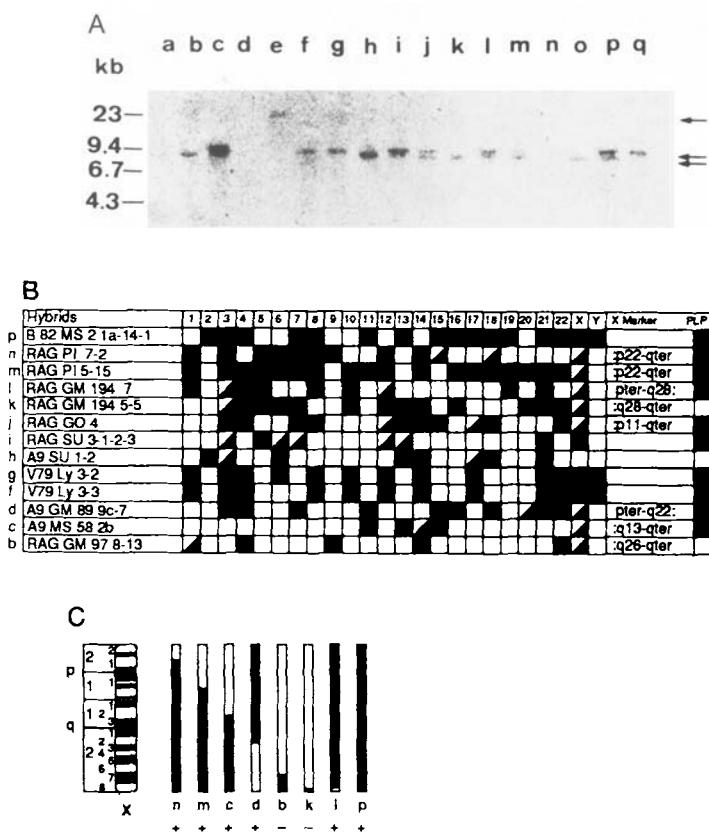


Abb. 15. Bestimmung der Chromosomenlokalisierung des PLP-Gens. A) Southern-Blot-Hybridisierung genomischer Mensch-Maus-Zellhybrid-DNA mit Human-PLP-spezifischen Sequenzen, B) Zuordnung der menschlichen Chromosomen zu den Zellhybridien und deren Verhalten in der Hybridisierung, C) Zuordnung des PLP-Gens zum Xq12-q22-Bereich. Erläuterung siehe Text.

Hybridzelllinie werden mit Hilfe von Markerproteinen bestimmt.

Die genomische DNA von 15 Somazellhybridlinien (siehe Abb. 15 A, a–q), die alle 23 Chromosomenpaare enthielten, wurden mit *Bam* HI vollständig geschnitten (Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Grzeschik, Universität Marburg), die Fragmente durch Agarose-Gelektrophorese getrennt und durch Southern-Blot-Hybridisierungsanalyse mit dem ³²P-markierten 1200 bp großen C-terminalen *Eco* RI-Fragment des genetischen PLP-Klons hybridisiert. In Abbildung 15 A ist die menschliche PLP-spezifische 9.3-kb-*Bam* HI-Bande in der Southern-Blot-Hybridisierungsanalyse zu erkennen (Pfeil rechts, Mensch). Die kleinere Bande (Pfeil rechts, Maus) ist die mausspezifische PLP-Bande. Die Rasterabbildung 15 B zeigt, welche menschlichen Chromosomen (1–22, X, Y, obere Reihe) ganz (Quadrate) oder partiell (Dreiecke) in den Hybriden vorhanden sind. Die Chromosomen 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 18, 20, 21 und 22 konnten ausgeschlossen werden, da die DNA aus diesen Zelllinien in den Spuren b, h und k nicht mit der PLP-Probe hybridisierten. Die Chromosomen 1, 3, 8, 11, 15, 17, 19 und Y schieden ebenfalls aus, da Hybridisierungen auch mit DNA aus Zelllinien auftraten, die diese Chromosomen nicht enthielten. Somit verblieb Chromosom X als einzige Möglichkeit für den PLP-Genlocus. Die Zuordnung zu Chromosom X wurde untermauert durch die Hybridisierung von 4X-chromosomenhaltiger Zelllinien-DNA, die mit *Bam* HI geschnitten wurde: Es traten deutlich stärkere PLP-spezifische Signale auf.

Die Eingrenzung des PLP-Locus auf den q13–q22-Bereich des X-Chromosoms gelang mit Hilfe der somatischen Zellhybride, die nur Teile des X-Chromosoms enthalten. Das Diagramm in Abbildung 15 C zeigt die Bereiche des X-Chromosoms, die in den jeweiligen Zelllinien enthalten sind. Hybridisierende Zelllinien sind mit einem „+“ versehen. Die Balken c und d ergeben den kleinsten überlappenden Bereich zwischen q13 und q22. In dieser Region ist auch das 3-Phosphoglycerat-Kinase(PGK)-Gen lokalisiert. Zur Bestätigung wurde der *Bam* HI-Blot mit einer ³²P-markierten PGK-cDNA hybridisiert. Parallel zu unseren Untersuchungen kamen Willard und Riordan^[36] sowie Mattei et al. zum gleichen Ergebnis^[37].

5.2.5. Konservierung der PLP-Struktur in der Evolution

Der Vergleich der Aminosäure- und entsprechenden codierenden Nucleotidsequenz des PLPs von in der Evolution sehr entfernten Spezies unterstreicht die hohe Konservierung der Sequenzen. Der Vergleich von Ratte, Maus und Mensch und, soweit vorhanden, Rind (Abb. 16 oben), zeigt, daß zwischen Mensch und Ratte kein Aminosäureaustausch stattgefunden hat und nur 22 Nucleotide von 831 codierenden Basen ausgetauscht sind; in der Maus sind 28 bp ausgetauscht und es gibt zwei konservative Aminosäureaustausche (Ser-Thr, Tyr-Cys). Die extrem hohe Konservierung demonstriert die engen Grenzen, in denen die Funktion des Proteins noch gewährleistet bleibt. Das gleiche gilt für die 3'-nichtcodierende Sequenz, in der um die potentiellen Polyadenylierungserkennungssequenzen eine sehr hohe Homologie herrscht (Abb. 16 unten).

5.3. Organisation des Gens des menschlichen Basischen Myelinproteins

Das Basische Myelinprotein (MBP) liegt im Myelin von Mensch, Maus und Ratte in verschiedenen Isoformen vor^[38, 39]. So dominieren im Myelin der Ratte und der Maus das 18.5- und 14-kDa-MBP. Das kleinere MBP unterscheidet sich von der größeren Isoform durch eine 40 Aminosäuren große Deletion im C-terminalen Bereich. Bei der Maus findet man eine 21.5-kDa- und eine 17-kDa-Form mit einer Insertion von 28 Aminosäuren, bei beiden im N-terminalen Bereich^[10, 40].

Die Anteile der vier Iso-MBP-Formen änderte sich in der Entwicklung von Maus und Ratte^[10, 41, 42]. Das Myelin des menschlichen Zentralnervensystems enthält drei dominante Isoformen, die 21.5-, die 18.5- und die 17.2-kDa-Form. Das 17.2-kDa-Protein entsteht durch eine Deletion von 41 Aminosäuren im C-terminalen Bereich (140–180) der 21.5-kDa-Form.

In Abschnitt 5.1 wurde die Isolierung eines vollständigen MBP-cDNA-Klons aus der Rattenhirn-cDNA-Bank beschrieben. Untersuchungen im Laboratorium von Hood^[11, 43] hatten ergeben, daß das MBP-Gen bei der Maus über sieben Exons verteilt, 30 kb lang und auf dem distalen Arm von Chromosom 18 lokalisiert ist. Wir isolierten das menschliche MBP-Gen durch Screening mit markierten MBP-cDNA-Sonden aus genetischen Cosmid-Banken (pcos2 EMBL und Charon 4A) und analysierten seine Exon-

Gly Leu Leu Glu Cys Cys Ala Arg Cys Leu Val Gly Ala Pro Phe Ala Ser Leu Val Ala 20
 H GGC TTG TTA GAG TGC TGT GCA AGA TGT CTG GTA GGG GCC CCC TTT GCT TCC CTG GTG GCC 60
 R T T

Thr Gly Leu Cys Phe Phe Gly Val Ala Leu Phe Cys Gly Cys His Glu Ala Leu Thr 40
 H ACT GGA TTG TGT TTC TTT GGG GTG GCA CTG TTC TGT GGC TGT GGA CAT GAA GCC CTC ACT 120
 R A A T

Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu 60
 H GGC ACA GAA AAG CTA ATT GAG ACC TAT TTC TCC AAA AAC TAC CAA GAC TAT GAG TAT CTC 180
 R T T G

Ile Asn Val Ile His Ala Phe Gln Tyr Val Ile Tyr Gly Thr Ala Ser Phe Phe Leu 80
 H ATC AAT GTG ATC CAT GCC TTC CAG TAT GTC ATC TAT GGA ACT GCC TCT TTC TTC CTT 240
 R T T

Tyr Gly Ala Leu Leu Leu Ala Glu Gly Phe Tyr Thr Thr Gly Ala Val Arg Gln Ile Phe 100
 H TAT GGG GCC CTC CTG GCT GAG GGC TTC TAC ACC ACC GGC GCA GTC AGG CAG ATC TTT 300
 R C T

Gly Asp Tyr Lys Thr Thr Ile Cys Gly Lys Gly Leu Ser Ala Thr Val Thr Gly Gly Gln 120
 H GGC GAC TAC AAG ACC ACC ATC TGC GGC AAG GGC CTG AGC GCA ACG GTA ACA GGG GGC CAG 360
 R

Lys Gly Arg Gly Ser Arg Gly Gln Ala His Ser Leu Glu Arg Val Cys His Cys 140
 H AAG GGG AGG GGT TCC AGA GGC CAA CAT CAA GCT CAT TCT TTG GAG CGG GTG TGT CAT TGT 420
 R B I

Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe Val Gly Ile Thr Tyr Ala Leu Thr Val 160
 H TTG GGA AAA TGG CTA GGA CAT CCC GAC AAG TTT GTG GGC ATC ACC TAT GCC CTG ACC GTT 480
 R T

Val Trp Leu Leu Val Phe Ala Cys Ser Ala Val Pro Val Tyr Ile Tyr Phe Asn Thr Trp 180
 H GTG TGG CTC CTG GTG TTT GCC TGC TCT GCT GTG CCT GTG TAC ATT TAC TTC AAC ACC TGG 540
 R A A T

Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser Ile Gly Ser Leu Cys 200
 H ACC ACC TGC CAG TCT ATT GCC TTC CCC AGC AAG ACC TCT GCC AGT ATA GGC AGT CTC TGT 600
 R T C

Ala Asp Ala Arg Met Tyr Gly Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly 220
 H GCT GAT GCC AGA ATG TAT GGT GTT CTC CCA TGG AAT GCT TTC CCT GGC AAG GTT TGT GGC 660
 R G

Ser Asn Leu Leu Ser Ile Cys Lys Thr Ala Glu Phe Gln Met Thr Phe His Leu Phe Ile 240
 H TCC AAC CTT CTG TCC ATC TGC AAA ACA GCT GAG TTC CAA ATG ACC TTC CAC CTG TTT ATT 720
 R C

Ala Ala Phe Val Gly Ala Ala Ala Thr Leu Val Ser Leu Leu Thr Phe Met Ile Ala Ala 260
 H GCT GCA TTT GTG GGG GCT GCA GCT ACA CTG GTT TCC CTG CTC ACC TTC ATG ATT GCT GCC 780
 R T C A

Thr Tyr Asn Phe Ala Val Leu Lys Leu Met Gly Arg Gly Thr Lys Phe 276
 H ACT TAC AAC TTT GCC GTC CTT AAA CTC ATG GGC CGA GGC ACC AAG TTC 828
 R G

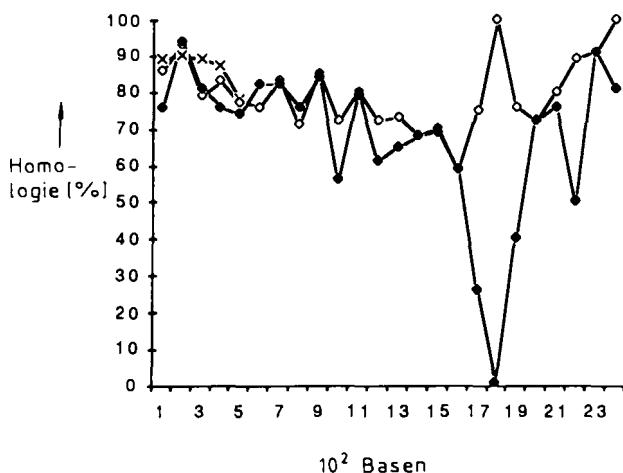
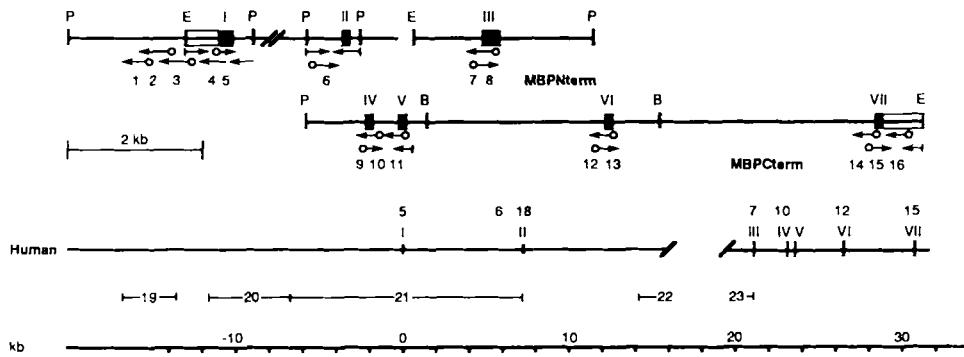


Abb. 16. Oben: Vergleich der Aminosäure- und codierenden Nucleotidsequenz des PLPs von Mensch, Ratte und Rind (H, R bzw. B). Unten: Graphische Veranschaulichung der Homologie im 3'-nichttranslatierten Bereich. × = Rind, ◆ = Ratte, ◇ = Maus.

Intron-Organisation. Wie für das menschliche PLP-Gen führten wir auch hier Restriktionsanalysen zur Kartierung des MBP-Gens durch. Es ist über sieben Exons und 32–34 kb verteilt^[44]; Abbildung 17 veranschaulicht seinen Aufbau und die Sequenzierungsstrategie.

Ein Vergleich der codierenden Sequenzen des menschlichen und Maus-MBP-Gens macht eine große Homologie in der Nucleotidsequenz dieser beiden Gene deutlich, obgleich sie nicht so hoch wie beim PLP ist. Es wurden drei potentielle Transkriptionsstartpunkte durch die Primer-Extension-Methode bei – 55, – 82 und – 183 bp 5'-wärts vom Translationsstart bestimmt. In der 5'-nichtcodierenden Region trifft man weder eine in eucaryotischen Genen häufig auftretende TATA- noch eine CAAT-Box an, jedoch drei direkte „Repeats“, eine gleichgerichtete nonamere Sequenz und zwei oktamere Nucleotidsequenzen. Eine dekamere Sequenz bei – 256 bis – 265 ist absolut homolog zu einer der regulatorischen Regionen des PLP-Gens. Zukünftige Untersuchun-



Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu 29
ATG GCG TCA CAG AAG AGA CCC TCC CAG AGG CAC GGA TCC AAG TAC CTG GCC ACA GCA AGT ACC ATG GAC CAT GCC AGG CAT GGC TTC CTC 87

Pro Arg His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys 58
CCA AGG CAC AGA GAC ACG GGC ATC CTT GAC TCC ATC GGG CGC TTC TTT GGC GGT GAC AGG GGT GCG CCC AAG CGG GGC TCT GGC AAG gtga 174

gtctgaggatgagggatgttttagtttaatggaaaaaagcaaggaaaatcagttaggtgaaactcagccattagggaaactggcacgtacecttgcgtctaaaggctcggtcc
gttgtggatcatatgcggccaaagactgtgggccttagggatgtttcgatccactcccccttttcctcacaagggtggtgccgggtgtggctcaggat
taaggacatgtgttgc...

Asp Ser His His Pro Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly 96
...ttccctggggaggacaaggcgcaaggactgtggacttgttcttgagggtcacccgcctctgtgttcag GAC TCA CAC CAC CGG GCA AGA ACT GCT CAC TAC GGC 288

Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile 119
TCC CTG CCC CAG AAG TCA CAC GGC CGG ACC CAA GAT GAA AAC CCC GTA GTC CAC TTC TTC AAG AAC ATT gtaagtgcgtcgatggaaagggtta 357

gcaactgtgaggggggggggggggg...

```
Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys 131
...gcccagggttctctgtgccttcag GTG ACG CCT CGC ACA CCA CCC CCG TCG CAG GGA AAG gtaaagacccggaaatgtttgattgtatcaactttctgata 393
```

Gly Arg Gly Leu Ser Leu Ser Arg Phe Ser Trp 142
 SFSFSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS

...ccctcagcggtgtgtggcccggtggctctgaaccactcaccagtccaggccatggggccctttccccggggccctgggtggcagctcccaagtggctcaagcagcgtggccagcac

Gly Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser 162
cgcgggtggagggtgagctccgtggtttctcttgacag GGG GCC GAA GGC CAG AGA CCA GGA TTT GGC TAC GGA GGC AGA GCG TCC GAC TAT AAA TCG 486

Aid his Lys Gly the Lys Gly Val Asp Ala Gin Gly Thr Ile Ser Lys Ile Phe Lys Leu 102
GCT CAC AAG GGA TTC AAG GGA GTC GAT GCC CAG GGC ACG CTT TCC AAA ATT TTT AAG CTG gtaaggtaacctctgtcagtcactga... 546

...agaataatgtcatcaaagcaatggcgctgacttcacccacagaatgcacttgttgcagagcatggttatgcggcaccactccctgggcctggaaatccgatc
cagtctctcacagaactggaaaattcattagcattgtctggggaggctggggaaaatggataaaaagaccagcttcggggtgcattctattagcagatgagagagacaccc

aatggctcagcatggaccacagaagaggggatgtgggtggaggacctgcggactctgtccataactctcttttcag GGA GGA AGA GAT ACT

Abb. 17. Oben: Exon-Intron-Organisation des menschlichen MBP-Gens. Unten: Nucleotidsequenz der Exons und umfangreicher Teile der Introns des MBPs.

gen sollen zeigen, ob diese Motive von Bedeutung für die Transkriptionsregulation sind. Die Isoformen des MBPs entstehen durch alternatives Spleißen. Es sind im wesentlichen die Exons II, V und VI, die hieran beteiligt sind. Abbildung 18 faßt die Spleißvorgänge und die daraus resultierenden Isoformen zusammen.

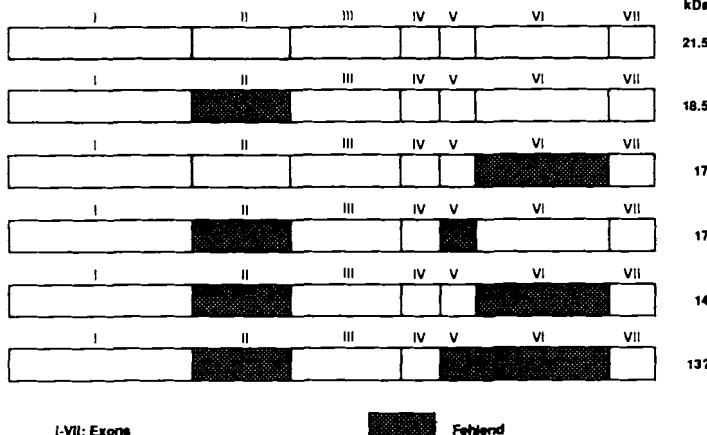


Abb. 18. Isoformen des Basischen Myelinproteins entstehen durch alternatives Spleißen. Die Molekulmassen sind in kDa rechts angegeben, die durch das Spleißen eliminierten Exons sind schraffiert dargestellt.

6. Tiermodelle zum Studium der normalen und der genetisch-pathobiochemisch veränderten Myelinmembran des Zentralnervensystems (Dysmyelinosen)

Tiermodelle mit einem auf genetischer Basis beruhenden defekten Aufbau der Myelinmembran eignen sich hervorragend a) zur Untersuchung des Membranaufbaus und der Funktion der Membrankomponenten, vor allem ihrer Proteine, b) für die Analyse der Differenzierungsvorgänge in der Myelogenese sowie c) für das Studium der Pathogenese auf molekularer Ebene. Von den Myelin-Mutanten bei Maus, Ratte, Kaninchen und Spanielhunden sollen zwei Geschlechtschromosom-gebundene Mutationen der Maus und der Ratte beschrieben werden.

6.1. Geschlechtlich (X-chromosomal) vererbte Defekte

6.1.1. Jimpy(ji)-Maus

1952 beschrieb Falconer den geschlechtsgebundenen Tabby(Ta)-Marker der Maus^[45]. Die heterozygoten Weibchen zeichnen sich durch eine Querstreifung des Rückenfells, die homozygoten Männchen durch ein hellbraunes Fell aus. Mit dem Ta-Marker gekoppelt ist das jimpy(ji)-Gen, das zum vollständigen Fehlen des Myelins der betroffenen männlichen Maus und zum frühen Tod unter den Symptomen des Tremors der gesamten quergestreiften Muskulatur und von Krämpfen führt. Die das ji-Gen tragenden Weibchen zeigen ein Mosaikmuster, da die Expression des X-chromosomal Gens von der Inaktivierung des mutierten oder des normalen X-Chromosoms bestimmt wird^[46, 47]. Während im heterozygoten Weibchen die Hypomyelinisierung mit zunehmendem Alter kompensiert wird, findet man bei der proteinche-

mischen Analyse des Gehirns der betroffenen Männchen eine markante Reduktion von PLP und MBP^[48, 49].

Der primäre Defekt der ji-Mutation wurde zunächst in der PLP-Expression gesucht. Jedoch erwiesen sich die Southern-Blots der genomischen DNA von ji- und normaler Maus mit der PLP-cDNA als Sonde als gleich^[34, 37, 50, 51]. Die exakte Bestimmung des ji-Defektes in der mRNA wurde durch Isolierung und Analyse der ji-PLP-cDNA erbracht^[50]. Es wurde eine 74-Basenpaare-Deletion mit Leserasterverschiebung des C-Terminus des PLP-Gens beobachtet.

Ein Blick auf die Exon-Intron-Struktur des menschlichen PLP-Gens zeigt, daß die 74-Basenpaare-Deletion exakt der Nucleotidsequenz von Exon V entspricht. Die nächstliegende Interpretation war die eines alternativen Spleißens (Abb. 14 unten). In der Tat liegt eine Umwandlung („Transition“) an der Spleiß-Acceptor-Stelle vor (AG → GG). Dabei werden Exon V, Intron IV und Intron V eliminiert. Exon V endet auf dem ersten Nucleotid des Glycins (G). Da Exon VI mit dem Triplet TTC (Phe) beginnt, kommt es zur Leserasterverschiebung und Synthese eines missense-Proteins. Die Folge ist der Verlust von myelinisierenden Oligodendrocyten und das Auftreten von unreifen Oligodendrocyten. Dies ist sehr gut erkennbar in der vergleichenden in-situ-Hybridisierung von normalen, md-Ratten- und ji-Maus-Gehirnschnitten mit antisense-PLP- und -MBP-mRNA (Abb. 19).

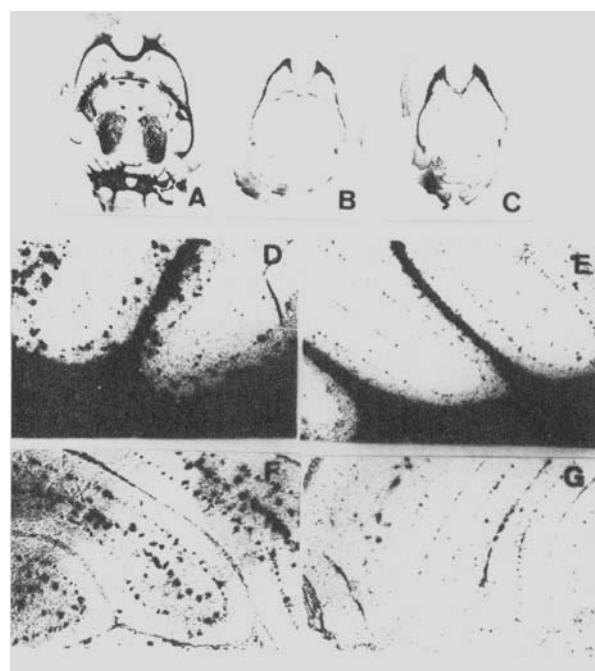


Abb. 19. In-situ-Hybridisierung von Horizontal-Cryoschnitten der normalen und der md-Ratte sowie der ji-Maus mit antisense-PLP- und -MBP-RNA. A Ratte; B md-Ratte; C ji-Maus; D normale Ratte mit antisense-PLP-RNA hybridisiert; E normale Ratte mit antisense-MBP-RNA hybridisiert; F md-Ratte mit antisense-PLP-RNA hybridisiert; G md-Ratte mit anti-MBP-RNA hybridisiert.

Einen weniger dramatischen Verlauf der Erkrankung beobachtet man in der Myelinsynthese-defizienten (msd) Maus, die phänotypisch der ji-Maus sehr verwandt ist^[52, 53]. Auch diese Mutation ist ein X-chromosomal gebundener Defekt. Es handelt sich um eine einzige Basen-Transition (C → T) in Exon IV, die zu einer homologen Aminosäure-Substitution (Alanin → Valin) im PLP führt^[69].

6.1.2. Myelin-defiziente (md) Ratte

Die md-Ratte ist eine im Phänotypus der ji-Maus sehr verwandte Mutante der Wistar-Ratte. Das endoplasmatische Reticulum der Oligodendrocyten des CNS ist aufgeweitet, im Cytoplasma treten flockige Ausfällungen auf^[54]. Die mRNA von PLP und MBP sowie von MAG und CNP sind stark reduziert. Abbildung 19 vergleicht die in-situ-Hybridisierung, die wir von Hirnschnitten der normalen Ratte, der md-Ratte und ji-Maus mit [³⁵S]UDPS-markierter antisense-PLP- und MBP-RNA durchführten^[55]. Die markant reduzierte Zahl von Oligodendrocyten in den Gehirnen von md-Ratten und ji-Mäusen ist erkennbar an der geringfügigen Markierung durch die spezifischen Hybridisierungs sonden.

Zur Aufklärung des genetischen Defekts auf der molekularen Ebene wurden Southern-Blots von normaler PLP-DNA und der von md-Ratten verglichen. Keine Größenunterschiede waren erkennbar; die Sequenzen der 5'-regulatorischen Region sowie die Sequenzen der Exons IV bis VII und Introns IV bis VI waren identisch. Aus der md-Ratten gehirn-spezifischen cDNA-Bank isolierten wir mit der Polymerase-Kettenreaktion(PCR)-Methode die die Exons I, II und III codierenden Nucleotidsequenzen und amplifizierten gleichzeitig mit geeigneten Oligonukleotid-Primern die Exons II und III sowie das Intron II. Die Sequenzierung der mit der PCR-Methode erhaltenen Fragmente der md-cDNA ergaben eine Punktmutation (A → C-Transversion), die zur Mutation von Thr⁷⁵ zu Pro führt. Die Punktmutation liegt im Exon III, der das zweite transmembranale α -helicale Segment codierenden Sequenz. Durch die Transversion wird gleichzeitig eine *Ava* II-Restriktionsschnittstelle geschaffen (GGACC). Dieser *Ava* II-Polymorphismus im Exon III bietet ein rasches Diagnostikum des md-Allels (Abb. 20). Welche Folgen hat diese Punktmutation Thr → Pro für die Proteinstruktur? Prolin mit dem vorhergehenden Glycin bricht die α -Helix-Struktur und führt zum Knick und zur teilweisen β -Turn-Struktur der Helix. Diese Konformation aber verhindert offenbar eine Integration der C-terminalen PLP-Sequenz in die Lipiddoppelschicht des Myelins. Zellbiologisch drückt sich diese A → C-Transversion, also die Mutation einer von 17 000 Basen durch den Verlust der Oligodendrozyten aus. Die Myelinisierung bleibt aus und führt zu einem frühen Tod des befallenen männlichen Tieres. Wir untersuchen diese pathogenetisch wichtige Reaktionskette augenblicklich sehr intensiv.

6.2. Autosomal-rezessiv vererbte Dysmyelinosen

Eine rezessiv vererbte Dysmyelinose ist der Shiverer-Defekt der Maus (shi-Maus). Dieser Defekt beruht auf der Deletion von fünf der sieben Exons des MBP-Gens, das auf Chromosom 18, q22-qter lokalisiert ist^[43, 56, 57]. Der Verlust des MBPs verhindert zwar nicht die Myelinbildung, jedoch bleibt die Ausbildung des im elektronenmikroskopischen Bild als main dense line (MDL, Abb. 3) erkennbaren kompakten cytosolischen Spaltes aus^[58]. Der Myelinisierungsdefekt konnte durch Implantation des intakten MBP-Gens in die Keimzelle der Maus im transgenen Mausmodell behoben werden^[59].

Eine weitere autosomale Maus-Mutante ist die Myelin-defiziente Maus. Die Arbeitsgruppe von Hood fand heraus, daß aufgrund einer MBP-Gen-Duplikation und -Inversion

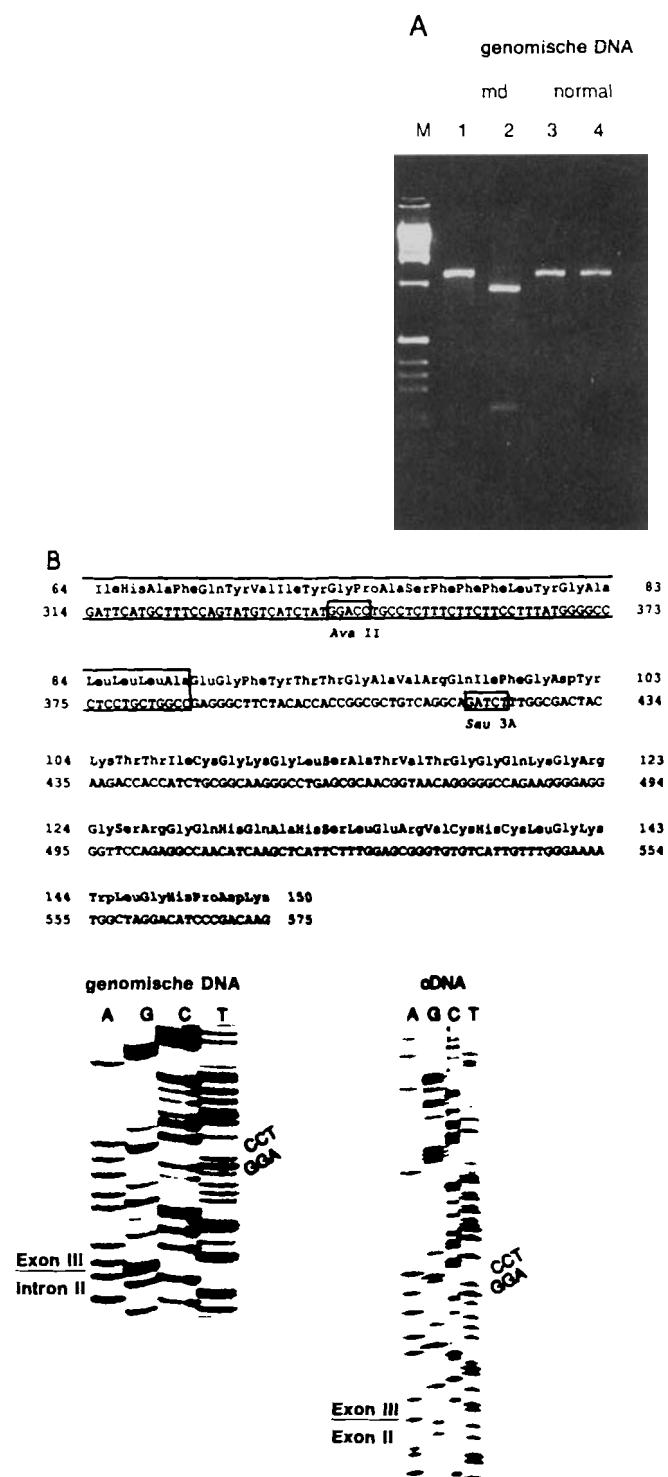


Abb. 20. A) Amplifikation von Exon II-Intron II-Exon III durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit genetischer DNA der Wildtyp- und md-Ratte als Template (md 1 und normal 3). Restriktion des resultierenden 1180-bp-Fragments mit *Ava* II. Es weist einen *Ava* II-Restriktionsfragmentlängen-Poly morphismus auf. *Ava* II spaltet das von der genetischen DNA der md-Ratte abgeleitete Fragment in ein 960 und ein 220 bp großes Fragment (md 2), nicht das PCR-Fragment der genetischen DNA der normalen Ratte (normal 4). B) Nucleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von Exon III des PLP-Gens der md-Ratte (siehe auch Abb. 16) sowie „Sequenzgelle“ der genetischen und cDNA der md-Ratte.

die Regulation der Genexpression gestört ist und dadurch der der Shiverer-Mutante verwandte Phänotypus entsteht. Auch hier gelang es durch Einschleusung des normalen MBP-Gens, transgene Mäuse zu schaffen, die Myelin in verschiedener Stärke bildeten^[60].

Der Quaking-Maus (qk-Maus) liegt ein an Chromosom 17 gebundener Defekt zugrunde. Phänotypisch beobachtet man elektronenmikroskopisch eine stark aufgelockerte Myelinstruktur mit stark reduzierter Expression sowohl des PLP- als auch des MBP-Gens. MBP scheint nicht in die Myelinmembran eingebaut zu werden. Eine molekularbiologische Erklärung dieser Mutation steht noch aus^[49, 61].

6.3. Geschlechtsgebundene rezessive Dysmyelinosen des Menschen

Demyelinisierungen führen zum Abbau von vorhandenem, intaktem Myelin durch entzündliche oder toxische Ursachen. Eine Reihe von Dysmyelinosen, Leucodystrophien, hingegen beruhen auf genetisch bedingten Funktionsstörungen der Oligodendrocyten. In diesem Zusammenhang sind die Human-Dysmyelinosen mit X-chromosomal-rezessivem Erbgang, z. B. die Adrenoleucodystrophie(ALD) und die „familiären diffusen Sklerosen“, auch als Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung bezeichnet, von besonderer Bedeutung^[62]. Die schwere Form der Adrenoleucodystrophie führt beim homozygoten männlichen Nachfahren frühzeitig zur geistigen Retardierung, zu motorischen Störungen, zur Entmyelinisierung des Nervus opticus mit Erblindung und Tod im Alter von vier bis acht Jahren. Charakteristisch und als diagnostisches Hilfsmittel verwertet findet man die Akkumulation sehr langketiger Fettsäuren ($> C_{24}-C_{26}$) in fast allen Geweben, meist als Cholesterinester^[63]. Die gaschromatographische Bestimmung der langketigen Fettsäuren in den Lipiden von Leucocyten, Hautfibroblasten und durch Aminocentese gewonnenen Zellen ist augenblicklich die vor allem pränatal verwandte diagnostische Methode der Wahl^[64]. Der ALD-Locus auf dem X-Chromosom ist noch nicht genau bestimmt, jedoch erfaßt eine für die Xq28-Bande spezifische DNA-Sonde einen Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP), der für das defekte Allel charakteristisch sein soll^[65]. Solange jedoch der genaue Abstand von Sonde und ALD-Locus nicht bekannt ist, haftet diesem RFLP wegen möglicher Rekombinationen ein Unsicherheitsfaktor an.

Eine seltene Leucodystrophie-Form ist die Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung. Schon im Säuglingsalter beginnt der geistige und psychische Verfall, der bis zum Tod in den ersten Lebensjahren progredient ist. Der Phänotypus ist dem der ji-Maus oder der md-Ratte sehr ähnlich. Die Erkrankung ist durch das völlige Fehlen der weißen Substanz des CNS histologisch charakterisiert. Astrocyten im Bereich der Dysmyelinisierung weisen Fetttröpfchen auf. Der postulierte Defekt des Phospholipidstoffwechsels^[66] ist sicherlich nur ein peripheres Symptom im komplexen Phänotypus dieser genetisch bedingten Dysmyelinose. Die X-Chromosomen-Linkage, verbunden mit einem völligen Fehlen des Proteolipoproteins (PLPs)^[67] und die immuncytochemisch stark veränderten Marker-Enzyme des Myelins weisen auf eine Mutation des PLP-Gens hin. Die Klonierung des Pelizaeus-Merzbacher-PLP-Gens und seine Analyse brachten Klarheit über die Mutation und einen Einblick in die Pathogenese der Erkrankung bei vier verschiedenen Familien: eine C → T-Transition in Exon IV, die zu einem Thr¹⁵⁵-Ile-Austausch^[70] sowie zu einer Pro¹⁴ → Leu^[71], Trp¹⁶² → Arg¹⁷² und Pro²¹⁶ → Ser-Substitution^[73] führt.

6.4. Demyelinisierende Erkrankungen

Die häufigste und schwerste, sehr oft progredient verlaufende entzündliche Erkrankung des CNS ist die Enzephalomyelitis disseminata, auch als Multiple Sklerose (MS) bezeichnet. Ihre Ursachen sind noch völlig ungeklärt, obwohl immer wieder Virus-Infektionen – es sind inzwischen mehr als 20 beschrieben worden – als auslösendes Ereignis angeführt wurden. Dies gilt besonders für das Windpocken-, Röteln- und Mumps-Virus und jüngst das Retrovirus HIV-1^[68]. Eine wesentliche Komponente in der Pathogenese ist die Autoimmunreaktion. Im Tiermodell gelingt es, eine symptomatologisch verwandte Demyelinisierung experimentell durch Immunisierung von Kaninchen oder Ratten mit dem Basischen Myelinprotein (MBP) zu erzeugen. Neben den entzündlichen Degenerationsherden, die bei dieser experimentellen allergischen Enzephalitis (EAE) auftreten, werden im Versuchstier T-Lymphocyten mit MBP-Spezifität aktiviert. Ein Transfer der T-Lymphocyten kann im gesunden Tier die Symptome der Multiplen Sklerose auslösen. Ganz analog zum Tiermodell findet man auch im Liquor cerebrospinalis der MS-Patienten MBP-spezifische T-Lymphocyten.

Unabhängig von den Ursachen der Multiplen Sklerose stellt sich die Frage, ob MBP das primäre Antigen für die Auslösung des Autoimmunprozesses ist. Für das Verständnis pathogenetischer Abläufe ist der molekulare Aufbau der am Geschehen beteiligten Strukturen von großer Hilfe. Die Topologie des MBPs ist eindeutig im cytosolischen Spalt der Myelinmembran, durch die dichten Lipiddoppelschichten so angeordnet, daß es von Proteasen nicht angegriffen werden kann, wie dies experimentell gezeigt wurde^[14]. Betrachtet man das Myelinmembranmodell (Abb. 8 oben), so wird deutlich, daß das Proteolipidprotein (PLP) große hydrophile Domänen an der Myelinmembran-Oberfläche exponiert, die für Proteasen von Makrophagen, Lymphocyten und Leukozyten als primärer Angriffspunkt direkt zugänglich sind. Durch eine Fragmentierung des PLPs würde die Membranorganisation des Myelins empfindlich gestört. Es könnten Phospholipide für den Angriff von Phospholipasen und in Folge auch das Basische Myelinprotein für Proteasen exponiert werden. Die hohe Antigenität des MBPs und seiner Peptidsfragmente übernimmt im Autoimmunisierungsprozeß die dominierende Rolle, wenn auch nach dieser noch hypothetischen Reaktionssequenz erst sekundär und auf einer späteren Stufe im pathogenetischen Geschehen. Die Kenntnis der entscheidenden Epitope, die primär im Entmarkungsprozeß von aktivierte T-Lymphocyten erkannt werden, könnte, auch wenn die Krankheitsursachen noch nicht aufgeklärt sind, von größter Bedeutung für das pathogenetische Verständnis der Multiplen Sklerose und für deren Therapie werden.

7. Zusammenfassung und Perspektiven der Membranforschung in der Neurobiologie

Die Myelinmembran des CNS ist aufgrund ihrer überschaubaren Zahl von Komponenten eine biologische Membran, deren Morphologie und Funktion heute auf der molekularen Ebene sehr weitgehend beschrieben werden kann. Die chemische und biochemische Analytik hat ergeben, daß

die einfachen und komplexen Myelinlipide, die die 5 nm dicke Doppelschicht aufbauen, die bestimmenden Strukturen für die isolierenden Eigenschaften der Myelinscheide um die Axone sind. Die dichte laterale Packung der langketigen Fettsäuren der Sphingolipide und des Cholesterins in der Lipiddoppelschicht wird stabilisiert durch ein hier erstmals beschriebenes Netz von Wasserstoffbrückenbindungen, das zwischen polaren Gruppen an der Interphase zwischen dem hydrophoben Kern der Doppelschicht und den polaren Köpfen der Lipide ausgespannt wird.

Der auffallend hohe Gehalt an sauren polaren Lipidkopfgruppen – eine anionische auf vier polare oder zwitterionische – bedingt eine polyanionische cytoplasmatische und extracytoplasmatische Oberfläche. Beide werden in ionische Wechselwirkungen einbezogen. Biochemische und immuntopochemische Studien führen zu der Erkenntnis, daß das Basische Myelinprotein im cytosolischen Spalt von außen nicht zugängig ist und über ionische Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der basischen Aminosäuren und den anionischen polaren Kopfgruppen der Sulfatide und Phospholipide, aber auch einer anionischen Domäne des Proteolipidproteins eine kompakte Schichtung der Ausstülpungen der Oligodendrocyten-Plasmamembran bewirkt. Sie findet in der „main dense line“ (MDL) im elektronenmikroskopischen Bild ihren Niederschlag. Ionische Wechselwirkungen zwischen polaren Kopfgruppen der Lipiddoppelschichten und Domänen des Proteolipidproteins müssen auf der extracytosolischen Seite für die dichte Aufeinanderlagerung der äußeren Oberflächen sich umeinanderwickelnder Myelinfortsätze verantwortlich gemacht werden. Diesen engen Spalt zwischen den Außenflächen erkennt man im Elektronenmikroskop als „intraperiod dense line“ (IDL). Zusätzlich könnten hydrophobe Wechselwirkungen zwischen gegenüberliegenden Membranoberflächen durch langketige Fettsäurereste ausgelöst werden. Beispielsweise gehen sie im PLP mit Thr/Ser¹⁹⁸ eine Esterbindung ein und könnten in der hydrophoben Phase intercalieren. Auch die hydrophoben Seiten amphipathischer Helices oder die flip-flop-Dynamik einer kleinen hydrophoben cis-Schleife bei der noch nicht verstandenen Dynamik des Spiralisierungsprozesses (Abb. 2B) könnten das Muster der äußeren Membran-Adhäsionsflächen bestimmen und dadurch ein wesentlicher stabilisierender Faktor bei der Bildung des dichten multilamellaren Membransystems sein. Dieses System ist nicht nur für die Isolatorfunktion der Myelinscheide verantwortlich, sondern auch für die saltatorische Erregungsleitung über die Ranvierschen Schnürringe, die mit der Depolarisierung nur kleiner Areale der axonalen Membran einhergeht.

Die Myelinisierung der Axone des CNS stellt einen faszinierenden Entwicklungs- und Differenzierungsprozeß bei der Reifung des Gehirns dar. Nach einem zeitlichen, aber auch in den einzelnen Hirnarealen räumlich regulierten Programm wird die Masse der Lipide und Myelinproteine innerhalb eines kurzen Zeitintervalls (2–3 Wochen bei Nagern, 1–2 Jahre beim Menschen) synthetisiert.

Mit den hier geschilderten molekulargenetischen Techniken können wir heute den Verlauf und die Regulation der Myelogenese analysieren und die steuernden Elemente und Faktoren sowie die Expression der Gene der Myelinmembranproteine und der Enzyme auflösen, die für die Synthese der komplexen Myelinlipide verantwortlich sind. In-situ-Hy-

bridisierungstechniken und die Analyse der DNA-Protein-Wechselwirkungen in den regulatorischen Regionen der hier beschriebenen Gene werden hierbei eine wichtige Rolle spielen. So wird beantwortet werden können, ob die Genaktivität der Myelinproteine simultan und konjugiert mit der Lipidsynthese „angeschaltet“ wird, wie der Transport der Myelinbausteine zum Axon vor sich geht, wo der Zusammenbau der segregierten Membranbausteine des Myelinfortsatzes der Oligodendrocyten-Plasmamembran erfolgt. Die in-vitro-Proteinsynthese des PLPs und des MBPs und die Integration des PLPs in die Lipiddoppelschicht wird derzeit experimentell untersucht, um Einblick in den in-vivo-Prozeß zu geben.

Die geschilderte molekulargenetische Analyse genetisch bedingter Myelindefekte (Dysmyelinosen), hier der jimpy-Maus und Myelin-defizienten Ratte, liefert einen überzeugenden Beweis für die weitreichenden Möglichkeiten, nicht nur den Defekt auf der DNA-Ebene und den Chromosomenort zu beschreiben, sondern auch die zellbiologische Grundlage für das pathogenetische Geschehen als Folge dieser Mutation aufzuklären. So werden wir bald wissen, warum die fehlerhafte Expression eines Strukturproteins, wie die des PLPs, den Tod des Oligodendrocyten, das Ausbleiben der Myelinisierung und damit den frühen Tod des Individuums verursacht. Die untersuchten Tiermodelle sind von erheblicher Wichtigkeit für die Aufklärung analoger, auf einer defekten Myelin synthetisierenden dysmyelinosen beim Menschen.

Eine Vielzahl genetisch bedingter Myelindefekte in der Tierwelt und beim Menschen warten noch auf die Aufklärung der zugehörigen Mutationen. Für die Aufklärung der pathogenetischen Vorgänge dieser Gehirnerkrankungen werden transgene Tiermodelle unverzichtbar sein. Die Aufklärung der Topochemie der Myelinmembran und die Verfügbarkeit der Proteinstrukturen hat der Erforschung der demyelinisierenden Erkrankungen, mit der Multiplen Sklerose als Hauptvertreter, einen wichtigen Impuls verliehen. Dies gilt vor allem für den autoimmunologischen Aspekt dieser Erkrankung. Die antigenen Epitope der Zielstrukturen des Myelins sind nun bestimmt. Damit eröffnen sich weitreichende therapeutische Möglichkeiten.

Die Ergebnisse der biochemischen und molekulargenetischen Forschung der letzten Jahre haben auf dem Gebiet der Neurobiologie, wie hier an der Myelinmembran des CNS dokumentiert, einen eindrucksvollen Beweis dafür geliefert, daß zunächst solide chemische und biochemische Kenntnis über makromolekulare Strukturen gewonnen werden müssen. Mit Hilfe der molekulargenetischen und zellbiologischen Techniken und Denkweisen gelingt es dann, die an diese Strukturen geknüpften normalen Funktionen und ihre pathologischen Abweichungen bis auf der molekularen Ebene verstehen zu lernen. Die „neue Biochemie“ im weitesten Sinne macht die molekulare Neurobiologie zu einem der aufregendsten Gebiete der modernen Biologie.

Die in diesem zusammenfassenden Beitrag dargestellten eigenen Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 74), dem Bundesministerium für Forschung und Technologie (Gennzentrum Köln) und der Fritz-Thyssen-Stiftung gefördert. Mein besonderer Dank gilt allen zitierten Mitarbeitern sowie Herrn Dr. B. Tunggal und Dipl.-Chem. K. Hofmann für die fruchtbare und begeisterte Zusammenarbeit auf diesem ein hohes Experimentiergeschick erfordern

Gebiet der Neurochemie. Herrn Jochen Teufel bin ich für die Hilfe bei der Fertigstellung der Abbildungen und des Manuskriptes zu Dank verpflichtet.

Eingegangen am 17. November 1989,
veränderte Fassung am 15. Februar 1990 [A 779]

- [1] R. Virchow, *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol.* 6 (1854) 562–572.
- [2] M. L. Ranvier: *Leçons sur l'Histologie du Système Nerveux*. Librairie F. Savy, Paris 1878.
- [3] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, *J. Physiol.* 117 (1952) 500–544.
- [4] T. V. Wahnheldt, J. M. Matthieu, G. Jeserich, *Neurochem. Int.* 9 (1986) 463–474.
- [5] P. I. Yakovlev, A.-R. Lecours in A. Minkowski (Hrsg.): *Regional Development of the Brain in Early Life*, Blackwell, Oxford 1967, S. 3–70.
- [6] W. T. Norton, W. Crammer in P. Morell (Hrsg.): *Myelin*, Plenum Press, New York 1984, S. 147–195.
- [7] Y. Oshiro, E. H. Eylar, *Arch. Biochem. Biophys.* 138 (1970) 392–396.
- [8] E. Eylar, S. W. Brostoff, G. Hashim, J. Cocciam, P. Burnett, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 5770–5784.
- [9] P. R. Carnegie, *Biochem. J.* 123 (1971) 57–67.
- [10] E. Barbarese, P. E. Braun, F. H. Carson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 3360–3364.
- [11] N. Takahashi, A. Roach, D. B. Taplow, S. B. Prusiner, L. Hood, *Cell* 42 (1985) 139–148.
- [12] J. Kamholz, F. de Ferrer, C. Puckett, R. A. Lazzarini, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 4962–4966.
- [13] P. E. Braun in P. Morell (Hrsg.): *Myelin*, Plenum Press, New York 1984, S. 97–106.
- [14] W. Stoffel, H. Hillen, H. Giersiefen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 5012–5016.
- [15] W. Stoffel, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [16] G. L. Stoner, *J. Neurochem.* 43 (1984) 433–447.
- [17] J. Folch, M. Lees, *J. Biol. Chem.* 191 (1951) 807–817.
- [18] F. Wolfgram, *J. Neurochem.* 13 (1966) 461–470.
- [19] M. Arquini, J. Roder, L. S. Chia, J. Down, D. Wilkinson, H. Bayley, P. Braun, R. Dunn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 600–604.
- [20] W. T. Norton, *J. Neurochem.* 21 (1973) 759–773.
- [21] M. V. Norgard, M. J. Tocci, J. J. Monahan, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 7665–7672.
- [22] U. Gubler, B. J. Hoffman, *Gene* 25 (1983) 263–269.
- [23] M. Schaich, R.-M. Budzinski, W. Stoffel, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 367 (1986) 825–834.
- [24] J. McLauchlan, D. Gaffney, J. L. Whitton, J. B. Clements, *Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 1347–1368.
- [25] H.-J. Diehl, M. Schaich, R.-M. Budzinski, W. Stoffel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 9807–9811.
- [26] E. J. Chen, P. H. Seburg, *DNA* 4 (1985) 165–170.
- [27] P. Heinrich: *Guidelines for Quick and Simple Plasmid Sequencing*, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim 1986.
- [28] A. Dautigny, P. M. Alliel, L. d'Auriol, D. Pham-Dinh, J. L. Nussbaum, F. Galibert, P. Jollès, *FEBS Lett.* 188 (1985) 33–36.
- [29] R. J. Milner, C. Lai, K. A. Nave, D. Lenoir, J. Ogata, J. G. Sutcliffe, *Cell* 42 (1985) 931–939.
- [30] R. Breathnach, P. A. Chambon, *Annu. Rev. Biochem.* 50 (1981) 349–383.
- [31] W. Gilbert, *Science* 228 (1985) 823–824.
- [32] T. C. Südhof, J. L. Goldstein, M. L. Brown, D. H. Russell, *Science* 228 (1985) 815–822.
- [33] D. Morello, A. Dautigny, D. Pham-Dinh, P. Jollès, *EMBO J.* 5 (1986) 3489–3493.
- [34] L. D. Hudson, J. A. Bendt, C. Puckett, C. A. Kozak, R. A. Lazzarini, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 1454–1458.
- [35] F. A. Ruddle, *Nature* 242 (1971) 165–169.
- [36] H. F. Willard, J. R. Riordan, *Science* 230 (1985) 940–942.
- [37] A. Dautigny, M. G. Mattei, D. Morello, P. M. Alliel, D. Pham-Dinh, L. Amar, D. Arnaud, D. Simon, J. F. Mattei, J. L. Guenet, P. Jollès, P. Avner, *Nature* 321 (1986) 867–869.
- [38] P. R. Dunkley, P. R. Carnegie, *Biochem. J.* 141 (1974) 243–255.
- [39] F. de Ferrer, H. Engh, L. Hudson, J. Kamholz, C. Puckett, S. Molinaux, R. A. Lazzarini, *Cell* 43 (1985) 721–727.
- [40] R. E. Mårtenson, G. E. Deibler, M. W. Kies, S. S. McKneally, R. Shapira, R. F. Kibler, *Biochim. Biophys. Acta* 263 (1972) 193–203.
- [41] C. W. Campagnoni, G. D. Carey, A. T. Campagnoni, *Arch. Biochem. Biophys.* 190 (1978) 118–125.
- [42] J. H. Carson, M. L. Nielson, E. Barbarese, *Dev. Biol.* 96 (1983) 485–492.
- [43] A. Roach, N. Takahashi, D. Pravtcheva, F. Ruddie, L. Hood, *Cell* 42 (1985) 149–155.
- [44] R. Streicher, W. Stoffel, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 370 (1989) 503–510.
- [45] D. S. Falconer, *Nature* 169 (1952) 664–665.
- [46] M. F. Lyon, *Nature* 190 (1961) 372–373.
- [47] S. M. Gartler, A. D. Riggs, *Annu. Rev. Genet.* 17 (1983) 155–190.
- [48] A. L. Kerner, J. H. Carson, *J. Neurochem.* 43 (1984) 1706–1715.
- [49] B. J. A. Sorg, D. Agrawal, H. C. Agrawal, A. T. Campagnoni, *J. Neurochem.* 46 (1986) 379–387.
- [50] L. A. Nave, C. Kai, F. E. Bloom, R. J. Milner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1986) 1454–1458.
- [51] M. V. Gardiner, W. B. Macklin, A. J. Diniak, P. L. Deininger, *Mol. Cell. Biol.* 6 (1986) 3755–3762.
- [52] A. Meier, A. D. MacPike, *Exp. Brain Res.* 10 (1970) 512–528.
- [53] S. Billings-Gagliardi, L. H. Adcock, M. K. Wolf, *Brain Res.* 194 (1980) 325–328.
- [54] K. Yanagisawa, I. D. Duncan, J. P. Hammang, R. H. Quarles, *J. Neurochem.* 47 (1986) 1901–1907.
- [55] D. Boison, W. Stoffel, *EMBO J.* 8 (1989) 3295–3302.
- [56] D. F. Saxe, N. Takahashi, L. Hood, M. I. Simon, *Cytogenet. Cell. Genet.* 39 (1985) 246–249.
- [57] P. S. Sparkes, T. Mohandas, C. Heiman, H. J. Roth, I. Klissak, A. T. Campagnoni, *Hum. Genet.* 75 (1987) 147–150.
- [58] J. M. Matthieu, J. M. Roach, F. X. Omlin, I. Rauboldt, G. Almanzan, P. E. Braun, *J. Cell. Biol.* 103 (1986) 2673–2682.
- [59] C. Readhead, B. Popko, N. Takahashi, H. D. Shine, R. Saavedra, R. L. Sidman, L. Hood, *Cell* 48 (1987) 703–712.
- [60] B. Popko, C. Puckett, E. Lai, H. D. Shine, C. Readhead, N. Takahashi, S. W. Hunt, R. L. Sidman, L. Hood, *Cell* 48 (1987) 713–721.
- [61] E. L. Hogan, S. Greenfield in P. Morell (Hrsg.): *Myelin*, Plenum Press, New York 1984, S. 489–534.
- [62] G. Neuhauser in P. J. Vinken, C. W. Bryott (Hrsg.): *Handbook of Clinical Neurology*, North Holland, Amsterdam 1979, S. 498–500.
- [63] N. Igakishi, H. Schaumburg, J. Power, Y. Kishimoto, E. Kolodemy, K. Suzuki, *J. Neurochem.* 26 (1976) 851–860.
- [64] J. Boué, I. Oberlé, R. Heilg, J. L. Mandel, A. Moser, W. Larsen, Y. Du-mez, A. Boué, *Hum. Genet.* 69 (1985) 272–274.
- [65] I. Oberlé, D. Drayna, G. Camerino, R. White, J. L. Mandel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 2824–2828.
- [66] F. Seitelberger in P. J. Vinken, C. W. Bryott (Hrsg.): *Handbook of Clinical Neurology*, North Holland, Amsterdam 1979, S. 150–202.
- [67] A. H. Koeppen, N. A. Ronca, E. A. Greenfield, M. B. Hans, *Ann. Neurol.* 21 (1987) 159–170.
- [68] E. P. Reddy, M. Sandberg-Wollheim, R. V. Mettus, P. E. Ray, E. De Freitas, H. Koprowski, *Science* 243 (1989) 529.
- [69] S. Gencic, L. D. Hudson, *J. Neurosci.* 10 (1990) 117–124.
- [70] W. Stoffel, T. Weimbs, T. Dick, E. Boltshauser, unveröffentlicht.
- [71] J. A. Trofatter, S. R. Dlouky, W. De Myer, P. M. Conneally, M. E. Hodes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 9427–9430.
- [72] L. D. Hudson, C. Puckett, J. Berndt, J. Chan, S. Gencic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 8128–8131.
- [73] S. Gencic, D. Abuelo, M. Ambler, L. D. Hudson, *Am. J. Hum. Genet.* 45 (1989) 435–443.