



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου
Εργαστήριο Νευροεπιστημών
Λευκωσία, Κύπρος



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Διαγονιδιακή αντικατάσταση της
ανθρώπινης κοννεξίνης 32 σε Knockout
ποντίκια στο κεντρικό και περιφερικό
νευρικό σύστημα**

Επόπτες
Κλεόπας Κλεόπα &
Ειρήνη Σαργιαννίδου

Τριμελής Επιτροπή
Δημήτριος Κουρέτας
Κλεόπας Κλεόπα
Αιμιλία Ζιφα

Όνομα: Λάουρα Χριστοδούλου

Ιούλιος 2010

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κληρονομικές νευροπάθειες, γνωστές και ως ασθένειες Charcot Marie Tooth (CMT), είναι από τις πιο κοινές νευρολογικές παθήσεις. Εκδηλώνονται ως αργή αλλά προοδευτική μυϊκή αδυναμία και ατροφία και απώλεια αίσθησης στα άκρα. Η X-συνδεδεμένη μορφή (CMT1X) αυτής της ασθένειας είναι η δεύτερη πιο κοινή απομυελινωτική μορφή της CMT και είναι αποτέλεσμα πολλαπλών μεταλλάξεων στο GJB1 γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη των χασματοσυνδέσμων κοννεξίνη 32 (Cx32). Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κάποια αποτελεσματική θεραπεία για την CMT1X και ούτε για κάποιο άλλο τύπο της CMT. Κατανοώντας τους μοριακούς μηχανισμούς και εξετάζοντας πιθανές θεραπείες σε προσεγγιστικά μοντέλα ασθενειών θα βοηθήσει την ανάπτυξη μελλοντικών θεραπειών.

Η Cx32 εκφράζεται στα κύτταρα της μυελίνης των περιφερικών νεύρων και σε κύτταρα του ΚΝΣ και σχηματίζει ενδοκυτταρικούς και διακυτταρικούς χασμοσυνδέσμους. Οι χασμοσύνδεσμοι στα Schwann cells σχηματίζονται κυρίως από Cx32, σε αντίθεση με τα ολιγοδενδροκύτταρα που ο σχηματισμός των χασματοσυνδέσμων γίνεται εκτός από την Cx32 και από άλλες κοννεξίνες (όπως Cx47) και συνεισφέρουν κοινά στη λειτουργία. Ενώ ποντίκια με διαγραφή της Cx32 αναπτύσσουν περιφερική νευροπάθεια, ποντίκια με έλλειψη είτε της Cx32 είτε άλλων κοννεξινών αναπτύσσουν ήπιο κεντρικό φαινότυπο, σε αντίθεση με τα διπλά knock out (KO) ποντίκια για Cx32 και Cx47 που αναπτύσσουν σοβαρό φαινότυπο και στο ΚΝΣ. Έχουν ήδη γίνει μοντέλα ποντικών με CMT1X που εκφράζουν τις T55I (από T:θρεονίνη σε I:ισολευκίνη) και R75W (από R:αργινίνη σε W:τρυπτοφάνη) GJB1 μεταλλάξεις των κυττάρων της μυελίνης του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος. Οι μεταλλάξεις της Cx32 διατηρούνται γύρω από τον πυρήνα και αποτυχαίνουν να σχηματίσουν χασμοσυνδέσμους στη μυελίνη, προκαλώντας έτσι προοδευτική περιφερική νευροπάθεια μαζί με ήπιες διαταραχές της μυελίνης του ΚΝΣ. Έχει αποδειχθεί ότι αυτές οι μεταλλάξεις της Cx32 προκαλούν κυρίως απώλειας λειτουργίας και δεν επηρεάζουν άλλες πρωτεΐνες των χασματοσυνδέσμων που εκφράζονται από το ίδιο κύτταρο.

Σ' αυτή τη μελέτη ο σκοπός είναι η εισαγωγή του αγρίου τύπου ανθρώπινου γονιδίου GJB1 σε GJB1 KO ποντίκια, για να εξεταστεί κατά πόσον η ανθρώπινη Cx32 (hCx32) προερχόμενη από το διαγονίδιο μπορεί να αντικαταστήσει και να επαναφέρει τη λειτουργία της Cx32 του ποντικού (mCx32) και να εμποδίσει την εμφάνιση διαταραχών της CMT1X τόσο στο ΠΝΣ όσο στο ΚΝΣ. Ως πρώτο βήμα έγινε η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν την αγρίου τύπου ανθρώπινη Cx32 (hCx32) τόσο στα Schwann cells όσο και στα ολιγοδενδροκύτταρα. Η έκφραση οδηγήθηκε από τον CNP υποκινητή κατά μήκος της πράσινης φθορίζουσας ουσίας EGFP από μια καθοδική αλληλουχία IRES-EGFP. Διασταυρώνοντας τα ποντίκια αυτά με KO ποντίκια παρατηρήθηκε ότι τα διαγονιδιακά ποντίκια εκφράζουν την εξωγενώς αγρίου τύπου ανθρώπινη Cx32 σε Cx32 KO background. Μελετήθηκαν τα ποντίκια για την έκφραση της hCx32 προερχόμενα από το διαγονίδιο, προκειμένου να αποδειχθεί ότι η θέση στην οποία εισήχθηκε είναι σωστή σχηματίζοντας χασμοσυνδέσμους στο ΠΝΣ και στο ΚΝΣ. Η συνέχιση της έρευνας θα καθορίσει εάν η διαγονιδιακή έκφραση της Cx32 μπορεί να σώσει το περιφερικό φαινότυπο στα Cx32 KO ποντίκια αποτρέποντας την παθολογία στα Cx32 KO ποντίκια.

Η μελέτη αυτή θα βοηθήσει στην ανάπτυξη θεραπείας μέσω της αντικατάστασης του γονιδίου της Cx32 για τους CMT1X ασθενείς, παρέχοντας στήριξη σε επιπλέον προσπάθειες προς μελέτες γονιδιακής θεραπείας σε CMT1X μοντέλα ποντικών με αναμενόμενες κλινικές εφαρμογές στο μέλλον.

| | |
|---|-----------|
| Περίληψη..... | 2 |
| 1. Εισαγωγή..... | 6 |
| 1.1 Κληρονομική Νευροπάθεια Charcot Marie Tooth (CMT)..... | 6 |
| 1.2 Κοννεξίνες και Χασμοσύνδεσμοι..... | 9 |
| 1.2.1 Χασμοσύνδεσμοι..... | 9 |
| 1.2.2 Κοννεξίνες..... | 11 |
| i) Κοννεξίνη 32 (Cx32) | 12 |
| ii) Cx32 σχηματίζει χασμοσυνδέσμους στα μυελινωτικά κύτταρα Schwann | 14 |
| iii) Cx32 και η έκφραση της στα ολιγοδενδριτικά κύτταρα..... | 15 |
| 1.3 Η παρούσα μελέτη..... | 17 |
| 1.3.1 Σκοπός..... | 17 |
| 2. Υλικά-Μέθοδοι..... | 18 |
| 2.1 Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που να εκφράζουν την αγρίου τύπου ανθρώπινη Cx32..... | 18 |
| 2.2 Ανάλυση της έκφρασης της διαγονιδιακής ανθρώπινης Cx32 στο ΠΝΣ και ΚΝΣ σε ποντίκια knock out (KO) για Cx32..... | 21 |
| 3. Αποτελέσματα..... | 24 |
| 3.1 Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών..... | 24 |
| 3.2 Ανάλυση του DNA από ουρές ποντικών της πρώτης γενιάς..... | 24 |
| 3.3 Ανοσοαποτύπωση και ανοσοφθορισμός για εκτίμηση των απογόνων της πρώτης γενιάς..... | 25 |
| 3.4 Ανάλυση του DNA από ουρές ποντικών της δεύτερης γενιάς..... | 28 |
| 3.5 Μέτρηση των επιπέδων του mRNA της mCx32 και της hCx32 του προϊόντος της RT-PCR..... | 29 |
| 3.6 Ανάλυση της αγρίου τύπου hCx32 σε Cx32 KO background..... | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 4. Συζήτηση & Συμπεράσματα..... | 35 |
| 5. Ευχαριστίες..... | 37 |
| 6. Βιβλιογραφικές αναφορές..... | 38 |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κληρονομική Νευροπάθεια Charcot Marie Tooth (CMT)

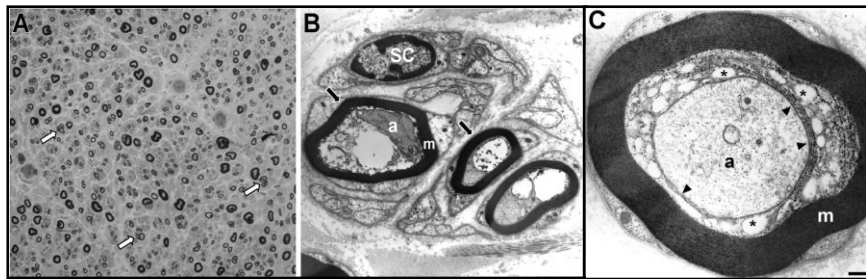
Κληρονομικές νευροπάθειες, γνωστές και ως ασθένεια Charcot Marie Tooth (CMT) είναι από τις πιο κοινές κληρονομικές νευρολογικές διαταραχές. Η CMT είναι μία κοινή νευρομυϊκή πάθηση που πήρε το όνομα της από τρεις γιατρούς τους Jean Martin Charcot, Pierre Marie και Howard Henry Tooth, οι οποίοι αναγνώρισαν πρώτοι την ασθένεια πριν από 100 χρόνια (Wrabetz et al., 2004, Kleopa et al., 2005). Πρόκειται για γενετικές παθήσεις οι οποίες επηρεάζουν τα περιφερειακά νεύρα, τα οποία μεταφέρουν τα κινητικά και τα αισθητικά μηνύματα μεταξύ του εγκεφάλου ή και του νωτιαίου μυελού και του υπόλοιπου σώματος. Τα συμπτώματα έχουν να κάνουν με την προοδευτική αδυναμία και ατροφία συνήθως στο κάτω μέρος των ποδιών και στα χέρια (εικόνα 1), απώλεια της ελαστικότητας των μυών καθώς επίσης και απώλεια αισθητικότητας (Kleopa et al., 2006). Τα προβλήματα κίνησης όμως είναι πολύ πιο σημαντικά από τα αισθητικά προβλήματα.



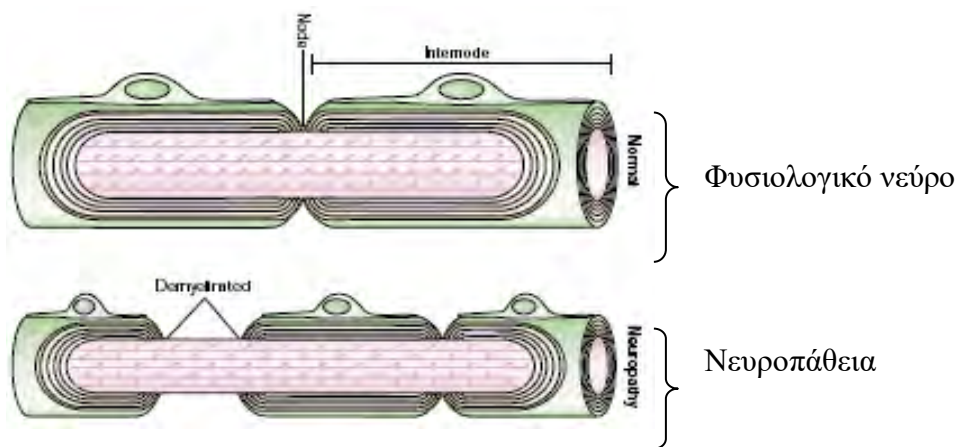
Εικόνα 1: Προοδευτική αδυναμία και ατροφία στα άκρα σε ασθενή 61 ετών. (Kleopas et al., 2006)

Η CMT οφείλεται σε μεταλλάξεις του GJB1 γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη των χασματοσυνδέσμων κοννεξίνη 32 (Cx32). Η Cx32 εκφράζεται στα κύτταρα της μυελίνης (κύτταρα του Schwann στο ΠΝΣ και τα ολιγοδενδριτικά κύτταρα στο ΚΝΣ) όπου σχηματίζει ενδοκυτταρικά και διακυτταρικά χασμοσυνδέσμους.

Χαρακτηριστικό της ασθένειας αυτής είναι η απομυελίνωση των νευρών, αλλά και ο σχετικά πρόωμος εκφυλισμός των αξόνων των νευρών (εικόνα 2 και 3), που αποτελεί την κύρια αιτία των νευρολογικών προβλημάτων (Kleopa et al., 2006). Σε πολλούς ασθενείς εκτός από νευροπάθεια παρουσιάζεται και δυσλειτουργία του εγκεφάλου, λόγω της παρουσίας της πρωτεΐνης των χασματοσυνδέσμων τόσο στα περιφερικά νεύρα όσο και στον εγκέφαλο.



Εικόνα 2: Αποτελέσματα βιοψίας νεύρου από ασθενή με φυλοσύνδετη ασθένεια CMT όπου φαίνεται σε χαμηλή μεγέθυνση (A) και σε ηλεκτρονική μικροσκόπηση (B, C) η παθολογία της απομυελίνωσης και του εκφυλισμού των αξόνων (τροποποιημένη εικόνα από Kleopa et al., 2006).



Εικόνα 3: Σχηματική ανασκόπηση των παθολογικών αλλαγών στη CMT1 νευροπάθεια. Οι ενδιάμεσοι κόμβοι της μυελίνης φαίνεται να χάνονται και αντικαθίστανται από ένα ή περισσότερους κόμβους μικρότερου μήκους και κάποιες από τις περιοχές του άξονα έχουν πάθει απομυελίνωση. Τα νευρικά ινίδια είναι πιο πυκνά πακεταρισμένα και λιγότερο φωσφορυλιωμένα. Αυτές οι αλλαγές συνοδεύονται από προοδευτική απώλεια των αισθητήριων και κινητήριων αξόνων. (τροποποιημένη εικόνα από Suter et al., 2003)

Η CMT τύπου 1 μπορεί να είναι αυτοσωμική ή/και φυλοσύνδετη και χωρίζεται σε υποκατηγορίες (πίνακας 1).

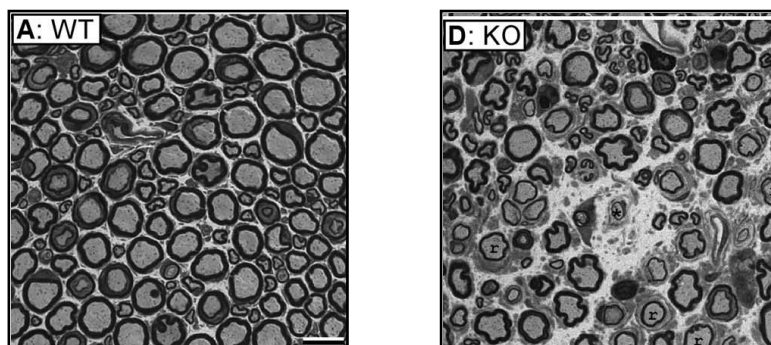
| Ασθένεια | Σύνδεση στο Χρωμόσωμα | Προσβεβλημένο γονίδιο |
|---|-----------------------|-----------------------|
| CMT1 (αυτοσωμική ή φυλοσύνδετη X συνδεόμενη νευροπάθεια) | | |
| HNPP | 17q11 | PMP22 |
| CMT1A | 17q11 | PMP22 |
| CMT1B | 1q22-23 | MPZ |
| CMT1C | 16p13.1-12.3 | LITAF/SIMPLE |
| CMT1 | 10q21 | EGR2 |
| CMT1X | Xq13.1 | GJB1 |

Πίνακας 1: Κληρονομικές νευροπάθειες τύπου CMT1

Στον πίνακα φαίνονται οι τύποι της αυτοσωμικής και φυλοσύνδετης απομυελινωτικής νευροπάθειας CMT1, η θέση του χρωμοσώματος στην οποία βρίσκεται και το γονίδιο που επηρεάζεται. (Wrabetz et al., 2004).

Η X-συνδεδεμένη μορφή της ασθένειας (**CMT1X-φυλοσύνδετη**) αποτελεί τη δεύτερη πιο κοινή μορφή απομυελίνωσης της CMT (μετά το διπλασιασμό του γονιδίου PMP22) και είναι αποτέλεσμα εκατοντάδων μεταλλάξεων στο gap junction beta 1 (GJB1) γονίδιο που βρίσκεται στο X χρωμόσωμα με συχνότητα 7-11% μεταξύ όλων των ασθενών με CMT (Kleopa et al., 2006 α/β). Η CMT1X προκαλεί απομυελινωτική πολυνευροπάθεια επηρεάζοντας έτσι το ΠΝΣ και το ΚΝΣ (εικόνα 4). Η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων στους άντρες είναι μεταξύ 5-20 ετών. Τα κύρια χαρακτηριστικά στους πάσχοντες άρρενες είναι μέτρια έως βαριά κινητική και αισθητική νευροπάθεια, που μπορεί να συνοδεύεται κι από βαρηκοΐα, ενώ οι γυναίκες-φορείς είναι συνήθως χωρίς συμπτώματα (Kleopa et al, 2006 α/β). Σε περιπτώσεις που παρουσιάζονται συμπτώματα στις γυναίκες αυτό γίνεται σε καθυστερημένη ηλικία εμφάνισης. Αυτό οφείλεται στη τυχαία απενεργοποίηση του ενός X χρωμοσώματος στις γυναίκες και προκαλείται μωσαϊκός φαινότυπος (Kleopa et al., 2006). Παθολογικές μεταλλάξεις στο γονίδιο GJB1 ανιχνεύονται σε >90% των ασθενών. Παρόμοια

με τους CMT1X ασθενείς, τα ετερόζυγα Cx32 +/- θηλυκά ποντίκια έχουν λιγότερη απομυελίνωση απ' ότι τα ομόζυγα Cx32 -/- της ίδιας ηλικίας (Scherer et al., 1998).



Εικόνα 4: Εξέλιξη της νευροπάθειας σε διαγονιδιακά ποντίκια KO για την κοννεξίνη 32. Στις λεπτές αυτές τομές του μηριαίου νεύρου, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ποντίκια WT, μεταλλαγμένα ποντίκια που δεν εκφράζουν τη φυσιολογική πρωτεΐνη (KO) εμφανίζουν απομυελίνωση (*) και επαναμυελίνωση (R) (τροποποιημένη εικόνα από Sargiannidou et al.,2009)

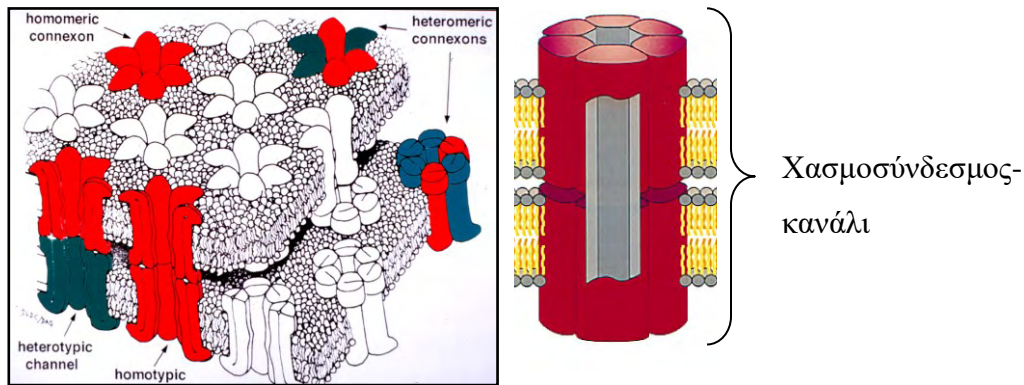
Δεν έχει βρεθεί μέχρι στιγμής κάποια αποτελεσματική θεραπεία για τους ασθενείς με CMT1X αλλά και ούτε για κάποιο από τους άλλους τύπους της CMT. Κατανοώντας τους μοριακούς μηχανισμούς και ελέγχοντας πιθανές θεραπείες σε μοντέλα ζώων είναι πολύ σημαντικό για την ανάπτυξη θεραπειών στο μέλλον.

1.2 Κοννεξίνες και Χασμοσύνδεσμοι:

1.2.1 Χασμοσύνδεσμοι

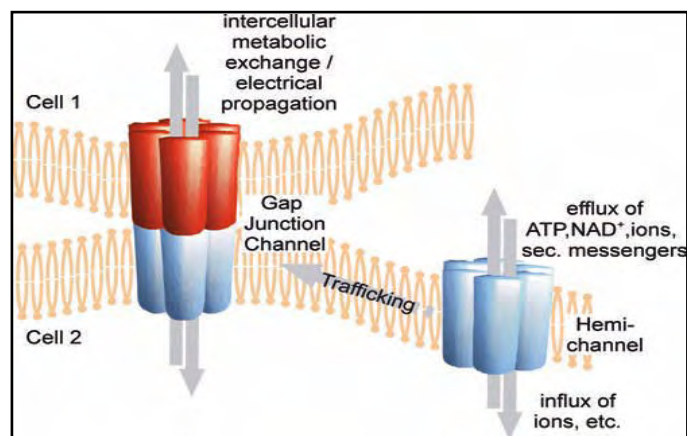
Οι **χασμοσύνδεσμοι** είναι κανάλια στη κυτταρική μεμβράνη που βρίσκονται στους περισσότερους ιστούς, συνήθως μεταξύ διπλανών κυττάρων, αλλά στην περίπτωση του ελύτρου της μυελίνης (myelin sheath) βρίσκονται μεταξύ των στρωμάτων στο ίδιο κύτταρο (Dobrowolski et al., 2009). Οι χασμοσύνδεσμοι έχουν σημαντικό ρόλο στην ηλεκτρική συνδεσιμότητα (electrical connectivity), μεταβολική συμβολή, έλεγχο της ανάπτυξης και κυτταρική διαφοροποίηση. Τα κανάλια σχηματίζονται από δυο κυτταρικούς ημιδιαύλους-κοννεξόνια και βοηθούν στην ένωση και στην επικοινωνία παρακείμενων κυττάρων. Το

κάθε κοννεξόνιο αποτελείται από εξαμερή μόρια κοννεξίνης και σχηματίζουν ένα πόρο-κανάλι (Dobrowolski et al., 2009). Τα κανάλια των χασμοσυνδέσμων μπορούν να περιλαμβάνουν ημιδιαύλους με τις ίδιες κοννεξίνες (ομοτυπικό) ή με διαφορετικές κοννεξίνες (ετεροτυπικό) (εικόνα 5) (Dobrowolski et al., 2009, Kleora et al, 2010).



Εικόνα 5: Ομοτυπικά και ετεροτυπικά κανάλια – χασμοσύνδεσμοι. (Kleora et al, 2010)

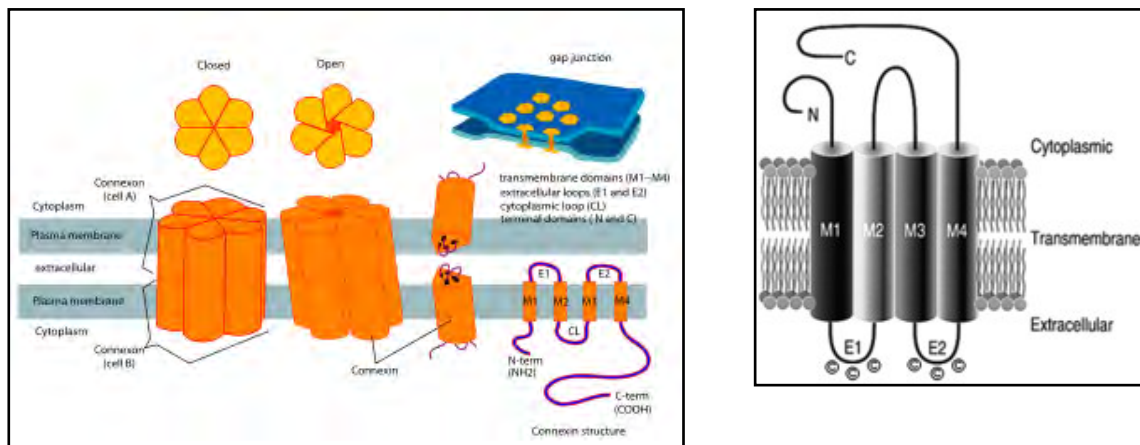
Η διάμετρος του καναλιού είναι γύρω στα 1.2 nm και έτσι μπορούν να περάσουν μόρια μικρότερα των 1000 Da όπως ιόντα, δεύτεροι διαβιβαστές, μεταβολίτες, νουκλεοτίδια ή μικρά πεπτίδια μεταξύ των κυττάρων (εικόνα 6) (Dobrowolski et al., 2009, Kleora et al, 2006, Sargiannidou et al, 2010).



Εικόνα 6: Οι χασμοσύνδεσμοι βοηθούν στην διακυτταρική επικοινωνία επιτρέποντας την ανταλλαγή μικρών μορίων όπως μεταβολίτες ή δεύτερους διαβιβαστές. Τα κοννεξόνια ή ημιδιαύλοι ανοίγουν προσωρινά και βοηθούν στην έξοδο ATP, NAD⁺, ιόντων ή δεύτερων διαβιβαστών και στην είσοδο Ca²⁺ ή άλλων ιόντων (Dobrowolski et al., 2009).

1.2.2 Κοννεξίνες

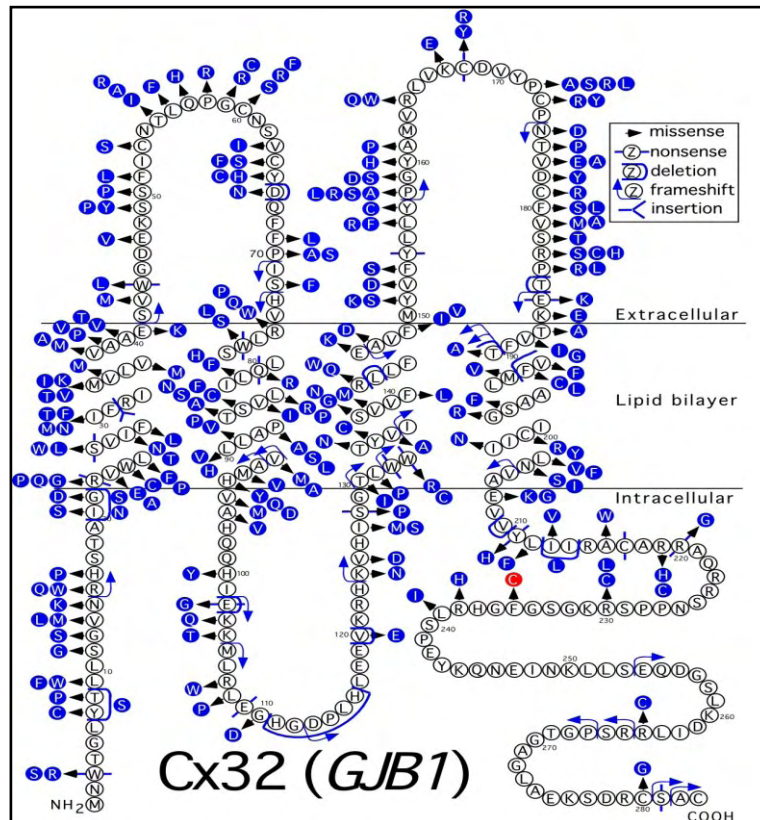
Οι **κοννεξίνες** ανήκουν σε πολυγονιδιακή οικογένεια με πάνω από 20 πρωτεΐνες χασμοσυνδέσμων (Willecke K et al., 2002). Η δομή και η λειτουργία τους είναι συντηρημένη. Το όνομα κάθε πρωτεΐνης προέρχεται από το μοριακό βάρος της κατά την ηλεκτροφόρηση (Kleora et al, 2006). Έχουν ένα κυτταροπλασματικό αμινοτελικό άκρο, 4 διαμεμβρανικές περιοχές (εικόνα 7) με μορφή α έλικας, μία ενδοκυτταρική και 2 εξωκυτταρικές θηλιές και ένα κυτταροπλασματικό καρβοξυτελικό άκρο (Dobrowolski et al., 2009, Bruzzone R et al., 1996). Η τρίτη διαμεμβρανική περιοχή πιθανόν να σχηματίζει το πόρο με τα πολικά κατάλοιπα να σχηματίζουν το τοίχωμα του πόρου (Maeda S et al., 2009). Η ενδοκυτταρική θηλιά και το C-τελικό άκρο είναι τα τμήματα που κάνουν τις κοννεξίνες να διαφέρουν μεταξύ τους (Willecke K et al., 2002). Οι 2 εξωκυτταρικές θηλιές ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κοννεξινών και βοηθούν στο σχηματισμό ετεροτυπικού καναλιού. Η κάθε θηλιά περιλαμβάνει 3 κατάλοιπα κυστεϊνών τα οποία είναι συντηρημένα σε όλες τις κοννεξίνες και ενώνονται με τα αντίστοιχα των κοννεξινών του άλλου ημικαναλιού με δισουλφιδικούς δεσμούς για να σχηματίσουν χασμοσυνδέσμους (Sargiannidou et al., 2010).



Εικόνα 7: Κοννεξίνη και ο σχηματισμός του καναλιού. Επίσης εικονίζεται η δομή της κοννεξίνης με τις τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές.

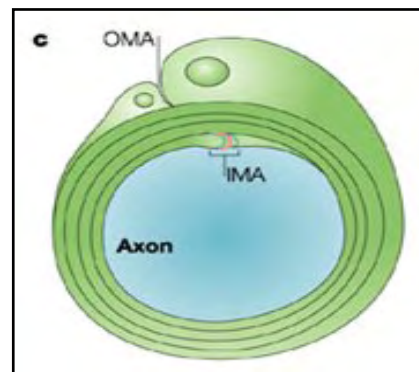
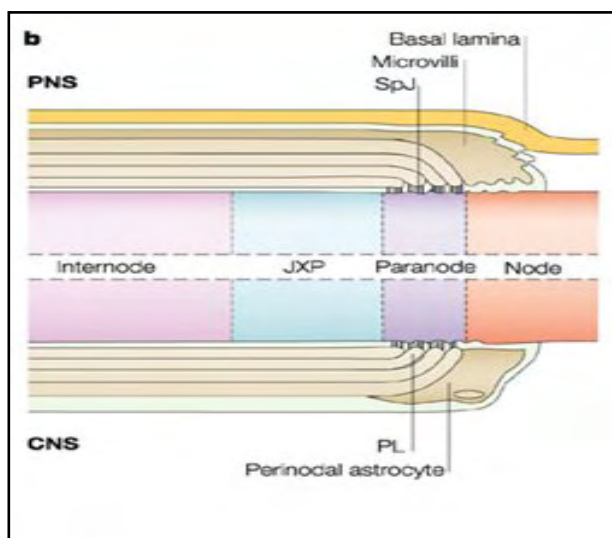
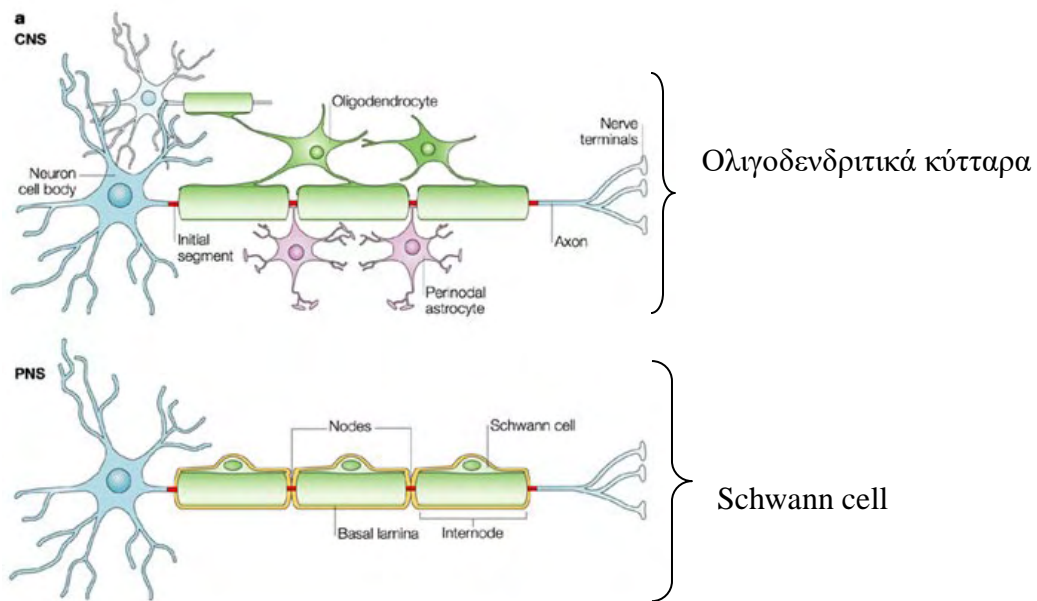
i) Κοννεξίνη 32 (Cx32)

Η Cx32 είναι η πρώτη κοννεξίνη που έχει κλωνοποιηθεί και εκφράζεται από το γονίδιο GJB1 (εικόνα 8). Είναι υψηλά συντηρημένη στα είδη των θηλαστικών. Η αλληλουχία των αμινοξέων της ανθρώπινης Cx32 πρωτεΐνης έχει 98% ομοιότητα με την ανάλογη πρωτεΐνη στα ποντίκια και στους αρουραίους.



Εικόνα 8: Διάγραμμα που δείχνει την δομή της ανθρώπινης πρωτεΐνης Cx32. Επίσης φαίνονται σχηματικά οι μεταλλάξεις της Cx32 (Kleopa et al., 2006 a/b)

Η Cx32 είναι άφθονη στο ήπαρ και εκφράζεται σε πολλούς τύπους κυττάρων συμπεριλαμβάνοντας τα ολιγοδενδροκύτταρα στο ΚΝΣ και τα κύτταρα Schwann στο ΠΝΣ. Τα γλοιακά αυτά κύτταρα είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό της μυελίνης γύρω από τον άξονα του νευρικού κυττάρου (Nave, 2010, Poliak et al., 2003) (εικόνα 9).



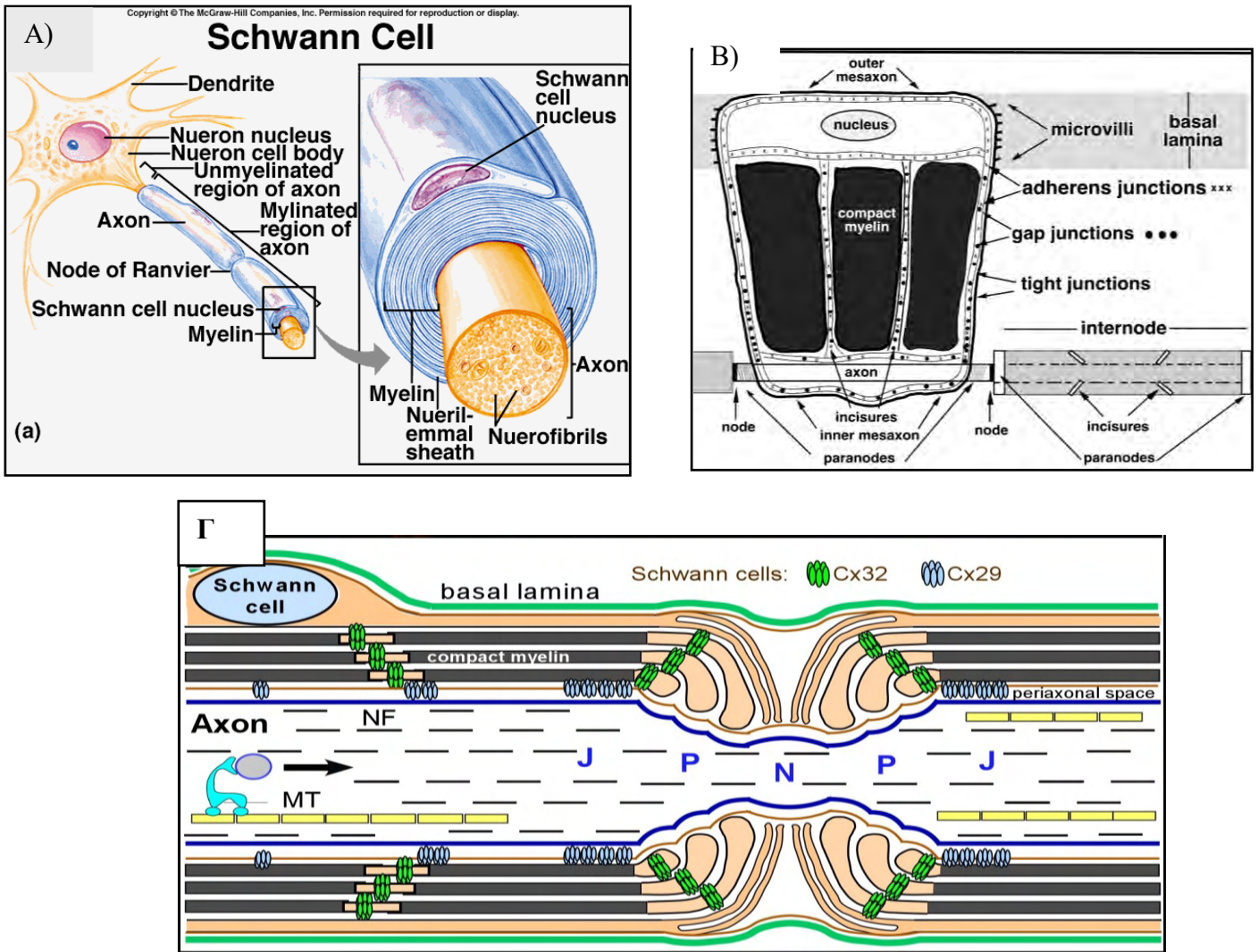
Εικόνα 9: a) Τα μυελινωτικά γλοιακά κύτταρα σχηματίζουν τη μυελίνη (myelin sheath) περιτυλίγοντας με τη μεμβράνη τους αρκετές φορές γύρω από τον άξονα. Η μυελίνη καλύπτει τον άξονα σε μεσοκομβία (internodes) αφήνοντας κενά τα οποία λέγονται nodes of Ranvier. Τα ολιγοδενδριτικά μπορούν να μυελινώσουν διαφορετικούς άξονες και κάποια internodes για κάθε άξονα ενώ τα Schwann κύτταρα μπορούν να μυελινώσουν ένα και μοναδικό internode σε ένα άξονα. b) Σχηματική εγκάρσια τομή όπου φαίνονται ο κόμβος (nodes), οι παρακομβιακές περιοχές (paranodes) και οι εγγύς παρακομβιακές περιοχές (juxtaparanodes). c) Σχηματική απεικόνιση του

μεσαξονίου (inner and outer mesaxon: IMA και OMA αντίστοιχα). (τροποποιημένη εικόνα από Poliak et al., 2003)

Οι χασμοσύνδεσμοι που σχηματίζονται από την Cx32 παίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοιότητα του μυελινωτικού άξονα του νευρικού κυττάρου (Kleopa et al., 2006). Η σημαντικότητα της λειτουργίας των κοννεξινών και ο ενδοκυτταρικός και ο μεταξύ των κυττάρων σχηματισμός των χασματοσυνδέσμων, φαίνεται από τις επιδράσεις των μεταλλάξεων που συμβαίνουν στις κοννεξίνες. Ένας μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων του GJB1 γονιδίου που κωδικοποιεί την Cx32 προκαλεί CMT1X (X-linked Charcot Marie Tooth), (Kleopa et al., 2006). Σε αυτές τις μεταλλάξεις αποδίδονται η περιφερική νευροπάθεια και ο ήπιος φαινότυπος του ΚΝΣ (Shy et al., 2007). Οι περισσότερες μεταλλάξεις προκαλούν απώλεια λειτουργίας λόγω αδυναμίας σχηματισμού λειτουργικών χασμοσυνδέσμων. Αποτελέσματα κάποιων άλλων μεταλλάξεων είναι η μείωση της διαμέτρου του πόρου, εμποδίζεται η διάχυση των δεύτερων διαβιβαστών, το κανάλι είναι λιγότερο σταθερό και η ηλεκτροφυσιολογία του είναι μη φυσιολογική και έτσι οι ημιδιαύλοι έχουν διαρροή (Oh et al., 1997, Rabadan-Diehl et al., 1994, Liang et al., 2005).

ii) Cx32 σχηματίζει χασμοσυνδέσμους στα μυελινωτικά κύτταρα Schwann

Η Cx32 έχει δυνατή έκφραση στις εξωτερικές πλευρές των παρακομβικών περιοχών (paranodes) και των εγκοπών (incisures) της μυελίνης (εικόνα 10B), ενώ η Cx29 εκφράζεται κυρίως στις εσωτερικές πλευρές των paranodes και των εγγύς παρακομβικών περιοχών (juxtaparanodes) στο ΠΝΣ (Sargiannidou et al., 2010) (εικόνα 10Γ). Μοντέλα ζώων της CMT1X έχουν δείξει ότι η έλλειψη της Cx32 στα Schwann κύτταρα προκαλούν απομυελινωτική νευροπάθεια (Kleopa et al., 2006, Scherer et al., 1998).

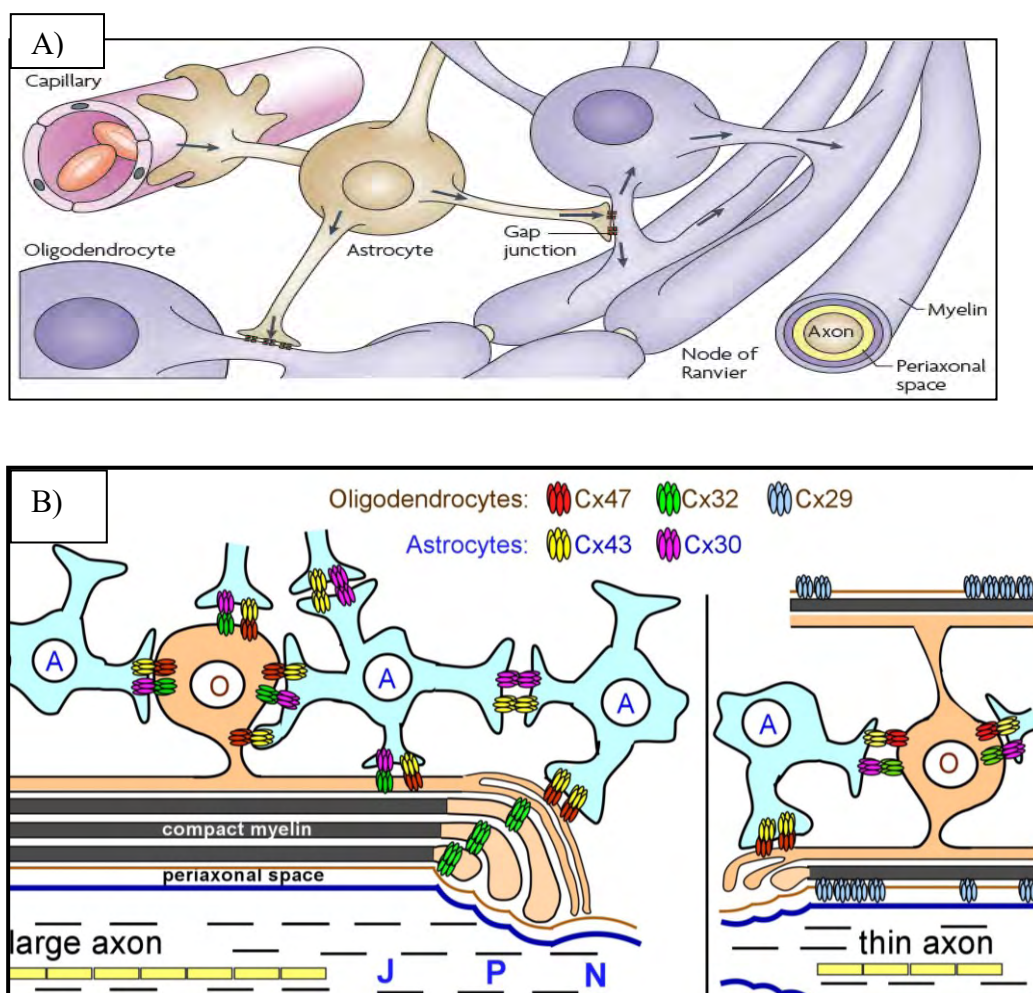


Εικόνα 10: Α) Φαίνεται σχηματικά η δομή ενός νευρικού κυττάρου και η θέση του Schwann cell καθώς και της μυελίνης. Β) Φαίνονται σχηματικά οι εγκοπές (incisures) της μυελίνης, οι παρακομβικές περιοχές (paranodes) και τις εγγύς παρακομβικές περιοχές (juxtaranodes) (Scherer S. S., 1999). Γ) Φαίνεται η έκφραση της Cx32 και της Cx29 στις παρακομβικές περιοχές και στις εγκοπές της μυελίνης. (Sargiannidou et al., 2010)

iii) Cx32 και η έκφραση της στα ολιγοδενδριτικά κύτταρα

Τα γλοιακά κύτταρα του ΚΝΣ είναι τα ολιγοδενδριτικά κύτταρα, τα αστροκύτταρα και τα μικρογλοιακά. Τα ολιγοδενδροκύτταρα εκφράζουν 3 από τις πρωτεΐνες των χασματοσυνδέσμων (Cx32, Cx29, Cx47) (εικόνα 11B) (Kleopas et al., 2004) και συνήθως σχηματίζουν χασμοσυνδέσμους μαζί με τα αστροκύτταρα (Rash et al., 2001). Η Cx32 κυρίως

εκφράζεται κατά μήκος των ιών της μυελίνης της λευκής ουσίας, στις Schmidt-Lanterman incisures, στις paranodes, οριακά του κόμβου του Ranvier και σχηματίζει ενδοκυτταρικά χασμοσυνδέσμους (Kamasawa et al., 2005) αλλά και μεταξύ των ολιγοδενδριτικών κυττάρων και των αστροκυττάρων με άλλες κοννεξίνες (εικόνα 11). Η Cx32 επίσης σχηματίζει αυτόλογους χασμοσυνδέσμους εντός της μη συμπαγούς μυελίνης (Kamasawa et al., 2005). Ασθενείς με CMT1X φαίνεται να έχουν ήπιο φαινότυπο του ΚΝΣ ή είναι ασυμπτωματικοί. Αυτό αποδεικνύεται μέσα από τα προκλητά δυναμικά (evoked potentials) που δείχνουν μια ήπια δυσλειτουργία στους ασθενείς (Nicholson et al,1996, Nicholson et al,1998). Υπάρχουν όμως και κάποιες μεταλλάξεις της Cx32 που συνδέονται με τον κλινικό φαινότυπο του ΚΝΣ και προκαλούν σπαστικότητα, αυξημένα αντανακλαστικά, αταξία ή οξεία αντιστρεπτή εγκεφαλοπάθεια (Kleopa et al, 2002, Kleopa and Scherer, 2006).



Εικόνα 11: A) Φαίνεται σχηματικά η θέση των ολιγοδενδριτικών κυττάρων και των αστροκυττάρων σε ένα νευρικό κύτταρο καθώς και οι χασμοσύνδεσμοι (Nave, 2010). B) Η

έκφραση των διαφόρων κοννεξινών στα ολιγοδενδροκύτταρα και αστροκύτταρα (Sargiannidou et al., 2010).

1.3 Η παρούσα μελέτη

1.3.1 Σκοπός

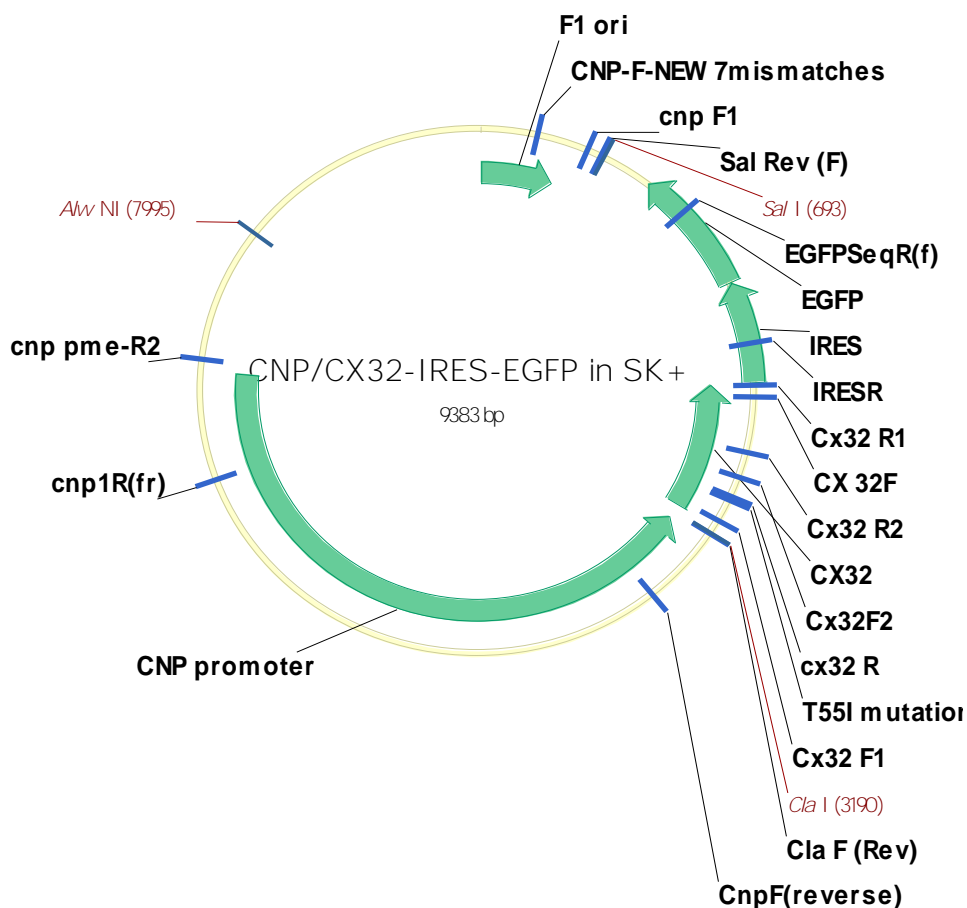
Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που να εκφράζουν την ανθρώπινη Cx32 σε knockout background για την Cx32 (KO hCx32). Θα γίνει σύγκριση και θα εξεταστεί η περιφερική νευροπάθεια των KO Cx32 ποντίκων και των KO hCx32 (ποντικών με την εξωγενώς αγρίου τύπου ανθρώπινη Cx32). Μέσα από αυτή τη μελέτη θα γίνει ανάλυση της έκφρασης της αγρίου τύπου ανθρώπινης Cx32 στα Schwann Cells και στα ολιγοδενδροκύτταρα σε knockout background για την Cx32 (KO hCx32 ποντίκια). Απώτερος σκοπός είναι να αποδειχθεί ότι η αντικατάσταση της φυσιολογικής Cx32 μπορεί να σώσει το φαινότυπο στα ποντίκια Cx32 KO, ως μοντέλα της CMT1X.

2. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

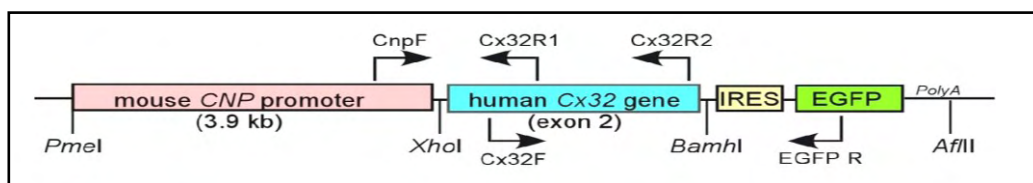
2.1 Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που να εκφράζουν την αγρίου τύπου ανθρώπινη Cx32

- Διαγονιδιακή κατασκευή

Η διαγονιδιακή κατασκευή έγινε χρησιμοποιώντας τον pSLN φορέα ο οποίος περιέχει την ανθρώπινη αλληλουχία του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου GJB1 μαζί με την αλληλουχία του IRES-EGFP. Το κομμάτι αυτό ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές PSLN-CLA-F (5'-TAGGATGCATATGGCGGCCGCCTGCAGCTGGCGCC-3') και PSLN-SAL-R (5'-AGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGT-3'). Αυτό το κομμάτι συνδέθηκε καθοδικά του CNP (2,3 κυκλική νουκλεοτιδική φωσφοδιεστεράση) υποκινητή σε ένα SK+ φορέα και σε θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού ClaI και SalI (εικόνα 12). Ο 3,9 Kb Cnp υποκινητής (δωρεά από Dr. Vittorio Gallo, Children's National Medical Center) του ποντικού έχει δείξει ότι οδηγεί την έκφραση του lacZ (Gravel et al., 1998) και του EGFP (Yuan et al., 2002) τόσο στα Schwann Cells όσο και στα ολιγοδενδροκύτταρα. Η σωστή αλληλουχία του γονιδίου εξετάστηκε με ανάλυση αλληλούχισης. Το DNA απομονώθηκε (DNA extraction) χρησιμοποιώντας Qiagen MaxiPrep kit ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρείας. Η διαγονιδιακή κασέτα (εικόνα 8) απελευθερώθηκε από τις αλληλουχίες του φορέα με πέψη με ένζυμα περιορισμού SalI και AlwNI.



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση της πλασμιδιακής κατασκευής



Εικόνα 13: Η δομή της διαγονιδιακής κατασκευής χρησιμοποιείται για την έκφραση της Cx32 σε κύτταρα μυελίνης του ΚΝΣ και ΠΝΣ. Ο Cnp υποκινητής των 3,9 Kb είναι ενωμένος ανοδικά του εξονίου 2 (που περιέχει το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης) του ανθρώπινου GJB1 γονιδίου. Η IRES – EGFP αλληλουχία τοποθετείται καθοδικά του εξονίου 2 για να μπορεί να γίνει συνέκφραση του EGFP.

Το κομμάτι αυτό απομονώθηκε, καθαρίστηκε και έγινε μικροένεση σε αρσενικούς προπυρήνες γονιμοποιημένων ωοκυττάρων. Η διαδικασία αυτή γίνεται ακολουθώντας συγκεκριμένα πρωτόκολλα της Ζωικής Μονάδας του Ινστιτούτου Νευρολογίας και

Γενετικής. Η ταυτοποίηση των διαγονιδιακών ποντικών ανιχνεύεται με PCR του DNA των ποντικών μετά από απομόνωση του από ένα κομμάτι 0,5 cm της ουράς των ποντικών. Κατά τη διαδικασία αυτή έγινε λύση των ουρών με παρουσία πρωτεΐνάσης K και επώαση τους καθ' όλη τη διάρκεια της νύκτας στους 55°C. Έπειτα από απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης στους 85 °C, έγινε PCR χρησιμοποιώντας 2 ζευγάρια εκκινητών. Το πρώτο ζευγάρι είναι Cnp1F (5'-TGTGGCTTTGCCCATACATA-3') και Cx32R (5'-CGCTGTTGCAGCCAGGCTGG-3') και το δεύτερο Cx32 F (5'-AGCTGCTGAGTGAGCAGGATGG-3') EGFP R1 (5'-GCTGAACTTGTGGCCGTTTA-3') με 732bp και 785bp PCR προϊόν αντίστοιχα (94°C X 5 min, 40 κύκλους στους 94°C X 30 s, 56°C X 30 s, 72°C X 30 s και μετά 72°C X 7 min). Οι απόγονοι εκτιμήθηκαν ανάλογα με την έκφραση του EGFP με ανοσοϊστοχημεία και ανοσοαποτύπωση του νωτιαίου μυελού (ΚΝΣ) και του ισχιακού νεύρου (ΠΝΣ). Οι διαγονιδιακές σειρές με την καλύτερη έκφραση του EGFP από την ανάλυση ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης, διασταυρώθηκαν περαιτέρω για να αυξηθεί ο αριθμός των ποντικών για το πείραμα.

▪ Η παραγωγή των διαγονιδιακών σειρών σε KO Cx32 background

Προκειμένου να γίνει δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών σε GJB1 KO background, τα αρσενικά διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν το διαγονίδιο διασταυρώθηκαν με θηλυκά GJB1 KO τα οποία ήταν διαθέσιμα στο εργαστήριο μας από το European Mouse Mutant Archive, Monterotondo, Ιταλία (η δημιουργία των ποντικών έγινε από τον Prof. Klaus Willecke, University of Bonn). Σ' αυτά τα ποντίκια το neo γονίδιο εισάχθηκε εντός του εξονίου 2 του GJB1 γονιδίου.

Οι γενότυποι των απογόνων καθορίστηκαν χρησιμοποιώντας triple PCR με ειδικούς εκκινητές του διαγονιδίου, καθώς και εκκινητές του neo γονιδίου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι: Exon1F (5'-GACCACTCCCCCTACACAGA-3'), NeoR2 (5'-CTCGTCCTGCAGTTCATTC-3') και Cx32R (5'-CGCTGTTGCAGCCAGGCTGG-3') (94°C X 5 min, 35 κύκλους of 94°C X 30 s, 56°C X 30 s, 72°C X 30 s και μετά 72°C X 7 min) με προϊόντα 721 και 586 bp αντίστοιχα.

- **Αντίστροφη μεταγραφή PCR (Reverse Transcription PCR)**

Το ολικό RNA απομονώθηκε από παγωμένους ιστούς εγκεφάλου χρησιμοποιώντας QIASOL αντιδραστήριο ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρείας Qiagen, RNA purification Using the Rneasy Lipid Tissue Mini Kit. Έγινε χρήση DNase I για να απομακρυνθούν οποιαδήποτε υπολείμματα από DNA και το RNA μετρήθηκε με φασματομετρία. Το RNA χρησιμοποιήθηκε για σύνθεση του cDNA με αντιδραστήρια της Applied Biosystems. Το cDNA ενισχύθηκε με PCR με τους εκκινητές RT CX32 F (5'-TGAGGCAGGATGAACTGGACAGGT-3') και RT CX32 R (5'-CACGAAGCAGTCCACTGT-3') που ενισχύουν την ενδογενώς-ποντικού και την εξωγενώς-διαγονιδιακή ανθρώπινη Cx32, παίρνοντας 553 bp PCR προϊόν (94°C _ 5 min, 40 κύκλους για 94°C _ 30 s, 60°C _ 30 s, 72°C _ 30 s και μετά 72°C _ 7 min). Στη συνέχεια γίνεται πέψη του προϊόντος της (RT)-PCR με *MscI* (που κόβει ειδικά την ανθρώπινη Cx32) ή/και με *HhaI* (που κόβει ειδικά την Cx32 του ποντικού) και γίνεται δυνατή η μέτρηση και σύγκριση των επιπέδων του mRNA της ενδογενώς/ποντικού και της διαγονιδιακής/ανθρώπινης Cx32.

2.2 Ανάλυση της έκφρασης της διαγονιδιακής ανθρώπινης Cx32 (hCx32) στο ΠΝΣ και ΚΝΣ σε ποντίκια χωρίς ενδογενώς Cx32 (mCx32)

Τα ισχιακά νεύρα και ο νωτιαίος μυελός των ενήλικων ποντικών εξετάστηκαν με ανοσοαποτύπωση και ανοσοφθορισμό.

- **Ανοσοαποτύπωση**

Τα ποντίκια ύστερα από ήπια αναισθησία με avertin θυσιάστηκαν με αυχενική εξάρθρωση. Τα δείγματα νωτιαίου μυελού, ισχιακού νεύρου και εγκεφάλου που συλλέχτηκαν διαλύθηκαν σε RIPA αντιδραστήριο (10 mM sodium phosphate pH 7.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM sodium fluoride, 1% sodium deoxycholate και 0,1% SDS) που περιέχει και μίγμα αναστολέων πρωτεασών.

Στη συνέχεια για τη λύση των ιστών χρησιμοποιούνται υπέρηχοι (sonicator) και για την ποσοτική τους ανάλυση φασματοφωτομετρία. Οι πρωτεΐνες από τα εκχυλίσματα των ιστών διαχωρίστηκαν με βάση το μοριακό τους βάρος έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης. Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Hybond-C extra membrane - GE Healthcare Bio Science) χρησιμοποιώντας τη semidry transfer unit. Οι μη ειδικές θέσεις της μεμβράνης μπλοκάρονται με προσθήκη 5% άπαχου γάλακτος σε Tris Buffered Saline (TBS) που περιέχει 0,1% Tween 20 (TBS-T) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη στη συνέχεια επώάζεται με αντίσωμα έναντι του EGFP (1:8000 αραίωση, πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη) ή με αντιγόνο κουνελιού έναντι της Cx32 (1:10000) μέσα σε 5% γάλα TBS-T, στους 4°C καθ' όλη τη διάρκεια της νύκτας. Για να μειωθεί η μη ειδική σύνδεση ο αντιγόνος του κουνελιού έναντι της Cx32 επώάζεται για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου πριν την ανοσοαποτύπωση, με σκόνη που προέρχεται από αφυδατωμένους ιστούς εγκεφάλου και ήπατος, από Gjb1 KO ποντίκια. Την επόμενη μέρα η μεμβράνη επώάζεται με δευτερεύων αντίσωμα κουνελιού συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (HRP) μέσα σε 5% γάλα TBS-T, για 1 ώρα. Στη μεμβράνη τοποθετείται υπόστρωμα υπεροξειδάσης για την αντίδραση χημειοφωταύγειας (ECL Plus). Στη συνέχεια η μεμβράνη εκθέτεται σε φωτογραφικό φιλμ και εμφανίζεται σε σκοτεινό θάλαμο.

▪ **Ανοσοφθορισμός**

Προετοιμασία δειγμάτων:

Σε ποντίκια τεσσάρων μηνών από όλους τους γενότυπους, έγινε αναισθησία με Avertin και στη συνέχεια ενδοκαρδιακή διάχυση με 4% καθαρή παραφορμαλδεΐδη (PFA) σε 0,1 M PBS. Έγινε συλλογή νωπιαίου μυελού και ισχιακών νεύρων τα οποία μονιμοποιούνται για 30 λεπτά σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης. Για την κρυοπροστασία των δειγμάτων νωπιαίου μυελού έγινε εμβάπτιση σε 20% σουκρόζη καθ' όλη τη διάρκεια της νύκτας. Ακολούθως τα δείγματα παγώνονται σε παγωμένη ακετόνη με ξηρό πάγο και τεμαχίζονται στον κρυοστάτη. Τομές 10 μm πάχους τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι νευρικές ίνες των ισχιακών νεύρων διαχωρίζονται πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες κάτω από το μικροσκόπιο.

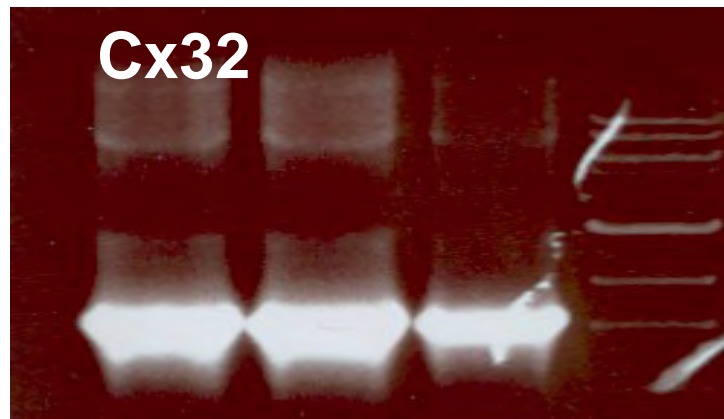
Μέθοδος ανοσοφθορισμού

Οι παγωμένοι ιστοί βυθίστηκαν σε ακετόνη για 10 λεπτά στους -20 °C με σκοπό την αύξηση της διαπερατότητας τους. Επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με 5% βόειο ορό (Bovine Serum Albumin - BSA) που περιέχει 0,5% Triton-X για 1 ώρα. Τα πρώτα αντισώματα αραιώθηκαν σε βόειο ορό και επώαστηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της νύκτας στους 4 °C. Χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της Cx32 (Zymed, με αραιώση 1:50) και πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της EGFP (Invitrogen, με αραιώση 1:2000). Οι τομές πλύθηκαν για να απομακρυνθεί η περίσσεια αντισωμάτων, τα οποία δεν συνδέθηκαν ειδικά. Ακολούθως επώαστηκαν σε δευτερεύον αντίσωμα συζευγμένο με φθορίζουσα ουσία FITC ή TRITC για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η οπτικοποίηση των πυρήνων των κυττάρων έγινε με χρήση του DAPI (4', 6',- diamidino- 2- phenylindole). Οι τομές καλύφθηκαν με καλυπτρίδες που συγκρατούνται με το Dako Fluorescence mounting medium. Τέλος οι εικόνες φωτογραφήθηκαν με Zeiss μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Zeiss Axionvision software.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών

Ο αρχικός μας στόχος ήταν η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που να εκφράζουν την αγρίου τύπου ανθρώπινη Cx32. Για να μπορεί να γίνει η μικροένεση της διαγονιδιακής κασέτας έπρεπε ως πρώτο βήμα να γίνει ενίσχυση με PCR του εξονίου 2 της ανθρώπινης Cx32 του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του *GJB1* (εικόνα 14) και ανάλυση της σωστής αλληλουχίας της ανθρώπινης Cx32. Αφού η ανάλυση έδειξε η αλληλουχία ήταν σωστή ακολούθησε πέψη του πλασμιδίου για την αφαίρεση του φορέα και τη μετατροπή του σε γραμμική μορφή πριν την μικροένεση.



Εικόνα 14: PCR πριν την αλληλούχιση

3.2 Ανάλυση του DNA από ουρές ποντικών της πρώτης γενιάς

Η ταυτοποίηση των διαγονιδιακών ποντικών της πρώτης γενιάς έγινε με PCR της ουράς τους. Χρησιμοποιήθηκαν 2 ζευγάρια εκκινητών όπου το πρώτο ζευγάρι είναι Cnp1F και Cx32R και το δεύτερο Cx32F και EGFP R1 με 732bp και 785bp PCR προϊόν αντίστοιχα. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε το πρώτο ζεύγος των εκκινητών είναι η παρουσία του Cnp υποκινητή που θα μας δείξει τη διαγονιδιακή Cx32. Το δεύτερο ζεύγος εκκινητών ωστόσο χρησιμοποιήθηκε για την επαλήθευση του πρώτου

PCR. Χρησιμοποιήθηκαν 9 δείγματα ουρών ποντικών της πρώτης γενιάς (εικόνα 15). Τα δείγματα 1-8 είναι απόγονοι του δείγματος με αριθμό 9 (founder). Το δείγμα με αριθμό 10 είναι ο θετικός μάρτυρας. Τα ίδια δείγματα χρησιμοποιήθηκαν και για το άλλο ζεύγος εκκινητών. Με το πρώτο ζεύγος εκκινητών CNPF-Cx32R (732bp προϊόν) τα δείγματα 1,4 και 7 έδειξαν ότι είναι διαγονιδιακά. Με το δεύτερο ζεύγος εκκινητών Cx32F-EGFP R1 (785bp προϊόν) πιστοποιείται ότι όντως τα δείγματα 1,4 και 7 είναι διαγονιδιακά ενώ τα 2,3,5,6 και 8 δεν είναι διαγονιδιακά γιατί δεν παρατηρείται ζώνη.



Εικόνα 15: PCR ανάλυση από DNA ποντικών πρώτης γενιάς.

3.3 Ανοσοαποτύπωση και ανοσοφθορισμός για εκτίμηση των απογόνων της πρώτης γενιάς

▪ Ανοσοαποτύπωση

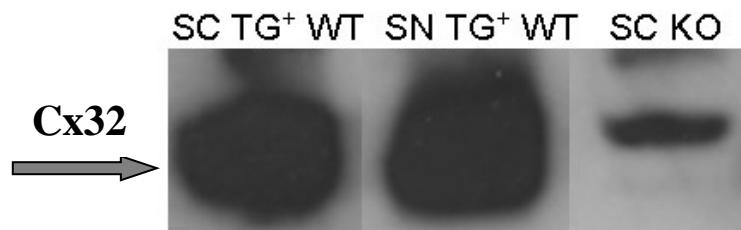
Οι απόγονοι της πρώτης γενιάς εκτιμήθηκαν ανάλογα με την έκφραση του EGFP και Cx32 με ανοσοαποτύπωση και ανοσοφθορισμό του νωτιαίου μυελού (για το ΚΝΣ) και του ισχιακού νεύρου (για το ΠΝΣ). Ο θετικός μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν δείγμα νωτιαίου μυελού από διαγονιδιακό ποντίκι με μετάλλαξη της Cx32 R75W σε KO background (TG⁺ KO). Επίσης χρησιμοποιήθηκε νωτιαίος μυελός από Cx32KO ποντίκια (SC KO), νωτιαίος μυελός και ισχιακό νεύρο από διαγονιδιακά ποντίκια σε WT background (SC TG⁺ WT και SN TG⁺ WT). Παρατηρείται σημαντική έκφραση της EGFP στο SC TG⁺ WT και στο SN TG⁺ WT. Στο SC KO δείγμα ως KO που είναι δεν βλέπουμε ζώνη για την EGFP (εικόνα 16Α). Τα ίδια δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για

την έκφραση της Cx32 και τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 16B, με χαρακτηριστική απώλεια έκφρασης της Cx32 στο SC KO δείγμα.

A)



B)

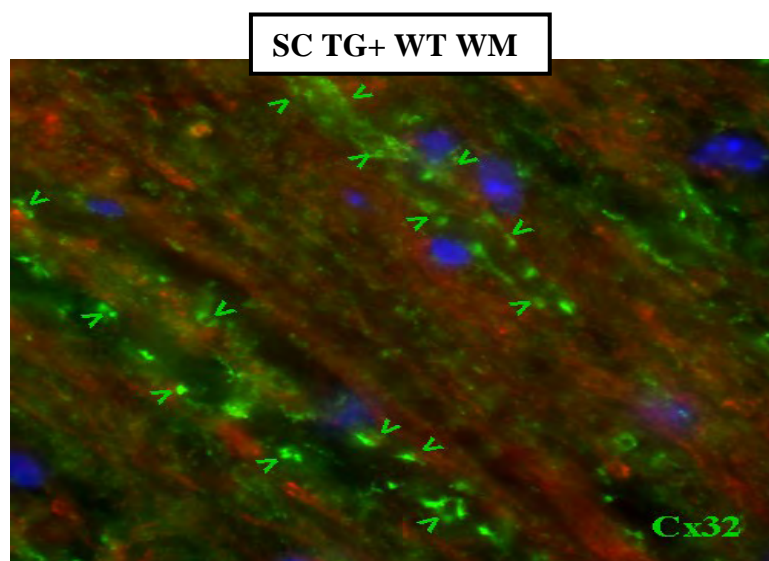


Εικόνα 16: A) Ανοσοαποτύπωση με τη χρήση του αντισώματος EGFP και B) με χρήση του αντισώματος Cx32

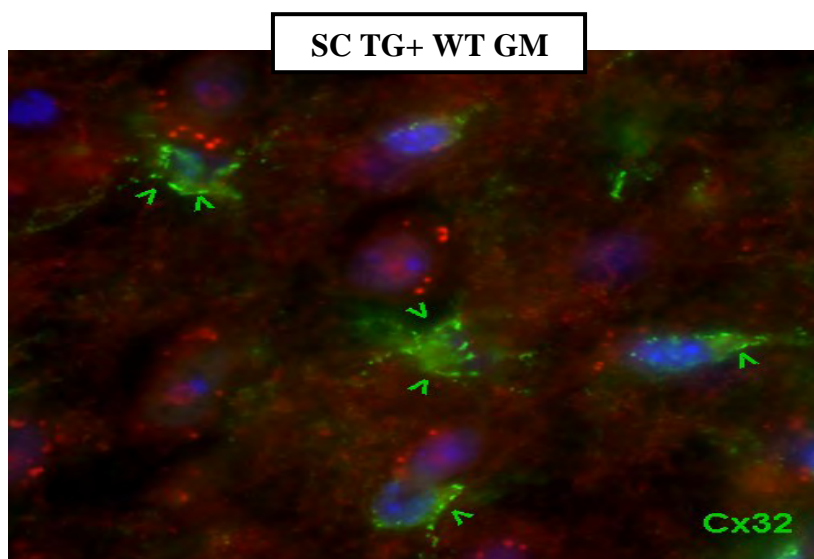
▪ Ανοσοφθορισμός

Για να εξακριβωθεί που ακριβώς εκφράζεται η Cx32 έγινε ανοσοφθορισμός σε τομές νωτιαίου μυελού (ΚΝΣ) και διαχωρισμένων νευρικών ινών ισχιακού νεύρου (ΠΝΣ). Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από διαγονιδιακά ποντίκια σε υπόβαθρο αγρίου τύπου (TG⁺ WT). Στα ποντίκια αυτά υπάρχει έκφραση της Cx32 αλλά δεν μπορεί να γίνει διαχωρισμός μεταξύ της ενδογενούς και εξωγενούς Cx32. Η ανάλυση έδειξε ότι στο ΚΝΣ εκφράζεται η Cx32 κατά μήκος των μεγάλων εμύλων αξόνων στη λευκή ουσία (εικόνα 17A, επιμήκης τομή) ενώ στη φαιά ουσία η Cx32 εκφράζεται στα κυτταρικά σώματα των ολιγοδενδροκυττάρων (εικόνα 17B, εγκάρσια τομή). Η Cx32 στο ΠΝΣ εκφράζεται στις παρακομβιακές περιοχές (paranodes) των Schwann cells (εικόνα 17Γ).

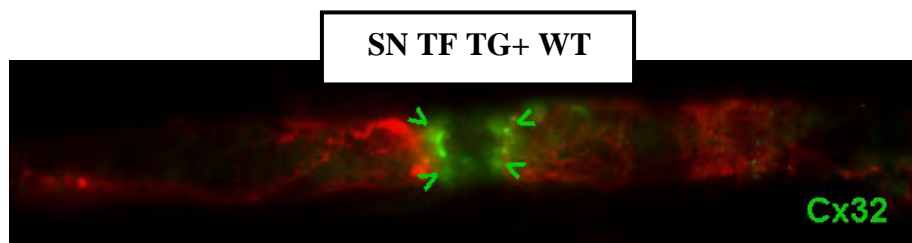
A)



B)



Γ)



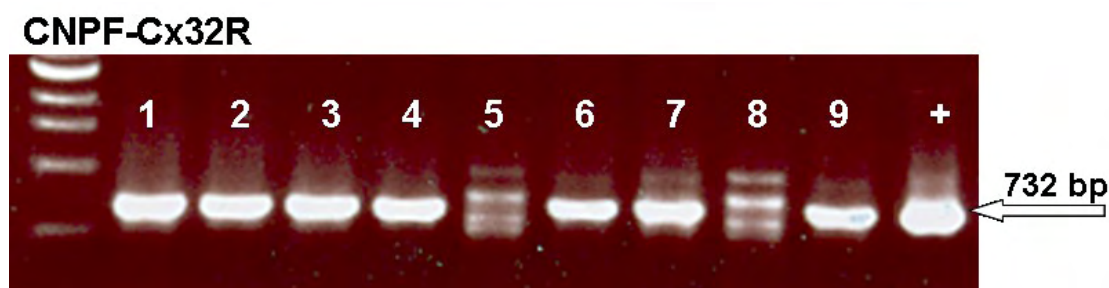
Εικόνα 17: Ανοσοφθορισμός με χρήση αντισώματος Cx32 όπως φαίνεται με πράσινο χρώμα.

3.4 Ανάλυση του DNA από ουρές ποντικών της δεύτερης γενιάς

Οι διαγονιδιακές σειρές με την καλύτερη έκφραση του EGFP όπως προκύπτει από την ανάλυση ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης, διασταυρώθηκαν περαιτέρω με Cx32 KO ποντίκια (δεύτερη γενιά). Σε ένα όμως αγρίου τύπου background, με καμία από τις 2 μεθόδους δεν μπορεί να γίνει διαχωρισμός μεταξύ της ενδογενούς/ποντικού Cx32 και της εξωγενούς/ανθρώπινης Cx32. Η αποτίμηση της ποσοτικής έκφρασης και της σωστής θέσης της εξωγενούς Cx32 μπορεί να γίνει μόνο μετά την έκφραση του διαγονιδίου σε Cx32 KO background.

Έγινε Triple PCR με χρήση 3 διαφορετικών ζευγαριών εκκινητών. Για παράδειγμα στην εικόνα 18 φαίνεται η ανάλυση 9 δειγμάτων ουρών για το κάθε ζεύγος εκκινητών. Με το πρώτο ζεύγος εκκινητών CNPF-Cx32R, γίνεται ανάλυση της εξωγενούς Cx32. Τα ποντίκια 1-4, 6-7, 9 είναι θετικά δίνοντας PCR προϊόν 732 bp. Το δεύτερο ζεύγος εκκινητών EXON1F-NEOR2 χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση των KO ποντικών. Όλα τα ποντίκια είναι θετικά με PCR προϊόν 721 bp. Τα θηλυκά ποντίκια 1-4 που δίνουν ζώνη για το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών πρέπει να ταυτοποιηθούν ως ομόζυγα (X^+X^+) ή ως ετερόζυγα (X^+X^-). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το τρίτο ζεύγος εκκινητών EXON1F-Cx32R με PCR προϊόν 586 bp. Στα θηλυκά ποντίκια η ζώνη μόνο με EXON1F-NEOR2 υποδηλώνει ότι είναι ομόζυγο (X^+X^+) ενώ ζώνη με EXON1F-NEOR2 και με EXON1F-Cx32R υποδηλώνει ότι είναι ετερόζυγο (X^+X^-). Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι τα δείγματα 1-4 είναι X^+X^- θηλυκά ενώ τα 5-7 είναι αρσενικά KO και τα 8-9 είναι X^+X^- θηλυκά.

A)



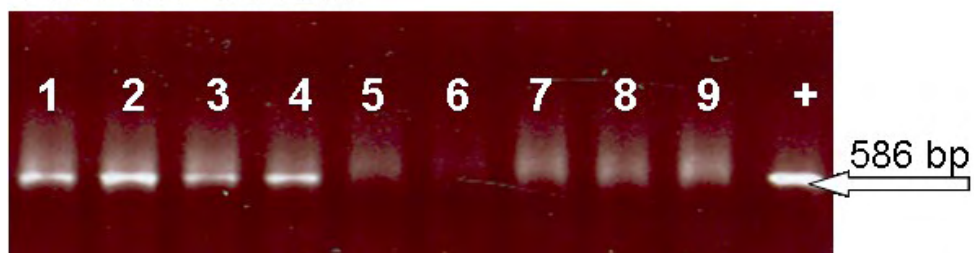
B)

EXON1F-NEOR2



Γ)

EXON1F-Cx32R

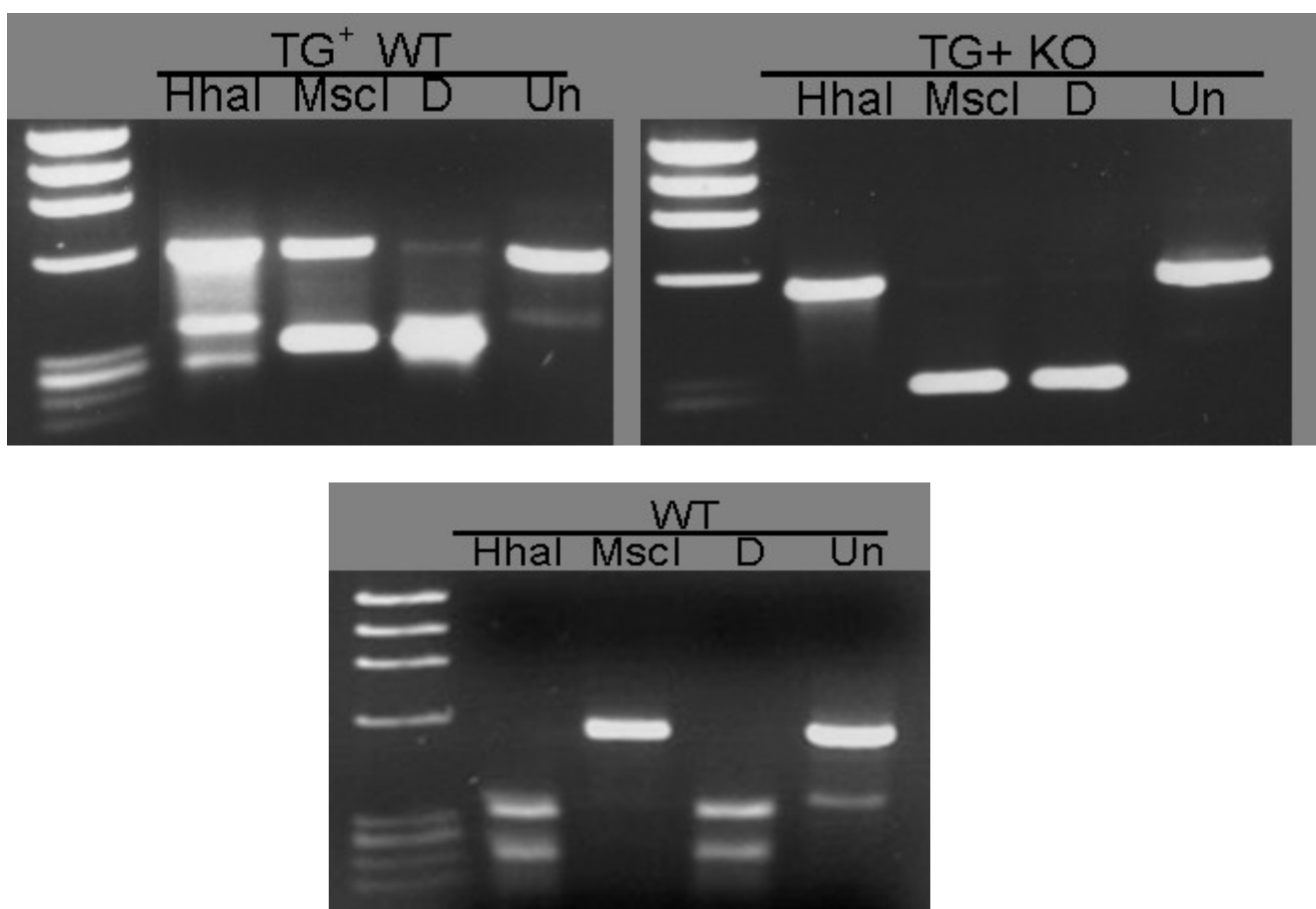


Εικόνα 18: Triple PCR με 3 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για ανάλυση του γενοτύπου των ποντικών.

3.5 Μέτρηση των επιπέδων του mRNA της mCx32 και της hCx32 του προϊόντος της RT-PCR

Μετά την απομόνωση RNA από ιστούς εγκεφάλου, έγινε αντίστροφη μεταγραφή και σύνθεση του cDNA. Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης της Cx32 ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές RT-Cx32F και RT-Cx32R δίνοντας 553 bp PCR προϊόν. Το προϊόν της PCR κόπηκε με δύο ένζυμα περιορισμού, με το ένζυμο *MscI* που κόβει ειδικά την ανθρώπινη Cx32 ή/και με το ένζυμο *HhaI* που κόβει ειδικά την Cx32 του ποντικού. Η μέθοδος αυτή δίνει τη δυνατότητα μέτρησης των επιπέδων του mRNA της ενδογενούς/ποντικού και της διαγονιδιακής/ανθρώπινης Cx32 (εικόνα 19). Στο δείγμα από ποντίκι σε WT background (TG⁺ WT), φαίνεται η πέψη και της διαγονιδιακής αλλά και της ενδογενούς Cx32. Πέψη με το *HhaI* δίνει 3 ζώνες. Αυτό σημαίνει ότι το ένζυμο περιορισμού κόβει την ενδογενούς Cx32 και δίνει 2 ζώνες 230bp

και 323bp και η άλλη ζώνη είναι της διαγονιδιακής Cx32 με 530bp (που δεν κόβεται). Η πέψη με το MscI δίνει πάλι 3 ζώνες, όπου η μία είναι η ενδογενώς Cx32 (που δεν κόβεται) και οι άλλες 2 που φαίνονται σαν μία, με μέγεθος 273bp και 280bp, είναι η διαγονιδιακή Cx32. Το D (double) είναι πέψη και με τα 2 ένζυμα περιορισμού HhaI και MscI. Το Un (uncut) αντιπροσωπεύει το μέγεθος του άκοπου προϊόντος της PCR χωρίς κανένα ένζυμο περιορισμού. Το άλλο δείγμα που χρησιμοποιήθηκε είναι διαγονιδιακό ποντίκι σε KO background (TG+ KO), το οποίο έχει μόνο τη διαγονιδιακή Cx32, που κόβεται μόνο από το ένζυμο MscI. Επίσης χρησιμοποιείται και ένα φυσιολογικό ποντίκι (WT) ως δείγμα όπου μόνο το HhaI ένζυμο μπορεί να κόψει. Η ανάλυση αυτή δείχνει ότι τα διαγονιδιακά ποντίκια σε WT υπόβαθρο έχουν δύο με τρεις φορές πιο υψηλά επίπεδα εξωγενούς Cx32 mRNA απ' ότι ενδογενή mCx32.



Εικόνα 19: Πέψη με ένζυμο περιορισμού HhaI (που κόβει τη διαγονιδιακή/ανθρώπινη Cx32) και MscI (που κόβει την ενδογενώς/ποντικού Cx32).

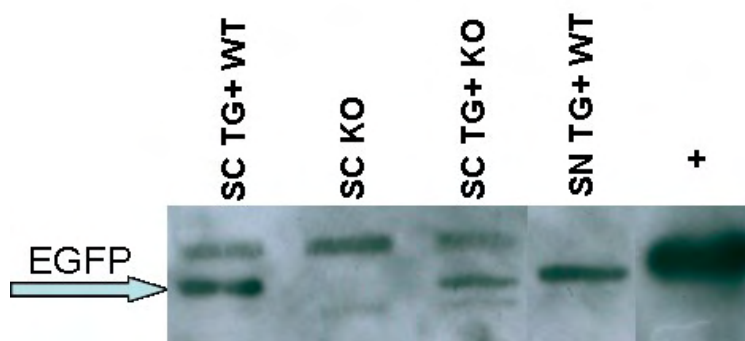
3.6 Ανάλυση της αγρίου τύπου hCx32 σε Cx32 KO background

Στη προσπάθεια να αποδειχθεί ότι η εξωγενώς hCx32 εκφράζεται σε Cx32 KO background έγινε μελέτη εκχυλισμάτων ισχιακού νεύρου και νωτιαίου μυελού. Η μελέτη αυτή έγινε με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντιγόρο κουνελιού έναντι της Cx32 και με αντίσωμα έναντι της EGFP. Επίσης έγινε ανοσοφθορισμός με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της Cx32 και με αντίσωμα έναντι της EGFP και σε ισχιακό νεύρο και νωτιαίο μυελό.

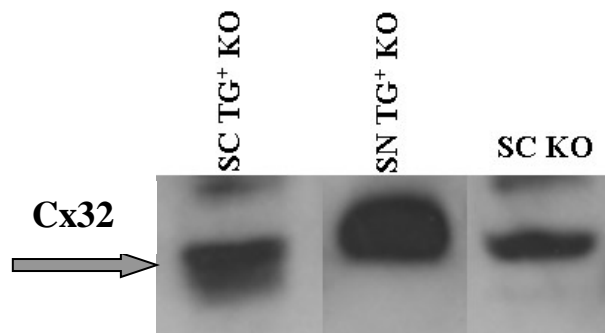
▪ Ανοσοαποτύπωση

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοαποτύπωση ήταν με τη σειρά που φαίνονται στο φιλμ: νωτιαίος μυελός διαγονιδιακού ποντικού σε WT background (SC TG⁺ WT), νωτιαίος μυελός KO ποντικών (SC KO), νωτιαίος μυελός διαγονιδιακού ποντικού σε KO background (SC TG⁺ KO), νωτιαίος μυελός και ισχιακό νεύρο θηλυκών και αρσενικών TG σε WT background ποντικών. Ο θετικός μάρτυρας ήταν HeLa cells επιμολυσμένα με φορέα για την έκφραση του EGFP. Παρατηρείται ότι EGFP έχουμε σε όλα τα δείγματα εκτός από το SC KO, όπως αναμένεται αφού το ποντίκι αυτό δεν έχει ούτε την ενδογενώς αλλά ούτε την εξωγενώς Cx32 (εικόνα 20A). Τα ίδια δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση της Cx32, όπου παρατηρείται πιο έντονη η έκφραση της Cx32 στο ΚΝΣ παρά στο ΠΝΣ (εικόνα 20B).

A)



B)

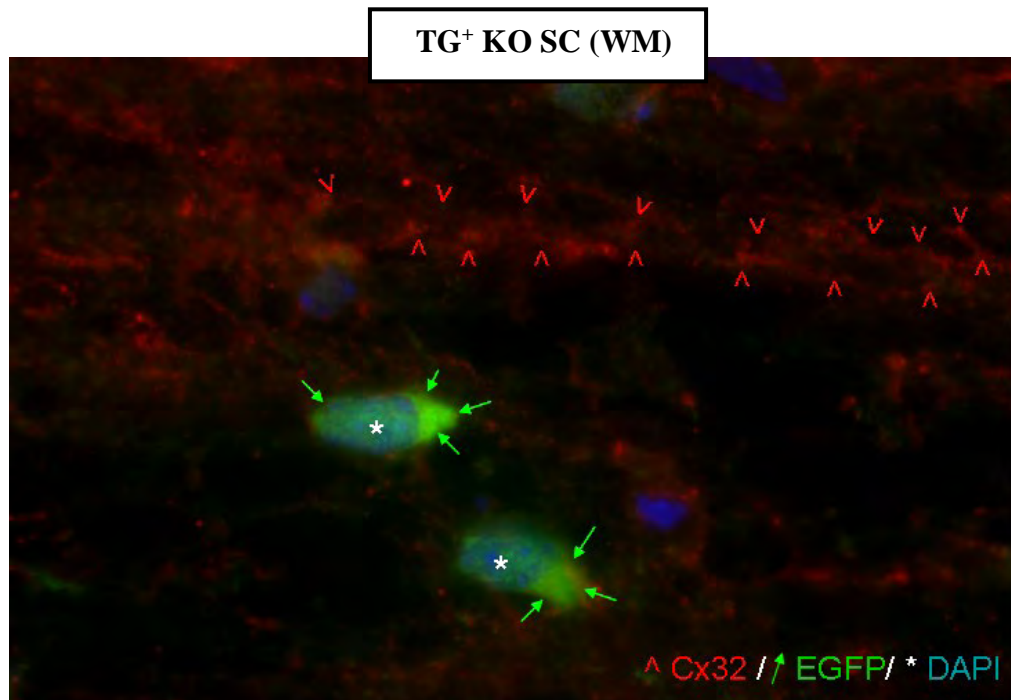


Εικόνα 20: A) Ανοσοαποτύπωση με τη χρήση του αντισώματος EGFP και B) με χρήση του αντισώματος Cx32.

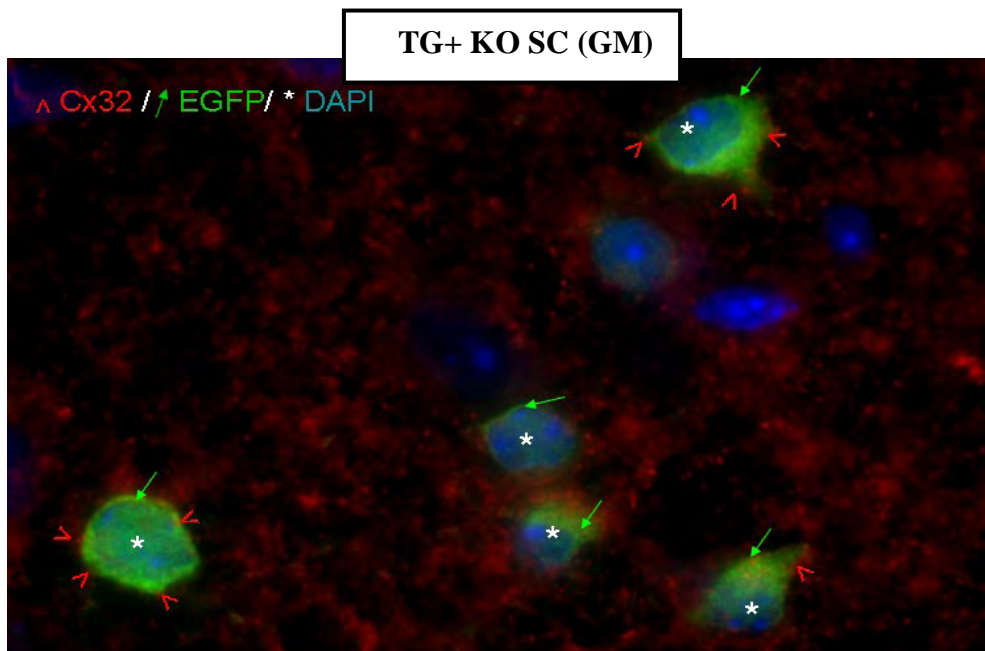
▪ Ανοσοφθορισμός

Για να εξακριβωθεί που ακριβώς εκφράζεται η Cx32 και η EGFP έγινε ανοσοφθορισμός σε δείγματα νωτιαίου μυελού (ΚΝΣ) και διαχωρισμένων νευρικών ισχιακών νεύρων (ΠΝΣ). Σε αυτή την ανάλυση η Cx32 φαίνεται με κόκκινο χρώμα, η EGFP με πράσινο και οι πυρήνες με μπλε (DAPI). Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι νωτιαίος μυελός από διαγονιδιακά ποντίκια σε KO background, όπου είναι εμφανής η λευκή και φαιά ουσία του (White και Gray Matter). Η ανάλυση έδειξε ότι στο ΚΝΣ εκφράζεται η Cx32 κατά μήκος των μεγάλων εμύελων αξόνων στη λευκή ουσία (εικόνα 21A, επιμήκης τομή) ενώ στη φαιά ουσία η Cx32 εκφράζεται στα κυτταρικά σώματα των ολιγοδενδροκυττάρων (εικόνα 21B, εγκάρσια τομή). Χρησιμοποιήθηκαν επίσης και διαχωρισμένες ίνες ισχιακού νεύρου (Teased Fibers) για το ΠΝΣ από διαγονιδιακά ποντίκια σε KO background (TG⁺ KO SN TF) όπου η Cx32 εκφράζεται στις παρακομβιακές περιοχές (paranodes) (εικόνα 21Γ). Σε όλα τα δείγματα η EGFP εκφράζεται γύρω από τον πυρήνα των ολιγοδενδροκυττάρων για το ΚΝΣ και των Schwann cells για το ΠΝΣ. Το συμπέρασμα είναι ότι υπάρχει φυσιολογικός εντοπισμός της hCx32 στα διαγονιδιακά ποντίκια.

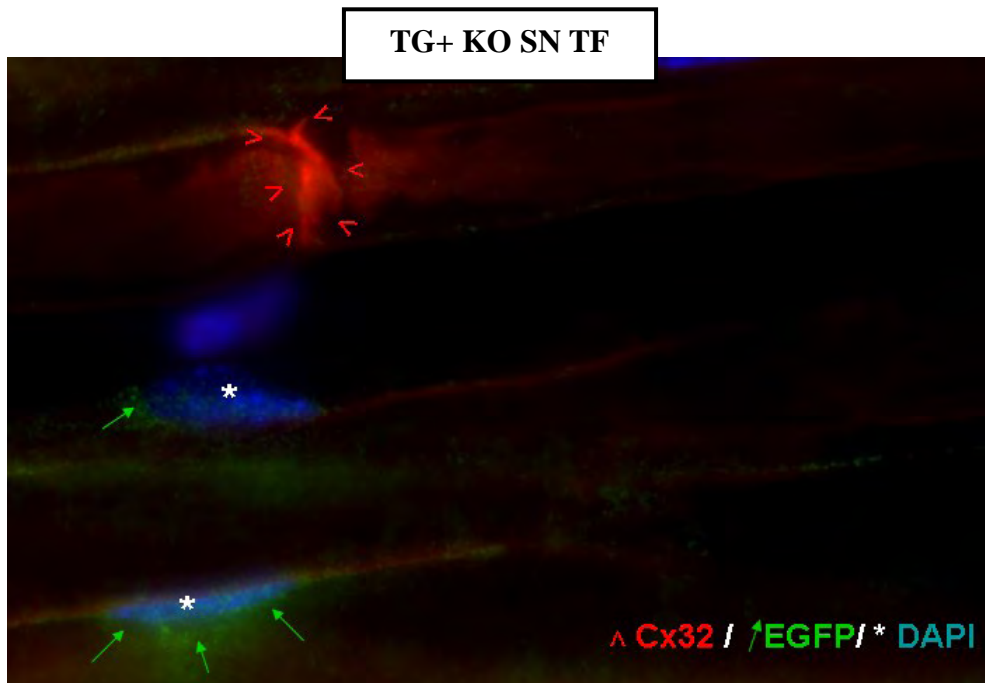
A)



B)



Γ)



Εικόνα 21: Ανοσοφθορισμός για εξακρίβωση της θέσης έκφρασης της Cx32 και EGFP.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ & ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μέσα από αυτή τη μελέτη καταφέραμε να δημιουργήσουμε διαγονιδιακά ποντίκια που να εκφράζουν hCx32 (ανθρώπινη Cx32) τόσο στο ΠΝΣ τόσο και στο ΚΝΣ. Επίσης καταφέραμε να εκφράζεται η hCx32 σε ποντίκια που δεν έχουν καθόλου την ενδογενώς Cx32 (TG⁺ KO background ποντίκια). Η έκφραση πιστοποιήθηκε τόσο σε επίπεδο RNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης με δύο μοριακές μεθόδους, την ανοσοαποτύπωση και τον ανοσοφθορισμό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση της διαγονιδιακής Cx32 ήταν 2 φορές περισσότερη απ' ό,τι η ενδογενώς Cx32 των κυττάρων της μυελίνης. Επίσης από τον ανοσοφθορισμό TG⁺ KO δειγμάτων φαίνεται ότι η Cx32 εκφράζεται στις σωστές περιοχές. Στο ΚΝΣ σχηματίζει χασμοσυνδέσμους γύρω από τον πυρήνα των ολιγοδενροκυττάρων στη φαιά ουσία (Gray Matter, GM) και κατά μήκος μεγάλων εμύελων αξόνων στη λευκή ουσία (White Matter, WM) του νωτιαίου μυελού ενώ στο ΠΝΣ στις παρακομβιακές περιοχές και εγκοπές της μη συμπαγής μυελίνης.

Ο απώτερος σκοπός αυτής της μελέτης είναι να γίνει αποτίμηση της περιφερικής νευροπάθειας στα TG⁺ KO ποντίκια σε ηλικία 8 μηνών συγκρίνοντάς τα με KO Cx32 ποντίκια. Με τη σύγκριση αυτή θα είναι εφικτό να δούμε τη διαφορά της νευροπάθειας μεταξύ των TG⁺ KO ποντικών και των KO Cx32 ποντικών. Άρα θα δούμε και τα αποτελέσματα της hCx32 στη νευροπάθεια και αν μπορεί να γίνει διάσωση του φαινοτύπου. Για να γίνει όμως εξέταση των αποτελεσμάτων της έκφρασης της εξωγενώς hCx32 στο περιφερικό φαινότυπο των KO Cx32 ποντικών, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν δείγματα κινητήριων νευρών από το μηρό 8 μηνών διαγονιδιακών ποντικών. Αυτά θα συγκριθούν με Cx32 KO ποντίκια που δεν εκφράζουν τα διαγονίδια. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες αυτή η ηλικία είναι η πιο κατάλληλη γι' αυτή την ανάλυση γιατί τα Cx32 KO ποντίκια και τα KO R75W ή KO T55I ποντίκια αναπτύσσουν προοδευτική απομυελίνωση μετά την ηλικία των 3 μηνών (Anzini et al., 1997) και δείχνουν σημαντικά το βαθμό απομυελίνωσης στην ηλικία των 8 μηνών χωρίς να αναπτύσσουν εμφανή φαινοτυπική ανωμαλία (Sargianidou et al, 2009).

Η απομυελίνωση στο ΚΝΣ είναι ήπια, για το λόγο αυτό το επόμενο βήμα της μελέτης είναι η διασταύρωση των TG⁺ KO ποντικών με Cx47 KO ποντίκια και η δημιουργία διπλών KO ποντικών σε Cx32/Cx47. Αυτό γίνεται προκειμένου να

συγκριθούν τα διπλά ΚΟ ποντίκια που εκφράζουν τη διαγονιδιακή Cx32 με διπλά ΚΟ ποντίκια που να μην την εκφράζουν και να εξεταστεί κατά πόσον η διαγονιδιακή Cx32 είναι ικανή να εμποδίσει την παθολογία του κεντρικού και περιφερικού συστήματος. Η μελέτη αυτή στηρίζει νέες προσπάθειες έρευνας γονιδιακής θεραπείας σε CMT1X μοντέλα ποντικών με αναμενόμενες κλινικές εφαρμογές στο μέλλον. Έτσι οι προσπάθειες αυτές θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη μιας θεραπείας μέσω της αντικατάστασης του γονιδίου της Cx32 για τους CMT1X ασθενείς.

5. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω τον Δρ. Κλεόπα Κλεόπα που με δέχτηκε στο εργαστήριο Νευροεπιστημών για τη διεξαγωγή της διπλωματικής μου εργασίας και που μου έδωσε την ευκαιρία να μάθω να δουλεύω και να συνεργάζομαι με τα άτομα που ο ίδιος εμπιστεύεται για το πέρας των ερευνητικών μελετών του εργαστηρίου. Ευχαριστώ από καρδιάς την Δρ. Ειρήνη Σαργιαννίδου για τη πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε με τις γνώσεις και της υποδείξεις της, για την ενθάρρυνση και τις χρήσιμες προτάσεις της καθώς και για τη φιλική της συμπεριφορά και την δημιουργία ενός ευχάριστου και εποικοδομητικού κλίματος για έρευνα και συνεργασία. Επίσης ευχαριστώ τον καθηγητή μου αλλά και επιβλέπων μου Δρ. Δημήτρη Κουρέτα για τη βοήθεια του. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους δουλέψαμε μαζί στο εργαστήριο, την Δρ. Κυριακή Μαρκουλλή και την υποψήφια διδάκτορα Νατάσα Σχίζα.

Θα ήταν παράληψη μου να μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τους φίλους μου, τους συμφοιτητές μου και ειδικά το Γιάννο Τσούκκα για την ηθική και κάθε μορφής συμπαράσταση που μου προσέφεραν όχι μόνο αυτό το διάστημα αλλά καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Τέλος αφιερώνω τη διπλωματική μου εργασία στην αγαπημένη μου μητέρα που ο μεγάλος πόθος της, πριν να φύγει από αυτό τον κόσμο, ήταν να με καμαρώσει την μέρα της ορκωμοσίας μου παίρνοντας το πτυχίο μου.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abrams, C. K., M. V. Bennett, et al. (2002). "Voltage opens unopposed gap junction hemichannels formed by a connexin 32 mutant associated with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 3980-3984.
- Abrams, C. K., S. Oh, et al. (2000). "Mutations in connexin 32: the molecular and biophysical bases for the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease." Brain Res Brain Res Rev **32**(1): 203-214.
- Altevogt, B. M. and D. L. Paul (2004). "Four classes of intercellular channels between glial cells in the CNS." J Neurosci **24**(18): 4313-4323.
- Anzini, P., D. H. Neuberg, et al. (1997). "Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin 32." J Neurosci **17**(12): 4545-4551.
- Bruzzone, R., T. W. White, et al. (1996). "Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling." Eur J Biochem **238**(1): 1-27.
- Dobrowolski, R. and K. Willecke (2009). "Connexin-caused genetic diseases and corresponding mouse models." Antioxid Redox Signal **11**(2): 283-295.
- Goodenough, D. A. and D. L. Paul (2003). "Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(4): 285-294.
- Gravel, M., A. Di Polo, et al. (1998). "Four-kilobase sequence of the mouse CNP gene directs spatial and temporal expression of lacZ in transgenic mice." J Neurosci Res **53**(4): 393-404.
- Kamasawa, N., A. Sik, et al. (2005). "Connexin-47 and connexin-32 in gap junctions of oligodendrocyte somata, myelin sheaths, paranodal loops and Schmidt-Lanterman incisures: implications for ionic homeostasis and potassium siphoning." Neuroscience **136**(1): 65-86.
- Kleopa, K. A., J. L. Orthmann, et al. (2004). "Unique distributions of the gap junction proteins connexin29, connexin32, and connexin47 in oligodendrocytes." Glia **47**(4): 346-357.
- Kleopa, K. A. and S. S. Scherer (2006a) . "Molecular genetics of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease." Neuromolecular Med **8**(1-2): 107-122.
- Kleopa, K. A., S. W. Yum, et al. (2002). "Cellular mechanisms of connexin32 mutations associated with CNS manifestations." J Neurosci Res **68**(5): 522-534.

- Kleopa, K. A., E. Zamba-Papanicolaou, et al. (2006b). "Phenotypic and cellular expression of two novel connexin32 mutations causing CMT1X." Neurology **66**(3): 396-402.
- Liang, G. S., M. de Miguel, et al. (2005). "Severe neuropathy with leaky connexin32 hemichannels." Ann Neurol **57**(5): 749-754.
- Maeda, S., S. Nakagawa, et al. (2009). "Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution." Nature **458**(7238): 597-602.
- Nagy, J. I. and J. E. Rash (2000). "Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS." Brain Res Brain Res Rev **32**(1): 29-44.
- Nave, K. A. (2010). "Myelination and the trophic support of long axons." Nat Rev Neurosci **11**(4): 275-283.
- Nicholson, G. and A. Corbett (1996). "Slowing of central conduction in X-linked Charcot-Marie-Tooth neuropathy shown by brain stem auditory evoked responses." J Neurol Neurosurg Psychiatry **61**(1): 43-46.
- Nicholson, G. A., L. Yeung, et al. (1998). "Efficient neurophysiologic selection of X-linked Charcot-Marie-Tooth families: ten novel mutations." Neurology **51**(5): 1412-1416.
- Oh, S., Y. Ri, et al. (1997). "Changes in permeability caused by connexin 32 mutations underlie X-linked Charcot-Marie-Tooth disease." Neuron **19**(4): 927-938.
- Poliak, S. and E. Peles (2003). "The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier." Nat Rev Neurosci **4**(12): 968-980.
- Rabadan-Diehl, C., G. Dahl, et al. (1994). "A connexin-32 mutation associated with Charcot-Marie-Tooth disease does not affect channel formation in oocytes." FEBS Lett **351**(1): 90-94.
- Rash, J. E., T. Yasumura, et al. (2001). "Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons." J Neurosci **21**(6): 1983-2000.
- Sargiannidou, I., N. Vavlitou, et al. (2009). "Connexin32 mutations cause loss of function in Schwann cells and oligodendrocytes leading to PNS and CNS myelination defects." J Neurosci **29**(15): 4736-4749.
- Sargiannidou I., M. K., Kleopa K. A. (2010). "Molecular mechanisms of gap junction mutations in myelinating cells." Histol Histopathol **25**.

- Scherer, S. S. (1999). "Nodes, paranodes, and incisures: from form to function." Ann N Y Acad Sci **883**: 131-142.
- Scherer, S. S., S. M. Deschenes, et al. (1995). "Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS." J Neurosci **15**(12): 8281-8294.
- Scherer, S. S., Y. T. Xu, et al. (2005). "Transgenic expression of human connexin32 in myelinating Schwann cells prevents demyelination in connexin32-null mice." J Neurosci **25**(6): 1550-1559.
- Scherer, S. S., Y. T. Xu, et al. (1998). "Connexin32-null mice develop demyelinating peripheral neuropathy." Glia **24**(1): 8-20.
- Shy, M. E., C. Siskind, et al. (2007). "CMT1X phenotypes represent loss of GJB1 gene function." Neurology **68**(11): 849-855.
- Suter, U. and S. S. Scherer (2003). "Disease mechanisms in inherited neuropathies." Nat Rev Neurosci **4**(9): 714-726.
- Willecke, K., J. Eiberger, et al. (2002). "Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome." Biol Chem **383**(5): 725-737.
- Wrabetz, L., Feltri, L. M., Kleopa, K. A., and Scherer, S. S. (2004). Inherited Neuropathies: Clinical, Genetics, and Biological Features Disease Myelin Biology and Disorders. **2**: 905 - 951.
- Yuan, X., R. Chittajallu, et al. (2002). "Expression of the green fluorescent protein in the oligodendrocyte lineage: a transgenic mouse for developmental and physiological studies." J Neurosci Res **70**(4): 529-545.