Herstellung und Charakterisierung eines binär-genetischen Systems zur Zellablation in der Maus (*Mus musculus*) mittels Diphtherie-Toxin

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Biologie der Universität Hamburg

> vorgelegt von Damian Brockschnieder aus Rheda-Wiedenbrück

Hamburg, Mai 2003

Die vorliegende Arbeit wurde am "Zentrum für Molekulare Neurobiologie der Universität Hamburg (ZMNH)" in der Arbeitsgruppe von Dr. Dieter Riethmacher in der Zeit von Mai 1999 bis Mai 2003 durchgeführt.

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg auf Antrag von Herrn Prof. Dr. T. JENTSCH Weitere Gutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. L. RENWRANTZ

Tag der Disputation: 11. Juli 2003

Hamburg, den 25. Juni 2003



Professor Dr. A. Frühwald Dekan

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung	1
II. Einleitung	3
1. Physikalische Methoden der Zellablation	3
2. Toxigene Methoden der Zellablation	4
2.1. Toxine	4
2.1.1. Diphtherie-Toxin	5
2.2. Ein-Komponenten Systeme	7
2.3. Zwei-Komponenten Systeme	7
2.4. Technologien zur Herstellung konditionaler Mausmutanten	8
2.5. Binär-genetische Systeme	10
2.5.1. Die neue Toxin-Maus : ROSA26-DTA	11
3. Verwendete Cre Mäuse	13
3.1. Nex-Cre	13
3.2. Alfp-Cre	14
3.3. CD19-Cre	15
3.4. CNP-Cre	15
III. Ergebnisse	18
1. Herstellung und Charakterisierung von ROSA26-DTA Mauslinien	18
1.1. Konstruktion der Targeting Vektoren	18
1.2. ES Zell Transfektion und Selektion	20
1.3. Identifizierung von homolog rekombinierten ES Zellklonen	21
1.4. Verifikation von homolog rekombinierten ES Zellklonen	22
1.5. Funktionelle Charakterisierung von positiven ES Zellklonen	24
1.5.1. Nachweis von lacZ Expression	24
1.5.2. Cre-induzierte Aktivierung von DTA in ES Zellen	24
1.6. Generierung von chimären und heterozygoten ROSA26-DTA Tieren	28
1.7. Phänotyp von ROSA26-DTA Mäusen	28
1.8. LacZ Expression in ROSA26-DTA Mäusen	29
2. Ablation verschiedener Zelltypen	33
2.1. Ablation von cortikalen Neuronen (Nex-Cre)	33
2.2. Ablation von Hepatozyten (Alfp-Cre)	40
2.3. Ablation von Oligodendrozyten und Schwann Zellen (CNP-Cre)	45
2.4. Ablation von B Zellen (CD19-Cre)	55
2.4.1. Charakterisierung überlebender B Zellen	57
IV. Diskussion	60
1. ROSA26-DTA Mausstämme	60
2. Zellablationen	63
2.1. Ablation von cortikalen Neuronen	63
2.2. Ablation von Hepatozyten	66
2.3. Ablation von Oligodendrozyten und Schwann Zellen	68
2.4. Ablation von B Zellen	73
3. Beurteilung des Ablationssystems und Ausblick	75
V. Material und Methoden	78
1. Antikörper	78
2. Bakterienstämme	79
3. Vektoren	79
4. ES Zellinie	79
5. Mausstämme	79
6. Chemikalien	79

	7. Nährmedien	.80
	8. Zellkulturmedien	.80
	9. DNA- und RNA-Methoden	.81
	9.1. Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten	.81
	9.2. Isolierung genomischer DNA aus ES Zellen	.81
	9.3. Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe bzw.	
	Schwanzstücken	.81
	9.4. Phenol / Chloroform-Extraktion	.82
	9.5. Fällung von DNA	.82
	9.6. Agarosegelelektrophorese	.82
	9.7. Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen	.83
	9.8. Restriktionsverdau von DNA und Transformation kompetenter Bakterien	.84
	9.9. Dephosphorylierung von DNA	.84
	9.10. Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase	.84
	9.11. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	.84
	9.12. Sequenzierung von DNA	.88
	9.13. Radioaktive Markierung von DNA	.88
	9.14. Synthese Digoxigenin-markierter in vitro-Transkripte	.88
	9.15. Southern-Hybridisierung	.89
	10. Zellkultur-Methoden	.90
	10.1. Praparation und Kultur primarer embryonaler Fibroblasten	.90
	10.2. Kultur, Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen	.90
	10.3. Transiente Transfektion von ES Zeilen mit Expressionsplasmiden	.91
	11. HIStologische Methoden	.92
	11.1. Histologische Analyse von Ischlasherven	.92
	11.2. Herstellung von Kunststonschnitten	.92
	11.3. Hallialoxiiii / Eosin-Farburg von Kunststoffschnitten	.ອວ ດວ
	11.5. Herstellung von Vibratomschnitten	.93
	11.6. R_Galaktosidase_Eärbung	.95 Q/
	11.7 Herstellung von Gefrierschnitten	.94 Q/
	11.8 Immunhistologie auf Gefrierschnitten	9 <u>4</u>
	11.9 <i>In situ</i> -Hybridisierung	95
	11 10 FACS Analyse von Lymphocyten-Populationen	.00
	11 11 Detektion von Zellproliferation und Apoptosen	.00
	11.12. MACS Sortierung von B Zellen	.97
v	l. Abkürzungen	.98
V	II. Literaturverzeichnis	100

I. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird ein neues, binäres System vorgestellt, das die gezielte Ablation (Elimination) von Zelltypen durch die konditionale Expression von Diphtherie-Toxin in der Maus ermöglicht. Die A Kette des bakteriellen Diphtherie-Toxins (DTA) hat sich in früheren Studien als ein potentes, zellautonom wirkendes Agens bewährt, um Zellen innerhalb eines Organismus abzutöten. Mit Hilfe der toxigenen DTA-Ablation konnten Einsichten in die physiologische Funktion und Ontogenese von bestimmten Zelltypen gewonnen werden. Die gezielte Ablation von Zellen besitzt zudem Relevanz bei der Generierung von Tier-Modellen zur Untersuchung degenerativer Krankheiten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zuerst eine Mauslinie (ROSA26-DTA) mit einem ubiquitär exprimierten, konditionalen DTA Allel generiert. Dazu wurde ein DNA Konstrukt – bestehend aus einer loxP-flankierten ("gefloxten") lacZ-Cassette, gefolgt von einem DTA Gen – durch eine "knockin"-Strategie unter die Kontrolle des ubiquitär aktiven ROSA26 Promotors gestellt. Die Translation des Toxins wird in dieser Mauslinie durch die Insertion des lacZ Gens in das offene Leseraster des DTA Gens verhindert. Durch die zellspezifische Expression von Cre Rekombinase (Cre) in Zielzellen kann die Deletion der lacZ-Stop-Cassette induziert und damit die Translation von DTA initiiert werden. Diese Strategie macht sich die ständig wachsende Anzahl an gewebespezifisch Cre-exprimierenden Mauslinien zu Nutze und sollte die Ablation von zahlreichen Zelltypen erlauben.

Der Nachweis von ß-Galaktosidase in adulten und embryonalen Geweben der ROSA26-DTA Linie bestätigte die erwartete ubiquitäre Expression der lacZ-Stop-Cassette und sprach für die Möglichkeit, die Expression von DTA in allen Geweben mit Hilfe von Cre Rekombinase aktivieren zu können.

Um die Funktionalität des Toxinallels *in vivo* zu demonstrieren, wurde der ROSA26-DTA Stamm mit verschiedenen, gewebespezifisch Cre-exprimierenden Mauslinien (Nex-Cre, CNP-Cre, Alfp-Cre, CD19-Cre) gekreuzt und die Zelltyp-spezifischen Ablationen in der F1 Generation analysiert. Die Nex-Cre induzierte Ablation von postmitotischen, cortikalen Neuronen führte zu einem degenerierten Cerebralcortex in neugeborenen Tieren. Eine genauere Analyse der Ablation zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten gab Aufschluß über den Zeitverlauf der Zelleliminierung. So zeigte sich, daß zwischen dem Beginn der Cre Expression in cortikalen Neuronen am Entwicklungstag E11.5 und dem Auftreten apoptotischer Zellen eine Zeitspanne von 2-3 Tagen lag.

Die Eliminierung von Oligodendrozyten und Schwann Zellen mit Hilfe von CNP-Cre Mäusen führte zu einem Phänotyp, der durch einen Tremor des gesamten Körpers, eine Hinterlaufschwäche und eine geringe Lebensspanne von ca. 2 Wochen gekennzeichnet war. Ähnliche Symptome wurden in den natürlich vorkommenden "Myelin-Mutanten" wie "*shiverer*", *"jimpy*" oder *"trembler*" beobachtet, jedoch besaßen diese Mutanten eine höhere Lebensdauer. Eine immunhistochemische Analyse von Myelin-Markerproteinen offenbarte eine vollständige Dysmyelinisierung des Gehirnes von Tieren, deren Oligodendrozyten eliminiert wurden. In peripheren Nerven kam es durch die CNP-Cre induzierte Ablation von Schwann Zellen zu einer Hypomyelinisierung und Degeneration von Axonen.

Während Oligodendrozyten und Neurone nahezu vollständig eliminiert werden konnten, erfolgte die Alfp-Cre induzierte Ablation von Hepatozyten und die CD19-Cre induzierte Ablation von B Zellen nur zu einem gewissen Prozentsatz. In letzteren Fällen zeigte sich, daß die Rekombinationsfrequenzen der verwendeten Cre Mäuse sowie die Existenz von Regenerations- und Selektionsmechanismen in bestimmten Geweben das Überleben von Zellpopulationen und die Integrität von Organen stark beeinflussen.

Abschließend werden in dieser Arbeit die Verwendung der erzeugten Mausmodelle und der Nutzen der hier entwickelten Ablationstechnik zur Klärung detaillierter biologischer Fragestellungen diskutiert. Zukünftig sollte das hier entwickelte Ablationssystem dazu beitragen, die Entwicklung und Interaktionen von Zelltypen aufklären zu können. Auf dem Gebiet der Stammzellforschung eröffnet sich die Möglichkeit, das (regenerative) Potential von Zellen oder Geweben durch Transplantationen in Zelltyp-dezimierte Mäuse zu testen.

II. Einleitung

Höhere Organismen setzen sich aus spezialisierten Zellen und Geweben zusammen. Einsichten in die physiologische Funktion und Ontogenese von bestimmten Zelltypen können mittels ihrer Eliminierung (Ablation) gewonnen werden. Die gezielte Ablation von Zellen besitzt zudem Relevanz bei der Generierung von Tier-Modellen zur Untersuchung degenerativer Krankheiten (z.B. Parkinson).

Zur Zellablation werden neben physikalischen Methoden toxigene Methoden verwendet, die durch die Expression oder Zelltyp-spezifische Applikation eines Zellgifts charakterisiert sind.

In dieser Arbeit wird ein neues, binäres System vorgestellt, das die gezielte Elimination von Zelltypen durch die konditionale Expression von Diphtherie-Toxin in der Maus ermöglicht.

1. Physikalische Methoden der Zellablation

Physikalische Methoden eignen sich zur Ablation gut zugänglicher und leicht identifizierbarer Zelltypen in verschiedenen Organismen. Die gebräuchlichsten Methoden zur physikalischen Zerstörung von Zellen sind die chirurgischmechanische Entfernung, die UV-Laser Entfernung (Lohs-Schardin *et al.* 1979) sowie die Farbstoff-Photoablation (Miller, J. P. *et al.* 1979; Mizrahi *et al.* 2001; Gilmour *et al.* 2002).

Mittels der UV-Laser Entfernung war es z.B. möglich, die weitere Entwicklung von Blastoderm-Zellen von *Drosophila melanogaster* systematisch zu bestimmen und so eine Karte der larvalen Epidermisentwicklung zu erstellen (Lohs-Schardin *et al.* 1979).

Bei der Farbstoff-Photoablation wird ein Fluoreszensfarbstoff in die zu tötenden Zellen injiziert. Zum gewünschten Zeitpunkt werden die Zellen und ihre Tochterzellen dann mit Licht einer Wellenlänge, die vom Farbstoff absorbiert wird bestrahlt. Die daraus resultierende Hitzeentwicklung oder Freisetzung von toxischen Reaktionsprodukten zerstört die betreffenden Zellen schließlich (Miller, J. P. *et al.* 1979). Mit diesem Verfahren wurde die Organisation der Synapsenbildung nach der Ausschaltung einzelner Neurone in der Küchenschabe (*Periplaneta americana*) untersucht (Libersat *et al.* 1996; Mizrahi *et al.* 2001).

Durch die Analyse der Photoablation von primären Mesenchymzellen zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Seeigels konnte ein kritisches Zeitfenster für den Einfluß dieses Zelltypes auf die Entwicklung eines zweiten Zelltypes (sekundäre Mesenchymzellen) bestimmt werden (Ettensohn 1990).

2. Toxigene Methoden der Zellablation

Im Gegensatz zu physikalischen Methoden kann man durch die zellspezifische Expression von Toxinen im Organismus verborgene und äußerlich schwer identifizierbare Zellen (z.B. Gruppen von Neuronen im Gehirn) erreichen. Toxigene Methoden setzen in der Regel die Generierung eines genetisch manipulierten Stammes voraus. Bei den ersten Versuchen zur toxigenen Zellablation wurden einfache Systeme verwendet, die durch die Expression verschiedener Toxingene unter der Kontrolle zellspezifischer Promotoren gekennzeichnet waren. Es stellte sich als Nachteil dieser Ansätze heraus, daß die Toxineffekte in den transgenen Tiere direkt präsent waren und Phänotypen wie Letalität oder Infertilität die Etablierung stabiler Linien nicht zuließen. Daher wurden später binäre, genetische Systeme entwickelt, in denen ein konditionales Toxinallel erst durch die Kreuzung mit einem zweiten "Aktivatorstamm" in der F1 Generation zur Ausprägung kommt. Wenn frühe, dominante Effekte die Analyse späterer Entwicklungsstadien verhindern, kann als weitere Regulationsmöglichkeit sowohl die Aktivierung des Toxingens als auch die Toxinwirkung induzierbar, d.h. temporal abhängig von der Verabreichung einer chemischen Substanz oder eines anderen Induktors (z.B. Temperatur) gestaltet werden.

Einen nicht-transgenen Ansatz zur Zellelimination bieten einige neurotoxische Verbindungen wie 6-Hydroxydopamine (Kostrzewa *et al.* 1974; Super *et al.* 1997) oder 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (Langston *et al.* 1983). Sie werden benutzt, um bestimmte Subpopulationen von Neuronen aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften zu dezimieren.

2.1. Toxine

Potente, zellautonom wirkende Toxine sind eine Voraussetzung für genetische Systeme, die die Abtötung von Zellen innerhalb eines Organismus zum Ziel haben. Die toxischen Agenzien sollten möglichst in essentielle, homeostatische Prozesse (Translation, Replikation, Aufrechterhaltung des Zellmilieus) eingreifen, damit sie gegen alle Zelltypen einsetzbar sind. In diesem Sinn haben sich besonders bakterielle Toxine wie Diphtherie-Toxin DT (siehe unten Diphtherie-Toxin) aus *Corynebacterium Diphtheriea* oder Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* (Kobayashi *et al.* 1995; Watanabe *et al.* 1998; Yoshida *et al.* 2001) bewährt. Häufig benutzt wird auch die *Herpes simplex* Virus-1 codierte Thymidinkinase (HSV1-TK) (Borrelli *et al.* 1989; Heyman *et al.* 1989; Bush *et al.* 1998; Rindi *et al.* 1999; Mathis *et al.* 2000). Nukleosidanaloga wie Gancyclovir sind normalerweise unschädlich für eukaryontische Zellen. Werden sie jedoch durch HSV1-TK phosphoryliert, dann können die modifizierten Formen während der Replikation in die DNA eingebaut werden und die DNA-Synthese inhibieren, wodurch schließlich der Zelltod ausgelöst wird. Die *In vivo* Zellablation mittels HSV1-TK kann temporal durch die Verabreichung von Gancyclovir kontrolliert werden; sie ist jedoch auf sich teilende Zellen beschränkt, und es dauert 3-7 Tage von der Induktion bis zum Zelltod.

Weitere Beispiele für Toxine, die zur Zellablation in transgenen Mäusen benutzt wurden, sind Ricin (aus Pflanzen) (Landel *et al.* 1988), Saporin (Truitt *et al.* 2002), Barnase (Leuchtenberger *et al.* 2001) und eine mutierte Form des viralen lonenkanals M2 (Smith *et al.* 2002).

2.1.1. Diphtherie-Toxin

Das natürliche Diphtherie-Toxin (DT) wird von Iysogenen *Corynebacterium Diphtheriea* Stämmen als ein Vorläuferprotein mit einem Signalpeptid synthetisiert und nach Abspaltung des Signalpeptides sezerniert (Collier 2001). Das native Protein besteht aus drei funktionellen Faltungsdomänen (Bennett *et al.* 1994). Aminoterminal befindet sich eine C-Domäne mit katalytischen Eigenschaften. Darauf folgt eine T-Domäne, die an der Translokation des Toxins in das Zytosol von Zielzellen beteiligt ist. N-terminal folgt eine R-Domäne, die für die Bindung an Zellrezeptoren verantwortlich ist (Abb. 1).

Die Aktivierung von DT erfolgt an Zielzellen durch eine proteolytische Spaltung in eine A-Kette (21kD) und eine B-Kette (37kD), die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind (Gordon *et al.* 1994; Gordon *et al.* 1995). Die A-Kette beinhaltet die C-Domäne mit ihrer katalytischen ADP-Ribosyl-Transferase Aktivität und ist für die Toxizität verantwortlich. Die B-Kette besteht aus Rezeptorbindungsdomäne und T-Domäne und ist für den Eintritt des Toxins in Zellen notwendig.



Abb. 1: Schematische Darstellung der Struktur von Diphtherie-Toxin

DT wird durch Rezeptor-vermittelte Endocytose in die Endosomen von Toxinsensitiven Zellen aufgenommen (Simpson *et al.* 1998; Skretting *et al.* 1999; Falnes *et al.* 2000b). Als DT Rezeptor wurde eine membranständige Form des "heparinbindenden EGF-like growth factor" (HB-EGF precursor) identifiziert (Naglich *et al.* 1992). Der saure pH-Wert in Endosomen induziert die Translokation der A-Kette (DTA) in das Cytosol (Draper *et al.* 1980; Sandvig *et al.* 1980; Ren *et al.* 1999). Dort katalysiert die A-Einheit den Transfer des ADP-Ribose Anteils von NAD⁺ auf einen modifizierten Histidinrest (Diphthamid) des Elongationsfaktors EF2. Diese Modifikation inaktiviert EF2, was zur Inhibition der Translation führt (Honjo *et al.* 1971). Darauf erfolgt die Induktion des Zelltodes (Yamaizumi *et al.* 1978).

Zur Ablation eukaryontischer Zelltypen wird in der Regel nur die katalytische A-Kette ohne Signalpeptid exprimiert, um die Sekretion des Proteines zu verhindern (Maxwell, I. H. *et al.* 1986). Selbst wenn das Toxin aus einer absterbenden Zelle in den interzellulären Raum gelangt, kann es aufgrund der fehlenden B-Kette nicht von umliegenden Zellen aufgenommen werden; die Wirkung bleibt daher zellautonom.

Die Toxizität von DTA wird allgemein als sehr hoch angenommen. Yamaizumi et al. haben in Zellkulturexperimenten gezeigt, daß ein Molekül DTA im Cytosol einer Zelle ausreicht, um sie abzutöten (Yamaizumi et al. 1978). Inwieweit dieses Resultat für verschiedene Zelltypen in vivo zutrifft, wurde bisher nicht systematisch untersucht. Doch wurde zumindest für Maus-Zygoten gezeigt, daß mindestens die zehnfache DTA deutlichen Menge nötig ist, um einen Effekt auf ihre Überlebenswahrscheinlichkeit zu erzielen (Palmiter et al. 1987). Neuere Untersuchungen mit kurzlebigen DTA Formen legen den Schluß nahe, daß wenige DTA-Moleküle im Cytosol die Proteinsynthese innerhalb von Stunden irreversibel inhibieren (Falnes et al. 1998; Falnes et al. 2000a).

2.2. Ein-Komponenten Systeme

Im Jahr 1987 wurden in zwei unabhängigen Publikationen zum ersten Mal die in vivo Effekte einer zellspezifischen Expression eines Toxingens beschrieben (Breitman et al. 1987; Palmiter et al. 1987). In diesen Publikationen wurde ein DNA-Konstrukt mit dem DTA Gen unter der Kontrolle von zellspezifischen Regulationssequenzen bzw. Promotoren per Mikroinjektion in den Pronukleus von Zygoten eingeführt. Nachfolgend wurden transgene Mäuse untersucht, die dieses DNA-Konstrukt an zufälliger Stelle als Conkatemer in ihr Genom integriert hatten und das Toxin in den Zielzellen exprimierten. Dieser Ansatz fand darauf häufige Anwendung, beispielsweise um die ontogenetische Beziehung zwischen den drei Zelltypen des Pankreas aufzuklären (Herrera et al. 1994). Als Nachteil dieser Methode offenbarte sich in mehreren Experimenten, daß die Penetranz von DTA-codierenden Transgenen im Vergleich zu anderen Transgenen sehr niedrig war (Palmiter et al. 1987; Kaur et al. 1989; Lee, P. et al. 1998). Es war daher erforderlich, eine große Anzahl von Tieren zu generieren und die korrekte Expression des Toxins zu untersuchen. Obwohl die Ursache dafür bisher nicht aufgeklärt ist, wird angenommen, daß im Zusammenhang mit der zufälligen, genomischen Integration des Toxingens eine schwache ektopische Expression des Toxins temporär auftreten kann, die ausreicht, um zerstörerische Effekte während der Embryogenese auszuüben. Um dieses Problem zu umgehen, wurde in einigen Arbeiten eine katalytisch inaktivere Form des Toxins (tox176) verwendet (Maxwell, F. et al. 1987). Mit diesem mutierten DTA wurden u.a. Paneth Zellen des Dünndarmes (Garabedian et al. 1997) oder Photorezeptorzellen in der Retina (Ying et al. 2000) dezimiert. Einen anderen Ansatz bietet die sogenannte "gene targeting"-Technologie, die die gerichtete Manipulation eines Genes erlaubt (siehe 2.4.). Mit dieser Technologie wurde beispielsweise das DTA Gen unter die endogenen, regulatorischen Sequenzen des NKR-P1 Gens gestellt, um so "Natürliche-Killer" Zellen zu dezimieren (Arase et al. 1999).

2.3. Zwei-Komponenten Systeme

Binäre Systeme setzen die Aktivierung des Toxins durch einen zweiten Faktor voraus und bieten den Vorteil einer erweiterten zeitlichen Kontrolle über die Toxinwirkung. Ein aktivierender Faktor kann beispielsweise eine unschädliche Substanz durch eine Modifikation in ein Toxin verwandeln. Beispiele für dieses Verfahren sind die Zellablation mittels HSV-1 TK in Kombination mit Gancyclovir oder Toxinvarianten, die nur bei einer permissiven Temperatur aktiv sind und erfolgreich in *Drosophila melanogaster* eingesetzt wurden (Bellen *et al.* 1992; Moffat *et al.* 1992). Ein anderes System – genannt "Immunotoxin-Mediated Cell Targeting" (IMCT) – beruht darauf, Zielzellen durch die Expression der α Untereinheit des humanen Interleukin-2 Rezeptors (hIL-2R α) zu markieren. Die lokale Applikation eines hIL-2R α Antikörpers, der mit einem bakteriellen Toxin fusioniert ist, führt dann zur Eliminierung der Zielzellen (Kobayashi *et al.* 1995). Auf diese Weise war es möglich, die Rolle von "Starburst Amacrinen" Zellen in der Retina (Yoshida *et al.* 2001) und von "Golgi-Zellen" im Cerebellum (Watanabe *et al.* 1998) aufzuklären.

2001 wurde eine weitere Variante der DTA-Ablation publiziert : Michiko Saito *et al.* machten sich dabei zu Nutze, daß der murine "HB-EGF precursor" (DT-Rezeptor) im Gegensatz zum humanen nahezu nicht an DT bindet (Mitamura *et al.* 1995). Mäuse sind deshalb selbst gegenüber hohen Dosen von DT resistent. Exprimiert man jedoch ein transgenes Konstrukt des humanen DT-Rezeptors spezifisch in Hepatozyten von Mäusen, so kann durch die Injektion von DT der Zelltod in Hepatozyten induziert werden (Saito *et al.* 2001; Jung *et al.* 2002).

2.4. Technologien zur Herstellung konditionaler Mausmutanten

In jüngerer Zeit wurden binär-genetische Systeme der Zellablation vorgestellt, in denen ein konditionales DTA Allel erst durch Kreuzung mit einem zweiten "Aktivatorstamm" in der F1 Generation zur Ausprägung kommt. Auf dieser Strategie beruht auch das Modell dieser Arbeit. Zu seiner Erläuterung soll hier zuvor ein Überblick über die dazu notwendigen methodischen Voraussetzungen gegeben werden.

Zur Analyse der *in vivo* Funktion von Genen und Zellen werden häufig Tiere mit genetischen Modifikationen hergestellt. Zur Zeit werden hauptsächlich zwei Strategien verwendet, um das Genom von Mäusen zu verändern :

- 1. Additive Einführung eines "Transgenes"¹ an zufälliger Stelle ins Genom durch Mikroinjektion von DNA-Konstrukten in den Pronukleus einer befruchteten Eizelle
- Gezielte Erzeugung von Mutationen in Genen mittels homologer Rekombination in ES Zellen (engl. gene targeting) und anschließende Herstellung von Mäusen durch die Injektion der mutanten Zellinien in Blastozysten (im weiteren näher beschrieben)

ES Zellinien sind aus pluripotenten Stammzellen etabliert worden, die aus der inneren Zellmasse von Blastozysten stammen (Evans *et al.* 1981; Martin 1981). Die ES Zellen können *in vitro* genetisch manipuliert werden und besitzen nach der Injektion in Blastozysten das Potential zu allen Strukturen der aus den Blastozysten hervorgehenden, chimären Mäuse beizutragen (Bradley *et al.* 1984). Durch Rückkreuzungen von chimären Tieren, bei denen ES Zellen zur Bildung der Keimzellen beigetragen haben, kann die Mutation an die Nachkommen weitergegeben werden und somit heterozygote Mäuse erhalten werden. Zur Einführung von Mutationen in das Genom von ES Zellen werden "Targeting Vektoren" verwendet, mit denen ES Zellen transfiziert werden. In den "Targeting Vektoren" ist die einzufügende Mutation von homologen Sequenzen des Zielgenes (auch als "kurzer Arm" und "langer Arm" bezeichnet) flankiert. Durch homologe Rekombination zwischen den endogenen Gensequenzen und den homologen Sequenzen im "Targeting Vektor" kann die Mutation zielgenau in das Genom einer ES Zelle eingefügt werden (Thomas *et al.* 1987).

Die gezielte genomische Manipulation in ES Zellen wird zur Herstellung der sogenannten "knockout" und "knockin" Mausmutanten verwendet. Im Falle von "knockout" Mäusen werden Allele mit Mutationen (Insertionen oder Deletionen) hergestellt, die die Ausschaltung der Funktion (-en) eines bestimmten Genes zum Ziel haben. In "knockin" Mäusen wird eine bestimmte Sequenz an definierter Stelle ins Genom eingefügt, um sie zur Expression zu bringen. Häufig wird auf diese Weise eine cDNA unter die Kontrolle der endogenen, regulatorischen Sequenzen eines Gens gestellt.

¹ Der Begriff "Transgen" ist in der Mausgenetik historisch auf Gene bezogen, die durch die hier unter 1) beschriebene Methodik in das Genom eingefügt wurden. Die Bedeutung dieses Begriffes hat sich heute jedoch auf mutante Allele ausgedehnt, die mit der unter 2) beschriebenen Technik erzeugt wurden.

Will man die Mutationen auf bestimmte Zelltypen im Organismus beschränken, so hat sich das Cre/loxP System bewährt. Es kann in vielfältiger Weise genutzt werden, um in vivo speziell markierte DNA Sequenzen zu inserieren bzw. deletieren, translozieren oder zu invertieren (Lakso et al. 1992; Lewandoski 2001). Cre ist eine Rekombinase des P1 Phagen, die die sequenzspezifische Rekombination zwischen zwei 34 Basenpaar langen Erkennungsseguenzen (loxP) katalysiert. Die natürliche Funktion von Cre besteht darin, Dimere des Bakteriophagengenoms nach der Replikation in Monomere zu dissoziieren. DNA Fragmente, die zwischen zwei gleichsinnig orientierten loxP Sequenzen plaziert sind, werden durch Cre deletiert. Sind die loxP Sequenzen dagegen in gegensätzlicher Richtung orientiert, induziert Cre die Inversion des loxP-flankierten DNA Segmentes. Häufig wird das Cre/loxP System benutzt, um genomische Mutationen in Mäusen auf bestimmte Gewebe zu begrenzen (konditionale "knockout" oder "knockin" Mäuse). Zur Ausprägung der Mutation kreuzt man den Mausstamm, in dessen Genom die loxP Elemente eingeführt wurden, mit einer gewebe- oder zellspezifisch Cre-exprimierenden Effektor-Mauslinie. In Nachkommen, die sowohl das Cre Gen als auch das loxP-Allel tragen, wird in Cre-exprimierenden Zellen die Mutation durch eine Umordnung oder Entfernung des loxP-flankierten ("gefloxten") DNA Segmentes induziert. Durch die Verpaarung mit unterschiedlichen Cre Stämmen kann bestimmt werden, in welchen Geweben und zu welchem Entwicklungszeitpunkt Mutationen erzeugt werden.

In neuerer Zeit werden verschiedene Wege beschritten, das Cre/loxP System induzierbar zu gestalten, um so eine erweiterte zeitliche Kontrolle über die Cre Expression zu gewinnen (Metzger *et al.* 1995; Brocard *et al.* 1997; Wunderlich *et al.* 2001).

2.5. Binär-genetische Systeme

In den letzten Jahren wurde in einigen Publikationen ein binär-genetisches System beschrieben, das Cre zur Aktivierung des DTA Genes benutzt. Es besteht aus zwei Mauslinien, die gekreuzt werden. In der einen Linie wird ein konditionales DTA Transgen unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors transkribiert. Die Translation des DTA Transkriptes wird in dieser Linie verhindert, indem das offene Leseraster des DTA Genes durch eine loxP-flankierte Translations-Stop-Cassette unterbrochen ist. In der anderen Linie wird das Cre Gen unter der Kontrolle eines ubiquitär aktiven Promotors in allen Zellen exprimiert. Kreuzt man beide Stämme, wird in Zielzellen von Nachkommen, die das DTA Gen und das Cre Gen geerbt haben, die Translations-Stop-Cassette deletiert und so die Translation des DTA ermöglicht. Uta Grieshammer *et al.* deletierten auf diese Weise Muskelzellen im Maus-Embryo und konnten so deren Bedeutung für die Entwicklung von Motoneuronen demonstrieren (Grieshammer *et al.* 1998). In einer weiteren Publikation wurde die essentielle Bedeutung der "roof plate" für die Spezifizierung von Interneuronen im dorsalen Neuralrohr gezeigt (Lee, K. J. *et al.* 2000).

2.5.1. Die neue Toxin-Maus : ROSA26-DTA

Vor dem Hintergrund, daß Zellablationsexperimente in Mäusen bisher die zeitaufwendige und teils mit Schwierigkeiten (geringe Penetranz der Toxingene in transgenen Mäusen) behaftete Generierung mutanter Mauslinien voraussetzten, wurde mit dieser Arbeit versucht, ein universell einsetzbares, effizientes und gut regulierbares System zu schaffen. Daher lag es nahe, eine Strategie zu benutzen, die mit den schon vorhandenen und in ihrer Anzahl ständig wachsenden, gewebespezifischen Cre Mäusen kompatibel ist. Das hier vorgestellte binärgenetische System beruht auf einer Mauslinie (ROSA26-DTA) mit einem ubiquitär exprimierten, konditionalen DTA Allel. Die Translation des Toxins wird in dieser Mauslinie durch die Insertion einer IoxP-flankierten ("gefloxten") Stop-Cassette in das offene Leseraster des DTA Gens verhindert (Abb. 2 und Abb. 3). Die Stop-Cassette beinhaltet das lacZ Reportergen; daher kann ein Nachweis von ß-Galaktosidase benutzt werden, um die potentielle Expression des DTA Proteines anzuzeigen. Durch eine zellspezifische Expression von Cre Rekombinase kann die Deletion der Stop-Cassette induziert und damit die Translation von DTA angeschaltet werden.



Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur des ROSA26-DTA Allels vor und nach erfolgter Cre Rekombination. Im unrekombinierten Allel (oben) sind der ROSA26 Promotor (R26) gefolgt vom ersten Exon des ROSA26 Gens (grünes Rechteck) dargestellt. Das Konstrukt aus Splice-Akzeptor (SA), loxP- (rote Dreiecke) flankiertem IacZ Gen, DTA Gen mit SV40 Polyadenylierungssignal und Neo Resistenzcassette wurde durch homologe Rekombination in ES Zellen in das erste Intron inseriert. Die Splice-Akzeptor Sequenz imitiert den Beginn eines Exons. In Cre Rekombinase exprimierenden Zellen kommt es zur Exzision des IacZ Gens. Das Ergebnis dieses Prozesses ist das rekombinierte Allel (unten), in dem der Leserahmen des DTA Gens mit dem Translationsstartcodon ATG fusioniert ist.

Das lacZ-DTA Konstrukt wurde durch eine "knockin" Strategie unter die Kontrolle des gut charakterisierten, ubiquitär aktiven ROSA26 Promotors gestellt. Der ROSA26 Genlokus wurde innerhalb eines "Promotor-Trap" Versuches in ES Zellen identifiziert (Friedrich *et al.* 1991). Der Promotor wurde gewählt, da er sich aus folgenden Gründen gut für eine ubiquitäre Expression von Fremd-Genen eignet:

- 1) Der ROSA26 Genlokus ist während der Embryogenese und in adulten Geweben in nahezu allen Zellen exprimiert (Zambrowicz *et al.* 1997).
- Fremdgene lassen sich mit hoher Effizienz durch homologe Rekombination inserieren und zeigen eine Expression, die der endogenen Expression des ROSA26 Genes entspricht (Mao *et al.* 1999; Soriano 1999; Mao *et al.* 2001).
- 3) Die Insertionen zeigen im hetero- wie homozygoten Zustand keinen auffallenden Phänotyp (Zambrowicz et al. 1997).
- 4) Der Lokus hat sich in verschiedenen Cre-Reporterlinien als zugänglich für die Aktivität von Cre Rekombinase erwiesen (Soriano 1999; Srinivas *et al.* 2001).



Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur der mRNA und des translatierten Proteines ausgehend vom unrekombinierten (A) und vom Cre rekombinierten (B) lacZ-DTA Allel (vergl. Abb. 2). Die vom nicht-rekombinierten ROSA26-DTA Allel gebildete mRNA besteht aus Exon1 (E1) des ROSA26 Lokus, dem der Splice-Donor Stelle folgenden 3'-Bereich der Splice-Akzeptorsequenz, dem (Kozak) ATG-Startcodon des DTA Gens, der ersten loxP Stelle, dem im Leserahmen des Startcodons befindlichen lacZ Gen mit drei aufeinanderfolgenden Terminationscodons, der zweiten loxP Stelle und dem DTA Gen (ohne Startcodon) mit SV40 Polyadenylierungssignal. Die Translation der vom unrekombinierten ROSA26-DTA Lokus gebildeten mRNA führt zu einem Fusionsprotein bestehend aus dem Start-Methionin gefolgt von 21 Aminosäuren (AS) und der Proteinsequenz der ß-Galaktosidase. Die Cre-induzierte Exzision des gefloxten lacZ Gens führt zu einem Transkript (B) in dem der Leserahmen des DTA Gens mit dem ATG Startcodon fusioniert ist. Ausgehend von diesem Transkript wird ein Protein bestehend aus Diphtherie-Toxin A und einer 14 Aminosäuren umfassenden, Nterminal fusionierten Peptidsequenz gebildet.

3. Verwendete Cre Mäuse

Nach seiner Generierung wurde der ROSA26-DTA Stamm mit vier Cre Mauslinien verpaart, die Cre in unterschiedlichen Zellen und Geweben exprimieren. Auf diese Weise war es möglich, den Verlauf und die Effekte einer Toxinexpression in verschiedenen Geweben zu analysieren. Die benutzten Cre Mäuse besitzen im heterozygoten Zustand keine bekannten Defekte und sind im folgenden näher diskutiert.

3.1. Nex-Cre

Nex (<u>ne</u>uronal helix-loop-heli<u>x</u> protein-1) gehört zur Familie der neuronalen "basic helix-loop-helix" (bHLH) Transkriptionsfaktoren (Bartholoma *et al.* 1994). Nex wird auch als MATH2 (mammalian atonal homolog 2) bezeichnet, da es zu einer

Genfamilie in Säugern gehört, die mit dem "atonal" Genprodukt aus Drosophila melanogaster verwandt ist (Shimizu et al. 1995).

Beginnend mit der neuronalen Differenzierung (ca. E11.5) wird Nex durchgehend während der embryonalen Entwicklung in der corticalen Platte und der intermedialen Zone des sich entwickelnden Neocortex exprimiert. Dabei beschränkt sich die Expression auf pyramidale, postmitotische Neurone, die ihren Ursprung in der (Sub-) Ventrikularzone haben, aus der sie auswandern. Mitotisch aktive Vorläuferzellen in der Ventrikularzone und Interneurone exprimieren kein Nex (Göbbels 2002).

Außerdem findet sich embryonale Nex Expression in postmitotischen Neuronen des Rückenmarks, des Bulbus olfactorius, in Neuronen um den vierten Ventrikel und in einzelnen Zellen des Mittel- und Hinterhirnes. Im adulten Gehirn bleibt die Nex Expression im Cortex, der Amygdala und in der CA1-4 Region des Hippocampus erhalten (Schwab *et al.* 1998).

In dem verwendeten Nex-Cre Stamm wurden Teile der genomischen Struktur des Nex Gens durch eine Cre-codierende cDNA ersetzt ("knockin") (Schwab *et al.* 2000). Von dem modifizierten Allel kann kein funktionelles Nex Protein mehr gebildet werden. Stattdessen wird der endogenen Nex Expression folgend Cre Protein gebildet (Schwab *et al.* 2000). Hetero- wie homozygote Nex-Cre Mäuse zeigen keinen auffallenden Phänotyp.

Nex-Cre Mäuse wurden in dieser Arbeit benutzt, um den Effekt einer DTA Expression in postmitotischen Neuronen des Cortex zu untersuchen. Dieser Zelltyp ist ein Beispiel für Zellen, die während der embryonalen Entwicklung fortlaufend generiert werden.

3.2. Alfp-Cre

In Alfp-Cre Mäusen wurde ein synthetisches DNA Konstrukt mittels der Pronukleusinjektion in das Genom eingeführt, um eine Hepatozyten-spezifische Expression von Cre Rekombinase zu erreichen. Dazu wurde das Cre Gen unter die Kontrolle des Albumin Promotors und Enhancers sowie zusätzlich des alpha-Fetoprotein (Afp) Enhancers gestellt (Kellendonk *et al.* 2000). Diese Kombination wurde gewählt, weil in Säugern das Hepatozyten-spezifische Albumin Gen in direkter Nachbarschaft zum alpha-Fetoprotein Gen liegt und man davon ausgeht, daß die Expression des Albumin Gens durch regulatorische Afp-Enhancer-Sequenzen, die zwischen den beiden Genen lokalisiert sind, beeinflußt wird (Wen *et al.* 1991). In Mäusen wird das Albumin Gen während der Embryogenese kurz nach der Entstehung der Leberanlage (E9.5) zunächst schwach und innerhalb der weiteren Leberentwicklung stärker in Hepatozyten und Gallengangszellen exprimiert (Cascio *et al.* 1991). Die Alfp-Cre Mäuse wurden zur Hepatozyten-spezifischen Inaktivierung des c-jun Gens eingesetzt (Behrens *et al.* 2002) und werden in der vorliegenden Arbeit benutzt, um die Effekte einer Cre Rekombinase induzierten Expression von DTA in Hepatozyten zu untersuchen. Im Gegensatz zu vielen anderen differenzierten Zelltypen besitzen Hepatozyten die Fähigkeit, wieder in den Zellzyklus einzutreten und sich effektiv zu teilen (Michalopoulos *et al.* 1997; Fausto *et al.* 2003). Somit lassen sich Zellablationen in der Leber in einem höchst regenerationsfähigen System untersuchen.

3.3. CD19-Cre

Das CD19 Gen wird ausschließlich in Zellen der B Zell-Linie exprimiert (Zhou, L. J. *et al.* 1991). Die Expression von CD19 beginnt in den ersten Stadien der B Zell Entwicklung und setzt sich in der weiteren Entwicklung und Differenzierung fort (Krop *et al.* 1996). CD19-Cre Mäuse exprimieren Cre Rekombinase unter der Kontrolle des endogenen CD19 Promotors (Rickert *et al.* 1997). Die Insertion des Cre Gens in den CD19 Locus führt zu einem Allel, von dem kein funktionelles CD19 Protein gebildet werden kann. Da die für die Insertion heterozygoten Mäuse keinen auffälligen Phänotyp besitzen, können CD19-Cre Mäuse benutzt werden, um B Zell-spezifische, Cre/loxP abhängige Mutationen zu induzieren (Cazac *et al.* 2000; Horcher *et al.* 2001; Inui *et al.* 2002; Pasparakis *et al.* 2002).

In dieser Arbeit wurden CD19-Cre Mäuse mit der ROSA26-DTA Linie verpaart und die Toxin-induzierte Dezimierung von B Zellen in der Milz und im Knochenmark untersucht.

3.4. CNP-Cre

2',3'-Zyklo-Nukleotid 3'-Phoshodiesterase (CNPase oder kurz CNP) wird häufig als Marker für myelinisierende Gliazellen benutzt. Im zentralen Nervensystem (ZNS) wird CNP während der Entwicklung in Zellen der Oligodendrozyten-Linie exprimiert. Im peripheren Nervensystem (PNS) findet sich CNP Expression in myelinisierenden Schwann Zellen, jedoch ist die Expression hier weitaus schwächer als in Oligodendrozyten (Sprinkle 1989; Yu *et al.* 1994; Chandross *et al.* 1999). Außerhalb des Nervensystems beobachtet man eine schwache Expression in Lymphozyten (Sprinkle *et al.* 1985), den Hoden, dem Herzen und der Lunge (Scherer *et al.* 1994; Lappe-Siefke 2002) und in Photorezeptorzellen (Giulian *et al.* 1980).

2',3'-Zyklo-Nukleotid 3'-Phoshodiesterase (CNP) kommt in zwei Isoformen mit einem Molekulargewicht von 46 kDa (CNP-I) und 48 kDa (CNP-II) vor. Die codierenden Transkripte der beiden Isoformen unterscheiden sich nur in ihren 5'-Enden. Ausgehend von zwei Promotoren und durch alternatives Spleißen werden zwei Transkripte von einem Gen gebildet (Kurihara *et al.* 1990). Ein 2,6 kb Transkript codiert für CNP-I und ein 2,4 kb Transkript codiert für CNP-II. Die Transkripton des kürzeren Transkriptes (CNP-II) beginnt ausgehend von einem separaten Promotor in Exon 0. Der Transkriptionsstart des CNP-I Transkriptes liegt 3'-abwärts in Exon 1. Alternative Startcodons in Exon 0 und 1 initiieren die Translation der beiden Protein Isoformen (Gravel *et al.* 1994; Scherer *et al.* 1994). Die physiologische Funktion von CNP ist bisher unklar, jedoch konnte kürzlich gezeigt werden, daß es in CNP knockout Mäusen zu degenerativen Erscheinungen an Axonen kommt (Lappe-Siefke *et al.* 2003).

In CNP-Cre Mäusen wurde das offene Leseraster des Cnp1 Gens durch das der Cre Rekombinase ersetzt, indem die Cre cDNA mit dem zweiten Startcodon in Exon 1 fusioniert wurde (Lappe-Siefke *et al.* 2003). Damit wird Cre unter der Kontrolle beider CNP Promotoren exprimiert. Hinsichtlich der Entwicklung von Oligodendrozyten ist dies bedeutend, da die Vorläuferzellen der Oligodendrozyten nur die CNP-II Isoform ausgehend von Promotor 1 exprimieren (Scherer *et al.* 1994). Für die Cre-Insertion heterozygote Mäuse zeigen keinen auffälligen Phänotyp. In der vorliegenden Arbeit wurde die Ablation von Oligodendrozyten im Gehirn und die Ablation von Schwann Zellen in peripheren Nerven untersucht. In dieser Arbeit wird ein binäres System vorgestellt, das es erlaubt, mit Hilfe der wachsenden Anzahl an gewebespezifischen Cre Mäusen verschiedene Zelltypen *in vivo* zu eliminieren. Das System basiert auf einer Mauslinie, die ein konditionales Diphtherie-Toxin Allel unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven ROSA26 Promotors trägt. Zuerst wird hier die Herstellung und Charakterisierung dieses Mausstammes (ROSA26-DTA) dargestellt. Danach werden die Effekte der Expression von Diphtherie-Toxin in Neuronen, Hepatozyten, Oligodendrozyten, Schwann Zellen und B Zellen beschrieben. Auf diese Weise wird die Funktionalität des Systems beleuchtet und die Effizienz und der Zeitverlauf von Zellablationen näher beschrieben. Darüberhinaus wird diskutiert, welche Untersuchungsmöglichkeiten die Zelltyp-dezimierten Mäuse zur Klärung biologischer und medizinischer Fragestellungen bieten.

III. Ergebnisse

1. Herstellung und Charakterisierung von ROSA26-DTA Mauslinien

Die ROSA26-DTA Maustämme wurden mit den Standardmethoden der gezielten Genmanipulation (gene targeting) generiert. Die Vorgehensweise ist im folgenden beschrieben.

1.1. Konstruktion der Targeting Vektoren

Für die Insertion des lacZ-DTA Konstruktes in den genomischen ROSA26 Lokus wurde ein Targeting-Konstrukt pROSA26-DTA ausgehend von dem Vektor pRosa26-1 (Soriano 1999) hergestellt (Abb. 4; Tab. 1). Der Vektor pRosa26-1 enthält genomische Sequenzen des ROSA26 Gens der Maus (kurzer + langer Arm), an denen die homologe Rekombination in ES Zellen stattfinden kann (vergl. Abb. 5). In eine singuläre *Xba*I Schnittstelle des Vektors wurde das Konstrukt aus Splice-Akzeptor (SA), loxP-flankiertem lacZ Gen, DTA-SV40polyA Gen und einer Neomycin Resistenzcassette, bestehend aus Neo Gen und vorgeschaltetem Promotor des Phosphorglyceratkinase Gens (PGK), eingefügt. Auf die Splice-Akzeptor Sequenz folgt das Translationsstartcodon (Kozak ATG) des DTA Gens, das vom Rest des DTA Leserahmens durch ein (im Leserahmen des DTA Startcodons befindliches), "gefloxtes" lacZ Gen unterbrochen ist (Grieshammer *et al.* 1998). Der lacZ-Leserahmen wird am 3' Ende durch drei aufeinanderfolgende Translations-Terminationscodons beendet (Abb. 3).

Das PGK-Neo Gen dient zur positiven Selektion von ES Zellen, die Vektor-DNA in ihr Genom aufgenommen haben. Da bekannt ist, daß die Anwesenheit und Transkriptionsrichtung von Neo Resistenzgenen die Expression von Nachbargenen beeinflussen kann (Lewandoski 2001), wurden zwei Targeting Vektoren namens pROSA26-DTA (S bzw. AS) mit gegensätzlich ausgerichteter Neo Resistenzcassette hergestellt, um mit größerer Wahrscheinlichkeit eine Mauslinie mit korrekter Expression der lacZ-DTA Cassette erhalten zu können. In pROSA26-DTA (<u>S</u>ense) besitzt das Neo Gen die gleiche Transkriptionsrichtung wie das lacZ Gen und das DTA Gen. In pROSA26-DTA (<u>Anti-S</u>ense) ist die Neo Resistenzcassette invertiert.

Zusätzlich enthält der Vektor das *Herpes simplex* Virus-1 codierte Thymidinkinasegen (TK). In Verbindung mit Gancyclovir kann das TK Gen für eine

Negativselektion von Zellen benutzt werden, die durch zufällige (nicht-homologe) Rekombination Vektor-DNA eingebaut haben. Außerdem besteht der Vektor aus dem Klonierungsvektor pBluescript KS (Stratagene), durch den essentielle Plasmideigenschaften vermittelt werden.

Zur Linearisierung des zirkulären Plasmides wurde eine singuläre *Sac*II Schnittstelle verwendet.



Abb. 4: Plasmidkarte der Targeting Vektoren pROSA26-DTA (S, AS)

Sequenz	Herkunft der Sequenz / Referenz
Spliceakzeptor	pSAßgeo; (Zambrowicz <i>et al.</i> 1997)
	PCR-Produkt der Primer "5'SpliAc" und
	"3´SpliAc"
loxP-lacZ-loxP-DTA-SV40polyA	pUG80; (Grieshammer <i>et al.</i> 1998)
	Sall-Xbal Fragment
PGK-Neo Phosphotransferase,	pTV0; B. Walter
	Xhol-BamHI Fragment
HSV1-Thymidinkinase TK	pTV0; B. Walter
	HindIII-Sall Fragment
ROSA26 genomisch	pRosa26-1; (Soriano 1999)
pBluescript KS	Stratagene

Tab. 1 : Herkunft der Sequenzen, die zur Konstruktion der Targeting Vektoren pROSA26-DTA (S,AS) verwendet wurden.

1.2. ES Zell Transfektion und Selektion

Um das lacZ-DTA Konstrukt in das Maus-Genom einzufügen, wurden ES Zellen (embryonale Stammzellen) der Linie 14.1 (aus einer männlichen 129/Ola Maus-Blastozyste stammend) separat mit linearisierter Plasmid-DNA der Vektoren pROSA26-DTA (S) und –(AS) mittels Elektoporation transfiziert. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen für 7 Tage durch den Zusatz von Geneticin (G418) zum Medium auf die Anwesenheit des Neo Resistenzgens selektioniert. Geneticin resistente Zellen haben mit großer Wahrscheinlichkeit mitsamt des Neo Gens auch andere Teile des Targeting Vektors aufgenommen. Der Einbau der Fremd-DNA kann wie erwünscht durch homologe Rekombination zwischen der genomischen DNA des Rosa26 Lokus und den homologen Vektorsequenzen (kurzer + langer Arm) erfolgen. Häufiger kommt es jedoch zu einer ungerichteten Integration von Vektor-DNA an zufälliger Stelle im Genom. Um zwischen diesen Ereignissen zu unterscheiden, wurden die Zellen 5 Tage nach der Transfektion durch Zugabe von Gancyclovir ins Medium einer zusätzlichen, Negativ-Selektion unterworfen. Die Selektion mit Gancyclovir beruht auf dem Herpes simplex Virus-1 codiertem Thymidinkinasegen (TK). Zellen, in denen eine nicht-homologe Rekombination stattgefunden hat, sind im Gegensatz zu doppelt-homolog rekombinierten Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit Träger des TK Gens. Da die Thymidinkinase den Umbau von Gancyclovir in ein toxisches Substrat katalysiert, können so homolog rekombinierte Zellklone mit einem Faktor von 5-10 (D. Riethmacher, unveröffentlichte Beobachtung) angereichert werden. Entsprechend ließ sich zwei Tage nach Zugabe von Gancyclovir ins Medium ein massives Absterben von G418 resistenten Zellkolonien beobachten.



Abb. 5: Gezielte Modifikation des ROSA26 Lokus. Schematisch dargestellt sind die Struktur des Targeting Vektors, des ROSA26 Wildtyp Allels und des mutierten Allels. Durch Rekombination zwischen homologen Sequenzen des Targeting Vektors und des genomischen ROSA26 Lokus (durch Kreuze symbolisiert) wird das Konstrukt aus Splice-Akzeptor (SA), loxP-flankiertem (Pfeilköpfe) lacZ Gen, Diphtherie-Toxin A Gen mit SV40 Polyadenylierungssignal (DTA-SV40) und Neomycin-Resistenzcassette (PGK-Neo) in den ROSA26 Lokus inseriert. Die gegensätzliche Orientierung der Neo Resistenzcassette in den Targetingvektoren pROSA26-DTA (S,AS) ist durch Pfeile dargestellt. Die Lage der externen Proben A, B, die für Southern Blot Analysen verwendet wurden ist blau markiert. Relevante Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Eco*RI (RI), *Eco*RV (RV), *Sac*II (S), *Xba*I (X) und die Lage der Exons (E1, E2, E3) sind gekennzeichnet.

1.3. Identifizierung von homolog rekombinierten ES Zellklonen

Acht Tage nach der Elektoporation wurden G418 und Gangcyclovir resistente, deutlich identifizierbare Zellklone einzeln, mit Hilfe einer Pipette "gepickt", durch Trypsin-Behandlung vereinzelt und in 96 Lochplatten für zwei Tage expandiert. Danach wurden die Zellen jedes Klones auf zwei 96 Lochplatten verteilt. Eine der Platten diente als Replikamasterplatte. Die Klone dieser Platte wurden nach zweitägigem Wachstum mit Trypsin behandelt und bei –80°C eingefroren. In der zweiten Platte wurden die Klone eine Woche weiter expandiert, um sie dann zur Gewinnung von genomischer DNA zu lysieren.

Die Identifikation von homolog rekombinierten ES Zellklonen erfolgte durch eine Southern Blot-Analyse (Abb. 5 und Abb. 6). Dazu wurde die isolierte genomische ES Zell-DNA mit dem Restriktionsenzym *Eco*RV verdaut. Als Sonde diente ein radioaktiv markiertes, 140 bp großes *Eco*RI-*Hind*III DNA-Fragment, das aus dem Vektor pRosa26-5' stammte (Soriano 1999). Die DNA-Sequenz der Sonde ist komplementär zu einer DNA-Sequenz, die außerhalb des "kurzen Armes", direkt 5' vor einer *Sac*II-Schnittstelle lokalisiert ist (Probe B, siehe Abb. 5).

Von 150 auswertbaren Southern Blot Ergebnissen zeigten 7 Klone neben der WT Bande eine weitere Bande, die der Größe des zu erwartenden Fragmentes des mutierten ROSA26 Allels entsprach (Abb. 6). Vier der sieben Klone stammten aus ES Kulturen, die mit pROSA26-DTA (S) transfiziert wurden; die restlichen 3 Klone stammten aus Kulturen, die mit pROSA26-DTA (AS) transfiziert wurden.

1.4. Verifikation von homolog rekombinierten ES Zellklonen

Die als positiv (=homolog rekombiniert) identifizierten ES Zellklone wurden ausgehend von der eingefrorenen Masterplatte expandiert und mittels der gleichen Southern Blot-Analyse wie oben erwähnt verifiziert. Außerdem wurde mit Hilfe eines weiteren Southern Blots untersucht, ob zusätzlich zur Insertion in den ROSA26 Lokus weitere Integrationen von Sequenzen des Targeting Vektors ins Genom der Klone erfolgt waren (Abb. 6B). Die genomische DNA der einzelnen Klone wurde dazu mit *Eco*RV verdaut und mit einem radioaktiv markierten *Eco*RI Fragment (aus Plasmid pDI1) des DTA Gens hybridisiert. Für alle Klone wurde nur eine Bande mit einer Größe von ca. 14 kb detektiert. Bei zufälligen Integrationen des Targeting Vektors in das Genom würden bei einem *Eco*RV Verdau Fragmente verschiedener Größen entstehen bzw. ein 10 kb Fragment, wenn das TK Gen (*Eco*RV-Stelle im TK Gen) mitintegriert ist. Das Auftreten einer Bande (14kb), die der Größe des erwarteten *EcoR*V Fragmentes des mutierten ROSA26 Allels entsprach, zeigte im Falle der positiven Klone eine singuläre Insertion in den ROSA26 Lokus an.



Abb. 6: Nachweis der Insertion des lacZ-DTA Konstruktes in den genomischen ROSA26 Lokus (A,B,C,D) und Phänotyp von homozygoten ROSA26-DTA Mäusen (E). A) Southern Blot-Analyse genomischer DNA von 3 beispielhaft gezeigten G418 resistenten ES Zellklonen. Die genomische DNA wurde mit EcoRV verdaut und mit der externen 5'Probe B (siehe Abb. 5) hybridisiert. Klon 1 zeigt neben der WT Bande (11,0 kb) eine weitere Bande (3,6 kb), die der Größe des zu erwartenden Fragmentes des mutierten ROSA26 Allels entspricht. B) Southern Blot-Analyse genomischer DNA von 7 ES Zellklonen (1-3 Neo-AS; 4-7 Neo-S), die als homolog rekombiniert identifiziert wurden. Die genomische DNA wurde mit EcoRV verdaut und einer DTA spezifischen Probe hybridisiert. Das Vorhandensein einer Bande mit der Größe von 14 kb deutet für jeden der 7 getesteten Klone auf eine singuläre Insertion des Konstruktes in den ROSA26 Lokus hin. Die Klone 6F und 11E wurden zur Generierung von Mäusen benutzt. C) Southern Blot Analyse genomischer DNA aus Schwänzen adulter, heterozygoter (+/-), homozygoter (-/-) ROSA26-DTA (S) und WT (+/+) Mäuse. Die genomische DNA wurde mit EcoRI verdaut und der 5'Probe A (siehe Abb. 5) hybridisiert. Die extern des kurzen Armes liegende Probe beinhaltet ein 0,6 kb EcoRI-PacI Fragment aus dem Plasmid pR-A4 (Mao et al. 1999). D) PCR-Genotypisierung von ROSA26-DTA Mäusen (Wildtypprodukt 0,58 kb, mutantes Produkt 0,32 kb) E) Phänotyp homozygoter, ca. 6 Monate alter ROSA26-DTA Mäuse. Homozygote Tiere entwickelten eine gestauchte Kopfform und Degenerationen der Augen und des Schwanzes.

1.5. Funktionelle Charakterisierung von positiven ES Zellklonen

1.5.1. Nachweis von lacZ Expression

Da das ROSA26 Gen im ES Zellstadium bereits exprimiert ist, sollte die Insertion des loxP-lacZ-loxP-DTA Konstruktes in den homolog rekombinierten ES Zellklonen zu einer Expression von ß-Galaktosidase führen. In X-Gal Färbungen zeigten die 7 positiven Klone im Gegensatz zu Wildtypzellen innerhalb von 3 Stunden eine Blaufärbung, wodurch die erwartete Expression von ß-Galaktosidase bestätigt wurde (Abb. 8A). Wildtypzellen zeigten selbst bei längerer Inkubationszeit (>24 h) keine Blaufärbung.

1.5.2. Cre-induzierte Aktivierung von DTA in ES Zellen

Durch die Expression von Cre Rekombinase in Zellen, die eine funktionelle loxPlacZ-loxP-DTA Cassette enthalten, sollte die Exzision des lacZ Gens und darauf folgend die Expression von DTA induziert werden können.

Daher wurden zwei ES Klone mit gegensätzlicher Orientierung des Neo Gens ausgewählt (6F AS und 11E S) und transient mit einem Expressionsplasmid für Cre Rekombinase (pPGKCrebpA) transfiziert, um die Funktionalität der Cassette zu überprüfen (Abb. 7). Zur negativen Kontrolle wurden Parallelkulturen mit einem Plasmid transfiziert, in dem das Cre Gen gegen ein EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) Gen ausgetauscht wurde (pPGKEGFPbpA).

Einen Tag nach der Transfektion ließ sich die Expression von Cre Rekombinase und EGFP in einem Anteil (<1%) der rekombinanten Zellen und auch in WT Zellen (Kontrolle) immunhistochemisch bzw. im Falle von EGFP anhand von dessen Fluoreszensverhalten nachweisen. In den folgenden Tagen kam es in den Kulturen von WT und mutanten Zellen zu einer Zunahme der Zellzahl durch Proliferation. WT und mutante Kulturen unterschieden sich nicht auffallend in ihrem Wachstum. Im Falle der rekombinanten ES Zellen nahm am zweiten Tag nach der Transfektion die absolute Anzahl Cre positiver Zellen in der Kultur ab und sank nach 3 Tagen auf null. In Kulturen von WT Zellen kam es dagegen parallel zur Zunahme der Gesamtzellzahl auch zu einer Erhöhung der absoluten Anzahl Cre positiver Zellen. Letzteres kann wahrscheinlich durch eine Weitergabe des Cre Proteines und/oder des Cre Expressionsplasmides an Tochterzellen erklärt werden. Bezüglich der Expression

von EGFP unterschieden sich Wildtypzellen und rekombinante Zellen nicht. Beide Zelltypen exprimierten EGFP - analog zur Cre Expression in WT Zellen - über den Untersuchungszeitraum von 4 Tagen.

In einem weiteren Experiment wurden Zellen mit dem Cre Expressionsplasmid und einer limitierenden Menge an EGFP Expressionsplasmid cotransfiziert und die Expression von EGFP in den lebenden Kulturen beobachtet. Diese Vorgehensweise besaß im Gegensatz zu immunhistochemischen Färbungen den Vorteil, daß keine Zellen durch Waschschritte verloren gingen. Zusätzlich wurde auch bei den Cotransfektionen die Expression von Cre und EGFP in Parallelkulturen immunhistochemisch untersucht. Erfolgreich transfizierte WT Zellen und ihre Tochterzellen coexprimierten beide Gene über den gesamten Untersuchungszeitraum von 4 Tagen. EGFP oder Cre einzel-positive Zellen waren nur sehr selten zu beobachten (<5% der doppelt-positiven Zellen). In Kulturen der rekombinanten Zellen konnten (gleichsam der singulär mit dem Cre Expressionsplasmid transfizierten Kulturen) nur bis 2 Tage nach der Elektoporation doppelt-positive Zellen gefunden werden.

Zusammengenommen wird deutlich, daß ROSA26-DTA ES Zellen, die mit einem Cre Expressionsplasmid transfiziert wurden, für ca. 1-2 Tage nach der Transfektion nachweisbare Mengen an Cre Protein exprimieren. Im Gegensatz zu Kulturen von WT Zellen, die über den gesamten Untersuchungszeitraum von 4 Tagen Cre stabil exprimieren, kommt es danach in Kulturen von mutanten Zellen zu keiner Zunahme der absoluten Anzahl Cre positiver Zellen durch Proliferation. Stattdessen sind drei Tage nach der Transfektion keine Cre positiven Zellen mehr nachweisbar. Diese Ergebnisse indizieren, daß Cre Rekombinase durch die Aktivierung des DTA Gens in ROSA26-DTA ES Zellklonen eine Wachstumshemmung und schließlich den Zelltod auslöst. Mögliche, allgemein-zytotoxische Effekte der Cre Rekombinase selbst (Loonstra *et al.* 2001) sollten in diesem Experiment durch den Vergleich mit WT Kontrollkulturen normalisiert sein.

Um nachzuweisen, daß die Cre vermittelte Rekombination wie erwartet stattgefunden hat, wurde aus einer Kultur von ROSA26-DTA Zellen zwei Tage nach Transfektion mit einem Cre Expressionsplasmid genomische DNA gewonnen und in einer PCR Reaktion eingesetzt. Als Kontrolle diente DNA aus einer Kultur der gleichen Zellen, die ohne DNA transfiziert wurde. Die Lage der Primer und die PCR-

Bedingungen wurden so gewählt, daß ausschließlich das Cre-rekombinierte Allel als Matrize zur Bildung eines PCR-Produktes dienen konnte (siehe Material und Methoden 9.11.). Die Analyse der PCR-Reaktionen zeigte nur im Falle der Cretransfizierten Zellen ein Produkt der erwarteten Größe. Das PCR-Produkt wurde daraufhin kloniert und sequenziert. Die Sequenz entsprach der Sequenz des Cre rekombinierten Allels.

Die sich in der Orientierung der Neo-Cassette unterscheidenden ROSA26-DTA (S,AS) Allele waren in den zwei getesteten ES Zellklonen gleichsam funktionell. Daher wurde beschlossen, ausgehend von jedem Klon eine mutante Mauslinie zu generieren.



Abb. 7: Analyse der Expression von Cre Rekombinase (rot) (A,B,C,G,H,I) und EGFP (grün) (D,E,F,J,K,L) nach transienter Transfektion von WT (+/+) (A-F) und heterozygoten (+/-) ROSA26-DTA (S), (G-L) ES Zellen (Klon 11E) mit Expressionsplasmiden für Cre Rekombinase (pPGKCrebpA) und EGFP (pPGKEGFPbpA) als Kontrolle. Parallelkulturen wurden einen Tag nach der Transfektion über einen Zeitraum von drei Tagen analysiert. Maßstabsbalken = 125 µm. Die ES Zellen wurden in 6-Lochschalen auf Gelatine behandelten Deckgläschen für einen Tag kultiviert und dann chemisch (Lipofectamine Plus; Invitrogen) mit 1 µg Plasmid-DNA transfiziert. Zum Nachweis von Cre Rekombinase wurde ein Cre Antikörper benutzt, der wiederum mit einem Cy3konjugierten, sekundären Antikörper nachgewiesen wurde. EGFP wurde anhand seines Fluoreszensverhaltens nachgewiesen. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI angefärbt. Größere Zellkerne auf dem Boden der Kulturen gehören zu Fibroblasten, die als "Feeder"-Zellen zur Kultivierung von ES Zellen (kleinere Kerne in Zellagglomeraten) benötigt werden. Im Gegensatz zur WT Kontrolle waren Cre positive ROSA26-DTA ES Zellen drei Tage nach der Transfektion mit einem Cre Expressionsplasmid nicht mehr nachweisbar.

1.6. Generierung von chimären und heterozygoten ROSA26-DTA Tieren

Die Injektion der zwei rekombinanten ES Zellklone (6F AS und 11E S) in Blastozysten sowie der Transfer in den Uterus scheinschwangerer Weibchen wurden von der Serviceeinheit "Transgene Tiere" des "Zentrums für molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH)" durchgeführt.

In welchem Ausmaß die in die Blastozysten injizierten ES Zellen zur Bildung des Embryos beigetragen haben, kann man grob an der Fellfarbe der chimären Nachkommen ablesen. Dies ist möglich, da die injizierten ES Zellen aus dem beigeweiß gefärbten Mausstamm 129/Ola stammten und die Blastozysten aus Weibchen des schwarzen Mausstammes C57 BL/6 entnommen wurden. Chimäre dieser beiden Mausstämme besitzen mehr oder minder ausgedehnte braune bzw. weiße Flecken und Streifen innerhalb des schwarzen Felles. Ausgehend von jedem der zwei positiven ES Zellklonen wurden mehrere chimäre Männchen mit einem hohen Anteil an beige-weißer bzw. brauner Fellfarbe erhalten. (Weibliche chimäre Tiere kommen selten vor, da die verwendete ES Zellinie männlich ist.) Diese chimären Männchen wurden mit C57 BL/6 Weibchen gekreuzt, um durch die Transmission des mutierten Allels in die Keimbahn heterozygote Tiere zu erhalten. Die Nachkommen aus den Verpaarungen von chimären Männchen und C57 BL/6 Weibchen besaßen ausschließlich braunes Fell, was auf einen bestimmenden Beitrag der ES Zellen zur Keimbahnbildung hindeutete. Wie zu erwarten, konnten mittels PCR-Genotypisierung ca. 50% der braunen Nachkommen als heterozygote Träger des mutierten Allels identifiziert werden. Die unterschiedliche Orientierung des Neo Gens in den beiden Mauslinien konnte mit Hilfe einer PCR bestätigt werden (siehe Material und Methoden 9.11.).

Die Mauslinien werden analog zu den benutzten Targeting Vektoren im weiteren mit ROSA26-DTA (Sense) und ROSA26-DTA (Anti-Sense) bezeichnet.

1.7. Phänotyp von ROSA26-DTA Mäusen

Heterozygoten ROSA26-DTA (S; AS) Tiere wurden untereinander verpaart und die etwa vier Wochen alten Nachkommen nach dem Absetzen von ihren Muttertieren mittels PCR und Southern Blot genotypisiert (Abb. 6C, D). Dabei zeigte sich, daß der Anteil homozygoter Tiere bei ca. 15%, anstatt der zu erwartenden Mendelschen Häufigkeit von 25% lag (n=79 für ROSA26-DTA (S); n=89 für ROSA26-DTA (AS)). Der Zeitpunkt des Auftretens der erhöhten Letalität homozygoter Mutanten wurde nicht genau bestimmt. Das Auftreten von heterozygoten und Wildtyp Tieren entsprach dagegen dem Mendelschen 2:1 Verhältnis.

Heterozygote ROSA26-DTA Tiere waren bezüglich ihrer Gesundheit, Lebensdauer und ihres Reproduktionsverhaltens nicht von Wildtyptieren zu unterscheiden. Auch in den folgenden genaueren Analysen von verschiedenen Zelltypen und Geweben (B Zellen, Oligodendrozyten, Cortex, Leber) wurden keine Unterschiede bezüglich der Anzahl apoptotischer Zellen oder anderer degenerativer Erscheinungen im Vergleich zu Kontrolltieren gefunden (siehe Ergebnisse 2. Ablationen verschiedener Zelltypen).

Homozygote ROSA26-DTA Tiere entwickelten progressiv mit ihrem Alter eine Reihe von Auffälligkeiten wie eine kürzere Lebensdauer, eine geringere Größe, Abnormalitäten der Augen, Skelettabnormalitäten (Buckel, gestauchte Kopfform) und eine fortschreitende Degeneration des Schwanzes (Abb. 6E). Die Ursache für diese Veränderungen wurde nicht genau untersucht. Vor dem Hintergrund jedoch, daß bisher keine der berichteten Insertionen verschiedener Expressionskonstrukte an gleicher Stelle in den ROSA26 Lokus zu einem erkennbaren Phänotyp im homozygoten Zustand geführt hat, liegt hier wahrscheinlich kein Effekt vor, der auf der Modifikation des ROSA26 Lokus beruht. Es ist als wahrscheinlicher anzunehmen, daß von dem nicht-rekombinierten Allel im homozygoten Zustand die Bildung geringer Mengen einer DTA-Variante ausgeht, die zu den degenerativen Erscheinungen führt (siehe dazu auch Diskussion 1.).

Da homozygote Tiere offensichtlich unter ihren Defekten leiden, wurden sie nicht für Kreuzungen mit Cre Mäusen benutzt und ihre Zucht eingestellt.

1.8. LacZ Expression in ROSA26-DTA Mäusen

Die Insertion des lacZ-DTA Konstruktes in den ROSA26 Lokus sollte zu einer ubiquitären Expression des lacZ Genes führen. Um dies in den Mauslinien zu überprüfen, wurden Vibratom-Schnitte von Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien, sowie Gewebeschnitte adulter Mäuse mittels einer X-Gal Färbung auf das Vorhandensein von ß-Galaktosidase untersucht (Abb. 8 und Abb. 9). Dabei zeigte sich, daß ß-Galaktosidase in allen untersuchten Geweben detektiert werden konnte. Die Gewebe beider Mauslinien färbten sich in der gleichen Weise an. Die Orientierung des Neo Gens scheint daher keinen erkennbaren Einfluß auf die Expression des lacZ Gens auszuüben. Schnitte von homozygoten Embryonen zeigten bei gleichen Färbebedingungen eine stärkere Blaufärbung als Schnitte von heterozygoten Embryonen des gleichen Wurfes (Abb. 8C). Dieser Befund ist durch einen Gen-Dosis Effekt erklärbar, der schon häufig für lacZ oder andere Marker beschrieben wurde. Allgemein schien die lacZ Expression in embryonalen Geweben stärker als in postnatalen Geweben. Außerdem unterschieden sich postnatale Gewebe bezüglich ihres Färbeverhaltens. Während z.B. Gehirnschnitte in X-Gal-Färbelösung innerhalb von 3 Stunden eine blaue Farbe aufwiesen, dauerte es im Falle von Schnitten der Milz oder der Leber >12 Stunden bis eine deutliche Färbung erkennbar war. Es kann hier keine Aussage darüber gemacht werden, inwieweit diese Unterschiede durch die gewebespezifische Expression des lacZ Gens oder andere Zelltyp-spezifische Faktoren wie z.B. die Halbwertszeit der ß-Galaktosidase bedingt sind. Die beobachtete ubiquitäre Expression von ß-Galaktosidase in embryonalen und adulten Geweben deutet darauf hin, daß auch die potentielle, Creabhängige Expression von DTA in der gewünschten ubiquitären Weise gegeben ist.



Abb. 8: LacZ Expression in ROSA26-DTA (AS) ES Zellen und Embryonen. Die Embryonen wurden ganz (E11.5) oder halbiert (E15.5; E18.5) für einen Tag mit X-Gal gefärbt **A)** ROSA26-DTA (AS) (+/-) (Klon 6F) und WT (+/+) ES Zellen Maßstabs-Balken = 200 μ m **B**) Heterozygoter ROSA26-DTA (AS) Embryo und Wildtyp Geschwisterembryo des Entwicklungstages E11.5 **C)** Heterozygoter und homozygoter ROSA26-DTA (AS) Embryo des Entwicklungstages E15.5. Bei gleichen Färbebedingungen zeigten homozygote Embryonen eine intensivere Färbung als heterozygote Geschwisterembryonen. **D)** Heterozygoter ROSA26-DTA (AS) Embryo und Wildtyp Geschwisterembryo des Entwicklungstages E18.5. Die Färbung des Darmes wurde auch in Kontrollembryonen beobachtet und wird von endogenen ß-Galaktosidasen verursacht.



Abb. 9: LacZ Expression in Geweben von 3 Wochen alten heterozygoten (+/-) ROSA26-DTA (AS) Tieren im Vergleich zu Geweben von Wildtyp (+/+) Kontrollen. Vibratomschnitte (70 μ m) der verschiedenen in Agarose eingebetteten Gewebe wurden einen Tag mit X-Gal gefärbt. **A,B)** Gehirn; Maßstabsbalken = 500 μ m **C,D)** Herzmuskel; Maßstabsbalken = 500 μ m **E,F)** Niere **G,H)** Leber **I,J)** Lunge **K,L)** Milz, Maßstabsbalken in D-L wie in C.
2. Ablation verschiedener Zelltypen

Um die Funktionalität des ROSA26-DTA Allels zur *in vivo*-Ablation verschiedener Zelltypen zu testen, wurden die beiden Toxin-Mausstämme mit unterschiedlichen Cre Mäusen gekreuzt. Die Cre Mäuse wurden so gewählt, daß ein weites Spektrum an Zellen zu verschiedenen Entwicklungsstufen untersucht werden konnte.

2.1. Ablation von cortikalen Neuronen (Nex-Cre)

In Nex-Cre Mäusen wird Cre Rekombinase während der embryonalen Entwicklung beginnend ab E11.5 hauptsächlich in der corticalen Platte und der intermedialen Zone des sich entwickelnden Cortex exprimiert. Dabei beschränkt sich die Expression auf postmitotische, pyramidale Neurone, die ihren Ursprung in der Ventrikularzone haben, aus der sie auswandern. Mitotisch aktive Vorläuferzellen in der Ventrikularzone und Interneurone exprimieren kein Nex bzw. Cre Protein (Göbbels 2002).

Die Expression von Cre in Nex-Cre Mäusen wurde immunhistochemisch (Abb. 12, 13, 14) und durch die Verpaarung mit einer Cre Reporter-Mauslinie nachgewiesen (Abb. 10). Die benutzte Cre Reportermaus trägt ein Transgen (Rep) bestehend aus einer "gefloxten" Stopcassette vor einem lacZ Gen unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven ß-Aktin Promotors des Huhns (Araki *et al.* 1995; Akagi *et al.* 1997).

Verpaart man Cre Reportermäuse mit Cre Mäusen, wird in Cre-exprimierenden Zellen doppel-mutanter Nachkommen die Stop-Cassette entfernt und das lacZ Gen konstitutiv exprimiert. Auf diese Weise sind alle Zellen dauerhaft markiert, in denen die Cre-katalysierte Rekombination stattgefunden hat. Da das rekombinierte Reporterallel an Tochterzellen weitergegeben wird, werden somit auch alle Zellen markiert, die von einer Zelle abstammen, in der die Cre-vermittelte Rekombination stattgefunden hat.



Abb. 10: Nex-Cre induzierte lacZ Expression im ZNS von Nex-Cre Mäusen, die zur Darstellung der Cre Expression mit einer Cre Reportermaus gekreuzt wurden. Das Reportertransgen (Rep) besteht aus einer "gefloxten" Stopcassette vor einem lacZ Gen unter der Kontrolle des ß-Actin Promotors des Huhns. Durch Verpaarung von Cre-Reporter Mäusen mit Cre Mäusen wird in Cre-exprimierenden Zellen doppeltransgener Nachkommen die Stopcassette entfernt und das lacZ Gen permanent (auch in Tochterzellen) aktiviert. Vibratomschnitte (Dicke : 70 µm) von doppeltransgenen (Rep/+, Nex-Cre/+) Tieren wurden am Entwicklungstag E18.5 zur Detektion von ß-Galaktosidase Aktivität für einen Tag mit X-Gal gefärbt A) Sagittalschnitt durch ein Vorderhirn. LacZ positive Zellen befinden sich im cerebralen Cortex (cc), und dem Bulbus olfactorius (ob). Die Ventrikularzone des Cortex (vz) enthält keine lacZ⁺ Zellen. In einfach-transgenen Kontrollgehirnen wurden keine lacZ⁺ Zellen gefunden (nicht gezeigt). B) Transversalschnitt durch die thorakale Region des Rückenmarks. Hauptsächlich Neurone des dorsalen Horns zeigen eine Cre-induzierte lacZ Expression. Die ß-Gal Expression in Zellen außerhalb des Rückenmarks (*) wurde auch in WT Tieren beobachtet (nicht gezeigt) und rührt von endogenen ß-Galaktosidasen her, die wahrscheinlich im Knochen lokalisiert sind. Maßstabsbalken in A und B = 250 µm.

Homozygote und heterozygote Nex-Cre Mäuse wurden mit beiden ROSA26-DTA Linien, die sich in der Orientierung des Neo Gens unterscheiden, verpaart. Nachkommen, die Träger des Cre und des Toxin-Allels waren, wurden ohne äußerlich erkennbare Defekte der Atmung oder Motorik geboren; sie starben jedoch im Gegensatz zu ihren Geschwistertieren innerhalb des ersten Tages nach der Geburt.

Zur genaueren anatomischen Untersuchung wurden Köpfe von 18.5-tägigen Embryonen in ein Kunststoffpolymer eingebettet und sagittale Schnitte angefertigt (Abb. 11). In doppel-mutanten (DTA/+, Nex-Cre/+) Tieren war im Vergleich zu einfach-mutanten DTA/+ bzw. Nex-Cre/+ und Wildtyp Tieren ein auffällig fehlentwickelter Cerebral-Cortex zu erkennen. Die lokale Degeneration des Gehirnbereiches stimmte mit der Expressionsdomäne der Cre Rekombinase in NexCre Mäusen überein. Die Degeneration des Cortex konnte auch anhand von X-Gal gefärbten Vibratomschnitten gezeigt werden (Abb. 11). Mit Ausnahme der Ventrikularzone war innerhalb des Cortex im Gegensatz zu den heterozygoten DTA/+ Kontrollen fast keine X-Gal Färbung zu erkennen. Das Ausbleiben von ß-Galaktosidase-Aktivität zeigt an, daß die lacZ Cassette des ROSA26-lacZ-DTA Allels in den noch vorhandenen Zellen durch Cre Aktivität deletiert wurde. Daher sollten die betreffenden Zellen DTA exprimieren und auf dem Weg sein abzusterben. Anstatt einer normalen Cortex-Schichtung wiesen Doppelmutanten ein wellenartiges Muster auf. Dabei scheinen die regelmäßig angeordneten, blau gefärbten Regionen durch lacZ positive Zellen hervorgerufen zu werden, die an definierten Stellen aus der Proliferationsschicht in die darüberliegende, apoptotische Intermedialzone eingewandert sind.

Die Resultate für die beiden ROSA26-DTA (S;AS) Linien waren in allen Analysen identisch, so daß ihre Unterscheidung im weiteren keine Erwähnung mehr findet.



Abb. 11: Anatomie des cerebralen Cortex von einfach-mutanten DTA/+ (A,C,E) und doppel-mutanten Nex-Cre/+, DTA/+ (B,D,F) Embryonen des Entwicklungstages E18.5. A,B) Toluidinblau angefärbte Sagittalschnitte in Kunststoff eingebetteter Köpfe von Kontroll- (A) und doppel-mutanten (B) Embryonen. Dargestellt ist die Region des Telencephalons (T) mit Bulbus olfactorius (OB). In doppel-mutanten Embryonen ist der Cortex degeneriert und zeigt anstatt einer normalen Schichtung ein auffälliges Wellenmuster aus hell und dunkel angefärbten Bereichen. Dunkel angefärbte Bereiche enthalten Ansammlungen pyknotischer Kerne, was auf apoptotische Zellen hindeutet. Maßstabsbalken = 500 µm C,D) Vergrößerte Ausschnitte des parietalen Cortex aus A, B. In C ist die Schichtung des Cortex gekennzeichnet : VZ Ventrikularzone, SVZ Subventrikularzone, IZ Intermedialzone, SP Subplatte, CP Cortikalplatte, MZ, Marginalzone. Maßstabsbalken in C, D = 50 µm. EF) Sagittale Vibratomschnitte durch Gehirne von DTA/+ Kontroll- (E) und doppel-mutanten (F) Embryonen, die zum Nachweis von ß-Galaktosidase Expression mit X-Gal angefärbt wurden. Dargestellt ist die Region des Telencephalons (T) mit Bulbus olfactorius (OB) (in der Mutante bei der Präparation des Gehirnes z.T. abgerissen) und Lateralventrikel (LV). Maßstabsbalken = 500 µm.

Da das untersuchte E18.5 Stadium eher als ein Endstadium der Cortexentwicklung betrachtet werden kann, wurden frühere Embryonalstadien (E12.5, E14.5, E15.5, E16.5) mittels immunhistochemischer Methoden untersucht, um mehr Aufschluß über den zeitlichen Verlauf des degenerativen Prozesses zu erhalten.

Am Embryonaltag E12.5 – einen Tag nach dem Expressionsbeginn von Nex – war eine Schicht Cre positiver Zellen in der cortikalen (Prä-) Platte nachweisbar (Abb. 12). Die Cre positive Zellschicht besteht zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich aus differenzierten Pionierneuronen. Außerdem konnte die Präplatten-spezifische Schicht von Cajal Retzius Zellen anhand der Expression des Markerproteines Reelin nachgewiesen werden (Abb. 12). Cajal Retzius Zellen exprimierten keine Cre Rekombinase und sollten sich daher auch in doppel-mutanten Embryonen normal entwickeln können, sofern ihre Entwicklung und Wanderung nicht von Nex-positiven Neuronen beeinflußt wird. Sowohl Cre als auch Reelin positive Zellen waren zum Zeitpunkt E12.5 in den Doppelmutanten vorhanden und zeigten keine Unterschiede im Vergleich mit Kontrollembryonen. In TUNEL-Färbungen zur Detektion apoptotischer Zellen wurden ebenfalls keine Unterschiede zwischen Kontrollen und Doppelmutanten zum Zeitpunkt E12.5 beobachtet (Daten nicht gezeigt).



Abb. 12: Doppel-Immunfluoreszens Analyse der Expression von Cre und Reelin im cerebralen Neocortex von einfach mutanten (Nex-Cre/+) (A,B) und doppel-mutanten (Nex-Cre/+, DTA/+) (C,D) Embryonen. Es wurden Antikörper gegen Cre (rot) und Reelin (grün) verwendet. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI angefärbt. **A,B**) Sagittalschnitte des Kopfes im Bereich des Neocortex zum Entwicklungstag E12.5. Kontrollschnitte (A) und Schnitte von Doppelmutanten (B) unterscheiden sich zu diesem Zeitpunkt nicht. **C,D**) Sagittalschnitte des Kopfes im Bereich des Neocortex zum Entwicklungstag E14.5. Im Vergleich zur Kontrolle (C) sind Neurone in Doppelmutanten (D) nur schwach Cre positiv. Außerdem ist die Cre Färbung nicht wie normal nukleär lokalisiert. Reelin positive Zellen exprimieren kein Cre und bleiben in den Mutanten unbeeinflußt. Maßstabsbalken in B,C,D wie in A = 50 µm.

In den folgenden Tagen (E14.5 und E15.5) wurde im Neocortex von Doppelmutanten im Vergleich zu Kontrollgehirnen eine deutlich schwächere Cre Immunreaktivität (Abb. 12) in Kombination mit einer zunehmenden Anzahl TUNEL positiver Zellen registriert (Daten nicht gezeigt). Als Resultat dieses fortschreitenden Prozesses war am Tag E16.5 eine hohe Anzahl von apoptotischen Zellen lokal beschränkt im Cortex von Doppelmutanten nachweisbar (Abb. 13). Ausgenommen davon war die Subventrikularzone, in deren Zellen keine Cre Rekombination stattfindet. Zudem war auf Kunststoffschnitten und X-Gal gefärbten Vibratomschnitten die bereits erwähnte, abnorme Schichtung des Cortex erkennbar.

Am Tag E18.5 fand sich, wie schon erwähnt, ein völlig degenerierter Cortex ohne Schichtung und Dickenwachstum (Abb. 11). Wie zum Zeitpunkt E16.5 war ein Großteil der dorsal der Subventrikularzone vorhandenen Zellen apoptotisch und exprimierte kein Cre Protein (Daten nicht gezeigt).

Nex bzw. Cre werden neben der Expression in Neuronen des Cortex auch in bestimmten Neuronen des Rückenmarks ab E11.5 exprimiert. Aus diesem Grund wurden Kryoschnitte der thorakalen Rückenmarksregion von Embryonen im Alter von E18.5 angefertigt und auf die Expression von Cre und apoptotischen Zellen hin untersucht (Abb. 14). Wie im Gehirn fand sich auch hier eine deutliche Dezimierung Cre positiver Zellen in den doppel-mutanten Embryonen im Vergleich zu heterozygoten Nex-Cre Embryonen. Die Anzahl apoptotischer Zellen schien nur leicht erhöht. Daraus läßt sich folgern, daß der Hauptteil der Nex-positiven Neurone wahrscheinlich zu früheren Entwicklungszeitpunkten apoptotisch und eliminiert wurde.



Abb. 13: Analyse der Nex-Cre induzierten Zellablation anhand von vergleichbaren Sagittalschnitten des cerebralen Neocortex von einfachmutanten DTA/+ (A,C,E) und Nex-Cre/+ (G,I) und doppel-mutanten Nex-Cre/+, DTA/+ (B,D,F,H,J) Embryonen des Entwicklungstages E16.5. A,B) Toluidinblau angefärbte Sagittalschnitte in Kunststoff eingebetteter Köpfe von Kontroll- (A) und doppelmutanten (B) Embryonen. Dargestellt ist die Region des Telencephalons (T) Bulbus olfactorius mit (OB). Maßstabsbalken = 250 μ m. C,D) Vergrößerter Ausschnitt des parietalen Cortex aus A und B. In C sind cortikale Schichten gekennzeichnet : Subventrikularzone (SV), Intermedialzone (IZ) und Cortikalplatte (CP) E,F) Vibratomschnitte zum Nachweis von ß-Galaktosidase für einen Tag mit X-Gal G,H,I,Jgefärbt. Doppel-Immunfluoreszens-Studie Cre positiver (G,H) und TUNEL positiver Zellen (I,J). Maßstabsbalken in D-J wie in C.



Abb. 14: Doppel-Immunfluoreszens-Studie von Cre⁺ (rot) und apoptotischen TUNEL⁺ (grün) Zellen in Transversalschnitten der thorakalen Rückenmarksregion von A) Kontroll (Nex-Cre/+) und B) doppel-mutanten (Nex-Cre/+, DTA/+) Embryonen des Entwicklungstages E18.5.

Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken = 250 µm.

Die beobachtete Degeneration des Cortex in Verbindung mit der Abnahme Cre positiver Zellen und der gleichzeitigen, lokalen Zunahme apoptotischer Zellen zeigt, daß durch die Expression von Cre das selektive Absterben von Neuronen in ROSA26-DTA Mäusen ausgelöst werden kann. Da davon auszugehen ist, daß von den unbetroffenen Vorläuferzellen in der Ventrikularzone beständig Neurone generiert werden, liegt im sich entwickelnden Cortex wahrscheinlich ein dynamischer Prozess aus Zellneubildung, Migration und Zelltod vor. Die beobachtete Zeitspanne zwischen dem Auftreten Cre positiver Zellen und dem Einsatz massiver Apoptose läßt darauf schließen, daß der Prozess der Ablation bei den hier betroffenen cortikalen Neuronen 2-3 Tage dauert. Dies stimmt gut mit dem beobachteten Zeitverlauf der Ablation in ES Zellkulturen überein.

2.2. Ablation von Hepatozyten (Alfp-Cre)

Im folgenden sollte durch die Elimination von Hepatozyten die Funktionalität des Systems an einem anderen Zelltyp, in einem anderen Organ demonstriert werden.

Zur Elimination von Hepatozyten wurden Alfp-Cre Mäuse benutzt, in denen Cre analog zu Albumin exprimiert wird (Kellendonk *et al.* 2000).

In Mäusen wird das Albumin Gen während der Embryogenese kurz nach der Entstehung der Leberanlage (E 9.5) zunächst schwach und innerhalb der weiteren Leberentwicklung stärker in Hepatozyten exprimiert.

Die Expression von Cre in Hepatozyten der erhaltenen Alfp-Cre transgenen Mauslinie wurde mit Hilfe eines Cre Antikörpers in Kryoschnitten von Lebern adulter Mäuse nachgewiesen (Abb. 15D). Im Vergleich zur Cre Expression in Neuronen von Nex-Cre Tieren war die Immunreaktivität deutlich schwächer. Dies könnte darauf hindeuten, daß die gebildete Menge an Cre Protein in den Hepatozyten relativ gering ist (siehe dazu auch (Postic *et al.* 2000)). Außerdem war stets nur ein Anteil (<35%) der Hepatozyten Cre positiv. Durch eine Verpaarung mit dem Cre Reporterstamm konnte gezeigt werden, daß im adulten Stadium eine zunehmende Anzahl (ca. 35%→65%) von Leberzellen ein Cre rekombiniertes und aktiviertes lacZ-Reportergen trug (Abb. 15). Es muß daher in einem beträchtlichen Teil der Hepatozyten oder ihren Vorläuferzellen an einem nicht näher definierten Zeitpunkt zu einer Cre-induzierten Rekombination des Reporterallels gekommen sein. Dieser Befund legt nahe, daß die Cre Expression in vielen Zellen transient und nicht konstitutiv erfolgt.

Alternativ könnten die Cre Expressionslevel stark schwanken und teilweise unter ein Niveau fallen, das einen immunhistochemischen Nachweis nicht erlaubt.



Abb. 15: Expression von Cre Rekombinase in der Leber von Alfp-Cre Mäusen. A,B,C) Alfp-Cre induzierte lacZ Expression in Lebern von Alfp-Cre Mäusen, die zur Darstellung der Cre Expression mit einer Cre Reporterlinie gekreuzt wurden. Vibratomschnitte (Dicke: 70 µm) der Leber von 6 Tage (A) und 15 Tage (B) alten doppel-transgenen (Rep/+, Alfp-Cre/+) Tieren (A,B) und einfach-transgenen (Rep/+) Kontrolltieren (C) wurden zur Detektion von ß-Galaktosidase für einen Tag mit X-Gal gefärbt. In A und B ist nur ein Prozentsatz der Hepatozyten ß-Galaktosidase positiv. Dies deutet darauf hin, daß die Alfp-Cre induzierte Rekombination des Reporterallels unvollständig in der Hepatozytenpopulation erfolgte. Mit fortschreitendem Alter scheint der Anteil Cre rekombinierter Zellen in der Leber von Alfp-Cre Tieren zuzunehmen (vergl. A,B). D) Immunhistochemischer Nachweis von Cre Rekombinase (rot) mit Hilfe eines Cre Antikörpers in der Leber von 6 Tage alten doppel-transgenen (Rep/+, Alfp-Cre/+) Tieren. Nur ein Prozentsatz (<35%) der Hepatozyten von Alfp-Cre Tieren exprimiert nachweisbare Mengen an Cre Rekombinase. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken in $A-D = 250 \ \mu m$.

Die Alfp-Cre Linie wurde mit der ROSA26-DTA (S) Linie gekreuzt und die Nachkommen im Alter von ca. 6 Wochen untersucht. Äußerlich betrachtet waren die Tiere aller Genotypen gesund, ihre Lebern unauffällig, und es wurde innerhalb von 5 Monaten keine erhöhte Letalität festgestellt. Zur genaueren Analyse wurden Kunststoffschnitte vom rechten Leberlappen mikroskopisch untersucht (Abb. 16). Dabei zeigten die Lebern von Alfp-Cre/+, DTA/+ Tieren deutliche Zeichen einer toxischen Hepatose (Roessle 1929) wie Kernanomalien, zytoplasmatische Schwellungen und eine erhöhte Anzahl mitotischer Zellen (Ishak *et al.* 1972; Klinge 1973).



Abb. 16: Morphologie der Leber von 6 Wochen alten doppel-mutanten Alfp-Cre/+, DTA/+ Tieren (**B**) und einfach-mutanten DTA/+ Kontrolltieren (**A**). Kunststoffschnitte von PFA-fixierten Lebern wurden mit Hämatoxilin/Eosin angefärbt. In Lebern von doppel-mutanten Tieren war neben pyknotischen Kernen, die auf Zelltod hinweisen, eine erhöhte Anzahl an mitotischen Zellkernen (siehe Pfeile in B) zu beobachten. Außerdem waren Hepatozyten im Vergleich zu Kontrollen häufig ballonartig angeschwollen. Maßstabsbalken in A, B = 125 µm

Immunhistologische Analysen der rechten Leberlappen von doppel-mutanten und heterozygoten Alfp-Cre Tieren zeigten keine Unterschiede in der Anzahl Cre positiver Zellen. Es fand sich jedoch eine vierfach erhöhte Anzahl TUNEL positiver Zellen in Alfp-Cre/+; DTA/+ Lebern im Vergleich zu den einfach-transgenen Kontrollen (Abb. 17C). Ein weiteres Charakteristikum degenerativer Leberprozesse ist ein Konzentrationsanstieg der Enzyme Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) (auch als GOT, GST bezeichnet) im Serum betroffener Organismen. Diese Enzyme sind in hoher Konzentration in gesunden Hepatozyten enthalten und werden im Falle eines Absterbens von Leberzellen ins Serum freigesetzt. Sie dienen in der Humanmedizin als Indikator für pathologische Leber-Prozesse. Die Aktivitäten der beiden Enzyme wurden im Blutserum der Versuchstiere vom Labor der Abteilung "Innere Medizin" des "Universitätskrankenhauses Eppendorf" bestimmt (Abb. 17). Die Serumaktivitäten der Enzyme AST und ALT war in doppel-mutanten Tieren im Vergleich zu den einfach-transgenen Kontrollen, (die sich nicht unterschieden), um den Faktor 5-7 erhöht. Dieser Wert entspricht eher einer schwächeren Leberschädigung als einer akuten, dramatischen Schädigung, bei der um bis zu zwei Größenordnungen höhere Serumwerte erreicht werden können (Saito et al. 2001; Mallet et al. 2002). Dieser Befund stimmte mit den mikroskopisch-anatomischen Daten überein, die ebenfalls nicht für eine akute zirrhotische oder fibrotische Veränderung sprachen. Inwieweit die Hepatose sich langfristig entwickelt und eventuell zur Leberzirrhose führt, wurde noch nicht untersucht.



Abb. 17: Alfp-Cre induzierte Apoptose von Hepatozyten in ROSA26-DTA (S) Mäusen. A,B) Serumaktivität der Aspartat-Aminotransferase (AST) und der Alanin-Aminotransferase (ALT) in ca. 6 Wochen alten doppel-transgenen Alfp-Cre/+, DTA/+ (n=4) und Alfp-Cre/+ (n=6) bzw. DTA/+ (n=4) Kontrolltieren. Den Tieren wurde unter tiefer Narkose Blut (0,5 ml) mit Hilfe einer Glaskapillare aus einem Retinagefäß entnommen. Nachdem das Blut geronnen war (2 h bei Raumtemperatur), wurde das Serum durch Zentrifugation abgetrennt. Die Bestimmung der Enzym-Serumaktivitäten wurde von der Abteilung "Innere Medizin" des UKE (Hamburg) mit einem automatischen Analysegerät vorgenommen. Die AST und ALT Aktivitäten waren in doppel-mutanten Tieren gegenüber Kontrolltieren nach einem Student-t-Test signifikant erhöht (p<0,01). **C)** Anzahl TUNEL⁺ Zellen in Lebern von 6 Wochen alten doppel-transgenen Alfp-Cre/+, DTA/+ (n=4) Mäusen und Alfp-Cre/+ (n=3) bzw. DTA/+ (n=1) Kontrolltieren (zusammengefasst). Zur Detektion von apoptotischen Zellen wurde eine TUNEL Färbung auf Kryoschnitten vom rechten Leberlappen durchgeführt. Für jedes Tier wurden TUNEL⁺ Zellen in einem vergleichbaren mikroskopischen Bildausschnitt von drei Schnitten ausgezählt. Die vierfache Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen in doppel-mutanten Tieren gegenüber Kontrolltieren ist nach einem Student-t-Test signifikant (p<0,01).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Alfp-Cre abhängige Aktivierung des Toxinallels zu einer Leberschädigung führte, die durch einen erhöhten Prozentsatz apoptotischer Zellen und erhöhte AST und ALT Serumwerte gekennzeichnet war. Da die Leber insgesamt nicht dramatisch geschädigt war, muß davon ausgegangen werden, daß ein beträchtlicher Anteil der Hepatozyten der Ablation entkommen konnte und regenerative Prozesse den stetigen Zellverlust ausgleichen konnten. Die hohe Regenerationsfähigkeit der Leber während einer chronischen Gewebezerstörung oder nach einer Hepatektomie ist ein bekanntes Phänomen (Michalopoulos *et al.* 1997; Fausto *et al.* 2003).

2.3. Ablation von Oligodendrozyten und Schwann Zellen (CNP-Cre)

Oligodendrozyten und Schwann Zellen gehören zur Gruppe der Gliazellen, die neuronalen Ursprungs ist. Schwann Zellen untergliedern sich in zwei Populationen, die nicht-myelinisierenden Schwann Zellen, die mit kleinkalibrigen, unmyelinisierten Axonen assoziiert sind und die myelinisierenden Schwann Zellen. Myelinisierende Schwann Zellen sind für die Myelinisierung von Nerven im peripheren Nervensystem (PNS) verantwortlich. Im zentralen Nervensystem (ZNS) übernehmen Oligodendrozyten die Myelinisierung. Die Eliminierung von myelinisierenden Gliazellen sollte es ermöglichen, in einem *in vivo* Modell die Konsequenzen von Dysund Demyelinisierungen untersuchen zu können. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse können hilfreich für das Verständnis demyelinisierender Krankheiten wie Multipler Sklerose sein.

Um Oligodendrozyten und myelinisierende Schwann Zellen zu eliminieren, wurde der ROSA26-DTA (AS) Mausstamm mit heterozygoten CNP-Cre Mäusen gekreuzt, in denen Cre unter der Kontrolle des endogenen 2´,3´-Zyklo-Nukleotid 3´- Phoshodiesterase (CNPase) Promotors exprimiert wird (Lappe-Siefke *et al.* 2003).

CNPase wird häufig als Marker für myelinisierende Gliazellen benutzt. Im zentralen Nervensystem wird CNP während der Entwicklung in Oligodendrozyt-Vorläuferzellen und reifen Oligodendrozyten exprimiert. Im peripheren Nervensystem findet sich CNP Expression in myelinisierenden Schwann Zellen, jedoch ist die Expression hier weitaus schwächer als in Oligodendrozyten (Sprinkle 1989; Yu *et al.* 1994; Chandross *et al.* 1999).

In dieser Arbeit konnte die Expression von Cre in Oligodendrozyten des ZNS heterozygoter CNP-Cre Mäuse immunhistochemisch gezeigt werden (Abb.18, 19, 20). Die Expression im ZNS und PNS wurde darüberhinaus in der Arbeitsgruppe von Klaus-Armin Nave (Göttingen) durch Verpaarung mit dem auch in dieser Arbeit benutzten Cre Reporter-Mausstamm verifiziert (persönliche Kommunikation C. Lappe-Siefke und (Lappe-Siefke *et al.* 2003)).

Doppel-mutante Nachkommen aus Verpaarungen von heterozygoten CNP-Cre und ROSA26-DTA (AS) Mäusen entwickelten sich ungefähr bis zum achten Tag nach ihrer Geburt normal und wiesen außer einem geringfügig vermindertem Gewicht keine Auffälligkeiten auf. Ab diesem Zeitpunkt jedoch, zeigten sie eine Hinterlaufschwäche und einen Tremor des gesamten Körpers. Diese Symptome ähneln denen von natürlich vorkommenden Mausmutanten wie z.B *jimpy* (Nave *et al.* 1987), *shiverer* (Chernoff 1981) oder *trembler* (Gale *et al.* 1982), bei denen es aufgrund von Mutationen in Genen für Myelinbestandteile zu Hypomyelinisierungen kommt (siehe dazu auch Diskussion 2.3.). Bei den Nachkommen verlief die Erkrankung jedoch dramatischer als bei den erwähnten *jimpy*, *shiverer* oder *trembler* Mäusen. So zeigten doppel-mutante CNP-Cre/+, DTA/+ Tiere im Vergleich zu Kontroll-Geschwistertieren ungefähr ab dem achten Tag nach ihrer Geburt ein deutlich geringeres Größenwachstum und eine Gewichtsabnahme. Schließlich starb der größte Teil der Tiere im Alter von 10-16 Tagen.

Die Myelinisierung des ZNS ist ein Prozess, der in der Maus hauptsächlich in den ersten drei postnatalen Wochen stattfindet (Foran *et al.* 1992). Er geht mit einer Proliferationsphase von Oligodendrozyten einher, die ihren Höhepunkt während der ersten 9 Tage nach der Geburt erreicht (Mathis *et al.* 2000). Oligodendrozyten kommen in der sogenannten "weißen Substanz" des ZNS in hoher Dichte vor. Areale mit einem großen Anteil an weißer Substanz liegen im Cerebellum, im Corpus Callosum und im Rückenmark.

In diesen Arealen läßt sich die Reduktion von Oligodendrozyten mit Hilfe von Antikörpern darstellen, die gegen Oligodendrozyten-spezifische Proteine wie z.B. "Myelin Basic Protein (MBP)" oder "Myelin Associated Glycoprotein (MAG)" gerichtet sind. MBP und MAG kommen im Zellkörper von Oligodendrozyten vor und sind zudem Bestandteile der Myelinscheiden, die Axone einkleiden. Im ZNS von heterozygoten CNP-Cre Mäusen können zusätzlich einzelne Oligodendrozyten und ihre Vorläufer zellspezifisch mit einem Antikörper gegen die im Nukleus lokalisierte Cre Rekombinase identifiziert werden.

Kryoschnitte des Gehirns von 14 Tage alten Nachkommen aus Verpaarungen von heterozygoten CNP-Cre Tieren mit ROSA26-DTA (AS) Tieren wurden mit Antikörpern gegen MBP, MAG, Cre und CNPase (nicht gezeigt) auf das Vorhandensein von Myelin und Oligodendrozyten untersucht (Abb. 18 und Abb. 19). Dabei zeigte sich, daß in Gehirnen von doppel-mutanten Mäusen bei äußerlich vorhandener, struktureller Integrität keiner der Myelinbestandteile und keine Cre positiven Zellen mehr nachzuweisen waren. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls auf der RNA Ebene durch eine *in situ*-Hybridisierung mit einer MBP spezifischen RNA-Sonde bestätigt werden (Abb. 19). Beide Einzelmutanten unterschieden sich nicht und zeigten die normale Expression der Marker wie in Wildtyp-Kontrolltieren. Die Expression von Markerproteinen für Astrocyten (Glial Fibrillic Acid Protein; GFAP) und Neuronen (Neurofilament 160; NF160) zeigte keine auffälligen Veränderungen. Das Fehlen der Expression von verschiedenen Markerproteinen für Oligodendrozyten deutet stark darauf hin, daß es mit der gewählten Ablationsmethode möglich ist, Oligodendrozyten und ihre Vorläuferzellen spezifisch und mit sehr hoher Effizienz zu eliminieren.



Abb. 18: CNP-Cre induzierte Ablation von Oligodendrozyten in ROSA26-DTA (AS) Mäusen. Sagittale Gehirnschnitte von einfach-mutanten CNP-Cre/+ Kontrolltieren (A,C,E,G,I,K) und doppel-mutanten CNP-Cre/+, DTA/+ Tieren (B,D,F,H,J,L) im Alter von 14 Tagen wurden mit Antikörpern auf die Expression von unterschiedlichen Markerproteinen untersucht. Dargestellt sind die Region des Corpus Callosum (A-F) und des Cerebellum (G-L). Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI angefärbt. A,B,G,H) Co-Immunfluoreszensstudie der Expression von MBP (Myelin Basic Protein) (rot) und dem Astrocytenmarkerprotein GFAP (Glial Fibrilic Acid Protein) (grün). In Doppelmutanten war MBP weder im Bereich normalerweise myelinisierter Nervenfasern des Gehirnes nachzuweisen, noch waren einzelne MBP⁺ Zellen auszumachen. Die Anzahl GFAP⁺ Zellen schien nach grober Abschätzung in Mutanten unverändert. C,D,I,J) Co-Immunfluoreszensstudie der Expression von MAG (Myelin Associated Glycoprotein) (grün) und Cre (rot). In Gehirnen von Doppelmutanten war das Myelinprotein MAG nicht zu detektieren. Außerdem waren im Gegensatz zu CNP-Cre Kontrollgehirnen keine Cre positiven Zellen nachzuweisen. E,F,K,L) Immunhistochemischer Nachweis von NF160 (Neurofilament 160). NF160 ist ein Bestandteil von Axonen und kann zum Nachweis von Nervenfasern benutzt werden. In doppel-mutanten Gehirnen wurden im Vergleich zu Kontrollgehirnen keine auffälligen Veränderungen des Expressionsmusters von NF160 beobachtet. Maßstabsbalken in B-L wie in A = $125 \,\mu m$.



Abb. 19: MBP Expression in sagittalen Gehirnschnitten von einfach-mutanten DTA/+ Kontrolltieren (A,C) und doppel-mutanten CNP-Cre/+, DTA/+ Tieren (B,D) im Alter von 14 Tagen. Dargestellt ist die Region des Cerebellum. **A,B**) Immunhistochemischer Nachweis von MBP (Myelin Basic Protein) mit Hilfe eines MBP spezifischen Antikörpers. Zur Detektion des MBP Antikörpers wurde ein Zweitantikörper benutzt, der mit HRP (Horseradish Peroxidase) konjugiert wurde. HRP Aktivität wurde in einer Farbreaktion (braune Farbe) mit Diaminobenzidin (DAB) nachgewiesen. Maßstabsbalken = 250 µm **C,D**) Nachweis der MBP mRNA mittels *in situ*-Hybridisierung mit einer Dig-markierten, MBP spezifischen Antisense-RNA Probe. In doppel-mutanten Gehirnen konnte weder MBP Protein noch konnten Zellen, die ein MBP RNA-Transkript bilden, nachgewiesen werden. Maßstabsbalken = 125 µm.

Auch im Rückenmark konnte die fehlende Expression der Markergene Cre, MBP (Abb. 20) und MAG (nicht gezeigt) demonstriert werden. In Bereichen, in denen normalerweise MBP exprimiert wird, wurde anhand von DAPI Färbungen eine geringere Anzahl an Zellkernen registriert. Auf Kunststoffschnitten war ebenfalls im Bereich der weißen Substanz eine deutliche Reduktion der Zellzahl erkennbar, die am wahrscheinlichsten durch die Ablation von Oligodendrozyten erklärbar ist (Abb. 20). Die Anzahl an Motoneuronen war dagegen nicht auffällig verändert.

Interessanterweise wurden in einigen Tieren wenige MBP positive Strukturen gefunden, die häufig auf eine der beiden lateralen Regionen des Rückenmarkes beschränkt waren (Abb. 20). In diesen Tieren muß es zeitweise zu einer geringen Expression von MBP gekommen sein, was auf die Entwicklung und Differenzierung einzelner Oligodendrozyten hindeutet, die der Ablation temporär entgehen konnten.



Abb. 20: CNP-Cre induzierte Ablation von Oligodendrozyten im Rückenmark von ROSA26-DTA (AS) Mäusen. Transversale Schnitte des Rückenmarks im Bereich der lumbalen Segmente von einfach-mutanten CNP-Cre/+ (A) bzw. DTA/+ (C) Kontrolltieren und doppel-mutanten CNP-Cre/+, DTA/+ (B,D) Tieren im Alter von 14 Tagen wurden untersucht. A,B) Co-Immunfluoreszensstudie der Expression von MBP (Myelin Basic Protein) (rot) und Cre (grün). Im Rückenmark von doppel-mutanten Tieren war das Myelinprotein MBP in der Regel nicht zu detektieren. In einigen Tieren wurden vereinzelt MBP positive Strukturen gefunden (siehe B), deren Lokalisation auf eine der lateralen Regionen des Rückenmarks beschränkt war. In den wenigen MBP positiven Bereichen und den übrigen Regionen des Rückenmarkes von doppel-mutanten Tieren wurden im Gegensatz zu heterozygoten CNP-Cre Kontrollen keine Cre positiven Zellen gefunden. Maßstabsbalken in B wie in A = 250 µm C,D) Toluidinblau angefärbte Kunststoffschnitte einer vergleichbaren Region wie in A (gekennzeichnet mit einem *). In Doppelmutanten ließ sich ein Zellverlust in der weißen Substanz des Rückenmarks (Doppelpfeil) erkennen. Im ventralen Horn sind einzelne Motoneurone (Pfeilkopf) zu erkennen, deren Anzahl in den Doppelmutanten nicht auffällig verändert war. Maßstabsbalken in C wie in D = 125 µm.

Myelinisierende Schwann Zellen, die Myelin bildenden Zellen des peripheren Nervensystems (PNS), exprimieren wie Oligodendrozyten im ZNS ebenfalls CNP (bzw. Cre in CNP-Cre Tieren) jedoch deutlich schwächer. Myelinisierungsdefekte im PNS lassen sich gut an einfach zu isolierenden Nerven wie dem Ischiasnerv erkennen. Daher wurden die Ischiasnerven von doppel-mutanten (CNP-Cre/+, DTA/+) und einfach-mutanten Tieren licht- und elektronenmikroskopisch miteinander verglichen (Abb. 21). Die in Kontrolltieren gut erkennbaren, myelinisierten Fasern innerhalb des Nerves waren in doppel-mutanten Tieren in ihrer Anzahl deutlich reduziert. Die noch vorhandenen myelinisierten Nervenfasern in betroffenen Tieren waren z.T. hypomyelinisiert und ihre Anzahl variierte innerhalb von verschiedenen Ischiasnerven. Auffälligerweise kamen myelinisierte Axone häufig in bestimmten Bereichen des Nervs in lokal erhöhter Anzahl vor (nicht gezeigt). Diese Gruppierung könnte das Resultat einer klonalen Expansion von Schwann Zellen sein, die der Ablation entgehen konnten.

In Ischiasnerven von CNP-Cre/+, DTA/+ Tieren fanden sich abnorm große Cluster von unmyelinisierten Axonen mit kleinem Durchmesser. Im Gegensatz zu den wesentlich kleineren Clustern von unmyelinisierten Axonen in Kontrolltieren waren die Axone nicht vom Zytoplasma nicht-myelinisierender Schwann Zellen umgeben und grenzten direkt aneinander. Die Axone in den Clustern sahen in der Regel äußerlich intakt aus, jedoch konnte auch in einigen Fällen eine Auflösung der strukturellen Integrität innerhalb der Cluster beobachtet werden (Abb. 21E, F). Interessanterweise wurden sehr ähnliche Beobachtungen an peripheren Nerven von transgenen Tieren gemacht, die ein DTA Konstrukt unter der Kontrolle des Schwann Zell-spezifischen P₀-Promotors (Myelin Protein Zero-Promotor) trugen (Messing *et al.* 1992).

In stark betroffenen Nerven mit einem niedrigen Anteil an myelinisierten Fasern waren in den Bereichen zwischen den Fasern häufig keine individuell abgegrenzten Axone noch andere geordnete Strukturen erkennbar (Abb. 21C). Dies deutet auf eine Degeneration der normalerweise dort vorkommenden Axone hin. Zusammengefaßt konnte gezeigt werden, daß es in CNP-Cre/+, DTA/+ Tieren einhergehend mit der vollständigen Ablation von Oligodendrozyten zu einer Dysmyelinisierung im Gehirn kommt. Außerdem führte die CNP-gesteuerte Expression von Cre in Schwann Zellen zu einer drastischen Hypomyelinisierung und Degeneration von Axonen in Nerven des PNS.



Abb. 21: CNP-Cre induzierte Zellablation in Ischiasnerven von ROSA26-DTA (AS) Mäusen. Ischiasnerven von einfach-mutanten Kontrolltieren (A,B) und doppel-mutanten (C.D.E.F) Tieren im Alter von 11 Tagen wurden in Kunststoff eingebettet. Querschnitte der Nerven wurden lichtmikroskopisch (Methylenblau-Färbung) (A,C,D) und elektronenmikroskopisch (B,E,F)untersucht. A) Kontrollnerv eines heterozygoten DTA/+ Tieres B) EM-Bild einer Gruppe von unmyelinisierten Axonen in einem Kontrollnerv. Einzelne Fasern sind von Zytoplasma nicht-myelinisierender Schwann Zellen (Pfeilkopf) umhüllt. Vergr. 12000x C,D) Rechter und linker Ischiasnerv eines doppel-mutanten CNP-Cre/+, DTA/+ Tieres. Die Anzahl myelinisierter Nervenfasern war in Nerven von doppel-mutanten Tieren drastisch reduziert. Der Anteil schwankte zwischen verschiedenen Tieren und auch innerhalb der beiden Nerven desselben Tieres wie hier verdeutlicht. Im Nerv in C sind nur noch wenige myelinisierte Fasern zu erkennen. Die Axone zeigen zudem Degenerationserscheinungen (*). In **D** sind neben normal myelinisierten Fasern abnorm große Areale (*) von gruppierten, unmyelinisierten Fasern zu erkennen (Vergrößerte Ausschnitte siehe E, F). E,F) Elektronenmikroskopische Vergrößerung eines vergleichbaren Areales wie in D (*) mit einem Cluster unmyelinisierter Axone. In **E** erkennt man, daß die gruppierten Axone direkt aneinander grenzen (Pfeilkopf), ohne vom Zytoplasma nichtmyelinisierender Schwann Zellen umhüllt zu sein (vergl. B). In F zeigen einige Axone Degenerationen (*) (Vakuolisierung, elektronendichte Residualkörper). Vergr. 12000x. Maßstabsbalken in A, C, D = 20 µm

2.4. Ablation von B Zellen (CD19-Cre)

B Zellen sind ein spezialisierter Zelltyp des Immunsystems. Ihre Entwicklung beginnt in der fötalen Leber und setzt sich während des gesamten Lebens im Knochenmark fort. Von dort migrieren B Zellen in die sekundären lymphatischen Organe wie die Milz. Die Identifizierung von B Zellen kann über Markerproteine wie CD19 oder B220 erfolgen. Deren Expression beginnt im Pro-B Zellstadium und bleibt während der weiteren Entwicklung und Differenzierung erhalten (Krop *et al.* 1996). CD19-Cre Mäuse haben sich als geeignet erwiesen, um spezifisch in B Zellen Cre/IoxP abhängige Mutationen zu induzieren (Rickert *et al.* 1997; Inui *et al.* 2002; Pasparakis *et al.* 2002).

Hier wurden CD19-Cre Mäuse mit ROSA26-DTA (S) Mäusen gekreuzt, um B Zellen durch die Expression von DTA zu eliminieren. Doppel-heterozygote Nachkommen (CD19-Cre/+, DTA/+) waren über den gesamten Untersuchungszeitraum von mehr als 6 Monaten äußerlich unauffällig. Dies ist zu erwarten, da B Zellen unter Laborbedingungen keine lebensnotwendigen Funktionen besitzen.

Zur Analyse des B Zell-Statuses wurden Knochenmark und Milz von ca. 2 Monate alten Mäusen auf ihre Anteile verschiedener Lymphozyten untersucht (Abb. 22). Dazu wurden Zellsuspensionen der Gewebe mit fluoreszensgekoppelten Antikörpern gegen die B Zell-spezifischen Oberflächenantigene CD19 und B220 (CD45R) markiert und in einem FACS-Gerät ausgezählt. Zudem wurden B Zell-Stadien anhand der Expression von IgM Antikörpern unterschieden : Pro- und Prä-B Zellen sind IgM negativ, B Zellen dagegen IgM positiv. Als T Zell Marker diente Thy1.1 (CD90). Zuerst wurde gezeigt, daß CD19 und B220 im Knochenmark und in der Milz nahezu (97%) coexprimiert werden. Sie wurden in dieser Arbeit daher als austauschbarer B Zell-Marker behandelt (Abb. 22A). Doppel-heterozygote Nachkommen (CD19-Cre/+, DTA/+) besaßen im Vergleich zu den einfachheterozygoten Kontrollen einen um 35% (23% zu 15%) reduzierten Anteil an CD19⁺/B220⁺ Zellen im Knochenmark. In der Milz lag die Reduktion bei 50% (55% zu 28%) (Abb. 22). Die Reduktion von B Zellen in der Milz führte zu einem invertierten B / T Zellverhältnis. So war der Anteil an Thy1.1 positiven T Zellen in der Milz von B Zell-dezimierten Tieren um 55% (29% zu 45%) erhöht. Der Anteil früher IgM⁻/B220⁺ Zellen war im Knochenmark leicht, aber nicht signifikant um 13% (14,4% zu 12,5%) reduziert und in der Milz deutlich und signifikant um 61% (19% zu 7,5%) reduziert. Der Anteil späterer IgM⁺/CD19⁺ Zellen war im Knochenmark um 53% (9,6% zu 4,5%)

reduziert und in der Milz um 40% (35,6% zu 21,3%). Die B Zell-Spezifität der Ablation wurde mit Hilfe einer CD8/CD4 Doppelfärbung von Thymuszellen belegt, die zeigte, daß der T Zellpool im Thymus unbeeinflußt blieb (Daten nicht gezeigt). Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß B Zellen und B Zellvorläufer beginnend im Knochenmark und zu einem höheren Prozentsatz in der Milz dezimiert werden konnten. Die höhere Reduktion von B Zellen in der Milz läßt sich vermutlich durch unterschiedliche Rekombinationsfrequenzen in den beiden Organen erklären. Aus Experimenten mit CD19-Cre Mäusen anderen ist bekannt. daß Rekombinationsfrequenzen von 70-80% in Pre B Zellen des Knochenmarks und 90-95% in reifen B Zellen der Milz gefunden wurden (Rickert et al. 1997). Die erhöhte Häufigkeit von rekombinierten Zellen unter den reifen B Zellen der Milz im Vergleich zu den jüngeren Zellen im Knochenmark läßt sich vermutlich durch zwei Faktoren erklären. Erstens ist die Rekombination ein zeitabhängiger Prozess, dessen Eintreten sukzessive mit der Entwicklungsstufe der B Zellen immer wahrscheinlicher wird. Und zweitens kommt unterstützend hinzu, daß die Expression (Proteinmenge / Zelle) von CD19 bzw. Cre parallel mit der Entwicklung der B Zellen zunimmt (Schwenk et al. 1997).



Abb. 22: CD19-Cre induzierte B Zell-Ablation in ROSA26-DTA (S) Mäusen **A**) FACS Analyse von Lymphozyten der Milz, die auf ihren B Zell-Anteil untersucht wurden. B220⁺/CD19⁺ doppeltpositive Zellen sind rot dargestellt. **B**) Quantifizierung des Anteils B220⁺/CD19⁺ B Zellen in doppel-mutanten (n=4) und einfach-heterozygoten CD19-Cre/+ (n=3) Tieren bzw. DTA/+ (n=2) Kontrolltieren (zusammengefaßt) im Alter von 5-8 Wochen. Die Reduktion des Anteils von B Zellen in mutanten Tieren um 35% (Knochenmark) bzw. um 50% (Milz) ist nach einem Student-t-Test signifikant (p<0,05).

2.4.1. Charakterisierung überlebender B Zellen

Legt man die zitierten Rekombinationsfrequenzen (70-95%) zugrunde, so stellt sich die Frage, warum die beobachteten Eliminationseffizienzen (30-50%) unter diesen Werten lagen. Zwei mögliche Erklärungen für eine unvollständige Ablation wären eine nicht erfolgte Exzision der lacZ Stopcassette in überlebenden B Zellen oder alternativ eine ineffektive Toxinwirkung in B Zellen nach erfolgter Cre-vermittelter Rekombination. Um zu überprüfen, ob die überlebenden B Zellen ein rekombiniertes Allel trugen, wurde eine Southern Blot Analyse ihrer genomischen DNA durchgeführt (Abb. 23). Dazu wurden B220⁺ positive Zellen mittels MACS Sortierung (Magnetic Cell Sorting) aus der Milz von doppel-mutanten (CD19-Cre/+; DTA/+) und heterozygoten ROSA26-DTA (DTA/+) Kontrolltieren isoliert. Die Reinheit der B220⁺ positiven Zellfraktion wurde durch eine FACS Analyse mit >90% bestimmt. Aus der B220⁺ positiven Zellfraktion und der Durchfluß-Zellfraktion (enthielt <10% B220⁺ Zellen) wurde dann genomische DNA gewonnen. Die DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Xbal verdaut und mit einer DTA spezifischen Sonde (HindIII-EcoRI Fragment aus pDI1) hybridisiert. Durch dieses Vorgehen kann das nicht rekombinierte ROSA26-DTA Allel im Southern Blot als eine Bande der Größe von 6,8 kb identifiziert werden. Die Exzision des gefloxten lacZ Gens führt zu einer Bande von 3,8 kb für das rekombinierte ROSA26-DTA Allel (vergl. Abb. 5).

In der B220 positiven sowie der Durchfluß-Zellfraktion ließ sich im Southern Blot die dem nicht-rekombinierten Lokus entsprechende Bande nachweisen (Abb. 23C). Nur nach Überexposition des Röntgenfilms konnte ausschließlich in der B220⁺ Zellfraktion doppel-mutanter Tiere eine Bande nachgewiesen werden, die der des rekombinierten Allels entsprach (Abb. 23C, M1 und schwächer in M2, M3). Daraus läßt sich schließen, daß der weitaus überwiegende Teil überlebender B220⁺ Zellen in der Milz der Deletion der IoxP-flankierten Stopcassette entgangen ist. Die Unterrepräsentanz von B Zellen mit einem aktivierten DTA Allel weist auf eine effektive Wirkung des Diphtherie-Toxins in B Zellen hin. Die wenigen Zellen, die ein rekombiniertes DTA Allel tragen bilden vermutlich eine Population von kurzlebigen Zellen, in denen die Rekombination erst vor kurzer Zeit stattfand. Es läßt sich ein Szenario entwerfen, in dem neben der Ablation des größten Teiles der B Zellen stets ein gewisser Pool von (Vorläufer-) B Zellen spontan der Rekombination entgehen kann und es aufgrund von positiven Selektionsmechanismen zu einer Anreicherung dieses Pools kommt. Da selbst unter normalen Bedingungen täglich ein großer

Überschuß von B Zellen im Knochenmark generiert wird, der zu einem Wiederauffüllen des peripheren B Zellpools beitragen kann, liegt die Annahme nahe, daß in der Milz von B Zell-dezimierten Tieren ein erhöhter Umsatz von B Zellen vorliegt.

Um diese Hypothese zu testen, wurde der Prozentsatz von BrdU (5-Brom-2'-desoxy-Uridin) positiven B Zellen in der Milz von 4-5 Monate alten doppel-mutanten und Kontroll-Geschwistertieren bestimmt, die über einen Zeitraum von 7 aufeinanderfolgenden Tagen mit Trinkwasser versorgt wurden, dem BrdU in einer Konzentration von 1 mg/ml zugesetzt wurde (Abb. 23A). BrdU ist ein Thymidinanalogon und eignet sich zur Markierung von mitotischen Zellen und deren Tochterzellen, da es effektiv in die DNA sich teilender (B) Zellen eingebaut wird und keinen Einfluß auf die Proliferation und das Überleben von B Zellen hat (Schittek et al. 1991). Die quantitative Bestimmung des Prozentsatzes BrdU positiver B Zellen (B220⁺) erfolgte nach der Präparation der Milz durch eine FACS Analyse. In doppelmutanten Tieren war der Anteil BrdU positiver B Zellen im Vergleich zu Kontrolltieren um 25% (26% zu 34%) signifikant erhöht (Abb. 23B). Da reife B Zellen sich in der Milz nur noch sehr selten teilen, ist davon auszugehen, daß der Einbau des BrdU im Knochenmark vor der Migration in die Milz stattfand (Forster et al. 1990; Hao et al. 2001). Der erhöhte Umsatz von peripheren B Zellen spricht für eine kürzere Halbwertszeit von B Zellen in der Milz von CD19-Cre/+, DTA/+ Tieren und unterstützt die Hypothese, daß nicht-rekombinierte B Zellen aufgrund des von einem aktivierten DTA Gen ausgehenden (hohen) Selektionsdruckes positiv selektiert werden und beständig zur Bildung des peripheren B Zellpools beitragen. Im Einklang damit wurden die berichteteten CD19-Cre induzierten Rekombinationsfrequenzen von 70-95% in B Zellpopulationen beobachtet, in denen von den rekombinierten knockout-Allelen kein nachteiliger Einfluß auf das Überleben von B Zellen ausging (Rickert et al. 1997; Inui et al. 2002; Pasparakis et al. 2002). CD19-Cre induzierte Mutationen, die einen nachteiligen Einfluß auf die Lebensspanne von B Zellen haben, führten übereinstimmend mit den Beobachtungen in dieser Arbeit – zu herabgesetzten Rekombinationsfrequenzen innerhalb des B Zellpools der Milz. So wurden für Populationen von B Zellen, die zwei inaktivierte Allele des Nemo Gens (Pasparakis 2002) oder des Pax5 Gens (Horcher et al. 2001) trugen et al. Rekombinationsfrequenzen von <12% bzw. 16% beobachtet.



Abb. 23: Charakterisierung von überlebenden B Zellen in der Milz von doppelmutanten CD19-Cre/+, DTA/+ Tieren. A,B) Erhöhter Umsatz von B Zellen in der Milz von doppel-mutanten CD19-Cre/+, DTA/+ Tieren im Vergleich zu einfachmutanten CD19-Cre/+ bzw. DTA/+ Tieren. A) FACS Analyse der Inkorporation von BrdU in B Zellen (B220⁺) aus der Milz von Mäusen, deren Trinkwasser für 7 Tage BrdU zugesetzt wurde. B) Quantifizierung des Anteils BrdU positiver B Zellen (B220⁺) in doppel-mutanten (n=5) und einfach-mutanten CD19-Cre/+ (n=4) bzw. DTA/+ Tieren (n=1) (zusammengefaßt). Der im Vergleich zu Kontrollen um 25% erhöhte Anteil BrdU positiver B Zellen in mutanten Tieren ist nach einem Student-t-Test signifikant (p<0,05). C) Southern Blot Analyse von genomischer B Zell DNA aus 3 doppel-mutanten CD19-Cre/+, DTA/+ Tieren (M1, M2, M3) im Vergleich zu einfach-mutanten DTA/+ Kontrolltieren (K). Zur DNA Gewinnung wurden B220⁺ Milzzellen mittels MACS angereichert. Genomische DNA aus der B220⁺ Zellfraktion und der Durchflußzellfraktion (B220⁻) wurde mit Xbal verdaut und mit einer radioaktiv markierten DTA spezifischen Sonde hybridisiert. Die genomische DNA aus überlebenden B Zellen von CD19-Cre/+, DTA/+ Mutanten zeigte im Southern Blot die Bande (6,8 kb) des unrekombinierten ROSA26-DTA Allels. Nur nach Überexposition der Membran konnte im Falle der Doppelmutanten zusätzlich eine schwache, spezifische Bande (3,8 kb) des rekombinierten Allels erkannt werden.

IV. Diskussion

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Etablierung eines binären Zellablationssystems, das es erlaubt, mit Hilfe der wachsenden Anzahl an gewebespezifisch Creexprimierenden Mauslinien verschiedene Zelltypen *in vivo* zu eliminieren. Dazu wurde eine Mauslinie hergestellt, die ein konditionales Diphtherie-Toxin Allel unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven ROSA26 Promotors trägt. Der ROSA26-DTA Stamm wurde mit verschiedenen Cre Mäusen gekreuzt und die Zelltyp-spezifischen Ablationen in der F1 Generation analysiert. Auf diese Weise konnte die vielfältige Funktionalität des Systems demonstriert werden und Aufschluß über die Effizienz und den Zeitverlauf der Zellablationen gewonnen werden. Darüberhinaus bieten die Zelltyp-dezimierten Mäuse weitere Untersuchungsmöglichkeiten zur Klärung biologischer Fragestellungen und können zu einem besseren Verständnis von verschiedenen Aspekten degenerativer Krankheiten beitragen.

1. ROSA26-DTA Mausstämme

Die ROSA26-DTA Maustämme wurden mit Standardmethoden der gezielten Genmanipulation (gene targeting) generiert.

Die Insertion des lacZ-DTA Konstruktes in den genomischen ROSA26 Lokus konnte in 5% der Neomycin und Gancyclovir resistenten ES Klone durch einen Southern Blot nachgewiesen werden. Zwei ES Klone mit unterschiedlicher Orientierung des Neo Gens wurden ausgewählt und auf die Funktionalität des lacZ-DTA Konstruktes genauer untersucht. Dazu wurde zum einen die ß-Galaktosidase Expression in beiden Klonen und zum anderen die Aktivierung der DTA-Cassette nach erfolgter, Cre-vermittelter Deletion des gefloxten lacZ Gens demonstriert. Letzteres wurde durch eine transiente Expression von Cre Rekombinase in ES Zellkulturen untersucht. Cre Protein bzw. das als Kontrolle eingesetzte EGFP konnten ca. 15 Stunden nach der Transfektion nachgewiesen werden. Danach wurde in Kulturen der ROSA26-DTA ES Zellklone im Gegensatz zu WT Kontrollkulturen ein Wachstumsstop Cre positiver Zellen beobachtet und schließlich waren nach 72 Stunden keine Cre positiven Zellen mehr nachweisbar. Daher schien das lacZ-DTA Allel in den beiden getesteten ES Zellklonen funktionell zu sein. Ausgehend von den zwei rekombinanten ES Zellklonen wurden die ROSA26-DTA Mausstämme (S, AS) etabliert, die sich in der Orientierung des Neo-Gens unterschieden.

Durch X-Gal Färbungen von Embryonen verschiedener Entwicklungsstufen und von verschiedenen Geweben adulter Mäuse wurde gezeigt, daß die Expression der lacZ Stopcassette der ubiguitären Expression des endogenen ROSA26 Lokus entsprach. Die ubiquitäre lacZ Expression wies zudem darauf hin, daß die Cre-abhängige DTA Aktivierung potentiell in allen Geweben erfolgen kann. Von der Orientierung des Neo Gens schien kein Einfuß auf die Expression des lacZ Gens auszugehen, da sich die Gewebe beider Maustämme in ihrem Färbeverhalten nicht unterschieden. Homozygote Embryonen färbten sich im Vergleich zu heterozygoten stärker, was auf einen Gen-Dosis Effekt schließen läßt. Allgemein schien die lacZ Expression in embryonalen Geweben stärker als in postnatalen Geweben. Außerdem unterschieden sich postnatale Gewebe bezüglich ihres Färbeverhaltens. Diese Unterschiede können durch die tatsächliche, gewebespezifische Expression des lacZ Gens oder andere Zelltyp-spezifische Faktoren wie z.B. die Halbwertzeit der ß-Galaktosidase bedingt sein. Auf eine detailliertere, zelluläre Expressionsanalyse wurde hier verzichtet, da die ubiquitäre Expression von Fremdgenen im ROSA26 Lokus bereits ausführlich beschrieben ist (Kisseberth et al. 1999; Soriano 1999; Mao et al. 2001).

Homozygote ROSA26-DTA Tiere entwickelten mit fortschreitender Lebensdauer eine Reihe pathologischer Auffälligkeiten wie eine Degeneration des Schwanzes, Skelettdeformationen und Abnormalitäten der Augen. Außerdem wurde eine reduzierte Lebensdauer beobachtet. Die Ursache für diese Veränderungen wurde nicht genau bestimmt. Vor dem Hintergrund jedoch, daß bisher keine der berichteten Insertionen verschiedener Expressionskonstrukte an gleicher Stelle zu einem erkennbaren Phänotyp im homozygoten Zustand geführt hat, liegt hier offensichtlich kein Effekt vor, der auf der Inaktivierung des ROSA26 Gens oder benachbarter Loci beruht. Mit großer Wahrscheinlichkeit kann von dem nicht-rekombinierten DTA Allel im homozygoten Zustand die Bildung geringer Toxinmengen ausgehen, die zu den degenerativen Erscheinungen führen. Aufgrund von drei aufeinanderfolgenden Stop-Codons am Ende des lacZ Leserahmens ist es unwahrscheinlich, daß das toxische Protein durch einen irregulären Translationsstart im lacZ Gen in Verbindung mit einem Durchlesen des lacZ Genes gebildet wird. Da der Leserahmen des DTA Gens durch die lacZ Stopcassette von seinem Startcodon getrennt ist, kann die Initiation der Translation (von Teilen) des DTA Genes wahrscheinlich nur irregulär im DTA Gen erfolgen. Das von dem nicht-rekombinierten Allel gebildete Toxin besäße daher eine kürzere Aminosäuresequenz als das von dem rekombinierten Allel gebildete Toxin, welches aus dem DTA Fragment und 14 N-terminal fusionierten Aminosäuren (loxP Sequenz) besteht (Abb. 3).

Aufgrund der Annahme, daß die Translationskontrolle des DTA Gens in homozygoten Tieren nicht ausreichend ist, wurde beschlossen, eine zusätzliche Transkriptionskontrolle in das Allel zu integrieren. Dazu wurde ein neuer Targeting Vektor konstruiert, in dem eine Polyadenylierungssignalsequenz in den 3'untranslatierten Bereich des lacZ Gens eingefügt wurde. Aufgrund dieser Sequenz sollte im uninduzierten Zustand ausschließlich ein lacZ Transkript und nicht wie zuvor eine polycistronische mRNA aus lacZ und DTA gebildet werden. Zur Zeit werden chimäre Mäuse für das neue Konstrukt verpaart, um heterozygote Mäuse zu erhalten. Es wird interessant sein zu sehen, ob homozygote Tiere des neuen Mausstammes keine Defekte mehr aufweisen.

Heterozygote ROSA26-DTA Tiere waren bezüglich ihrer Gesundheit, Lebensdauer, und ihres Reproduktionsverhaltens nicht von Wildtyptieren zu unterscheiden. Auch in den genaueren Analysen von verschiedenen Zelltypen und Geweben (B Zellen, Oligodendrozyten, Cortex, Leber) wurden keine Unterschiede bezüglich der Anzahl apoptotischer Zellen oder anderer degenerativer Erscheinungen im Vergleich zu WT Kontrolltieren gefunden. Scheinbar wird in heterozygoten Tieren im Gegensatz zu homozygoten Tieren kein Toxin oder nur eine unschädliche Menge an Toxin gebildet. Die beobachtete, erhöhte Aktivität von ß-Galaktosidase in homozygoten Tieren gegenüber heterozygoten Tieren zeigt an, daß von zwei lacZ-DTA Allelen die Bildung größerer Transkriptmengen und daraus resultierend höhere Proteinlevel als von einem Allel ausgehen. Für den Fall, daß es entsprechend der ß-Galaktosidase-Bildung in heterozygoten ROSA26-DTA Mäusen zu einer verminderten Produktion des für homozygote Mäuse postulierten Toxins kommt, so weist das Ausbleiben erkennbarer Symptome auf die Existenz eines für Zellen tolerablen Schwellenwertes gegenüber der Toxinvariante hin. In diesem Zusammenhang könnte die

Beobachtung, daß schon ein Molekül DTA ausreicht, um Zellen abzutöten, widersprüchlich erscheinen (Yamaizumi et al. 1978). Andererseits wurde jedoch gezeigt, daß Mutationen, die die Halbwertszeit (Falnes et al. 1998; Falnes et al. 2000a) oder die katalytischen Aktivität (Yamaizumi et al. 1978; Maxwell, F. et al. 1987) des DTA herabsetzen auch zu einer verminderten Zytotoxizität führen. Die Halbwertszeit des DTA Proteines hängt dabei (entsprechend der "N-end rule" (Varshavsky 1996)) entscheidend von dem aminoterminalen Aminosäurerest ab (Falnes et al. 1998). Methionin wirkt stabilisierend, während andere Aminosäuren zu einer schnelleren Degradation des Proteines führen. Es ist möglich, daß das hypothetische, vom unrekombinierten ROSA26-DTA Allel ausgehende Translationsprodukt durch eine irreguläre Initiation der Translation kein Start-Methionin besitzt und daher eine verminderte Halbwertszeit aufweist. Außerdem könnte die katalytische Aktivität des gebildeten Proteines im Vergleich zum WT Protein reduziert sein. Der normale Phänotyp heterozygoter ROSA26-DTA Mäuse ließe sich also durch die Produktion einer tolerablen Menge einer DTA Variante erklären, die bedingt durch eine kürzere Halbwertszeit und/oder eine verminderte katalytische Aktivität eine geringere Zytotoxizität als das WT DTA besitzt.

Trotz der nicht abschließenden Klärung der Diskrepanz zwischen den Phänotypen von hetero- und homozygoten Mäusen kann festgestellt werden, daß heterozygote ROSA26-DTA Mäuse sich aufgrund ihres normalen Phänotypes für Zellablationsexperimente mit verschiedenen Cre Mäusen eignen.

2. Zellablationen

2.1. Ablation von cortikalen Neuronen

Die *in vivo* Funktionalität des Toxinallels wurde zuerst durch eine Verpaarung mit Nex-Cre Mäusen demonstriert. Nex bzw. Cre werden während der embryonalen Entwicklung beginnend ab E11.5 in der cortikalen Präplatte und der intermedialen Zone des sich entwickelnden Neocortex exprimiert. Dabei beschränkt sich die Expression auf postmitotische, pyramidale Neurone, die ihren Ursprung in der Ventrikularzone haben, aus der sie auswandern (Göbbels 2002). Neben der cortikalen Expression von Nex kommen im ZNS noch andere, weniger definierte Expessionsdomänen in Neuronen um den vierten Ventrikel (temporär), im

Rückenmark, dem Bulbus olfactorius und in einzelnen Zellen des Mittel- und Hinterhirnes vor (Schwab et al. 1998). Die Ablation wurde in diesen Regionen nicht im Detail untersucht, jedoch wurde im Bulbus olfactorius und im Rückenmark eine Nex-Cre induzierte Ablation von Neuronen beobachtet. Hier wurde eine detaillierte Analyse der Zellablation von Neuronen zu verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien auf die Region des dorsalen Pallium beschränkt. Beginnend ab dem Entwicklungszeitpunkt E12.5 konnten, parallel mit dem Auftreten von Reelin produzierenden Cajal Retzius-Zellen, Cre positive Neurone in der Präplatte detektiert werden. Das Auftreten beider Zelltypen stimmte mit dem Einsetzen der neuronalen Differenzierung im Cortex überein (Marin-Padilla 1998). Cre-induzierte Toxineffekte waren zu diesem frühen Zeitpunkt nicht zu beobachten. Zwei Tage später (E14.5) war im Cortex von doppel-mutanten (Nex-Cre/+, DTA/+) Tieren eine drastische Abnahme an Cre Immunreaktivität und eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen zu verzeichnen. Die Anzahl apoptotischer Zellen nahm in der Folgezeit weiter zu. Zum Zeitpunkt E16.5 waren Cortexschichten, die normalerweise Nex bzw. Cre positive Neurone enthalten mit apoptotischen Zellen angefüllt. Das Toxin-induzierte Absterben von corticalen Neuronen führte schließlich zu einem verkümmerten und ungeschichteten Cortex in neugeborenen Tieren. In den degenerierten Cortexregionen war auf X-Gal angefärbten Schnitten ein auffälliges Wellenmuster zu erkennen, das durch spitzzulaufende Regionen ß-Gal positiver Zellen hervorgerufen wurde, die in regelmäßigen Abständen in den apoptotischen, ß-Gal negativen Gebieten vorkamen. Die ß-Galaktosidase-Aktivität zeigt an, daß die lacZ Cassette des ROSA26-lacZ-DTA Allels in den Zellen höchstwahrscheinlich (noch) nicht durch Cre Aktivität deletiert wurde. Da diese Regionen direkt benachbart zur unbetroffenen Subventrikularschicht lokalisiert waren, könnte es sich hier um Areale handeln, in denen stetig undifferenzierte Vorläuferzellen aus der (Sub)-Ventrikularschicht auswandern, schließlich differenzieren und absterben. Die beobachtete Beschränkung des Auswanderns von Zellen auf bestimmte Punkte in der (Sub-) Ventrikularzone könnte ein interessanter Anhaltspunkt für das Verständnis der Generierung und Migration von cortikalen Neuronen sein.

Die Zeitdifferenz von 2-3 Tagen zwischen dem Auftreten Cre positiver Zellen und dem Auftreten TUNEL positiver, pyknotischer Zellen zeigt, daß die Cre-induzierte Ablation mittels DTA (zumindest in cortikalen Neuronen) ein Prozess ist, der nicht innerhalb von wenigen Stunden erfolgt. Allgemein läßt sich die Cre induzierte Aktivierung eines Genes, hier exemplarisch verdeutlicht am Beispiel des DTA Genes, mechanistisch in folgende Schritte unterteilen: 1. Bildung und Akkumulation von Cre mRNA, 2. Bildung und Akkumulation von Cre Protein, 3. Cre-vermittelte Rekombination als stochastisches Ereignis, 4. Transkription des DTA Genes und Akkumulation von DTA mRNA, 5. Bildung und Akkumulation von DTA Protein. In unterschiedlichen Experimenten mit dem Cre/IoxP System wurden Zeitspannen von weniger als einem Tag bis zu mehreren Tagen zwischen der Cre-Transkription und einem biologischen Effekt des Zielgenes beobachtet (Nagy 2000). Im Falle des Nex-Cre Allels konnte eine Aktivierung eines ß-Galaktosidase Reportergenes schon einen Tag nach dem Expressionsbeginn von Nex (E11.5) durch X-Gal Färbungen nachgewiesen werden (Göbbels 2002). Daher kann man annehmen -vorausgesetzt die Effizienz der Rekombination des lacZ-DTA Allels ist mit der des erwähnten Reporterallels vergleichbar-, daß die Rekombination des lacZ-DTA Allels zum Zeitpunkt E12.5 ebenfalls schon in einigen Zellen stattgefunden hat. Demzufolge werden in dem sich anschließenden Zeitraum von 2-3 Tagen bis zum Auftreten von apoptotischen Zellen vermutlich folgende Schritte durchlaufen, wobei die individuelle Dauer jedes Schrittes nicht genau beziffert werden kann: 1. Transkription des DTA Genes und Akkumulation von DTA mRNA, 2. Bildung und Akkumulation von DTA Protein, 3. DTA-katalysierte Modifikation des Elongationsfaktors, 4. Hemmung der Proteinsynthese, 5. Auslösung des Apoptose-Prozesses, an dessen Ende die Bildung TUNEL-positiver "Zellen" vor dem Zelltod steht. Übereinstimmend mit diesem Ablauf wurde eine drastische Abnahme der Cre Immunreaktivität, hinweisend für eine Einschränkung der Proteinsynthese, vor der Bildung TUNEL-positiver, pyknotischer Kerne beobachtet. Da der Zeitverlauf des Absterbens von Neuronen dem des Absterbens von Cre-exprimierenden ES Zellen glich, kann man davon ausgehen, daß es sich hier um einen Mechanismus handelt, der auch auf andere Zelltypen zutrifft. Die Verzögerung zwischen dem Expressionsbeginn des Cre Transgens und der endgültigen Elimination der Zellen sollte bei der Planung und Interpretation von Ablationsexperimenten und insbesondere bei Zellinienstudien bedacht werden.

Um den möglichen Einfluß der Orientierung der Neo Cassette auf die Zellablation zu überprüfen, wurden Nex-Cre Mäuse mit beiden ROSA26-DTA (S;AS) Linien

gekreuzt. Beim Vergleich der Degenerationen des cerebralen Cortex wurden keine Unterschiede gefunden. Wie bereits aufgrund der in beiden Linien gleichartigen lacZ Expression vermutet, hat die Orientierung der Neo Cassette keinen erkennbaren Einfluß auf die Cre-vermittelte Rekombination des lacZ-DTA Konstruktes sowie die Expression des DTA Gens.

2.2. Ablation von Hepatozyten

Alfp-Cre Mäuse wurden benutzt, um die Effekte einer Cre Rekombinase induzierten Expression von DTA in Hepatozyten zu untersuchen. Die Leber wurde u.a. als Zielorgan ausgewählt, um die Funktionalität des Ablationssystem an einem Organ zu testen, das im Vergleich zu anderen Geweben eine schwache und heterogene lacZ Färbung in ROSA26-DTA Mäusen aufwies. Zum anderen lassen sich anhand des Absterbens von Hepatozyten Prozesse, wie sie bei degenerativen Lebererkrankungen vorkommen, simulieren.

Die Expression von Cre in Hepatozyten von heterozygoten Alfp-Cre Tieren wurde immunohistochemisch und durch Verpaarung mit Cre Reportertieren untersucht. Beide Methoden zeigten, daß es zu einer mosaikartigen Expression von Cre in Hepatozyten der Leber kommt. Die Ursache dafür, daß die Expression des Alfp-Cre Transgenes nicht in allen Hepatozyten wie beabsichtigt der Albumin-Expression folgt, könnte mit dem genomischen Integrationsort des transgenen Konstruktes zusammenhängen. Eine weitere Begründung für die häufig beobachteten, unvollständigen Penetranzen von Transgenen besteht in dem Fehlen von relevanten Promotor- und Regulationselementen in den transgenen Konstrukten. Die beobachtete unvollständige Rekombinationsfrequenz stimmte nicht mit Veröffentlichungen überein, in denen für die Alfp-Cre vermittelte Rekombination von einer nahezu 100%igen Frequenz in Hepatozyten berichtet wird (Kellendonk et al. 2000; Behrens et al. 2002). Dieser scheinbare Widerspruch könnte durch einen späteren Untersuchungszeitpunkt der Rekombination in den erwähnten Publikationen erklärt werden. Übereinstimmend damit wurde für ein ähnliches Cre-Transgen unter der Kontrolle des Albumin-Promotors eine progressive, altersabhängige Rekombination in der Leber berichtet (Postic et al. 2000), wie sie auch in dieser Arbeit für das Alfp-Cre Transgen beobachtet wurde. Zum anderen könnte es auch zu einem generationsabhängigen "Silencing" des Cre Transgenes in den verwendeten Alfp-Cre Mäusen gekommen sein. Ein als gut charakterisiertes,

zufällig in das Genom integriertes Transgen wird häufig in der Generationsfolge der transgenen Mäuse schlechter exprimiert. Als Ursache für dieses Phänomen werden Unterschiede in der DNA-Methylierung des Transgenes diskutiert.

Die Cre-induzierte Ablation von Hepatozyten wurde durch eine erhöhte Anzahl apoptotischer Leberzellen in Verbindung mit einem Aktivitätsanstieg der Indikatorenzyme AST und ALT im Serum sowie durch histologische Untersuchungen gezeigt. Die eher milden Leberschädigungen zeigten, daß eine bedeutende Anzahl von funktionellen Hepatozyten zu jeder Zeit in der Leber vorhanden war. Als Ursache für eine unvollkommene Elimination kommt in erster Linie die beobachtete, unvollständige Penetranz des Alfp-Cre Transgenes in Betracht. Im Einklang damit unterschieden sich X-Gal Färbungen von Kontrollen (DTA/+) und doppel-mutanten (Alfp-Cre/+, DTA/+) Lebern nicht (Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutete, daß es in einem Großteil überlebender Zellen nicht zu einer Cre vermittelten Exzision des lacZ Genes gekommen war. Möglich wäre aber auch, daß es nicht in allen Hepatozyten nach erfolgter Cre Rekombination zur Produktion letaler Toxinmengen kommt. Dafür spräche zum einen die im Vergleich zu anderen Geweben mosaikhafte, eher schwache Expression der lacZ-Stopcassette in der Leber und zum anderen die ballonartigen Schwellungen einiger Hepatozyten, die als ein Anzeichen für eine schwache Intoxikation gewertet werden können (Klinge 1973). In beiden Szenarien kann das Repertoir an überlebenden Zellen dank der enormen Regenerationsfähigkeit der Leber die ständigen Zellverluste ausgleichen. Im Gegensatz zu anderen regenerativen Organen (Knochenmark, Haut) ist die Regeneration der Leber nicht von Vorläufer- oder Stammzellen abhängig (Fausto et al. 2003). Selbst große Zellverluste nach Hepatektomien von 70% der Zellmasse können innerhalb weniger Tage durch die Aktivierung der Proliferation aller vorhandenen reifen Zelltypen ausgeglichen werden. Hepatozyten beispielsweise teilen sich in adulten Lebern normalerweise nur sehr selten (1 Hepatozyt von 20000). Mathematischen Berechnungen zufolge besitzt ein einziger Hepatozyt jedoch genügend Proliferations-Kapazität, um mehrere Lebern generieren zu können (Michalopoulos et al. 1997).

Das hier geschaffene Modell einer toxischen Hepatose bietet die Möglichkeit, die Auswirkungen von stetigem Hepatozytenverlust und Regenerationsprozessen zu untersuchen. Da die Überlebenswahrscheinlichkeit der Hepatozyten genetisch bedingt herabgesetzt ist, kann das Modell auch zur Überprüfung des Entwicklungsund Bevölkerungspotentials von transplantierten, exogenen Hepatozyten oder Vorläuferzellen benutzt werden. Inwieweit die Hepatose langfristig verläuft wurde noch nicht untersucht; sollte sich jedoch eine Leberzirrhose entwickeln, wäre dieses von klinischem Interesse, da bisher kein gutes Zirrhosemodell existiert.

2.3. Ablation von Oligodendrozyten und Schwann Zellen

Die Funktion von Oligodendrozyten und Schwann Zellen und insbesondere des von ihnen gebildeten Myelins wurde in der Maus anhand von verschiedenen, natürlich vorkommenden und gezielt erzeugten "Myelin-Mutanten" untersucht (zusammengefaßt in (Nave 1994; Baumann *et al.* 2001)). Darüberhinaus wurden Tiermodelle für Demyelinisierungen mit chemischen und viralen Methoden erzeugt (Blakemore 1973; Miller, D. J. *et al.* 1995; Mathis *et al.* 2000). Hier wurde versucht, ein Modell zu schaffen, an dem durch die völlige Ausschaltung von Oligodendrozyten die Konsequenzen einer Dysmyelinisierung und mögliche Myelin-unabhängige Aufgaben von Oligodendrozyten studiert werden können. Dazu wurde der ROSA26-DTA (AS) Mausstamm mit heterozygoten CNP-Cre Mäusen gekreuzt, in denen Cre unter der Kontrolle des endogenen 2´,3´-zyklo-nukleotid 3´-Phoshodiesterase (CNP) Promotors exprimiert wird (Lappe-Siefke *et al.* 2003).

CNP wird spezifisch in Oligodendrozyten und Schwann Zellen exprimiert und häufig als Marker für myelinisierende Gliazellen im PNS und ZNS benutzt (Sprinkle 1989; Yu *et al.* 1994; Chandross *et al.* 1999). Außerhalb des Nervensystems findet sich eine schwache Expression in Lymphozyten (Sprinkle *et al.* 1985), den Hoden (Scherer *et al.* 1994) und Photorezeptorzellen (Giulian *et al.* 1980). Aufgrund der nicht-lebensnotwendigen Funktionen letzterer Gewebe ist es unwahrscheinlich, daß mögliche DTA-induzierte Zellverluste bedeutend zu dem beobachteten, neurologischen Phänotyp in CNP-Cre/+, DTA/+ Doppelmutanten beigetragen haben. Eher von Bedeutung könnte in diesem Zusammenhang die Expression des CNP Gens in einzelnen, unidentifizierten Zellen des Herzens und der Lunge sein (Chandross *et al.* 1999; Lappe-Siefke 2002), jedoch kann hier keine Aussage über den Einfluß einer eventuellen Eliminierung dieser Zellen gemacht werden. Außerdem wurde mit Hilfe von Cre-Indikatormäusen eine CNP-Cre induzierte Rekombination in einzelnen Motoneuronen im Rückenmark und in einzelnen Neuronen des Cortex nachgewiesen (Lappe-Siefke 2002). Da diese Zelltypen zum Untersuchungszeitpunkt
keine Cre Rekombinase exprimierten, ist anzunehmen, daß die Rekombination durch eine transiente Cre Expression zu einem frühen Zeitpunkt in Zellen der Abstammungslinie erfolgte. Möglicherweise ist der CNP-Promotor in einer Population von Vorläuferzellen aktiv, die Oligodendrozyten und Subpopulationen von Neuronen bilden. Hinweise für die Existenz von gemeinsamen Vorläuferpopulationen von Oligodendrozyten und Neuronen wurden im ventralen Rückenmark (Yu et al. 1994; Kessaris et al. 2001; Zhou, Q. et al. 2001) und auch im Cortex gefunden (Williams et al. 1991; He et al. 2001). Obwohl CNPase in der Literatur bisher eher nicht als Marker für sehr frühe Stadien der Oligodendrozytenentwicklung galt, weisen neuere Erkenntnisse auf eine Aktivität des CNP-Promotors in multipotenten Vorläuferzellen hin (Peyron et al. 1997; Takebayashi et al. 2000; Belachew et al. 2001). Eine genauere Analyse der Ablation von Oligodendrozyt-Vorläufern und Neuronen zu frühen Stadien von CNP-Cre/+, DTA/+ Embryonen könnte zur Beantwortung der Fragen beitragen, ab welchem Stadium CNP in der Oligodendrozytenlinie exprimiert wird und inwieweit die postulierten Neuron/Glia-Vorläuferzellen existieren und zur Generierung von Neuronen beitragen.

Um die Effekte einer CNP-Cre induzierten Ablation von myelinisierenden Schwann Zellen des peripheren Nervensystems zu untersuchen, wurden Ischiasnerven lichtund elektronenmikroskopisch untersucht. In den Nerven von CNP-Cre/+, DTA/+ Tieren fanden sich neben Gruppen normal myelinisierter Fasern große Areale mit vollständig unmyelinisierten Nervenfasern, die z.T degeneriert waren. Das Vorhandensein myelinisierter Axone zeigte, daß einige Schwann Zellen der Ablation entgehen konnten. Ein Grund dafür könnte sein, daß die bekanntermaßen schwache Expression von CNP (bzw. Cre) in Schwann Zellen (Sprinkle 1989; Yu et al. 1994; Chandross et al. 1999) nicht zur Rekombination in jeder Zelle ausreicht. Alternativ wäre es auch möglich, daß eine bisher nicht näher beschriebene Population von CNPase negativen, myelinisierenden Schwann Zellen existiert. Nicht Crerekombinierte Schwann Zellen könnten durch eine klonale Expansion das Fehlen der DTA-eliminierten Zellen teilweise kompensieren. Die beobachtete Gruppierung von myelinisierten Axonen innerhalb von Nerven läßt auf einen solchen klonalen Ursprung von überlebenden Schwann Zell-Populationen schließen. Es ist bekannt, daß Schwann Zellen ein hohes regeneratives Potential besitzen. Normalerweise mitotisch nicht mehr aktive Schwann Zellen können sich unter bestimmten Bedingungen wieder effektiv teilen und nicht-myelinisierende Schwann Zellen können reversibel zu myelinisierenden Schwann Zellen differenzieren (Saida *et al.* 1980; Messing *et al.* 1992; Jessen *et al.* 1998; Cheng *et al.* 2002).

Interessanterweise wurde eine ähnliche Gruppierung myelinisierter und unmyelinisierter Axone in peripheren Nerven von Mäusen beschrieben, die ein DTA-Transgen unter der Kontrolle des Schwann Zell-spezifischen P₀-Promotors trugen (Messing et al. 1992). Außerdem wurden in Nerven dieser Tiere ungewöhnlich große Cluster von nicht-myelinisierten Axonen beobachtet, wie sie auch in CNP-Cre/+, DTA/+ Tieren vorkamen. Die Axone in diesen Clustern waren abnormerweise nicht vom Zytoplasma nicht-myelinisierender Schwann Zellen umgeben und grenzten direkt aneinander. Als mögliche Erklärungen für dieses Phänomen wurde vorgeschlagen, daß die normale, initiale Segregation der Fasern durch promyelinisierende Schwann Zellen behindert ist (Feltri et al. 2002) und/oder nichtmyelinisierende Schwann Zellen als eine sekundäre Reaktion auf die Myelinisierungs-Defekte ihre Fortsätze zurückziehen (Messing et al. 1992). Im Fall der CNP-Cre induzierten Ablation ist es nicht eindeutig zu beurteilen, inwieweit eine Ablation von nicht-myelinisierenden Schwann Zellen oder sogar Schwann Zell-Vorläufern zu der Bildung der Cluster beigetragen hat, da keine eindeutigen Daten über die CNP Expression in diesen Zelltypen vorliegen.

Die teilweise massive Degeneration von Axonen in peripheren Nerven von CNP-Cre/+, DTA/+ Tieren geht mit großer Wahrscheinlichkeit auf das Fehlen von Schwann Zellen zurück (siehe dazu auch (Riethmacher *et al.* 1997)). In verschiedenen Untersuchungen wurde der bedeutende Einfluß von Schwann Zellen auf den Durchmesser, die Dichte und Phosphorylierung von Neurofilamenten sowie auf Transportleistungen und andere Parameter von Axonen gezeigt (de Waegh *et al.* 1992; Cole *et al.* 1994; Martini 2001). Man nimmt an, daß die Beeinträchtigung von Axoneigenschaften für Axonverluste verantwortlich ist. Dies wird besonders in verschiedenen humanen und murinen Neuropathien evident, die auf Mutationen in von Schwann Zellen gebildeten Proteinen zurückgehen (Frei *et al.* 1999; Sancho *et al.* 1999; Krajewski *et al.* 2000). Die sichtbare Symptomatik des neuropathologischen Phänotyps von CNP-Cre/+, DTA/+ Tieren kommt der von spontan auftretenden *trembler* Mäusen nahe, die eine Punktmutation im PMP22 Gen (peripheral myelin protein-22) tragen und dadurch verursachte Hypomyelinisierungen im PNS aufweisen (Gale *et al.* 1982; Suter *et al.* 1992). Im Menschen sind Mutationen des PMP22 für den häufigsten Subtyp der "Charcot-Marie-Tooth" Krankheit verantwortlich, die ebenfalls durch Demyelinisierungen im PNS gekennzeichnet ist (Maier *et al.* 2002).

Der Verlust von Axonen, der vorzugsweise in distalen Bereichen von langen peripheren Nerven vorkommt, scheint für Muskelatrophien in den erwähnten Neuropathien verantwortlich zu sein und könnte auch die Hinterlaufschwäche in CNP-Cre/+, DTA/+ Tieren erklären. Gleichwohl ist die Hinterlaufschwäche ein relativ unspezifisches Symptom von PNS- und ZNS-Hypomyelinisierungen und ist nicht notwendigerweise mit Motoneuronverlusten assoziiert (Mathis *et al.* 2000; Feltri *et al.* 2002).

CNP-Cre/+, DTA/+ Tiere besaßen eine erheblich kürzere Lebensspanne (ca. 2 Wochen) als Tiere mit ähnlichen PNS-Defekten wie *trembler* (>1 Jahr) oder P₀-DTA Tiere (3-4 Monate). Obwohl eine Trennung der PNS-Symptomatik von der ZNS-Symptomatik in CNP-Cre/+, DTA/+ Tieren hier nur aus didaktischen Gründen gerechtfertigt werden kann, läßt sich vermuten, daß der frühe Tod dieser Tiere wahrscheinlich auf die Ablation von Oligodendrozyten im ZNS zurückzuführen ist.

Die Ablation von Oligodendrozyten im Gehirn und Rückenmark von 2 Wochen alten Mäusen (CNP-Cre/+, DTA/+) konnte durch das Fehlen von Myelin Proteinen (MAG; MBP; CNPase) und Cre positiven Zellen demonstriert werden. Da CNPase (CNP-II) bzw. Cre bereits im Embryonalstadium in Vorläuferzellen von Oligodendrozyten und sich differenzierenden Oligodendrozyten exprimiert ist (Scherer *et al.* 1994; Yu *et al.* 1994; Belachew *et al.* 2001), findet die Ablation der Oligodendrozyten-Linie wahrscheinlich schon zu einem frühen Zeitpunkt vor der postnatalen Myelinisierungsphase statt.

Die sichtbaren Symptome (Körpertremor, Hinterlaufschwäche) der Tiere, deren Oligodendrozyten und Schwann Zellen mittels DTA eliminiert wurden, gleichen nicht nur den Symptomen der *trembler* Maus, sondern auch denen von natürlich vorkommenden Mausmutanten wie z.B *jimpy* (Nave *et al.* 1987) oder *shiverer* (Chernoff 1981), bei denen es aufgrund von Mutationen in Myelinbestandteilen zu Hypomyelinisierungen im ZNS kommt. *Shiverer* Mäusen fehlen aufgrund einer Deletion von großen Teilen des MBP Genes alle Isoformen des MBP Proteines

(Roach et al. 1985). Die resultierenden Defekte im ZNS wie Myelinabnormalien und eine Hypomyelinisierung führen zum Tod von shiverer Mäusen nach 4-5 Monaten Lebenszeit. In jimpy Mäusen wurden verschiedene Mutationen im PLP (Proteolipid Protein) Gen gefunden, das für ein Strukturprotein des im ZNS vorkommenden Myelins codiert. Jimpy Mäuse besitzen, verursacht durch eine Strukturmutationen, ein C-terminal verkürztes PLP Protein (Nave et al. 1987); in jimpy^{msd} Mäusen (myelin synthesis-deficient) (Gencic et al. 1990) oder jimpy-4j-Mäusen (Pearsall et al. 1997) findet sich dagegen ein einzelner Aminosäureaustausch in der PLP Sequenz. Im Menschen sind Mutationen im PLP Gen für eine seltene Leukodystrophie, das Pelizaeus-Merzbacher Syndrom verantwortlich (Pelizaeus 1885; Koeppen et al. 2002). Mäuse mit den erwähnten *jimpy* Mutationen weisen einen Verlust an Myelin und Oligodendrozyten auf und sterben innerhalb von 3-4 Wochen, wobei die jimpy-4j Mutation zur größten Reduktion an Myelin und Oligodendrozyten führt und die Mäuse die kürzeste Lebensspanne besitzen. Obwohl vielfach allgemein angenommen, ist der Verlust an Myelin wahrscheinlich nicht direkt ursächlich für den frühen Tod der Tiere (Billings-Gagliardi et al. 1999). Dies wird am deutlichsten durch die Tatsache demonstriert, daß doppel-mutante quaking/shiverer Mäuse, die kein ZNS-Myelin bilden, jedoch Oligodendrozyten besitzen, länger als 100 Tage lebensfähig sind (Wolf et al. 1999). Tiere, in denen Oligodendrozyten (und Myelin) durch HSV-TK1 drastisch (>90%) reduziert wurden, starben in der dritten Lebenswoche (Mathis et al. 2000). Die nahezu 100-prozentige Elimination von Oligodendrozyten und der Verlust von jeglichem Myelin im Gehirn könnte den drastischen Krankheitsverlauf in CNP-Cre/+, DTA/+ Tieren erklären, sofern kein gravierender, additiver Effekt der PNS-Defekte auftritt.

Der Vergleich der Lebensspannen der erwähnten Mausmutanten führt zu der Hypothese, daß eine kritische Anzahl von Oligodendrozyten notwendig ist, um bisher wenig charakterisierte, Myelin-unabhängige Aufgaben zu erfüllen. Dies wird durch die kürzlich veröffentlichte Beobachtung gefestigt, daß es in CNP-defizienten Mäusen bei physikalisch normaler Myelinisierung zu Degenerationen an Axonen kommt (Lappe-Siefke *et al.* 2003). Diese Erkenntnis ist von medizinischer Bedeutung, als daß Verluste von Axonen mit Läsionen der weißen Substanz in Fällen von Multipler Sklerose assoziiert sind (Trapp *et al.* 1998). Eine grundsätzlich andere Erklärung für die kurze Lebenspanne von Oligodendrozyt-dezimierten Tieren besteht darin, daß häufig beobachtete, sekundäre Erscheinungen wie die Infiltration von Immunzellen oder reaktive Astrogliosen entscheidender als allgemein vermutet zu einem frühen Tod beitragen (Billings-Gagliardi *et al.* 1999; Mathis *et al.* 2000). CNP-Cre/+, DTA/+ Tiere scheinen ein geeignetes Modell zu sein, um die Konsequenzen von Oligodendrozytenverlusten, insbesondere für die Funktion und das Überleben von Axonen, aufklären zu können (siehe auch Diskussion 3.). Außerdem bietet es aufgrund des vollständigen Fehlens von Oligodendrozyten aussichtsreiche Bedingungen, um durch die Transplantation von Stammzellen oder exogenen Gliazellen Remyelinisierungs-Strategien zu untersuchen. Letzteres besitzt eine zunehmende klinische Relevanz bei der Therapie von demyelinisierenden Krankheiten (Duncan *et al.* 1997; Cao *et al.* 2002; Stangel *et al.* 2002).

2.4. Ablation von B Zellen

B Zellen entwickeln sich aus hematopoetischen Vorläuferzellen zu einem Bestandteil des Immunsystems. Hier wurde die Dezimierung von B Zellen mit Hilfe von CD19-Cre Mäusen untersucht. In doppel-mutanten Tieren (CD19-Cre/+, DTA/+) waren B Zellen und B Zellvorläufer (CD19⁺, B220⁺) beginnend im Knochenmark (-35%) und zu einem höhere Prozentsatz in der Milz (-50%) dezimiert.

Die erhöhte Reduktion von B Zellen in der Milz gegenüber dem Knochenmark kann wahrscheinlich durch eine erhöhte Rekombinationsfrequenz erklärt werden. In anderen Experimenten mit CD19-Cre Mäusen wurden für verschiedene Allele übereinstimmende Rekombinationsfrequenzen von 70-80% in Pre-B Zellen des Knochenmarks und 90-95% in reifen B Zellen der Milz gefunden (Rickert *et al.* 1997; Inui *et al.* 2002; Pasparakis *et al.* 2002). Die erhöhte Häufigkeit von rekombinierten Zellen unter den reifen B Zellen der Milz im Vergleich zu den jüngeren Zellen im Knochenmark läßt sich vermutlich durch zwei Faktoren erklären. Erstens ist die Rekombination ein zeitabhängiger Prozess, dessen Eintreten sukzessive mit der Entwicklungsstufe der B Zellen immer wahrscheinlicher wird. Und zweitens kommt unterstützend hinzu, daß die Expression (Proteinmengemenge/Zelle) von CD19 bzw. Cre parallel mit der Entwicklung der B Zellen zunimmt (Schwenk *et al.* 1997).

Die Differenz zwischen den zitierten Rekombinationsfrequenzen (70-95%) und den beobachteten Eliminationseffizienzen (30-50%) gab Anlaß zu einer weiteren Charakterisierung der überlebenden B Zellen. Mittels einer Southern Blot Analyse wurde gezeigt, daß der weitaus überwiegende Teil überlebender B Zellen in der Milz der Deletion der loxP-flankierten Stopcassette entgangen ist. Die Unterrepräsentanz von rekombinierten B Zellen deutet zum einen auf eine Selektion von B Zellen hin, in denen Cre nicht exprimiert wird oder nicht funktionell ist, und zum anderen läßt es eine effektive Ablation von Zellen mit einem aktivierten Diphtherie-Toxin Allel erkennen. Bei einer positiven Selektion von unrekombinierten B Zellen und gleichzeitiger Ablation rekombinierter Zellen sollte der B Zellpool, - vorausgesetzt es kommt nicht zu einer drastischen Erhöhung der Lebensdauer unrekombinierter B Zellen – einen erhöhten Umsatz aufweisen. In der Tat wurde im Vergleich zu Kontrolltieren in der Milz von doppel-mutanten Tieren, denen BrdU ins Trinkwasser zugesetzt wurde eine um 25% erhöhter Anteil von BrdU positiven Zellen gefunden. Da reife B Zellen sich in der Milz nur noch sehr selten teilen, ist davon auszugehen, daß der Einbau des BrdU im Knochenmark vor der Migration in die Milz stattfand (Forster et al. 1990; Hao et al. 2001). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß es in den B Zell-dezimierten Tieren zu einer erhöhten Proliferation von peripheren B Zellen gekommen ist. Um diese Frage zu klären, könnte man den BrdU Einbau in Tieren untersuchen, in denen der Zustrom von B Zellen aus dem Knochenmark unterbunden ist. Technisch kann die B Zellentwicklung im Knochenmark durch die Applikation eines Antikörpers gegen IL-7R (Pasparakis et al. 2002) oder eine induzierbare Inaktivierung des RAG-2 Gens (Hao et al. 2001) erreicht werden. Der erhöhte Umsatz von peripheren B Zellen läßt auf eine kürzere Halbwertszeit von B Zellen in der Milz von CD19-Cre/+, DTA/+ Tieren schließen.

Es wird allgemein angenommen, daß die Anzahl peripherer B Zellen einer flexiblen, homeostatischen Kontrolle unterliegt (Freitas *et al.* 1986). Selbst unter normalen Bedingungen wird täglich ein großer Überschuß von B Zellen im Knochenmark generiert, der effektiv zu einem Wiederauffüllen des peripheren B Zellpools in B Zelldezimierten Tieren beitragen kann (Osmond 1993; Agenes *et al.* 1999). So besitzen Mäuse mit einer dreifach verminderten Produktion von B Zellen im Knochenmark immer noch normale Anzahlen von peripheren B Zellen (Agenes *et al.* 1997). Daraus kann geschlossen werden, daß die beobachtete Reduktion von B Zell-Vorläufern im Knochenmark von CD19-Cre/+, DTA/+ Tieren sich nicht limitierend auf den B Zellpool in der Peripherie auswirkt. Diese Überlegungen führen zu der Hypothese, daß ein stetiger B Zellverlust in CD19-Cre/+, DTA/+ Tieren durch eine positive Selektion nicht rekombinierter Zellen der B Zellinie zum Teil ausgeglichen wird. Ein ähnlicher Auffüllmechanismus des B Zell-Pools wurde bei konditionalen Null-Mutanten des für die Identität von B Zellen essentiellen Pax5 Gens beschrieben (Horcher *et al.* 2001). Im Einklang mit obiger Hypothese wurden die berichteteten CD19-Cre induzierten Rekombinationsfrequenzen von 70-95% an Allelen beobachtet, von deren Mutationen kein nachteiliger Einfluß auf die Überlebenswahrscheinlichkeit von B Zellen ausgeht (Rickert *et al.* 1997; Inui *et al.* 2002). CD19-Cre induzierte Mutationen, die einen nachteiligen Einfluß auf die Lebensspanne von B Zellen haben führten, übereinstimmend mit den Beobachtungen in dieser Arbeit, zu herabgesetzten Rekombinationsfrequenzen innerhalb des B Zellpools der Milz. So wurden für Populationen von B Zellen, die zwei inaktivierte Allele des Nemo Gens (Pasparakis *et al.* 2002) oder des Pax5 Gens (Horcher *et al.* 2001) trugen, Rekombinationsfrequenzen von <12% bzw. 16% beobachtet.

Die Frage, auf welche Weise und für welche Dauer B Zellen der Cre Rekombination entgehen können, konnte in dieser Arbeit nur ansatzweise geklärt werden. Die loxP Stellen in der genomischen DNA von überlebenden B Zellen wiesen in Sequenzierungen keine Mutationen auf (Beobachtung D. Brockschnieder) und schienen daher intakt zu sein. Folglich liegt es näher anzunehmen, daß die Expression der Cre Rekombinase in überlebenden B Zellen herunterreguliert ist. Die mögliche Blockierung der Expression ("Silencing") des Cre Allels könnte durch DNA Modifikationen wie etwa Methylierung verursacht werden.

Als alternative Mechanismen, die eine Rekombination des lacZ-DTA Allels verhindern, kommen u.a. inaktivierende Mutationen des Cre Gens oder eine veränderte zelluläre Lokalisation der Cre Rekombinase in Betracht. Da der Nachweis des Cre Proteines in B Zellen von CD19-Cre Mäusen sich als schwierig erwies und unklare Ergebnisse lieferte, kann keine Aussage über die obigen Hypothesen gemacht werden.

Das hier beschriebene Modell bietet die Möglichkeit durch eine eingehendere Charakterisierung überlebender B Zellen bezüglich ihres (Entwicklungs-) Statuses und ihres funktionellen Potentials, Erkenntnisse über die homeostatische Kontrolle des B Zellpools zu gewinnen.

3. Beurteilung des Ablationssystems und Ausblick

Das hier vorgestellte Ablationssystem, basierend auf einer Mausmutante mit einem konditionalen, ubiquitär exprimierten DTA Allel hat sich als geeignet erwiesen, ein

weites Spektrum an Geweben und Zelltypen reproduzierbar eliminieren zu können. Im Gegensatz zur häufig benutzten Ablation mittels der *Herpes simplex* Virus-1 codierten Thymidinkinase bietet die DTA Ablation die Möglichkeit, auch postmitotische Zellen zu eliminieren. Die Spezifität der Ablationen wurde daran deutlich, daß selbst direkte Nachbarzellen apoptotischer Zellen unbeeinflußt blieben (siehe z.B. Nex-Cre Ablation → Subventrikularzone). Eine wichtige Voraussetzung für planmäßige Zellablationen sind gewebespezifisch Cre-exprimierende Mäuse, deren Anzahl durch die Identifizierung von zellspezifischen Promotoren in Zukunft weiter wachsen dürfte.

Die Effizienz der Eliminationen hat sich in verschiedenen Zielgeweben als variabel erwiesen. Während cortikale Neurone und Oligodendrozyten nahezu vollständig eliminiert werden konnten, wurden Hepatozyten und B Zellen nur zu einem gewissen Prozentsatz dezimiert. Wichtige Faktoren, die das Überleben von Zellpopulationen und die Integrität von Organen beeinflussen, sind die Rekombinationsfrequenzen der verwendeten Cre Mäuse sowie die Existenz von Regenerations- und Selektionsmechanismen in bestimmten Geweben.

Inwieweit möglicherweise unterschiedliche, Zelltyp-spezifische Toxizitäten und/oder Expressionslevel des DTA eine Bedeutung für die Effizienz der Ablationen besitzen, wurde in dieser Arbeit nicht genau untersucht. In diesem Zusammenhang stellt es sich wahrscheinlich als ein systemimmanentes Problem dar, daß der direkte Nachweis des Toxins mit einem DTA Antikörper in eigenen Versuchen nicht gelang und auch in keiner der bekannten Publikationen gezeigt wurde. Voraussichtlich hemmt DTA seine eigene Synthese und läßt Zellen absterben, bevor eine für den Nachweis ausreichende Menge des Toxins akkumulieren kann.

Zukünftig kann die hier entwickelte Ablationstechnik genutzt werden, um die vielfältigen Interaktionen von Zelltypen aufzuklären und die Entwicklung von Zellinien zu studieren. Mit Hilfe der DNA-Chip-Technologie ist es möglich, Unterschiede in der Genexpression von normalen Geweben und Geweben, in denen ein bestimmter Zelltyp eliminiert wurde, zu untersuchen. So ist es geplant, die Genexpression von Kleinhirnen, deren Oligodendrozyten eliminiert wurden, mit der normaler Kleinhirne zu vergleichen. Auf diese Weise sollte es möglich sein, Oligodendrozyten-spezifische Gene, die in Differenzierungs- oder Myelinisierungsprozessen involviert sind sowie Gene, die in Neuronen als Antwort auf die Abwesenheit von Oligodendrozyten induziert werden, zu identifizieren.

Medizinsch dürfte die Herstellung von Mausmodellen degenerativer Krankheiten und die Analyse von Regenerationsprozessen von Bedeutung sein. Vor allem in diesem Zusammenhang wird die derzeitige Entwicklung induzierbarer Cre Mäuse von Bedeutung sein, da die damit verbundene temporale Kontrolle über das Ablationsgeschehen es erlauben wird, auch partielle und wiederkehrende Degenerationen im adulten Organismus nachzuahmen.

Auf dem Gebiet der Stammzellforschung eröffnet sich die Möglichkeit, das (regenerative) Potential von Zellen oder Geweben durch Transplantationen in Zelltyp-dezimierte Mäuse zu testen. Da die Elimination der endogenen Gewebe genetisch gesteuert wird, sind Fremdgewebe von der Ablation nicht betroffen.

V. Material und Methoden

1. Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper gegen	Herkunftspezies	eingesetzte Konzentration / Verdünndung	Bezugsquelle
Cre	polyklonal, Kaninchen	1 : 3000	Babco Kat.Nr. PRB-106C
CNPase	monoklonal, Maus	10 µg/ml	Chemicon Kat.Nr. MAB326R
GFAP	monoklonal, Maus Klon G-A-5	1 : 400	Sigma Kat.Nr. G3893
MBP	monoklonal, Ratte	1 : 200	Chemicon Kat.Nr. MAB386
MAG	monoklonal, Maus	1: 200	Chemicon Kat.Nr. MAB1567
NF160	monoklonal, Maus	1:50	Sigma Kat.Nr. N5264
Reelin	monoklonal, Maus	1:100	Gabe von A. Goffinet
CD45R/ B220 R-Phycoerythrin konjugiert	monoklonal, Ratte Klon RA3-6B2	1 μg / 10 ⁶ Zellen	BD Bioscience Kat.Nr. 553089

Sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper gegen	Herkunftspezies	eingesetzte Konzentration / Verdünndung	Bezugsquelle
Kaninchen IgG (H+L), Cy3-konjugiert	Ziege	1:2000	Jackson Immuno Research bzw. Dianova Kat.Nr. 111-165-144
Kaninchen IgG (H+L), Alexa Fluor 488 konjugiert	Ziege	1:1000	Mobitec bzw. Molecular Probes Kat.Nr. A-11029
Ratte IgG Cy3-konjugiert	Ziege	1 : 400	Chemicon Kat.Nr. AP 183C
Ratte IgG Peroxidase- konjugiert	Ziege	1 : 600	Chemicon Kat.Nr. AP 183P
Maus IgG1 (Fc) Alexa Fluor 488 konjugierte Fab Fragmente		1 μg primäre Antikörper + 5 μl (200 μg/μl) Fab Fragmente	Mobitec bzw. Molecular Probes Zenon-Kit Kat.Nr. Z-25002

2. Bakterienstämme

Escherichia coli XL1-Blue MRF' (Jerpseth 1992)

3. Vektoren

pBluescript-SK II (+/-); (Stratagene) pTV-0; (B. Walter; Grundgerüst: pIC19R, (MARSH *ET AL.* 1984)) pSAßgeo; (Zambrowicz *et al.* 1997) pUG80; (Grieshammer *et al.* 1998) pRosa26-1; (Soriano 1999) pROSA26-DTA (S,AS); (D. Brockschnieder) pR-A4; (Mao *et al.* 1999) pPGKCrebpA; (Transgene Tiereinheit, ZMNH) pPGKEGFPbpA; (D. Brockschnieder) pDI1; (D. Brockschnieder) pZL1-MBP; (Gabe von M. Wegner)

4. ES Zellinie

In der Zellkultur wurde die embryonale Stammzellinie E14.1 eingesetzt, die aus einer männlichen 129/Ola Maus-Blastozyste stammt (Kuhn *et al.* 1991).

5. Mausstämme

Die verwendeten C57BI/6J-Mäuse stammten aus eigener Zucht bzw. wurden von der Tierhaltung des UKE Hamburg bezogen.

Die verwendeten Cre Mäuse stammten aus folgenden Arbeitsgruppen : Nex-Cre und CNP-Cre von K. A. Nave (Göttingen), CD19-Cre von K. Rajewsky (Köln/Boston), Alfp-Cre von G. Schütz (Heidelberg). Die floxLacZ-Reportermauslinie stammte von A. Berns (Amsterdam).

6. Chemikalien

Chemikalien wurden soweit nicht anders erwähnt bei Merck, Sigma oder Roth bezogen.

7. Nährmedien

Medien und Platten für die Kultivierung von *Escherichia coli* wurden gemäß Standard-Protokollen verwendet (Sambrook J. 1989). Die Konzentration von Ampicillin in Agar und Medien betrug 100 µg/ml.

8. Zellkulturmedien

Fibroblasten-Medium:

- 500 ml Dulbecco's MEM mit Glutamax-I, 4500 mg/l Glucose, mit Pyridoxin, Natriumpyruvat (Gibco BRL)
- 60 ml FCS (zuvor 30 min bei 55°C inaktiviert, Gibco BRL)
- 5,7 ml 100x nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco BRL)
- 5,7 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 u/ml Penicillin G/10000 µg/ml Streptomycin; Gibco BRL)
- 1,2 ml 50 mM ß-Mercaptoethanol (Gibco BRL)

ES Zell-Medium:

500 ml	DMEM/Glutamax (siehe oben, Gibco BRL)
90 ml	FCS (zuvor 30 min bei 55°C inaktiviert, Gibco)

- 6 ml 100x nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco BRL)
- 6 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (Gibco BRL)
- 1,2 ml 50 mM ß-Mercaptoethanol (Gibco BRL)
- 60 µl LIF (Leukemia Inhibitory Factor)

LIF (Leukemia Inhibitory Factor) wurde mit Hilfe einer CHO-Zellinie gewonnen, die die humane cDNA für den LIF-Faktor exprimiert (Genetics Institute; Cambridge, MA).

9. DNA- und RNA-Methoden

9.1. Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

Die Mini-Präparationen von Plasmid-DNA erfolgten durch Alkalische Lyse (Birnboim *et al.* 1979). In größerem Maßstab wurde die Isolierung mit dem Plasmid-Maxi-Präparations-Kit der Firma Qiagen durchgeführt (Qiagen, Hilden).

Die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des "QIAspin Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden; (Vogelstein *et al.* 1979)).

9.2. Isolierung genomischer DNA aus ES Zellen

Für den Nachweis von homologer Rekombination in embryonalen Stammzellklonen (ES Zellklonen) mittels Southern-Hybridisierung wurde die genomische DNA in 96 Loch-Platten präpariert (Ramirez-Solis *et al.* 1992). Die auf gelatinisierten 96 Loch-Platten konfluent gewachsenen ES Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 50 µl ES Zell-Lyse-Puffer/Loch (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5% N-Lauroylsarcosin (= "Sarcosyl"), 200 µg/ml Proteinase K) bei 60°C in einer mit Parafilm abgedichteten Feuchtkammer über Nacht inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl eiskaltem 100% Ethanol mit $^{1}/_{20}$ Vol 5M Natriumchlorid/Loch wurde die DNA für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wurden die Überstände abgegossen, die DNA zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und für etwa 20 min luftgetrocknet, bevor der Restriktionsverdau in 50 µl Restriktionsenzym) bei 37°C über Nacht unter leichtem Schütteln erfolgte. Die Hälfte dieses Ansatzes wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Gel zur Southern-Hybridisierung eingesetzt.

9.3. Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe bzw. Schwanzstücken

Embryonale Gewebe bzw. Schwanzstücke adulter Mäuse wurden in 200 μ l Embryonen-Lyse-Puffer (10 mM Tris pH 8,9, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0,45% Nonidet P40, 0,45% Tween 20, 25 μ g/ml Proteinase K) für 1 h oder über Nacht bei 55°C unter stetigem Schütteln inkubiert. Darauf erfolgte die Inaktivierung der

Proteinase K für 10 min bei 95°C. 1 µl dieser Lösungen wurde für die Genotypisierung in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

Zur DNA Isolierung für Southern Blots wurden Schwanzstücke oder Gewebe adulter Mäuse in SDS Schwanz-Lyse-Puffer (100 mM Tris pH 8,5, 200 mM NaCI, 5 mM EDTA, 0,2% SDS, 100 μ g/ml Proteinase K) über Nacht bei 55°C unter stetigem Schütteln inkubiert. Nach Phenol/Chloroform Extraktion der Lösung wurde die DNA gefällt und das Präzipitat in 100 μ l TE Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA) aufgenommen.

9.4. Phenol / Chloroform-Extraktion

Um Enzyme zu inaktivieren und Proteine aus einer DNA-haltigen Lösung zu entfernen, wurden diese mit 1 Volumen wassergesättigten Phenol / Chloroform-Gemisch durch Schütteln versetzt. Dabei kommt es zum Ausfallen der Proteine, die anschließend in der phenolischen (Inter-) Phase vorliegen. Durch Zentrifugation bei >12000 x g für 5 Minuten wurde eine Phasentrennung herbeigeführt. Die obere, DNA-enthaltene Phase wurde abgenommen und die DNA anschließend mit Isopropanol oder Ethanol gefällt.

9.5. Fällung von DNA

Um DNA oder RNA in einer wässrigen Lösung zu konzentrieren, wurde diese mit 0,7 Volumen Isopropanol oder 2 Volumen Ethanol versetzt. Auf diese Weise wird der Nukleinsäure die Hydrathülle entzogen, wodurch sie ausfällt. Der Effekt wurde in manchen Experimenten durch die Zugabe von 1/10 Volumen 3M Na-Acetat-Lösung pH 5,2 verstärkt. Danach wurde das DNA Präzipitat für 15-30 min bei >12000 x g abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das DNA Pellet wurde mit 1 Vol 70% Ethanol gewaschen, nach kurzer Zentrifugation getrocknet und in einer adäquaten Menge TE Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA) oder Wasser aufgenommen.

9.6. Agarosegelelektrophorese

DNA Moleküle wurden mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Als Matrix, in der im elektrischen Feld die Trennung erfolgte, diente in ca. 80°C heißem TAE Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA) gelöste Agarose. In

Abhängigkeit davon, in welchem Molekulargewichtsbereich eine effektive Trennung der DNA gewünscht wurde, wurde die Agarosekonzentration im Bereich von 0,6%-2% gewählt. Die heiße Gellösung wurde in einen Gelträger gegossen und das Gel, nachdem es abgekühlt war in eine mit TAE Puffer gefüllte Gelkammer eingesetzt. An das Agarosegel wurde eine elektrische Spannung von 10 V/cm Gellänge angelegt. Nukleinsäuren bewegen sich aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen in ihrem Zucker-Phosphat-Rückgrat zur Anode. Dabei wird die Geschwindigkeit durch die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die angelegte Gleichspannung beeinflußt. Lineare, doppelsträngige DNA-Moleküle bewegen sich im Agarosegel indirekt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Als Molekulargewichtsmarker wurde mit *Eco*RI und *Hind*III verdaute λ DNA verwendet.

Zum Anfärben von DNA-Banden wurde dem Gel vor dem Gießen Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zugefügt. Das in die Nukleinsäure interkalierende Ethidiumbromid fluoresziert unter UV-Licht. Gele konnten daher auf einem UV-Transilluminator fotografiert werden.

9.7. Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Die Abschätzung von DNA Konzentrationen erfolgte grob durch Agarose-Gelelektrophorese. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität der Probe mit der Fluoreszenzintensität einer definierten Menge Molekulargewichtsmarker verglichen. Die genaue Konzentration isolierter DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Dieses Verfahren beruht auf der Absorbtion von Licht im UV-Bereich durch die heterozyklischen Ringe der Nukleotide. Das Extinktionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Extinktion E von 1 entspricht einer Konzentration von 50 mg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 mg/ml RNA. Die Reinheit der DNA wurde anhand der Extinktion bei den Wellenlängen 260 und 280 nm bestimmt. Die DNA wurde als rein bezeichnet, wenn der Quotient aus E₂₆₀ und E₂₈₀ zwischen 1,65 und 2,0 lag. Bei Verunreinigungen der Proben mit Proteinen oder Phenolresten sinkt dieser Wert ab.

9.8. Restriktionsverdau von DNA und Transformation kompetenter Bakterien

Restriktionsverdaue von Plasmid- und genomischer DNA wurden mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen gemäß Standardmethoden durchgeführt (Sambrook J. 1989).

Die Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien erfolgte nach (Inoue *et al.* 1990).

9.9. Dephosphorylierung von DNA

Die Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) ist eine Phosphomonoesterase, die 5'-Phosphate von DNA Enden abspaltet. Sie ist zur Dephosphorylierung von Vektoren vor einer Insertionsligation geeignet. Da die T4-Ligase nur 5'-Phosphat-Enden mit 3'-OH-Enden verknüpfen kann, wird durch die Behandlung gespaltener Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase eine Religation des Vektors vermieden, wodurch der Anteil rekombinanter Plasmide im Ligationsansatz steigt. Die SAP hat gegenüber der alkalischen Kälberdarm-Phosphatase (CIP) den Vorteil, daß sie durch Hitze vollständig inaktivierbar ist.

Standardmäßig wurden 1 pmol DNA-Enden mit 0,1-0,5 U SAP (Boehringer) in 1x SAP-Puffer, 1 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Inaktivierung des Enzymes bei 65°C, für 15 min.

9.10. Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-Ligase benutzt, da dieses Enzym nicht nur komplementäre "sticky ends", sondern auch (glatte) "blunt ends" ligieren kann. Standardmäßig wurde ein molares Vektor / Insert Verhältnis von 1 : 3 benutzt. Die Ligation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur oder für 24 h bei 4-14°C. Ein Ligationsansatz (10µl) war typischerweise folgendermaßen zusammengesetzt: Vektor-DNA 30 fmol, Insert-DNA 90 fmol, T4-Ligase 1 µl (1U/µl; Boehringer), 10x T4-Ligasepuffer 1 µl, H₂O zu 10 µl.

9.11. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Technik zur exponentiellen *in vitro* Amplifikation von bestimmten DNA-Abschnitten (Mullis *et al.* 1986). Durch das Wiederholen eines ca. dreißigfachen

Zykluses aus Denaturierung, Anlagerung von Primern und davon ausgehender Komplementärstrangsynthese durch eine hitzestabile DNA-Polymerase erreicht man eine Vermehrung des DNA-Fragmentes zwischen den Primern. Standardmäßig wurde in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß ein 50 µl Reaktionsansatz zusammenpipettiert. Dieser enthielt 20-100 ng Template-DNA, 1 x PCR Puffer (Invitrogen), 2 mM MgCl₂, dNTPs je 0,2 mM, Primer 1, 2 ,3 je 0,4 µM, 0,2 µl Taq-Polymerase rek. 10 U/µl (Invitrogen). Als PCR Maschine wurde ein PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) benutzt.

Im folgenden sind die Primer, PCR Produkte und Programme beschrieben, die in den verschiedenen PCR-Amplifikationen eingesetzt wurden.

ROSA26-DTA Genotypisierung

a) Primer für das WT Allel
Rosa FA : AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT
Rosa RA : GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG
PCR-Produkt : 580 bp
b) Primer für das mutante Allel
Rosa FA : AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT
SpliAcB : CAT CAA GGA AAC CCT GGA CTA CTG
PCR-Produkt : 320 bp
c) Programm
20 s 94°C; 35 s 64°C; 35 s 72°C; 33 Zyklen

Nex-Cre Genotypisierung

a) Primer für das WT Allel
Nex S : TCT TTT TCA TGT GCT CTT GG
Nex R2: GCT CTT TCC TCG AAG GAC AAC T
PCR-Produkt : 500 bp
b) Primer für das mutante Allel
Nex S : TCT TTT TCA TGT GCT CTT GG
Cre a : CCG CAT AAC CAG TGA AAC AG
PCR-Produkt : 220 bp
c) Programm
20 s 94°C; 30 s 60°C; 30 s 72°C; 33 Zyklen

Alfp-Cre Genotypisierung

a) Primer für das Transgen
Cre TgS : ACC AGG TTC GTT CAC TCA TGG
Cre TgAS : AGG CTA AGT GCC TTC TCT ACA C
PCR-Produkt : 220 bp
b) Programm
20 s 94°C; 30 s 60°C; 30 s 72°C; 33 Zyklen

CNP-Cre Genotypisierung

a) Primer für das WT Allel
CNP5'F2 : TGC CCA AGC TCT TCT TCA GG
CNPR1 : TGG TCA GGA ACC AGC CAA A
PCR-Produkt : 520 bp
b) Primer für das mutante Allel
CNP5'F2 : TGC CCA AGC TCT TCT TCA GG
PLP-Cre a : TTCGGA TCC GCC GCA TAA C
PCR-Produkt : 360 bp
c) Programm
20 s 94°C; 35 s 63°C; 35 s 72°C; 33 Zyklen

CD19-Cre Genotypisierung

a) Primer für das WT Allel
CD19F2 : CCG GAC TCC TCA CCT GTC TC
CD19R2 : GGC TGC CAG ATG TCC TTG AA
PCR-Produkt : 200 bp
b) Primer für das mutante Allel
CD19F2 : CCG GAC TCC TCA CCT GTC TC
PLP-Cre a : TTCGGA TCC GCC GCA TAA C
PCR-Produkt : 430 bp
c) Programm
20 s 94°C; 35 s 63°C; 35 s 72°C; 33 Zyklen

Cre-Reporter Genotypisierung

a) Primer für das Transgen
CAT 2 : CAG TCA GTT GCT CAA TGT ACC
CAT 3 : ACT GGT GAA ACT CAC CCA
PCR-Produkt : 430 bp
c) Programm
20 s 94°C; 30 s 60°C; 30 s 72°C; 33 Zyklen

ROSA26-DTA (S), (AS) spezifische Genotypisierung

a) Primer für das ROSA26-DTA (S) Allel
3´Dt(A)F : CTA ACA CAC CCT GCA GCT CCA AA
Neo 2L : CGA ATT CGC CAA TGA CAA GAC GCT GG
PCR-Produkt : 450 bp
b) Primer für das ROSA26-DTA (AS) Allel
3´Dt(A)F : CTA ACA CAC CCT GCA GCT CCA AA
3´NeoF : GAA CTG TTC GCC AGG CTC AAG
PCR-Produkt : 580 bp
c) Programm
20 s 94°C; 30 s 63°C; 35 s 72°C; 33 Zyklen

ROSA26-DTA_{rekombiniert} spezifische Genotypisierung

a) Primer für das ROSA26-DTA Allel
Rosa FA : AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT
P5'DiphR1 : AAC CAG GTT TAG TCC CGT GGT
PCR-Produkt_{rekombiniert} : 580 bp
(PCR-Produkt_{unrekombiniert} : ca. 3600 bp; Dieses Produkt entsteht unter den angegebenen Bedingungen nicht in nachweisbarer Menge.)
c) Programm
20 s 94°C; 30 s 63°C; 40 s 72°C; 33 Zyklen

Amplifikation der Splice-Akzeptor Sequenz

a) Template-DNA : pSAßgeo; (Zambrowicz *et al.* 1997) 5'SpliAc : TTCGTCGACTCTAGAACTAGTGGATCCC 3'SpliAcR1 : CCATGTCGACGATGATCAAGCTTATCG b) PCR-Produkt : 120 bp
c) Programm
15 s 94°C; 30 s 50°C; 10 s 72°C; 33 Zyklen

9.12. Sequenzierung von DNA

DNA Sequenzierungen wurden von der "Sequenzier-Serviceeinheit" des "Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg" mit einem ABI Prism 377 DNA-Sequencer (Perkin Elmer) unter Verwendung des "ABI-Prism-Dye-Terminator-Cycle-Sequencing-Ready-Reaction Kit" (Perkin Elmer) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

9.13. Radioaktive Markierung von DNA

Zur Southern-Hybridisierung wurden die DNA-Proben mit Hilfe des "Prime-It RmT Random Primer Labeling Kits" (Stratagene) durch Einbau von α -³²P-dCTP radioaktiv markiert (Feinberg *et al.* 1983). Die Proben wurden mit Sephadex G50-Mikrosäulen (Probe Quant G50, Amersham-Pharmacia) aufgereinigt und vor Beginn der Hybridisierung denaturiert.

9.14. Synthese Digoxigenin-markierter in vitro-Transkripte

Die *in situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitten erfolgte mit einer Dig-markierten, MBP-spezifischen RNA-Sonde. Für die *in vitro*-Transkription wurde das "DIG-RNA-Labelling-Kit" der Firma Roche benutzt. Zunächst wurde die Plasmid-Matrize mit der MBP cDNA (pZL1-MBP) zur Generierung der Antisense-Probe mit *Pst*I linearisiert und danach Phenol/Chloroform-extrahiert, gefällt, gewaschen, getrocknet und in ddH₂O aufgenommen. Die Synthese des Antisense-Transkriptes erfolgte mit SP6 Polymerase. Die Synthese der *in vitro*-Transkripte fand in folgendem Ansatz für 1h bei 37°C statt:

- 1 µl linearisierte Plasmid-DNA (1 µg/µl)
- 2 µl 10x Transkriptionspuffer (Roche)
- 2 µl Dig-Mix (Roche)
- 0,5 µl RNAse-Inhibitor (105 U/µl, Amersham-Pharmacia)

13,5 µl DEPC-H₂O

1 µl RNA-Polymerase (2 U/µl, Roche)

Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit Formamid auf 50 µl aufgefüllt und über eine Sephadex G50-Mikrosäule (Probe Quant G50, Amersham-Pharmacia) aufgereinigt und vor Beginn der Hybridisierung bei 70°C für 5 min denaturiert.

9.15. Southern-Hybridisierung

Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde gemäß Standard-Methoden auf Nylonmembranen transferiert (Sambrook J. 1989). Dazu wurde das die zu transferierende DNA enthaltene Agarose-Gel auf eine Blotting-Apparatur, die mit 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat) getränktem Filterpapier (3M Whatman[™]) bedeckt war, überführt. Eine Nylonmembran (Hybond[™]-N+, Amersham) wurde luftblasenfrei in Gelgröße aufgelegt und überstehendes Filterpapier mit Plastikfolie abgedeckt. Auf die Membran wurden zwei weitere mit 20x SSC getränkte Filterpapiere der gleichen Größe gelegt, darüber ca. 10 cm Handtuchpapier geschichtet und der Aufbau mit einem Gewicht von etwa 500 g beschwert. Daraufhin erfolgte über den 20x SSC-Diffusionsgradienten der Transfer der DNA auf die Membran über Nacht. Die DNA wurde nach der Übertragung auf die Membran durch UV-Bestrahlung in einem Crosslinker-Gerät (Stratagene) kovalent an die Membran gebunden.

Die Vorhybridisierung der Membran erfolgte in 6x SSC, 5x Denhardt's, 0,5% SDS und 100 µg/ml denaturierter Lachsspermien-DNA für 2 h bei 68°C in einem Rollerofen (Biometra). Die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Probe wurde daraufhin bei gleicher Temperatur durchgeführt. Nach 16-24 h Hybridisierung wurde die Membran aufeinanderfolgend zweimal mit 2x SSC, 0,5% SDS für je 15 min und zweimal mit 0,2x SSC, 0,5% SDS für jeweils 30 min bei der Hybridisierungstemperatur gewaschen. Abschließend wurde die Membran auf einem Röntgenfilm (Kodak Biomax MR) bei -80°C exponiert oder mit Hilfe eines "Phospho-Imagers" (Fujix, BAS 2000, Raytest Isotopenmeßgeräte, Straubenhardt) entwickelt.

10. Zellkultur-Methoden

10.1. Präparation und Kultur primärer embryonaler Fibroblasten

Primäre embryonale Fibroblasten ("Feeder-Zellen") wurden aus Embryonen präpariert, die aus Kreuzungen von Wildtyp-Tieren mit transgenen Neomycinresistenten Mäusen stammten. Diese Neomycin resistenten Fibroblasten bilden die Matrix für das Wachstum embryonaler Stammzellen (ES Zellen).

Die Fibroblasten mußten vor der Co-Kultivierung mit ES Zellen wachstumsinaktiviert werden. Dazu wurde zu 10 ml Medienvolumen/150 mm Schale 100 µl Mitomycin C-Lösung hinzupipettiert (1 mg/ml Mitomycin C in PBS, 5% DMSO, Sigma). Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und auf neue Zellkulturschalen transferiert. Die wachstumsinaktivierten Fibroblasten konnten etwa zwei bis drei Wochen in Kultur gehalten werden.

10.2. Kultur, Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen

Nach schnellem Auftauen wurden die ES Zellen in ES Zell-Medium aufgenommen und ihrer Anzahl entsprechend auf Fibroblasten in 35 oder 60 mm Schalen kultiviert. Das Medium wurde jeden Tag gewechselt und die Zellen bei Erreichen einer geeigneten Dichte (viele einzelne Zellklone, jedoch keine Konfluenz) auf 100 mm Schalen kultiviert.

Für die Transfektion wurden 2 x 10^7 ES Zellen in 800 µl PBS in einer Elektroporationsküvette (Gene-Pulser Küvette 0,4 cm, Bio-Rad, München) mit 20-25 µg linearisiertem Targeting-Vektor gemischt und bei 300 V, 1200 µF mit einem Impuls von 2 ms elektroporiert (L. Fischer, Heidelberg). Im Anschluß wurden die ES Zellen resuspendiert und direkt auf vier dicht mit Fibroblasten bewachsenen 100 mm Schalen ausplattiert.

Am zweiten Tag nach der Elektroporation wurde die Selektion auf homolog rekombinante ES Zellklone mit Hilfe von 400 μ g/ml Geneticin (= G418, Gibco) in ES Zellmedium begonnen. Ab dem vierten Tag wurde zusätzlich mit 2 μ M Gancyclovir doppelselektioniert. Die resistenten Zellklone wurden acht Tage nach der Transfektion isoliert. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die Klone daraufhin einzeln mit einer Pipettenspitze in etwa 25 μ l PBS auf eine unbehandelte 96 Loch-Platte überführt. Danach wurden die ES Zellen durch Zugabe

von 25 µl 0,05% Trypsin/0,02% EDTA bei 37°C vereinzelt, 50 µl ES Zellmedium hinzupipettiert und die Zellen auf eine neue mit Fibroblasten dicht bewachsene 96 Loch-Platte transferiert. Zwei Tage später wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert und ES Zellmedium hinzugegeben. Die eine Hälfte dieser Zellsuspension wurde auf eine mit 0,5% Gelatine/H₂O vorbehandelte 96 Loch-Platte mit einer dünnen "Feeder-Zelllage", die andere Hälfte auf eine dicht mit "Feeder"-Zellen bewachsene 96 Loch-Platte überführt. Auf der dichtbewachsenen "Feeder"-Platte wurden die Stammzellklone bis zur Ausbildung von ausreichend großen Einzelkolonien kultiviert und anschließend folgendermaßen eingefroren: Die Klone wurden mit PBS gewaschen, trypsinisiert und 75 µl eiskaltes Einfriermedium (ES Zellmedium, 30% FCS, 13,3% DMSO) hinzugegeben. Die 96 Loch-Platte wurde in Papiertücher eingewickelt und unmittelbar bei -70°C eingefroren.

In der gelatinisierten 96 Loch-Platte wurden die ES Zellen bis zur Konfluenz hochgezogen, da hier vorwiegend eine ausreichende Zellzahl zur Isolierung genomischer DNA aus den Klonen wichtig war und eine frühzeitige Differenzierung der Zellen in Kauf genommen werden konnte. ES Zellklone, in denen das Targeting Konstrukt homolog integriert hatte, wurden mittels Southern-Hybridisierung identifiziert, dann aufgetaut und der Zellzahl entsprechend auf Fibroblasten in einem 96 Loch oder auf einer 35 mm Schale kultiviert.

10.3. Transiente Transfektion von ES Zellen mit Expressionsplasmiden

ES Zellen wurden mit einer Dichte von ca. 1 x 10⁶ Zellen/Loch auf "gelatinisierten" (2 h Inkubation in 5% Gelatine/dH₂O) Deckgläschen in 6 Loch-Platten ausgesäht und über Nacht in ES Medium wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und in jedem Loch durch 0,8 ml Optimen-Medium (Invitrogen) + 0,21 ml Transfektionsmix (6 µl Plus Reagenz; 4 µl LipofectAMINETM (beide Invitrogen), 0,2 ml Optimem-Medium, 1 µg Plasmid pPGKCrebpA bzw. 1 µg pPGKEGFPbpA) ersetzt. In Co-Transfektionen beider Plasmide wurden die Plasmide pPGKEGFPbpA und pPGKCrebpA im Massenverhältnis 1:3 eingesetzt. Die Transfektion erfolgte dann für 5 h bei 37°C, 7,5% CO₂. Danach wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und die Zellen über Nacht mit 1 ml ES Medium wachsen gelassen. Zur Detektion der Expression wurden die Deckgläschen zu den jeweiligen Zeitpunkten (1., 2., 3. Tag nach der Transfektion) aus den 6 Loch-Platten entnommen und die Zellen für 5 min mit 4% PFA fixiert bevor sie für den immunologischen Nachweis von Cre Rekombinase benutzt wurden.

11. Histologische Methoden

Die Altersbestimmung der Mäuse (-embryonen), die für histologische und andere Untersuchungen verwendet wurden erfolgte wie folgt :

Für Embryonen wurde der Tag nach dem Auftreten des Vaginalverschlußes als Tag 0.5 *postcoitum* (E0.5) festgelegt. Der Tag der Geburt wurde als P1 definiert, darauffolgende Tage entsprechend mit P2, P3 usw.

11.1. Histologische Analyse von Ischiasnerven

Die histologische Analyse von Ischiasnerven wurde mit Unterstützung von Michaela Schweizer ("Servicegruppe Morphologie", ZMNH Hamburg) durchgeführt. Ischiasnerven wurden in 4% PFA/1% Glutaraldehyd über Nacht fixiert und danach in 1% OsO₄ postfixiert, dehydriert und dann in Epon eingebettet. Schnitte (0,5 μm) wurden mit Methylenblau angefärbt und lichtmikroskopisch analysiert. Für die Elektronenmikroskopie wurden ultradünne Schnitte (60 nm) angefertigt, mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt und einem Zeiss EM 902 analysiert.

11.2. Herstellung von Kunststoffschnitten

Für die histologische Analyse, bei der es auf eine gute Gewebeerhaltung ankam, wurden Gewebe bzw. Embryonen in Hydroxyethylmethacrylat (Technovit 7100; Heraeus-Kulzer, Wehrheim) eingebettet. Dazu wurden die Präparate mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für mindestens 24 h fixiert und in Abhängigkeit von der Gewebegröße schrittweise in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 85%, 96% und 3x 100%) für mindestens je 15 min dehydriert. Daraufhin wurden die Gewebe über Nacht in Technovit 7100/100% Ethanol (1:1) inkubiert. Danach erfolgte die Infiltration in Vorbereitungslösung (100 ml Technovit 7100 mit 1 g Härter I) für einen Tag. Das Einbetten der Präparate fand in Vorbereitungslösung/Härter II (15:1) statt. Nach dem Auspolymerisieren des Kunststoffs über Nacht wurden die Präparate mit Technovit 3040 auf Histoblöcke fixiert und bis zum Schneiden bei RT aufbewahrt. 6 µm dicke Schnitte wurden mit einem Rotationsmikrotom (BM2165, Leica) angefertigt, im warmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger (Roth, Karlsruhe) aufgezogen und auf einer Heizplatte getrocknet.

11.3. Hämatoxilin / Eosin-Färbung von Kunststoffschnitten

Die Hämatoxilin-Färbung (Hämatoxilin III nach Gill, Merck) wurde bis zur gewünschten Signalintensität für etwa 15-20 min durchgeführt (dunkelblaue Färbung der Zellkerne). Nach Spülen für 15 min unter fließendem Leitungswasser ("Bläuen") erfolgte ein kurzes Waschen in dH₂O und die Gegenfärbung in frisch angesetzter Eosin-Lösung (0,25% Eosin Y, 0,1 M Essigsäure) für 8-10 min (orange bis rosa Färbung der übrigen Zellstrukturen). Anschließend wurden die Schnitte in dH₂O gewaschen (ca. 5 min), sorgfältig getrocknet und darauf die Hintergrundfärbung durch Eintauchen der Schnitte in 70% Ethanol für 15-20 s reduziert. Abschließend mußten die Schnitte sofort wieder in dH₂O gewässert werden, um das Ablösen vom Objektträger zu vermeiden. Die getrockneten Schnitte wurden in Eucitt (Kindler GmbH, Freiburg) eingedeckelt.

11.4. Toluidin Blau-Färbung von Kunststoffschnitten

Die Gewebeschnitte wurden bis zur gewünschten Stärke für ca. 15-30 min in Toluidin Blau-Lösung gefärbt (0,1% Toluidin Blau in dH₂O) und dann 10 min in Leitungswasser gewaschen. Nach kurzem Spülen in dH₂O wurden die Schnitte getrocknet und in Eucitt (Kindler GmbH, Freiburg) eingedeckelt.

11.5. Herstellung von Vibratomschnitten

Mit Hilfe eines Vibratoms (Leica VT1000S, Bensheim) wurden Schnitte von 50-70 μ m Dicke zur histologischen Analyse und für X-Gal Färbungen von Geweben angefertigt. Dazu wurden die Gewebe in 1% PFA über Nacht bei 4°C fixiert, dreimal mit PBS/2mM MgCl₂ für 5 min gewaschen und dann in 3% Agarose/PBS eingebettet. Nach dem Schneiden in PBS wurden die Schnitte mit X-Gal gefärbt und in Mowiol-Einbettmedium (100 mM Tris pH 8,5, 10% (w/v) Mowiol 4-88 (Calbiochem), 25% Glyzerin) eingedeckelt (siehe β -Galaktosidase-Färbung).

11.6. ß-Galaktosidase-Färbung

Die Gewebe wurden über Nacht in 1% PFA bei 4°C fixiert und dreimal mit PBS/2mM MgCl₂ für 5 min gewaschen. Der β-Galaktosidase-Nachweis wurde sowohl an Vibratomschnitten der fixierten Gewebe als auch auf ganzen Embryonen durchgeführt. Dazu wurden die Präparate in Detergenz-Lösung (0,1 M Phosphat-Puffer pH 7,3, 2mM MgCl₂, 0,01% Natriumdesoxycholat, 0,02% Nonidet P-40) für 10 min inkubiert. Danach schloß sich die Färbung für ca. 16 h in Detergenz-Lösung mit 1 mg/ml X-Gal, 5 mM Kaliumferricyanid, 5 mM Kaliumferrocyanid bei 37°C an. Abschließend wurden die Schnitte in 4% PFA für 1 h gewaschen, kurz mit PBS gespült und in Mowiol-Einbettmedium (100 mM Tris pH 8,5, 10% (w/v) Mowiol 4-88 (Calbiochem), 25% Glyzerin) eingedeckelt. Embryonen wurden mit 4% PFA über Nacht postfixiert und in PBS/50% Glyzerin aufbewahrt.

11.7. Herstellung von Gefrierschnitten

Immunhistologische Analysen oder *in situ*-Hybridisierungen wurden auf Gefrierschnitten durchgeführt. Nach dem Spülen in PBS wurden die präparierten Gewebe in 4% PFA für mehrere Stunden oder über Nacht fixiert. Danach wurden die Präparate über Nacht in 30% Sukrose inkubiert und dann in "Tissue Tec" ("OCT-Compound"; Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) in einer Einbettform ("Peel-Away"; Shandon, Frankfurt) in einer Alkohol/Trockeneis-Mischung eingefroren. In Abhängigkeit von Gewebeart bzw. dem Embryonalstadium wurden 10 µm dicke Schnitte im Kryostaten (2800 Frigocut, Reichert Jung) bei einer Blocktemperatur zwischen -20°C und -30°C angefertigt. Die Schnitte wurden auf Adhäsions-Objekträger (Histobond, Marienfeld) aufgezogen, bei Raumtemperatur getrocknet und dann feuchtigkeitsgeschützt eingefroren. Wie die gefrorenen Präparate konnten auch die Schnitte über mehrere Wochen bei -80°C aufbewahrt werden.

11.8. Immunhistologie auf Gefrierschnitten

Die Gefrierschnitte wurden für 5 min in 4% PFA postfixiert, dreimal für je 5 min in PBT (PBS mit 0,1% Tween 20) gewaschen und danach für 1 h bei RT in 0,2% BSA (Merck) in PBT blockiert. Im Anschluß erfolgte die Inkubation mit den Primär-Antikörpern über Nacht bei 4°C in PBT/0,2% BSA. Hierauf wurden die Schnitte dreimal für je 5 min mit PBT gewaschen und dann für 1 h mit den Sekundär-

Antikörpern in Blockierungslösung bei RT inkubiert. Zur Detektion der monoklonalen IgG1 Primär-Antikörper aus der Maus wurden Alexa Fluor 488 konjugierte Fab Fragmente (Zenon-Kit; Molecular Probes) verwendet. Nach mehrmaligem Waschen in PBT zur Reduktion des unspezifischen Hintergrundes wurden die Zellkerne mit PBT/1 mg/ml DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid) angefärbt und die Schnitte in Mowiol-Einbettmedium (100 mM Tris pH 8,5, 10% (w/v) Mowiol 4-88 (Calbiochem), 25% Glyzerin) eingedeckelt. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Fluoreszensmikroskop (Axioplan 2, Zeiss) und einer Digitalkamera (Axiocam, Zeiss).

11.9. In situ-Hybridisierung

In situ-Hybridisierungen wurden auf Gefrierschnitten mit einer Dig-markierten RNA-Probe, die 1:200 mit Hybridisierungspuffer (50 % Formamid; 5x SSC; 50 µg/ml Heparin; 50 µg/ml denaturierte Hefe t-RNS; 0,1% Tween 20) verdünnt wurde durchgeführt. Auf jeden Objektträger wurden 100 µl der Probelösung pipettiert, mit einem Deckglas bedeckt und dann über Nacht bei 65°C in einer feuchten Kammer (50% Formamid) hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger in Waschlösung (1 x SSC, 50% Formamid, 0,1% Tween 20) 3 x 30 min bei 65°C und anschließend 2 x 30 min bei RT in MABT Puffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,1 Tween 20) gewaschen. Um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren, wurde jeder Objektträger mit 600 µl Blocklösung (MABT, 2% Boehringer Blocking Reagent, 20% Ziegen-Serum) für 1h inkubiert. Der anti-DIG Antikörper (Roche) wurde 1:2500 in Blocklösung verdünnt, auf die Objektträger gegeben und über Nacht in einer geschlossenen, feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger 5 x 20 min bei RT in MABT und anschließend 2 x 10 min bei RT in Alkali-Phosphatase (AP) -Puffer (100 mM NaCl, 50 mM MgCl, 100 mM Tris pH 7,9, 0,1% Tween 20, 0,5 mg/ml Levamisol) gewaschen. Zur Signaldetektion wurden die Schnitte mit einer Färbelösung (3,5 µl NBT + 3,5 µl BCIP pro ml AP-Puffer) bis zum gewünschten Färbegrad (ca. 16 Stunden) bei RT und Lichtausschluß inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen mit H₂O wurde die Farbreaktion gestoppt. Nach der Färbung wurden die Gefrierschnitte getrocknet und mit Eucitt (Kindler GmbH, Freiburg) eingedeckelt.

11.10. FACS Analyse von Lymphocyten-Populationen

FACS Analysen wurden mit freundlicher Hilfe von Boris Fehse (UKE Hamburg) und Alexander Scheffold (Deutsches Rheumazentrum Berlin) durchgeführt.

Zur FACS-Analyse wurden Thymus, Knochenmark (aus Tibia und Femur) und Milz aus Mäusen entnommen. Darauf wurden Zellsuspensionen hergestellt, indem die Organe mit 5 ml kaltem PBS/0,5% BSA durch ein Nylonnetz (40 µm Poren, Falcon) gepresst wurden. Ca. 5 x 10⁶ Zellen wurden daraufhin in 50 µl für 15 min bei 4°C mit fluoreszensgekoppelten Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden 1 ml PBS/ 0,5% BSA zugegeben und die Zellen bei 200-300 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen ein weiteres Mal mit 1 ml PBS/0,5% BSA gewaschen. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und durch Zugabe von 0,4 ml PBS/0,5% BSA Zellsuspensionen hergestellt, die im FACS Gerät (FACSCalibur[™] oder FACScan[™], BD Bioscience) analysiert wurden oder an dieser Stelle zuvor für den Nachweis von BrdU benutzt wurden. Tote Zellen wurden durch die Zugabe von Propidiumiodid markiert und von der Analyse ausgeschlossen. Die Analyse der FACS Daten erfolgte mit dem CELLQuest[™] Programm (BD Bioscience).

11.11. Detektion von Zellproliferation und Apoptosen

Zur Bestimmung des Umsatzes von B Zellen in der Milz wurden 4-5 Monate alte Tiere über einen Zeitraum von 7 aufeinanderfolgenden Tagen mit Trinkwasser gefüttert, dem BrdU in einer Konzentration von 1 mg/ml zugesetzt wurde. Die BrdU-Trinklösung wurde täglich erneuert und vor Licht geschützt. Darauf wurde die Milz präpariert und der Anteil BrdU positiver B Zellen (B220⁺) in einem FACS Gerät bestimmt. Dabei wurde das BrdU, welches als Thymidin-Analogon nur in die DNA mitotisch aktiver Zellen inkorporiert wird, mit dem "BrdU Flow Kit™" (BD Bioscience) nachgewiesen. Die Detektion von Apoptosen auf Kryoschnitten erfolgte anhand der DNA-Fragmentierung durch eine TUNEL-Färbung (Gavrieli *et al.* 1992) mit Hilfe des "Apodetect Fluorescein Plus Kits™" (Appligene).

11.12. MACS Sortierung von B Zellen

Zur Isolation von B Zellen wurden Zellsuspensionen der Milz mit Hilfe von MACS (Mouse CD45R MicroBeads, Miltenyi Biotec) nach den Herstellerangaben aufgereinigt. MACS isolierte B Zellen (B220⁺) waren typischerweise >90% rein.

VI. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-Indolylphosphat
BrdU	5-Brom-2'-desoxy-Uridin
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CNP(ase)	2´,3´-Zyklo-Nukleotid 3`-Phoshodiesterase
Cre	Cre Rekombinase
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethypyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphophat
DT (A)	Diphtherie-Toxin (A)
DTT	Dithiothreitol
E11.5-18.5	embryonaler Entwicklungstag 11.5-18.5. Für Embryonen wurde der
	Tag nach dem Auftreten des Vaginalverschlußes als Tag 0.5
	postcoitum (E0.5) definiert.
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced green flluorescent protein
EM	Elektronenmikroskopie
ES Zelle	embryonale Stammzelle
et al.	et altera
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g, mg, µg	Gramm, Milligram, Mikrogramm
G418	Geneticin
GFAP	glial fibrillic acid protein
h, min	Stunde, Minute
HRP	horseradish peroxidase
HSV1-IK	Herpes simplex Virus-1 Thymidinkinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
I, MI, μΙ	Liter, Milliliter, Mikroliter
	Gen der Is-Galaktosidase
M_{ACS}	molar, millimolar, mikromolar
MAC5	magnetic cell solung
	myelin associated giycoprotein
	Niestineäureemid edenin dinueleetid
	n Nitro Rlau Tetrazoliumoblarid
Noo	Noomyoin Phoenbotraneforase Con
Nov	neuronal heliv-loon-heliv protein-1
NE 160	neuronai nein-ioop-nein protein-i neurofilament 160
PRS	nhosnhate huffered saline
PCR	nolymerase chain reaction

PFA PGK pH PLP PNS RNA RT	Paraformaldehyd (PFA-Lösungen wurden mit PBS hergestellt) Phoshoglyceratkinase <i>potentium hydrogenii</i> proteolipid protein peripheres Nervensystem ribonucleic acid Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
ß-Gal	IS-Galaktosidase
	Iris-Acetat-EDTA-Puffer
IE T	Iris-EDIA-Putter
lris	I ris-(hydroxymethyl-)aminomethan
tRNA	Transfer RNA
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling
U	Enzymeinheit (unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
veral.	veraleiche
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
ха	Frdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-R-D-Galactonyranosid
710	zontralos Norvonsvetom
LING	Letiliaies incineiisysieiii

VII. Literaturverzeichnis

- Agenes, F. and Freitas, A. A. (1999). "Transfer of small resting B cells into immunodeficient hosts results in the selection of a self-renewing activated B cell population." J Exp Med 189(2): 319-30.
- Agenes, F., Rosado, M. M. and Freitas, A. A. (1997). "Independent homeostatic regulation of B cell compartments." Eur J Immunol 27(7): 1801-7.
- Akagi, K., Sandig, V., Vooijs, M., Van der Valk, M., Giovannini, M., Strauss, M. and Berns, A. (1997). "Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice." Nucleic Acids Res 25(9): 1766-73.
- Araki, K., Araki, M., Miyazaki, J. and Vassalli, P. (1995). "Site-specific recombination of a transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase." Proc Natl Acad Sci U S A 92(1): 160-4.
- Arase, K., Saijo, K., Watanabe, H., Konno, A., Arase, H. and Saito, T. (1999). "Ablation of a specific cell population by the replacement of a uniquely expressed gene with a toxin gene." Proc Natl Acad Sci U S A 96(16): 9264-8.
- Bartholoma, A. and Nave, K. A. (1994). "NEX-1: a novel brain-specific helix-loop-helix protein with autoregulation and sustained expression in mature cortical neurons." Mech Dev 48(3): 217-28.
- Baumann, N. and Pham-Dinh, D. (2001). "Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system." Physiol Rev 81(2): 871-927.
- Behrens, A., Sibilia, M., David, J. P., Mohle-Steinlein, U., Tronche, F., Schutz, G. and Wagner, E. F. (2002). "Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver." Embo J 21(7): 1782-90.
- Belachew, S., Yuan, X. and Gallo, V. (2001). "Unraveling oligodendrocyte origin and function by cell-specific transgenesis." Dev Neurosci 23(4-5): 287-98.
- Bellen, H. J., D'Evelyn, D., Harvey, M. and Elledge, S. J. (1992). "Isolation of temperaturesensitive diphtheria toxins in yeast and their effects on Drosophila cells." Development 114(3): 787-96.
- Bennett, M. J. and Eisenberg, D. (1994). "Refined structure of monomeric diphtheria toxin at 2.3 A resolution." Protein Sci 3(9): 1464-75.
- Billings-Gagliardi, S., Nunnari, J. N., Nadon, N. L. and Wolf, M. K. (1999). "Evidence that CNS hypomyelination does not cause death of jimpy-msd mutant mice." Dev Neurosci 21(6): 473-82.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res 7(6): 1513-23.
- Blakemore, W. F. (1973). "Remyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse following demyelination induced by feeding cuprizone." J Neurol Sci 20(1): 73-83.
- Borrelli, E., Heyman, R. A., Arias, C., Sawchenko, P. E. and Evans, R. M. (1989). "Transgenic mice with inducible dwarfism." Nature 339(6225): 538-41.

- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H. and Robertson, E. (1984). "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines." Nature 309(5965): 255-6.
- Breitman, M. L., Clapoff, S., Rossant, J., Tsui, L. C., Glode, L. M., Maxwell, I. H. and Bernstein, A. (1987). "Genetic ablation: targeted expression of a toxin gene causes microphthalmia in transgenic mice." Science 238(4833): 1563-5.
- Brocard, J., Warot, X., Wendling, O., Messaddeq, N., Vonesch, J. L., Chambon, P. and Metzger, D. (1997). "Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A 94(26): 14559-63.
- Bush, T. G., Savidge, T. C., Freeman, T. C., Cox, H. J., Campbell, E. A., Mucke, L., Johnson, M. H. and Sofroniew, M. V. (1998). "Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice." Cell 93(2): 189-201.
- Cao, Q., Benton, R. L. and Whittemore, S. R. (2002). "Stem cell repair of central nervous system injury." J Neurosci Res 68(5): 501-10.
- **Cascio, S. and Zaret, K. S. (1991).** "Hepatocyte differentiation initiates during endodermalmesenchymal interactions prior to liver formation." Development 113(1): 217-25.
- Cazac, B. B. and Roes, J. (2000). "TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo." Immunity 13(4): 443-51.
- Chandross, K. J., Cohen, R. I., Paras, P., Jr., Gravel, M., Braun, P. E. and Hudson, L. D. (1999). "Identification and characterization of early glial progenitors using a transgenic selection strategy." J Neurosci 19(2): 759-74.
- **Cheng, C. and Zochodne, D. W. (2002).** "In vivo proliferation, migration and phenotypic changes of Schwann cells in the presence of myelinated fibers." Neuroscience 115(1): 321-9.
- Chernoff, G. F. (1981). "Shiverer: an autosomal recessive mutant mouse with myelin deficiency." J Hered 72(2): 128.
- Cole, J. S., Messing, A., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (1994). "Modulation of axon diameter and neurofilaments by hypomyelinating Schwann cells in transgenic mice." J Neurosci 14(11 Pt 2): 6956-66.
- **Collier, R. J. (2001).** "Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century." Toxicon 39(11): 1793-803.
- de Waegh, S. M., Lee, V. M. and Brady, S. T. (1992). "Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells." Cell 68(3): 451-63.
- Draper, R. K. and Simon, M. I. (1980). "The entry of diphtheria toxin into the mammalian cell cytoplasm: evidence for lysosomal involvement." J Cell Biol 87(3 Pt 1): 849-54.
- Duncan, I. D., Grever, W. E. and Zhang, S. C. (1997). "Repair of myelin disease: strategies and progress in animal models." Mol Med Today 3(12): 554-61.
- Ettensohn, C. A. (1990). "Cell interactions in the sea urchin embryo studied by fluorescence photoablation." Science 248(4959): 1115-8.
- Evans, M. J. and Kaufman, M. H. (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature 292(5819): 154-6.

- Falnes, P. O., Ariansen, S., Sandvig, K. and Olsnes, S. (2000a). "Requirement for prolonged action in the cytosol for optimal protein synthesis inhibition by diphtheria toxin." J Biol Chem 275(6): 4363-8.
- Falnes, P. O. and Olsnes, S. (1998). "Modulation of the intracellular stability and toxicity of diphtheria toxin through degradation by the N-end rule pathway." Embo J 17(2): 615-25.
- Falnes, P. O. and Sandvig, K. (2000b). "Penetration of protein toxins into cells." Curr Opin Cell Biol 12(4): 407-13.
- Fausto, N. and Campbell, J. S. (2003). "The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation." Mech Dev 120(1): 117-30.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." Anal Biochem 132(1): 6-13.
- Feltri, M. L., Graus Porta, D., Previtali, S. C., Nodari, A., Migliavacca, B., Cassetti, A., Littlewood-Evans, A., Reichardt, L. F., Messing, A., Quattrini, A., et al. (2002). "Conditional disruption of beta 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons." J Cell Biol 156(1): 199-209.
- Foran, D. R. and Peterson, A. C. (1992). "Myelin acquisition in the central nervous system of the mouse revealed by an MBP-Lac Z transgene." J Neurosci 12(12): 4890-7.
- **Forster, I. and Rajewsky, K. (1990).** "The bulk of the peripheral B-cell pool in mice is stable and not rapidly renewed from the bone marrow." Proc Natl Acad Sci U S A 87(12): 4781-4.
- Frei, R., Motzing, S., Kinkelin, I., Schachner, M., Koltzenburg, M. and Martini, R. (1999).
 "Loss of distal axons and sensory Merkel cells and features indicative of muscle denervation in hindlimbs of P0-deficient mice." J Neurosci 19(14): 6058-67.
- Freitas, A. A., Rocha, B. and Coutinho, A. A. (1986). "Lymphocyte population kinetics in the mouse." Immunol Rev 91: 5-37.
- **Friedrich, G. and Soriano, P. (1991).** "Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice." Genes Dev 5(9): 1513-23.
- Gale, A. N., Gomez, S. and Duchen, L. W. (1982). "Changes produced by a hypomyelinating neuropathy in muscle and its innervation. Morphological and physiological studies in the Trembler mouse." Brain 105(Pt 2): 373-93.
- Garabedian, E. M., Roberts, L. J., McNevin, M. S. and Gordon, J. I. (1997). "Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice." J Biol Chem 272(38): 23729-40.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." J Cell Biol 119(3): 493-501.
- Gencic, S. and Hudson, L. D. (1990). "Conservative amino acid substitution in the myelin proteolipid protein of jimpymsd mice." J Neurosci 10(1): 117-24.
- Gilmour, D. T., Maischein, H. M. and Nusslein-Volhard, C. (2002). "Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system." Neuron 34(4): 577-88.

- Giulian, D. and Moore, S. (1980). "Identification of 2':3'-cyclic nucleotide 3'phosphodiesterase in the vertebrate retina." J Biol Chem 255(13): 5993-5.
- **Göbbels, S. (2002).** "Zelltyp-spezifische Expression der Rekombinase Cre im Nervensystem der Maus." Dissertation, Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg ISBN 3-89873-541-9.
- Gordon, V. M., Klimpel, K. R., Arora, N., Henderson, M. A. and Leppla, S. H. (1995). "Proteolytic activation of bacterial toxins by eukaryotic cells is performed by furin and by additional cellular proteases." Infect Immun 63(1): 82-7.
- Gordon, V. M. and Leppla, S. H. (1994). "Proteolytic activation of bacterial toxins: role of bacterial and host cell proteases." Infect Immun 62(2): 333-40.
- Gravel, M., DeAngelis, D. and Braun, P. E. (1994). "Molecular cloning and characterization of rat brain 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase isoform 2." J Neurosci Res 38(3): 243-7.
- Grieshammer, U., Lewandoski, M., Prevette, D., Oppenheim, R. W. and Martin, G. R. (1998). "Muscle-specific cell ablation conditional upon Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice leads to massive spinal and cranial motoneuron loss." Dev Biol 197(2): 234-47.
- Hao, Z. and Rajewsky, K. (2001). "Homeostasis of peripheral B cells in the absence of B cell influx from the bone marrow." J Exp Med 194(8): 1151-64.
- He, W., Ingraham, C., Rising, L., Goderie, S. and Temple, S. (2001). "Multipotent stem cells from the mouse basal forebrain contribute GABAergic neurons and oligodendrocytes to the cerebral cortex during embryogenesis." J Neurosci 21(22): 8854-62.
- Herrera, P. L., Huarte, J., Zufferey, R., Nichols, A., Mermillod, B., Philippe, J., Muniesa, P., Sanvito, F., Orci, L. and Vassalli, J. D. (1994). "Ablation of islet endocrine cells by targeted expression of hormone-promoter-driven toxigenes." Proc Natl Acad Sci U S A 91(26): 12999-3003.
- Heyman, R. A., Borrelli, E., Lesley, J., Anderson, D., Richman, D. D., Baird, S. M., Hyman, R. and Evans, R. M. (1989). "Thymidine kinase obliteration: creation of transgenic mice with controlled immune deficiency." Proc Natl Acad Sci U S A 86(8): 2698-702.
- Honjo, T., Nishizuka, Y., Kato, I. and Hayaishi, O. (1971). "Adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis by diphtheria toxin." J Biol Chem 246(13): 4251-60.
- Horcher, M., Souabni, A. and Busslinger, M. (2001). "Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis." Immunity 14(6): 779-90.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." Gene 96(1): 23-8.
- Inui, S., Maeda, K., Hua, D. R., Yamashita, T., Yamamoto, H., Miyamoto, E., Aizawa, S. and Sakaguchi, N. (2002). "BCR signal through alpha 4 is involved in S6 kinase activation and required for B cell maturation including isotype switching and V region somatic hypermutation." Int Immunol 14(2): 177-87.

- Ishak, K. G. and Irey, N. S. (1972). "Hepatic injury associated with the phenothiazines. Clinicopathologic and follow-up study of 36 patients." Arch Pathol 93(4): 283-304.
- Jerpseth (1992). "XL1-Blue MRF'E.coli cells." Strategies(5): 81-93.
- Jessen, K. R. and Mirsky, R. (1998). "Origin and early development of Schwann cells." Microsc Res Tech 41(5): 393-402.
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., et al. (2002). "In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens." Immunity 17(2): 211-20.
- Kaur, S., Key, B., Stock, J., McNeish, J. D., Akeson, R. and Potter, S. S. (1989).
 "Targeted ablation of alpha-crystallin-synthesizing cells produces lens-deficient eyes in transgenic mice." Development 105(3): 613-9.
- Kellendonk, C., Opherk, C., Anlag, K., Schutz, G. and Tronche, F. (2000). "Hepatocytespecific expression of Cre recombinase." Genesis 26(2): 151-3.
- Kessaris, N., Pringle, N. and Richardson, W. D. (2001). "Ventral neurogenesis and the neuron-glial switch." Neuron 31(5): 677-80.
- Kisseberth, W. C., Brettingen, N. T., Lohse, J. K. and Sandgren, E. P. (1999). "Ubiquitous expression of marker transgenes in mice and rats." Dev Biol 214(1): 128-38.
- Klinge, O. (1973). "Cytologic and histologic aspects of toxically induced liver reactions." Curr Top Pathol 58: 91-116.
- Kobayashi, K., Morita, S., Sawada, H., Mizuguchi, T., Yamada, K., Nagatsu, I., Fujita, K., Kreitman, R. J., Pastan, I. and Nagatsu, T. (1995). "Immunotoxin-mediated conditional disruption of specific neurons in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A 92(4): 1132-6.
- Koeppen, A. H. and Robitaille, Y. (2002). "Pelizaeus-Merzbacher disease." J Neuropathol Exp Neurol 61(9): 747-59.
- Kostrzewa, R. M. and Jacobowitz, D. M. (1974). "Pharmacological actions of 6hydroxydopamine." Pharmacol Rev 26(3): 199-288.
- Krajewski, K. M., Lewis, R. A., Fuerst, D. R., Turansky, C., Hinderer, S. R., Garbern, J., Kamholz, J. and Shy, M. E. (2000). "Neurological dysfunction and axonal degeneration in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A." Brain 123 (Pt 7): 1516-27.
- Krop, I., de Fougerolles, A. R., Hardy, R. R., Allison, M., Schlissel, M. S. and Fearon, D. T. (1996). "Self-renewal of B-1 lymphocytes is dependent on CD19." Eur J Immunol 26(1): 238-42.
- Kuhn, R., Rajewsky, K. and Muller, W. (1991). "Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice." Science 254(5032): 707-10.
- Kurihara, T., Monoh, K., Sakimura, K. and Takahashi, Y. (1990). "Alternative splicing of mouse brain 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase mRNA." Biochem Biophys Res Commun 170(3): 1074-81.
- Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Jr., Lee, E. J., Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L. and Westphal, H. (1992). "Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A 89(14): 6232-6.
- Landel, C. P., Zhao, J., Bok, D. and Evans, G. A. (1988). "Lens-specific expression of recombinant ricin induces developmental defects in the eyes of transgenic mice." Genes Dev 2(9): 1168-78.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W. and Irwin, I. (1983). "Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis." Science 219(4587): 979-80.
- Lappe-Siefke, C. (2002). "Inaktivirung des CNP-Gens in der Maus und Expression der Cre-Rekombinase in myelinisierenden Gliazellen." Dissertation, Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg ISBN 3-89873-539-7.
- Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P. E., Griffiths, I. R. and Nave, K. A. (2003). "Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination." Nat Genet 33(3): 366-74.
- Lee, K. J., Dietrich, P. and Jessell, T. M. (2000). "Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification." Nature 403(6771): 734-40.
- Lee, P., Morley, G., Huang, Q., Fischer, A., Seiler, S., Horner, J. W., Factor, S., Vaidya, D., Jalife, J. and Fishman, G. I. (1998). "Conditional lineage ablation to model human diseases." Proc Natl Acad Sci U S A 95(19): 11371-6.
- Leuchtenberger, S., Perz, A., Gatz, C. and Bartsch, J. W. (2001). "Conditional cell ablation by stringent tetracycline-dependent regulation of barnase in mammalian cells." Nucleic Acids Res 29(16): E76.
- Lewandoski, M. (2001). "Conditional control of gene expression in the mouse." Nat Rev Genet 2(10): 743-55.
- Libersat, F. and Mizrahi, A. (1996). "In situ visualization and photoablation of individual neurons using a low cost fiber optic based system." J Neurosci Methods 67(2): 157-62.
- Lohs-Schardin, M., Cremer, C. and Nusslein-Volhard, C. (1979). "A fate map for the larval epidermis of Drosophila melanogaster: localized cuticle defects following irradiation of the blastoderm with an ultraviolet laser microbeam." Dev Biol 73(2): 239-55.
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H. B., Allak, B. A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A. and Jonkers, J. (2001). "Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A 98(16): 9209-14.
- Maier, M., Berger, P. and Suter, U. (2002). "Understanding Schwann cell-neurone interactions: the key to Charcot-Marie-Tooth disease?" J Anat 200(4): 357-66.
- Mallet, V. O., Mitchell, C., Guidotti, J. E., Jaffray, P., Fabre, M., Spencer, D., Arnoult, D., Kahn, A. and Gilgenkrantz, H. (2002). "Conditional cell ablation by tight control of caspase-3 dimerization in transgenic mice." Nat Biotechnol 20(12): 1234-9.
- Mao, X., Fujiwara, Y., Chapdelaine, A., Yang, H. and Orkin, S. H. (2001). "Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain." Blood 97(1): 324-6.

- Mao, X., Fujiwara, Y. and Orkin, S. H. (1999). "Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice." Proc Natl Acad Sci U S A 96(9): 5037-42.
- Marin-Padilla, M. (1998). "Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex." Trends Neurosci 21(2): 64-71.
- Marsh, J. L., Erfle, M. and Wykes, E. J. (1984). "The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation." Gene 32(3): 481-5.
- Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A 78(12): 7634-8.
- **Martini, R. (2001).** "The effect of myelinating Schwann cells on axons." Muscle Nerve 24(4): 456-66.
- Mathis, C., Hindelang, C., LeMeur, M. and Borrelli, E. (2000). "A transgenic mouse model for inducible and reversible dysmyelination." J Neurosci 20(20): 7698-705.
- Maxwell, F., Maxwell, I. H. and Glode, L. M. (1987). "Cloning, sequence determination, and expression in transfected cells of the coding sequence for the tox 176 attenuated diphtheria toxin A chain." Mol Cell Biol 7(4): 1576-9.
- Maxwell, I. H., Maxwell, F. and Glode, L. M. (1986). "Regulated expression of a diphtheria toxin A-chain gene transfected into human cells: possible strategy for inducing cancer cell suicide." Cancer Res 46(9): 4660-4.
- Messing, A., Behringer, R. R., Hammang, J. P., Palmiter, R. D., Brinster, R. L. and Lemke, G. (1992). "P0 promoter directs expression of reporter and toxin genes to Schwann cells of transgenic mice." Neuron 8(3): 507-20.
- Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H. and Chambon, P. (1995). "Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase." Proc Natl Acad Sci U S A 92(15): 6991-5.
- Michalopoulos, G. K. and DeFrances, M. C. (1997). "Liver regeneration." Science 276(5309): 60-6.
- Miller, D. J., Asakura, K. and Rodriguez, M. (1995). "Experimental strategies to promote central nervous system remyelination in multiple sclerosis: insights gained from the Theiler's virus model system." J Neurosci Res 41(3): 291-6.
- Miller, J. P. and Selverston, A. (1979). "Rapid killing of single neurons by irradiation of intracellularly injected dye." Science 206(4419): 702-4.
- Mitamura, T., Higashiyama, S., Taniguchi, N., Klagsbrun, M. and Mekada, E. (1995). "Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity." J Biol Chem 270(3): 1015-9.
- Mizrahi, A. and Libersat, F. (2001). "Synaptic reorganization induced by selective photoablation of an identified neuron." J Neurosci 21(23): 9280-90.
- Moffat, K. G., Gould, J. H., Smith, H. K. and O'Kane, C. J. (1992). "Inducible cell ablation in Drosophila by cold-sensitive ricin A chain." Development 114(3): 681-7.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1: 263-73.
- Naglich, J. G., Metherall, J. E., Russell, D. W. and Eidels, L. (1992). "Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor." Cell 69(6): 1051-61.
- Nagy, A. (2000). "Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring." Genesis 26(2): 99-109.
- Nave, K. A. (1994). "Neurological mouse mutants and the genes of myelin." J Neurosci Res 38(6): 607-12.
- Nave, K. A., Bloom, F. E. and Milner, R. J. (1987). "A single nucleotide difference in the gene for myelin proteolipid protein defines the jimpy mutation in mouse." J Neurochem 49(6): 1873-7.
- Osmond, D. G. (1993). "The turnover of B-cell populations." Immunol Today 14(1): 34-7.
- Palmiter, R. D., Behringer, R. R., Quaife, C. J., Maxwell, F., Maxwell, I. H. and Brinster, R. L. (1987). "Cell lineage ablation in transgenic mice by cell-specific expression of a toxin gene." Cell 50(3): 435-43.
- Pasparakis, M., Schmidt-Supprian, M. and Rajewsky, K. (2002). "IkappaB kinase signaling is essential for maintenance of mature B cells." J Exp Med 196(6): 743-52.
- Pearsall, G. B., Nadon, N. L., Wolf, M. K. and Billings-Gagliardi, S. (1997). "Jimpy-4J mouse has a missense mutation in exon 2 of the Plp gene." Dev Neurosci 19(4): 337-41.
- Pelizaeus, F. (1885). "Über eine eigenthümliche Form spastischer Lähmung mit Cerebralerscheinungen auf hereditärer Grundlage (Multiple Sklerose)." Arch Psychiat Nervenerkrankh 16: 698-710.
- Peyron, F., Timsit, S., Thomas, J. L., Kagawa, T., Ikenaka, K. and Zalc, B. (1997). "In situ expression of PLP/DM-20, MBP, and CNP during embryonic and postnatal development of the jimpy mutant and of transgenic mice overexpressing PLP." J Neurosci Res 50(2): 190-201.
- **Postic, C. and Magnuson, M. A. (2000).** "DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age." Genesis 26(2): 149-50.
- Ramirez-Solis, R., Rivera-Perez, J., Wallace, J. D., Wims, M., Zheng, H. and Bradley, A. (1992). "Genomic DNA microextraction: a method to screen numerous samples." Anal Biochem 201(2): 331-5.
- Ren, J., Kachel, K., Kim, H., Malenbaum, S. E., Collier, R. J. and London, E. (1999). "Interaction of diphtheria toxin T domain with molten globule-like proteins and its implications for translocation." Science 284(5416): 955-7.
- Rickert, R. C., Roes, J. and Rajewsky, K. (1997). "B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice." Nucleic Acids Res 25(6): 1317-8.
- Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G. R. and Birchmeier, C. (1997). "Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor." Nature 389(6652): 725-30.

- Rindi, G., Ratineau, C., Ronco, A., Candusso, M. E., Tsai, M. and Leiter, A. B. (1999). "Targeted ablation of secretin-producing cells in transgenic mice reveals a common differentiation pathway with multiple enteroendocrine cell lineages in the small intestine." Development 126(18): 4149-56.
- Roach, A., Takahashi, N., Pravtcheva, D., Ruddle, F. and Hood, L. (1985). "Chromosomal mapping of mouse myelin basic protein gene and structure and transcription of the partially deleted gene in shiverer mutant mice." Cell 42(1): 149-55.
- Roessle, R. (1929). "Hepatose und Hepatitis." Schweiz Med Wochenschr 59: 4-9.
- Saida, K., Sumner, A. J., Saida, T., Brown, M. J. and Silberberg, D. H. (1980). "Antiserum-mediated demyelination: relationship between remyelination and functional recovery." Ann Neurol 8(1): 12-24.
- Saito, M., Iwawaki, T., Taya, C., Yonekawa, H., Noda, M., Inui, Y., Mekada, E., Kimata, Y., Tsuru, A. and Kohno, K. (2001). "Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice." Nat Biotechnol 19(8): 746-50.
- Sambrook J., F. E. F., Maniatis T. (1989). "Molecular Cloning. A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sancho, S., Magyar, J. P., Aguzzi, A. and Suter, U. (1999). "Distal axonopathy in peripheral nerves of PMP22-mutant mice." Brain 122 (Pt 8): 1563-77.
- Sandvig, K. and Olsnes, S. (1980). "Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH." J Cell Biol 87(3 Pt 1): 828-32.
- Scherer, S. S., Braun, P. E., Grinspan, J., Collarini, E., Wang, D. Y. and Kamholz, J. (1994). "Differential regulation of the 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase gene during oligodendrocyte development." Neuron 12(6): 1363-75.
- Schittek, B., Rajewsky, K. and Forster, I. (1991). "Dividing cells in bone marrow and spleen incorporate bromodeoxyuridine with high efficiency." Eur J Immunol 21(1): 235-8.
- Schwab, M. H., Bartholomae, A., Heimrich, B., Feldmeyer, D., Druffel-Augustin, S., Goebbels, S., Naya, F. J., Zhao, S., Frotscher, M., Tsai, M. J., et al. (2000).
 "Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/Neuro D) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus." J Neurosci 20(10): 3714-24.
- Schwab, M. H., Druffel-Augustin, S., Gass, P., Jung, M., Klugmann, M., Bartholomae, A., Rossner, M. J. and Nave, K. A. (1998). "Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX, neuroD, NDRF): spatiotemporal expression and targeted disruption of the NEX gene in transgenic mice." J Neurosci 18(4): 1408-18.
- Schwenk, F., Sauer, B., Kukoc, N., Hoess, R., Muller, W., Kocks, C., Kuhn, R. and Rajewsky, K. (1997). "Generation of Cre recombinase-specific monoclonal antibodies, able to characterize the pattern of Cre expression in cre-transgenic mouse strains." J Immunol Methods 207(2): 203-12.
- Shimizu, C., Akazawa, C., Nakanishi, S. and Kageyama, R. (1995). "MATH-2, a mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of Drosophila proneural gene atonal, is specifically expressed in the nervous system." Eur J Biochem 229(1): 239-48.

- Simpson, J. C., Smith, D. C., Roberts, L. M. and Lord, J. M. (1998). "Expression of mutant dynamin protects cells against diphtheria toxin but not against ricin." Exp Cell Res 239(2): 293-300.
- Skretting, G., Torgersen, M. L., van Deurs, B. and Sandvig, K. (1999). "Endocytic mechanisms responsible for uptake of GPI-linked diphtheria toxin receptor." J Cell Sci 112 (Pt 22): 3899-909.
- Smith, C. A., Graham, C. M., Mathers, K., Skinner, A., Hay, A. J., Schroeder, C. and Thomas, D. B. (2002). "Conditional ablation of T-cell development by a novel viral ion channel transgene." Immunology 105(3): 306-13.
- Soriano, P. (1999). "Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain." Nat Genet 21(1): 70-1.
- **Sprinkle, T. J. (1989).** "2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, an oligodendrocyte-Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervous system." Crit Rev Neurobiol 4(3): 235-301.
- Sprinkle, T. J., McMorris, F. A., Yoshino, J. and DeVries, G. H. (1985). "Differential expression of 2':3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in cultured central, peripheral, and extraneural cells." Neurochem Res 10(7): 919-31.
- Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C. S., William, C. M., Tanabe, Y., Jessell, T. M. and Costantini, F. (2001). "Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus." BMC Dev Biol 1(1): 4.
- Stangel, M. and Hartung, H. P. (2002). "Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis." Prog Neurobiol 68(5): 361-76.
- Super, H., Martinez, A. and Soriano, E. (1997). "Degeneration of Cajal-Retzius cells in the developing cerebral cortex of the mouse after ablation of meningeal cells by 6-hydroxydopamine." Brain Res Dev Brain Res 98(1): 15-20.
- Suter, U., Welcher, A. A., Ozcelik, T., Snipes, G. J., Kosaras, B., Francke, U., Billings-Gagliardi, S., Sidman, R. L. and Shooter, E. M. (1992). "Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene." Nature 356(6366): 241-4.
- Takebayashi, H., Yoshida, S., Sugimori, M., Kosako, H., Kominami, R., Nakafuku, M. and Nabeshima, Y. (2000). "Dynamic expression of basic helix-loop-helix Olig family members: implication of Olig2 in neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, Olig3." Mech Dev 99(1-2): 143-8.
- Thomas, K. R. and Capecchi, M. R. (1987). "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells." Cell 51(3): 503-12.
- Trapp, B. D., Peterson, J., Ransohoff, R. M., Rudick, R., Mork, S. and Bo, L. (1998). "Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis." N Engl J Med 338(5): 278-85.
- Truitt, W. A. and Coolen, L. M. (2002). "Identification of a potential ejaculation generator in the spinal cord." Science 297(5586): 1566-9.
- Varshavsky, A. (1996). "The N-end rule: functions, mysteries, uses." Proc Natl Acad Sci U S A 93(22): 12142-9.
- Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979). "Preparative and analytical purification of DNA from agarose." Proc Natl Acad Sci U S A 76(2): 615-9.

- Watanabe, D., Inokawa, H., Hashimoto, K., Suzuki, N., Kano, M., Shigemoto, R., Hirano, T., Toyama, K., Kaneko, S., Yokoi, M., et al. (1998). "Ablation of cerebellar Golgi cells disrupts synaptic integration involving GABA inhibition and NMDA receptor activation in motor coordination." Cell 95(1): 17-27.
- Wen, P., Groupp, E. R., Buzard, G., Crawford, N. and Locker, J. (1991). "Enhancer, repressor, and promoter specificities combine to regulate the rat alpha-fetoprotein gene." DNA Cell Biol 10(7): 525-36.
- Williams, B. P., Read, J. and Price, J. (1991). "The generation of neurons and oligodendrocytes from a common precursor cell." Neuron 7(4): 685-93.
- Wolf, M. K., Nunnari, J. N. and Billings-Gagliardi, S. (1999). "Quaking*shiverer doublemutant mice survive for at least 100 days with no CNS myelin." Dev Neurosci 21(6): 483-90.
- Wunderlich, F. T., Wildner, H., Rajewsky, K. and Edenhofer, F. (2001). "New variants of inducible Cre recombinase: a novel mutant of Cre-PR fusion protein exhibits enhanced sensitivity and an expanded range of inducibility." Nucleic Acids Res 29(10): E47.
- Yamaizumi, M., Mekada, E., Uchida, T. and Okada, Y. (1978). "One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell." Cell 15(1): 245-50.
- Ying, S., Jansen, H. T., Lehman, M. N., Fong, S. L. and Kao, W. W. (2000). "Retinal degeneration in cone photoreceptor cell-ablated transgenic mice." Mol Vis 6: 101-8.
- Yoshida, K., Watanabe, D., Ishikane, H., Tachibana, M., Pastan, I. and Nakanishi, S. (2001). "A key role of starburst amacrine cells in originating retinal directional selectivity and optokinetic eye movement." Neuron 30(3): 771-80.
- Yu, W. P., Collarini, E. J., Pringle, N. P. and Richardson, W. D. (1994). "Embryonic expression of myelin genes: evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube." Neuron 12(6): 1353-62.
- Zambrowicz, B. P., Imamoto, A., Fiering, S., Herzenberg, L. A., Kerr, W. G. and Soriano, P. (1997). "Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells." Proc Natl Acad Sci U S A 94(8): 3789-94.
- Zhou, L. J., Ord, D. C., Hughes, A. L. and Tedder, T. F. (1991). "Structure and domain organization of the CD19 antigen of human, mouse, and guinea pig B lymphocytes. Conservation of the extensive cytoplasmic domain." J Immunol 147(4): 1424-32.
- **Zhou, Q., Choi, G. and Anderson, D. J. (2001).** "The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2." Neuron 31(5): 791-807.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Dieter Riethmacher für die Betreuung der Arbeit, die ich in seinem Labor im ZMNH anfertigen durfte.

Prof. Dr. Dr. Jentsch danke ich für die Begutachtung der Dissertation. Prof. Dr. Renwrantz gebührt Dank für die Übernahme des Coreferats.

PD Dr. Bach und Prof. Dr. Wiese möchte ich für die Begutachtung der Disputation danken.

Für die Unterstützung bei der Analyse peripherer Nerven danke ich Michaela Schweizer. Alexander Scheffold und Boris Fehse sei Dank für die Hilfe bei FACS Analysen. Für die Erzeugung und Bereitstellung von Cre Mäusen möchte ich den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Nave, Prof. Dr. Rajewsky und Prof. Dr. Schütz herzlich danken.

Besonders möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Forschergruppen für die stets freundliche Atmosphäre im ZMNH bedanken.