

## 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  $\beta$ -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, kortikalen 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 corticalen 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-dezimierete Mäuse zu testen