

4 Diskussion

4.1 Etablierung des konditionellen *met*^{flox} Allels

Die Nullmutante des Tyrosinkinase-Rezeptors *Met* ermöglichte wertvolle Einsichten in die Rolle dieses Signalsystems während der Embryonalentwicklung der Maus (Bladt et al., 1995). Die embryonale Letalität der Nullmutation verhinderte jedoch die Analyse möglicher Funktionen im adulten Organismus. Daher wurde unter Verwendung des Cre/loxP-Systems ein konditionelles *met*^{flox}-Allel etabliert, um diese Beschränkung zu überwinden.

Als Strategie wurde ein *knock-in* der cDNA, die für die zytoplasmatische Domäne des humanen Met-Rezeptors kodiert, in den genomischen *Met*-Locus der Maus gewählt. Die cDNA wurde mit loxP Erkennungssequenzen flankiert, um die Cre-vermittelte Deletion des Allels zu ermöglichen. Ein ähnliches Konstrukt, allerdings ohne loxP Sequenzen und somit nicht-konditionell, war publiziert und als funktionell unbeeinträchtigt beschrieben worden (Maina et al., 1996). Der zweite Grund für die Wahl dieser Strategie war die Überlegung, gezielt Punktmutationen in die humane cDNA des Targeting-Vektors einzuführen und auf diese Weise Mutanten des Rezeptors *in vivo* testen zu können.

In einer ersten Version des Targeting-Vektors wurde das Neomycin-Resistenzgen im Konstrukt belassen worden, da eine zuvor publizierte Arbeit eines ähnlichen Allels keinen Effekt des Resistenzmarkers auf die Expression des Rezeptors beschrieben hatte (Maina et al., 1996). Dies ist deshalb von Bedeutung, da sich die Anwesenheit einer Neomycin-Resistenzkassette in einem genomischen Locus negativ auf die Expression dieses Gens auswirken kann (Hug et al., 1996; Ley et al., 1998). Mögliche Effekte sind eine Deregulation des Expressionsmusters oder Änderung des Expressionsniveaus. Bei einem sogenannten hypomorphen Allel verringert sich hierbei die Menge des gebildeten Proteins signifikant. Neuere Arbeiten haben gezeigt, daß man durch die Belassung der Neomycin-Kassette in einem durch *gene targeting* modifizierten genomischen Locus gezielt ein hypomorphes Allel *in vivo* erzeugen kann (Meyers et al., 1998; Nagy et al., 1998).

Erste Tests des $\text{metflox}^{\text{neo}}$ -Allels zeigten, daß der modifizierte Rezeptor exprimiert wurde und aktiv war. Eine Unterscheidung zwischen den vom nativen und modifizierten Allel gebildeten Rezeptoren war möglich, da human-spezifische Antikörper gegen den C-Terminus des vom $\text{metflox}^{\text{neo}}$ -Allel abgelesenen Fusionsrezeptors zur Verfügung standen. Entgegen den Erwartungen erwies sich das $\text{metflox}^{\text{neo}}$ -Allel jedoch als hypomorph. Embryonen mit dem Genotyp $\text{metflox}^{\text{neo}}/\text{metflox}^{\text{neo}}$ starben unmittelbar nach der Geburt. Heterozygote $\text{metflox}^{\text{neo}}$ Tiere zeigten dagegen keinen Phänotyp und waren fertil.

Eine kürzlich publizierte Arbeit belegt nun, daß auch das von Maina et al. veröffentlichte *Met*-Fusionsallel hypomorph ist. Die ursprüngliche Publikation beschrieb eine Serie von Allelen mit unterschiedlichen Punktmutationen in der *Multiple-Docking-Site* von *Met*, mit deren Hilfe die Bindungsspezifität verschiedener Interaktionspartner wie *Grb2* *in vivo* getestet werden sollte (Maina et al., 1996). In allen Konstrukten war die Neomycin-Resistenzkassette im Locus belassen worden. Da für das Kontrollallel kein Phänotyp beschrieben wurde, wirkte sich die Anwesenheit des Resistenzmarkers offensichtlich nicht auf die Expression des *Met*-Konstrukts aus. Die Arbeit von Ieraci und al. läßt nun darauf schließen, daß diese Annahme wohl nicht zutreffend war. Nach Entfernung der Neomycin-Resistenzkassette aus dem $\text{Met}^{\text{Grb2neo}}$ Allel ist dieses Allel nicht mehr perinatal letal, wie von Maina et al. beschrieben, sondern zeigt nur noch einen milden Phänotyp im Cerebellum adulter Mäuse (Ieraci et al., 2002). Unveröffentlichte Ergebnisse deuten darauf hin, daß sich das reduzierte Expressionsniveau des hypomorphen *Met*-Allels stärker auf die Signaltransduktion in migrierenden Muskelvorläuferzellen als auf das Wachstum des Plazentalabyrinths auswirkt (R. Klein, persönliche Mitteilung). Homozygote Embryonen entwickeln sich daher bis zur Geburt, können dann aber aufgrund des fehlenden Zwerchfellmuskels, der aus migrierenden Vorläuferzellen hervorgeht, nicht atmen und sterben unmittelbar nach der Geburt.

Nachdem das $\text{metflox}^{\text{neo}}$ Allel offensichtlich hypomorph war, wurde ein zweiter Versuch zur Etablierung des konditionellen *Met* Allels unternommen. Das loxP-flankierte Neomycin-Resistenzgen wurde durch transiente Expression von Cre in ES Zellen entfernt, und durch Blastozysteninjektion eine neue met^{floX} -Linie etabliert. Homozygote met^{floX} -Tiere sind ohne Phänotyp und fertil, einigen Individuen mit einem $\text{met}^{\text{floX}}/\text{Met}$ - Genotyp zeigen aber in eine reduzierte Vitalität. Somit können $\text{met}^{\text{floX}}/\text{met}^{\text{floX}}$ Tiere nun in weiteren Experimenten für die Analyse des Met-Rezeptors

im adulten Organismus eingesetzt werden, wobei allerdings die leichte Reduktion der Aktivität des Allels im Auge behalten werden muss.

Mögliche adulte Funktionen von *Met* werden bei der Regenerationsvorgängen von Epithelien vermutet, z.B. bei der Regeneration der Leber nach partieller Hepatektomie oder bei der Wundheilung der Haut. Auch die Rolle von *Met* im Gehirn adulter Tiere kann nun untersucht werden. Von Interesse wird auch sein, ob *Met*^{-/-} Zellen in Tumormodellen eine veränderte Malignität zeigen werden, da sowohl die Zellmotilität als auch die Proliferation durch das Fehlen des *Met*-Rezeptors beeinträchtigt sein werden.

4.2 Rolle des *Met*-Signalsystems in der Wanderung von Muskelvorläuferzellen

Um die Signaltransduktion am *Met*-Rezeptor während der Embryonalentwicklung zu untersuchen, waren Nullmutanten von *Met* und *HGF/SF* in der Maus hergestellt worden (Bladt et al., 1995; Schmidt et al., 1995). Ein interessanter Phänotyp in diesen Mutanten war die Abwesenheit bestimmter Muskelgruppen. Die Analyse der mutanten Embryonen zeigte, daß sich die fehlenden Muskelgruppen aus migratorischen Vorläuferzellen entwickeln. Diese Muskelvorläuferzellen lösen sich vom Dermomyotom ab und wandern über festgelegte Routen an ihre Ziele (Bladt et al., 1995). In den *Met*- und *HGF/SF*-Mutanten ist die Delamination dieser Zellen vom Dermomyotom gestört. Die Zellen im Dermomyotom behalten ihre epitheliale Morphologie, eine epithelial-mesenchymale Konversion findet nicht statt, und die Zellen wandern nicht aus.

Eine Analyse der Expression von *HGF/SF* während der embryonalen Stadien, in denen die Wanderung von Muskelvorläuferzellen stattfindet, hatte gezeigt, daß *HGF/SF* entlang der Migrationsroute der Vorläuferzellen exprimiert wird (Dietrich et al., 1999). Der Faktor wird dort von mesenchymalen Zellen produziert. Die Muskelvorläuferzellen dagegen exprimieren während der gesamten Migration den Rezeptor *Met* und können damit das vom Mesenchym produzierte *HGF/SF*-Signal erkennen. Dies läßt vermuten, daß *HGF/SF* und *Met* nicht nur für die Delamination der Vorläuferzellen, sondern auch für die Wanderung an ihre Zielorte wichtig sein könnten. Eine Möglichkeit bestünde darin, daß *HGF/SF* für die Zielfindung der Zellen benötigt wird, sie somit während der Wanderung durch den Faktor gelenkt werden. Alternativ könnte das *Met*-Signalsystem eine permissive Rolle in der Wanderung ausüben und die Zellen in einem motilen Zustand erhalten, indem zum Beispiel ihre Aggregation verhindert wird. Eine dritte Möglichkeit wäre, daß *HGF/SF* das Überleben und Wachstum der Zellen während der Wanderungsphase sichert, und daß Zellen, die von ihrer Route abkommen und deshalb kein *HGF/SF* Signal mehr empfangen, sterben. Diese Hypothesen konnten allerdings in den Nullmutanten nicht überprüft werden, da in *Met*^{-/-} oder *HGF/SF*^{-/-} Embryonen keine Delamination und somit auch keine Wanderung der Muskelvorläuferzellen stattfindet.

Gab1 kodiert für ein Adaptorprotein, das an den aktivierten Met-Rezeptor bindet und das *Met*-Signal weiterleitet. Die Mutation von *Gab1* in der Maus hatte gezeigt, daß alle in den *Met*-bzw. *HGF/SF* Mutanten beobachteten Veränderungen auch in den *Gab1*-mutanten Mäusen auftreten, wobei der Phänotyp allerdings schwächer ausgeprägt ist. In den *Gab1*-Mutanten delaminieren weniger Zellen vom Dermomyotom, und Muskeln, die sich aus den wandernden Zellen entwickeln, sind abwesend oder zumindest in ihrer Größe reduziert. (Sachs et al., 2000).

Kombinationsmutanten mit dem Genotyp *Gab1*^{-/-}/*Met*^{+/-} boten nun die Möglichkeit, das Wanderungsverhalten von Muskelvorläuferzellen zu untersuchen, in denen die Dosis des *Met*-Signals reduziert ist. Das beschreibt Zellen, die zwar vom Dermomyotom delaminieren können, denen aber für die Wanderung an ihre Zielorte in den Extremitäten, im Zwerchfell und in der Zunge nur ein reduziertes *Met*-Signal zur Verfügung steht.

Eine Analyse der Verteilung von *Lbx1*-positiven Muskelvorläuferzellen an Tag E10,5 bzw. E11,5 zeigt, daß in den *Gab1*^{-/-}/*Met*^{+/-} Embryonen viele der Zellen, die vom Dermomyotom delaminiert haben, an ektopischen Positionen lokalisiert sind (Abb 3.5). Es fällt auf, daß die ausgewanderte Zellen in der Kombinationsmutante oft in Gruppen auftreten, während die wandernden Zellen in den Kontrolltieren vereinzelt sind (Abb. 3.5 B, Pfeile). Zudem sind in den mutanten Embryonen alle Zellen, die delaminiert haben, nicht sehr weit in die Extremitäteneinlage eingewandert. Zusammen weisen diese Beobachtungen darauf hin, daß *Met* auch während der Migration Signale vermittelt, die das Wanderungsverhalten der Zellen beeinflussen. Selbst wenn sie sich vom Dermomyotom ablösen, scheinen die Zellen in den *Gab1*^{-/-}/*Met*^{+/-} Embryonen nicht ihr normales Migrationverhalten aufzunehmen, sondern zu kleinen Gruppen zu aggregieren und nur kurze Distanzen zu migrieren.

Um zu bestimmen, wieviele der ausgewanderten Muskelvorläuferzellen schließlich ihre Zielorte in den Extremitäten, dem Zwerchfell und der Zunge erreichen und zu Muskelzellen differenzieren, wurde an Embryonen des Stadiums E14,5 eine Immunfärbung gegen das Muskelprotein *Myosin* durchgeführt. In den *Gab1*^{-/-}/*Met*^{+/-} Mutanten konnten keine Muskeln in der Zungenspitze, im Zwerchfell und in der distalen Extremität nachgewiesen werden (Abb 3.4). Damit ist der Verlust an Muskulatur in den *Gab1*/*Met*-Kombinationsmutanten noch ausgeprägter als in den

Gab1-Nullmutanten, bei denen die Muskulatur der Zunge sowie einige Muskelgruppen in den Extremitäten gebildet werden (Sachs et al., 2000). Im Vergleich dazu fehlen in den *Met*-Nullmutanten alle oben beschriebenen Muskeln in Extremitäten, Zungenspitze und Zwerchfell, da die Vorläuferzellen nicht vom Dermomyotom delaminieren (Bladt et al., 1995).

Da die Muskelvorläuferzellen in den *Gab1/Met*-Kombinationsmutanten delaminieren und, wenn auch stark eingeschränkt, migrieren, stellte sich die Frage, ob das Fehlen der beschriebenen Muskelgruppen allein auf reduzierte Migrationseffizienz bei den Vorläuferzellen zurückzuführen sei, oder ob vielleicht auch die Differenzierung der Vorläufer in reife Muskelzellen gestört ist. *In situ* Hybridisierung mit einer Sonde für den Muskeldifferenzierungsmarker *Myf5* zeigte, daß an Tag E11,5 vereinzelt migratorische Zellen die Basis der Zungenanlage erreicht haben (Abb. 3.3). Und Immunfärbung gegen den Muskelmarker *MyoD* an Tag E11,5 und E12,5 ergab, daß sowohl in Kontrolltieren als auch in den *Gab1-/-//Met+/-* Mutanten *Lbx1*-positive Muskelvorläufer den Differenzierungsmarker *MyoD* exprimieren (Abb. 3.6, 3.7). Muskeldifferenzierung kann damit auch bei einem abgeschwächten *Met*-Signal stattfinden, so daß das Fehlen der Muskeln in Extremitäten, Zwerchfell und Zunge nicht auf einen Differenzierungsdefekt in den *Gab1/Met*-Kombinationsmutanten zurückgeführt werden kann.

Der *Met*-Rezeptor kann *in vitro* und *in vivo* das Zellwachstum stimulieren, und damit könnte möglicherweise eine Abschwächung des mitogenen Signals für das Fehlen der beschriebenen Muskelgruppen verantwortlich sein. Daher wurde nun die Proliferationsrate der Muskelvorläuferzellen untersucht. Eine Analyse der BrdU-Inkorporation in die DNA *Lbx1*-positiver Vorläuferzellen in den Extremitätenanlagen von *Gab1-/-//Met+/-* Tieren an Tag E10,5 und E11,5 der Embryonalentwicklung ergab eine um etwa 25% reduzierte Proliferationsrate im Vergleich zu Kontrolltieren (Tab. 3.1). Dieser relativ geringe Unterschied erklärt jedoch das Fehlen ganzer Muskelgruppen nur unzureichend, so daß auch die Apoptoserate der Vorläuferzellen mittels TUNEL bestimmt wurde. Im Gegensatz zur Proliferationsrate konnten hier starke Unterschiede zwischen *Gab1-/-//Met+/-* Kombinationsmutanten und Kontrolltieren beobachtet werden. An Tag E10,5 liegt die Apoptoserate in den mutanten Embryonen mit etwa 16% um den Faktor 3,5 höher als in den Kontrolltieren mit 4%.

Einen Tag später, an Tag E11,5, kann diese erhöhte Apoptoserate nicht mehr beobachtet werden (Tab 3.1). Da im Vergleich zu E10,5 an Tag E11,5 die Zahl der *Lbx1*-positiven Muskelvorläuferzellen in den mutanten Tieren nochmals stark reduziert ist, gehen vermutlich die meisten der vom Dermomyotom delaminierten Vorläuferzellen zwischen E10,5 und E11,5 zugrunde.

Offenbar sterben die Muskelvorläuferzellen, wenn sie nicht zu ihren Zielorten migrieren können, da die wenigen Zellen, die ihre Ziele erreichen, korrekt zu Muskelzellen differenzieren. Es ist allerdings noch unklar, ob der *Met*-Ligand *HGF/SF* in diesem Zusammenhang direkt als Überlebenssignal wirkt, oder ob dafür andere Signalmoleküle entlang der Wanderungsrouten verantwortlich sind. Für *HGF/SF* ist bekannt, daß es in bestimmten Zellsystemen eine zytoprotektive Wirkung hat und das Überleben von Zellen fördert (Ebens et al., 1996; Fan et al., 2001; Maina und Klein, 1999; Wang et al., 2002; Xiao et al., 2001). Als Mitogen jedenfalls scheint *HGF/SF* in den migrierenden Muskelvorläuferzellen keine entscheidende Bedeutung zu besitzen, da die Proliferationsrate der Muskelvorläuferzellen in *Gab1*^{-/-}/*Met*^{+/-} Tieren nur etwa 25% niedriger liegt als in den Kontrolltieren.

Da die ektopisch positionierten *Lbx1*-positiven Muskelvorläuferzellen in den *Gab1*/*Met*-Mutanten offenbar zum großen Teil durch Apoptose eliminiert werden, stellt sich nun die Frage, warum diese Zellen nicht an ihre Zielorte wandern können.

Ein möglicher Grund für die im Vergleich zu *Gab1*^{-/-} Tieren weiter reduzierte Migrationsfähigkeit der wandernden Muskelvorläuferzellen in *Gab1*^{-/-}/*Met*^{+/-} Tieren könnte darin liegen, daß *HGF/SF*, das entlang des Migrationspfades der Vorläuferzellen von mesenchymalen Zellen sezerniert wird, als chemoattraktiver Faktor wirkt. Die Abschwächung dieses Signalweges durch Inaktivierung eines *Met*-Allels könnte somit den wandernden Zellen essentielle Informationen über die Richtung der Zellmigration vorenthalten.

Eine andere Möglichkeit wäre, daß das *Met*-Signalsystem während der Zellmigration entscheidend an Prozessen der Zellmotilität wie der Ausbildung migratorischer Membranfortsätze oder an der Restrukturierung des Gewebes entlang der Migrationsroute beteiligt ist. *HGF/SF* aktiviert die GTPasen *Rac*, *Rho* und *CDC42* und über diese die Kinase *PAK-1*, die Zellmotilität und Invasivität reguliert (Ridley et al., 1995; Rodrigues et al., 1997; Royal et al., 2000; Takaishi et al., 1994). *PAK-1* kann über

den *Grb2* und den *PI3-Kinase*-Signalweg aktiviert werden, wobei der Weg über *Grb2* unabhängig vom Adaptorprotein *Gab1* verläuft. Es ist zudem bekannt, daß *HGF/SF* die Expression von Proteasen wie *Urokinase-type-Plasminogen-Activator (uPA)* und Matrixmetalloproteinasen (MMP) induzieren kann (Jeffers et al., 1996). Diese Enzyme bauen Proteine der extrazellulären Matrix ab und ermöglichen so die Migration von Zellen im Gewebe. Eine Abschwächung des *Met*-Signals könnte dazu führen, daß das Gewebe entlang der Wanderungsrouten für die migratorischen Muskelvorläuferzellen schwerer zu durchdringen ist und deshalb nur wenige Zellen ihr Ziel erreichen. Möglicherweise ist dies auch der Grund dafür, daß die wenigen tatsächlich auswandernden Zellen in den *Gab1/Met*-Mutanten eher in kleinen Zellgruppen angetroffen werden, während die Zellen in den Kontrolltieren im Gewebe sichtbar vereinzelt sind.

Zur Beantwortung dieser Fragen wäre eine Microarray-Genexpressionsanalyse von Muskelvorläuferzellen mit *Gab1*^{-/-}/*Met*^{+/-} Genotyp denkbar. Die *Lbx1*-positiven Vorläuferzellen könnten durch Einkreuzen eines vorhandenen *Lbx1*-GFP (=Green Fluorescent Protein) Allels markiert, isoliert, in einer FACS-Zellsortiermaschine angereicht und für die Affymetrix Microarray-Analyse prozessiert werden. Auf diese Weise könnten zum Beispiel mögliche Veränderungen in der Expression von Metalloproteinasen oder Komponenten des Zytoskeletts analysiert werden.

4.3 Etablierung des *otx1Cre* Transgens

Die Konditionelle Mutagenese mit Hilfe der DNA-Rekombinasen Cre und Flp hat die Methoden der molekularen Genetik um ein äußerst vielseitiges und wertvolles Werkzeug erweitert (Dymecki, 1996a; Gu et al., 1994; Sauer und Henderson, 1988). Genomische Loci können nun *in vivo* nahezu beliebig manipuliert werden, die Technik erlaubt die Inaktivierung von Genen ebenso wie ihre Aktivierung, wobei Zeit und Ort der Rekombination prinzipiell frei wählbar sind. Erreicht wird dies durch die Kombination geeigneter gewebespezifischer Promotoren mit induzierbaren Varianten der Rekombinasen, so daß zum Beispiel eine ausschließlich in Hepatocyten exprimierte, modifizierte Cre-Rekombinase durch das Östrogen-Analogon Tamoxifen induziert werden kann (Imai et al., 2000). Entscheidend für die experimentelle Verwendbarkeit eines derartigen Cre-Transgens ist dabei eine möglichst authentische Expression der Rekombinase, die dem Expressionsmuster des gewählten endogenen Promotors im Idealfall völlig entspricht. Herkömmliche transgene Techniken, bei denen ein Konstrukt mit Rekombinase und spezifischem Promotor ungerichtet und randomisiert in das Genom integriert wird, resultieren häufig in einer unerwünschten ektopischen Expression der Rekombinase, wenn am Integrationsort vorhandene transkriptionelle Aktivator- oder Repressorelemente den eingebrachten Promotor beeinflussen. Aus diesem Grund werden Cre-Transgene häufig nach der *knock-in* Methode hergestellt. Dabei wird mittels ES Zell-Technologie und homologer Rekombination die Rekombinase gezielt in einen genomischen Locus und damit unter die Kontrolle des endogenen Promotors gebracht.

Diese *knock-in* Strategie wurde auch gewählt, um ein Cre-Transgen zu etablieren, das die Cre-Rekombinase spezifisch im Vorderhirn exprimieren sollte. Als Promotor wurde der Promotor des *Otx1* Gens gewählt. *Otx1* kodiert für einen Homöobox-Transkriptionsfaktor, der in der Maus ab Tag E8,5 im Vorderhirn exprimiert wird (Simeone et al., 1992; Simeone et al., 1993). Es wurde ein Targeting Vektor konstruiert, um Cre in den *Otx1* Locus einzubringen und unter Kontrolle des *Otx1* Promotors zu stellen. Ein Problem bei der Konstruktion des Vektors ergab sich daraus, daß die Kodierungssequenz von Cre offensichtlich kryptische Spleißsignale enthält, die bei der Expression dieses prokaryontischen Gens in eukaryontischen Zellen verwendet werden,

zu aberrantem Spleißen führen und damit in einer Verringerung der Transkriptmenge resultieren (R. Kühn, persönliche Mitteilung; Gorski und Jones, 1999; Wunderlich et al., 2001). Die Ursache dieses Phänomens liegt darin, daß prokaryontische Organismen kein Spleiß-System besitzen und somit kein Selektionsdruck gegen das Vorhandensein potentieller Spleiß-Sequenzen in der Kodierungssequenz eines Gens besteht (Urlinger et al., 2000). Ein besonders signifikantes kryptisches Spleißsignal in der Cre-Kodierungssequenz wurde mit Hilfe computergestützter Analyseverfahren identifiziert und durch stille Mutagenese eines Kodons von *cag* in *caa* beseitigt; die geringere Benutzungshäufigkeit von *caa* in der Maus (28% für *caa* gegen 72% für *cag* laut CGC Codon Usage Tables; CGC Wisconsin Package) wurde dabei in Kauf genommen.

Um die Akkumulation von loxP Erkennungssequenzen im Genom von Mäusen mit konditionellen Nullallelen zu vermeiden, wurde das Flp/FRT System zur Entfernung des Neomycinresistenz-Markers aus dem *otx1Cre* Allel gewählt. Die Wahrscheinlichkeit interchromosomaler Cre-vermittelter Rekombination ist zwar sehr gering, konnte *in vivo* jedoch beobachtet werden (Übersicht in Testa und Stewart, 2000). Der Versuch, das FRT-flankierte Neomycin-Resistenzgen durch transiente Expression der Flp-Rekombinase in ES Zellen *in vitro* aus dem *otx1Cre*-Lokus zu entfernen, führte nicht zum Erfolg. Grund dafür ist die im Vergleich zur Cre-Rekombinase deutlich geringere Effizienz von Flp bei 37°C: Flp hat als Enzym aus *S. cerevisiae* ein katalytisches Optimum bei etwa 30°C (Dymecki, 1996a). Ein erfolgreicher Einsatz von Flp in Säugerzellen wurde zwar beschrieben, hängt aber offensichtlich stark vom genomischen Lokus und der Sequenz des Zielgens ab (Dymecki und Tomaszewicz, 1998; Nagy et al., 1998). Erst der Einsatz des FLPe-Deleter Transgens, das ein mit gentechnischen Methoden optimiertes Flp-Derivat ubiquitär exprimiert, erlaubte die Entfernung des Neomycin-Resistenzgens aus dem *otx1Cre* Lokus *in vivo*. Diese optimierte Variante von Flp erweitert die Einsatzmöglichkeiten der Rekombinase erheblich und stellt Flp als Werkzeug für die Mausgenetik auf die gleiche Stufe mit der schon länger etablierten Cre-Rekombinase (Farley et al., 2000; Rodriguez et al., 2000).

Die Analyse des *otx1Cre^{neo}* Stammes, bei dem die Neomycin-Resistenzkassette noch nicht entfernt werden war, mit einem Reporterallel zeigte ubiquitäre Reporteraktivität im gesamten Embryo an Tag E10,5. Diese Beobachtung läßt sich entweder auf ubiquitäre Expression von Cre in diesem Embryonalstadium, oder aber auf eine Expression der Rekombinase in einem sehr frühen Stadium zurückführen. Letzteres ist

dadurch zu erklären, daß eine kurzzeitige Expression von Cre in einer Zelle ausreicht, um ein loxP-flankiertes Gen in dieser Zelle und in all ihren Nachkommen permanent zu deletieren. Würde Cre also bereits in der befruchteten Eizelle exprimiert, so wäre das loxP-flankierte Zielgen später im gesamten Embryo deletiert.

Nach Entfernung des Neomycin-Resistenzgens aus dem *otx1Cre* Locus konnte eine weitgehend spezifische Aktivität des *otx1Cre*-Allels beobachtet werden. Analysen mit dem Z/AP Reporterallel zeigen an Tag E10,5 Rekombination im dorsalen Telencephalon, Diencephalon und Mesencephalon sowie ventralem Diencephalon. Ektopische Cre-Aktivität wurde im cranialen Ektoderm, im Herzen sowie im kaudalen Ektoderm und Mesoderm beobachtet (Abb 3.10, 3.11).

Etwa 25% aller *otx1Cre*//Z/AP Embryonen zeigen eine unerwartete ubiquitäre Reporteraktivität. Aus der Literatur liegen ähnliche Befunde für ein anderes ZNS-spezifisches Cre-Transgen vor. Der *Foxg1-Cre* Stamm wurde ebenfalls mit der *knock-in* Technik erzeugt. *Foxg1-Cre* ist im Telencephalon aktiv, zeigt aber ebenfalls, in Abhängigkeit vom genetischem Hintergrund und Reporterallel, in einem geringen Prozentsatz von Embryonen weitflächige bzw. ubiquitäre Rekombination (Hebert und McConnell, 2000). Der genetische Hintergrund bzw. genetische Modifikatoren könnten auch beim *otx1Cre*-Allel eine Rolle spielen, da das Transgen mit 129/Sv R1 ES Zellen etabliert wurde und nun auf C57Bl/6 Hintergrund propagiert wird. Eine Inzidenz von etwa 25% ubiquitärer Expression könnte auf das Vorliegen eines Modifikatoralles deuten. Interessanterweise ist kürzlich ein weiteres *knock-in* *otx1Cre*-Allel publiziert worden, das ebenfalls ubiquitäre Cre-Aktivität in einem bestimmten Prozentsatz der Nachkommen zeigt (Puelles et al., 2003). Die Autoren geben an, daß dies auf die Expression von Cre in der Eizelle zurückzuführen sei, wenn das *otx1Cre* Allel über die weibliche Keimbahn vererbt wird. Für das hier beschriebene *otx1Cre* Allel konnte die Vererbung der ubiquitären Rekombination ausschließlich in der mütterlichen Linie allerdings nicht bestätigt werden, da auch Nachkommen eines männlichen Vererbers des *otx1Cre* Allels ubiquitäre Rekombination zeigen können.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das *otx1Cre* Transgen trotz der nachgewiesenen ektopischen Cre-Aktivität ein brauchbares Werkzeug bei der Analyse ZNS-spezifischer Genfunktionen sein kann. Die ektopische Expression von Cre im Schwanzbereich betrifft keine vitalen Organe, die im Herzen beobachtete Cre-Aktivität ist schwach und

dispergent, und die in einem bestimmten Prozentsatz aller Embryonen beobachtete ubiquitäre Cre-Aktivität würde in einer Nullmutante des jeweiligen konditionellen Allels resultieren, die sich in den meisten Fällen wohl sicher von einem ZNS-spezifischen Nullallel unterscheiden ließe.