

**Gesellschaft für
Versuchstierkunde**

Society for Laboratory
Animal Science

GV-SOLAS

Ausschuss für Genetik und Labortierzucht

Beschleunigte Rückkreuzung – „Speed“-kongene Stämme

1	Einleitung	- 2 -
2	Konventionelle Zucht kongener Stämme	- 2 -
3	„Speed“-kongene Stämme	- 6 -
3.1	Markerauswahl	- 8 -
3.2	Markerdichte.....	- 8 -
3.3	Geschlechtschromosomen	- 8 -
3.4	Anzahl der zu testenden Tiere pro Generation.....	- 9 -
3.5	Anzahl der Rückkreuzungsgenerationen.....	- 11 -
4	Praktische Probleme bei der Herstellung „Speed“-kongener Stämme	- 11 -
4.1	Marker sind nicht informativ für die ausgewählten Stämme	- 11 -
4.2	Die informativen Marker sind nicht gleichmäßig im Genom verteilt	- 11 -
4.3	Niedrige Reproduktionsleistung der Tiere	- 12 -
5	Zusammenfassung.....	- 13 -
6	Internetadressen für polymorphe genetische Marker.....	- 13 -
6.1	Maus.....	- 13 -
6.2	Ratte.....	- 14 -
7	Literatur.....	- 14 -
8	Autoren	- 16 -

1 Einleitung

Als *kongen* werden Organismen bezeichnet, die genetisch einander sehr ähnlich sind und sich nur in einem kleinen Teil des Genoms voneinander unterscheiden, im Extremfall nur durch eine einzige Genvariante, einem Allel. Die Etablierung von Tiermodellen mit diesen Eigenschaften bildet die Grundlage zur Untersuchung der Wirkung einzelner Allele auf unterschiedlichen genetischen Hintergründen.

Das ist insofern von großer Bedeutung als die Wirkung eines Gens nicht nur von seiner Variante – dem Allel – abhängt, sondern auch von vielen anderen Genen des Organismus und deren Allelen. Gene, die auf die Ausprägung anderer Gene Einfluss nehmen können, werden auch als modifizierende Gene (engl.: modifier genes) bezeichnet. Ihre Identität und Anzahl im genetischen Hintergrund sind weitestgehend unbekannt und variiert im Einzelfall wahrscheinlich beträchtlich.

Der tierexperimentellen Forschung stehen eine Vielzahl von Inzuchtstämmen der Labornager zur Verfügung, deren genetischer Hintergrund standardisiert und definiert ist, um die Wirkung der Allele eines Gens in unterschiedlichen Genomen analysieren zu können.

Die ersten kongenen Stämme bei Labormäusen wurden um 1920 von Snell entwickelt, um Abstoßungsreaktionen bei Tumortransplantationen besser verstehen zu können (Silver, 1995).

Kongene Inzuchtstämmen der Ratten entstanden hauptsächlich in den 70 und 80er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts in Prag, Cambridge, Hannover und Göttingen, um die Funktion und Struktur der Transplantationsantigene (MHC) zu erforschen (Hedrich, 2000).

Die Entwicklung eines kongenen Inzuchtstammes dauert in der klassischen Form mehrere Jahre. Die Erfolge der Genomforschung in den vergangenen Jahrzehnten haben es jedoch ermöglicht, die Entwicklung dieser Modelle mit Hilfe molekulargenetischer Methoden zu beschleunigen und zu optimieren. Im vorliegenden Heft wird diese Optimierungsstrategie erläutert.

2 Konventionelle Zucht kongener Stämme

Die Zucht eines kongenen Stamms erfolgt durch die Rückkreuzung eines interessierenden Allels vom Donorstamm auf den Rezipientenstamm (Abb. 1). Prinzipiell können auch mehrere interessierende Allele gleichzeitig zurückgekreuzt werden. Als Rezipientenstamm wird in der Regel ein Inzuchtstamm verwendet. Stammbäume der Inzuchtstämmen sind für Maus (Beck et al. 2000, Petkov et al. 2004) und Ratte (STAR Consortium 2008, Canzian, 1997) publiziert. Die Rückkreuzungsgenerationen werden mit F1, N2, N3, etc. benannt. In jeder Generation erfolgt eine Selektion auf das Vorhandensein des interessierenden Allels. Die Genotypisierung erfolgt üblicherweise mittels einer PCR-Reaktion auf genetischer Ebene, so dass auch bei rezessiven Allelen keine Notwendigkeit zum Einschalten von Zwischenkreuzungen zwischen die Rückkreuzungsschritte besteht.

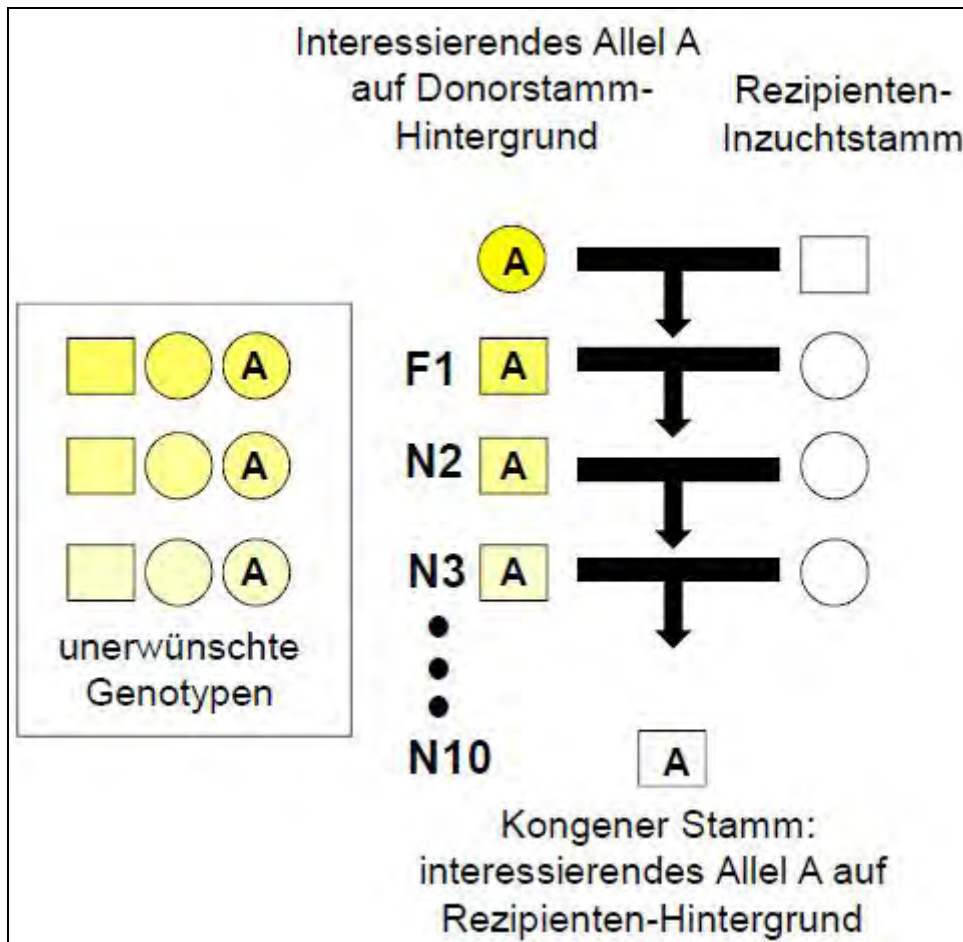


Abbildung 1. Schema zur Zucht eines kongenen Stamms durch Rückkreuzung eines interessierenden Allels „A“ vom Donorstamm auf den Rezipientenstamm. Männliche Tiere sind durch Quadrate, weibliche durch Kreise charakterisiert. Initial wird ein weibliches Trägartier des interessierenden Allels „A“ mit einem Männchen des Rezipienten-Inzuchtstamms angepaart. Alle männlichen Nachkommen dieser Kreuzung tragen das Y-Chromosom des Rezipientenstamms. In allen folgenden Generationen werden männliche Trägartiere des Allels „A“ selektiert und mit Weibchen des Rezipientenstamms gepaart. So wird in der N2-Generation das X-Chromosom sowie die mitochondriale DNA des Rezipientenstamms im Genom des kongenen Stamms verankert.

Bei der konventionellen Zucht kongener Stämme werden 10 Rückkreuzungen (F1, N2 – N10) des Donorstamms auf den Rezipientenstamm durchgeführt. Bei einer Generationsdauer der Maus von 10 - 14 Wochen beträgt der Zeitaufwand für die Zucht eines konventionellen kongenen Stamms 2 - 3 Jahre und kann somit die Beantwortung spezifischer wissenschaftlicher Fragestellungen signifikant verzögern.

Durch den Einsatz reproduktionstechnischer Maßnahmen wie hormonelle Ovulationsauslösung (Superovulation) junger Tiere bzw. Verwendung von Spermiovorläuferzellen kann der Zeitaufwand zur Zucht eines kongenen Stamms verkürzt werden (Behringer 1998, Ogonuki et al. 2009, Landa et al. 2010). Ein kongener Stamm kann entweder durch Anpaarung homozygoter Trägartiere weitergeführt werden oder durch Anpaarung heterozygoter bzw. hemizygoter Trägartiere mit Wildtypieren (Silver 1995).

Während des Rückkreuzungsprozesses werden die Donorstammanteile sukzessive durch Rezipientenstammanteile verdrängt. Bei der Kalkulation der Kontamination eines kongenen Stamms durch Donorstammanteile wird zwischen dem Genomanteil, der mit dem selektierten Genort chromosomal gekoppelt ist, und dem ohne Kopplung unterschieden (Abb. 2). Beim Genomanteil ohne Kopplung zum selektierten Genort nimmt die Kontamination durch Donorstammanteile bei jeder Rückkreuzungsgeneration „n“ theoretisch um 50 % ab. Der Anteil unerwünschter Donorstammallele am diploiden Genom des kongenen Stamms (Anteil von Donorstammallelen an der Gesamtallelanzahl) kann mit der Formel $0,5^n$ berechnet werden. Für $n = 10$ ergibt sich dafür ein Wert von 0,001 (= 0,1 %). Die Kontamination eines kongenen Stamms durch Donorstammanteile kann auch auf das haploide Genom bezogen werden und bezeichnet dann den Anteil heterozygoter (1 Donorstammallel sowie 1 Rezipientenstammallel) ungekoppelter Loci am Genom des kongenen Stamms. Diese Kontamination wird mit der Formel $0,5^{n-1}$ berechnet; für $n = 10$ ergibt sich dafür ein Wert von 0,002 (= 0,2 %). Bei der weiteren Zucht des kongenen Stamms durch Inzucht werden bei der Hälfte der heterozygoten Loci Rezipientenstammallele fixiert. In der Praxis kann die Kontamination der nicht gekoppelten Loci eines kongenen Stamms durch unbeabsichtigte und/oder verfahrenstechnisch immanente Selektion bei der Zucht größer sein als rechnerisch vorhergesagt (Berry und Cutler Linder 2007). Der Wert kann durch zusätzliche Rückkreuzungsgenerationen weiter reduziert werden (Abb. 2). Um eine Beeinflussung des Phänotyps kongener Stämme durch nicht gekoppelte Donorstammanteile auszuschließen, wurde angeraten, für das ausgewählte interessierende Allel mehrere unabhängige kongene Stämme mit demselben Rezipientenstamm zu erzeugen (Armstrong et al. 2006).

Wesentlich schwerwiegender ist die Kontamination des kongenen Stammes mit Donorstammanteilen, die mit dem selektierten Genort gekoppelt sind (Abb. 2). Beim Rückkreuzungsprozess wird nicht nur das interessierende Allel vom Donorstamm auf den Rezipientenstamm übertragen, sondern ein chromosomales Fragment von beträchtlicher Größe. Das übertragene Fragment wird auch als „congenic interval“ oder „differential chromosomal interval“ bezeichnet. Die Größe des Chromosomenfragments (in cM, Definition siehe Abb. 2), das zusammen mit dem selektierten Allel auf den Rezipientenstamm übertragen wird, kann ab der 5. Rückkreuzungsgeneration mit Hilfe der Formel $200 / n$ berechnet werden. Für die 10. Rückkreuzungsgeneration (N10) ergibt sich eine Fragmentgröße von ca. 20 cM. Bei einer Gesamtgröße des haploiden Mausgenoms von mehr als 1500 cM entspricht dies etwa 1,3 % des Genoms der Maus. Bei Fortführung des kongenen Stamms durch Inzucht wird das Donorstammfragment, das mit dem interessierenden Allel gekoppelt ist, auf beiden Autosomen fixiert. Wird der kongene Stamm jedoch durch Rückkreuzung (Kreuzung hetero- oder hemizygoter Trägartiere mit Wildtyptieren) weiter propagiert, so trägt nur ein Autosom das mit dem interessierenden Allel gekoppelte Donorstammfragment, d.h. die Kontamination beträgt nur 0,66 % des diploiden Genoms.

Kontaminationen eines kongenen Stamms durch Restanteile des Donorstamms können den Phänotyp entscheidend beeinflussen (Silver 1995, Lusi et al. 2007). Wegen der Fragmentgröße und einer möglichen Wirkung benachbarter Genorte in

denselben Funktionsabläufen z.B. bei Multigenfamilien (<http://www.ensembl.org/index.html>) ist die Beeinflussung in erster Linie durch die kontaminierenden Donorstammanteile zu erwarten, die eine Kopplung zum selektierten Genort aufweisen (Abb. 2).

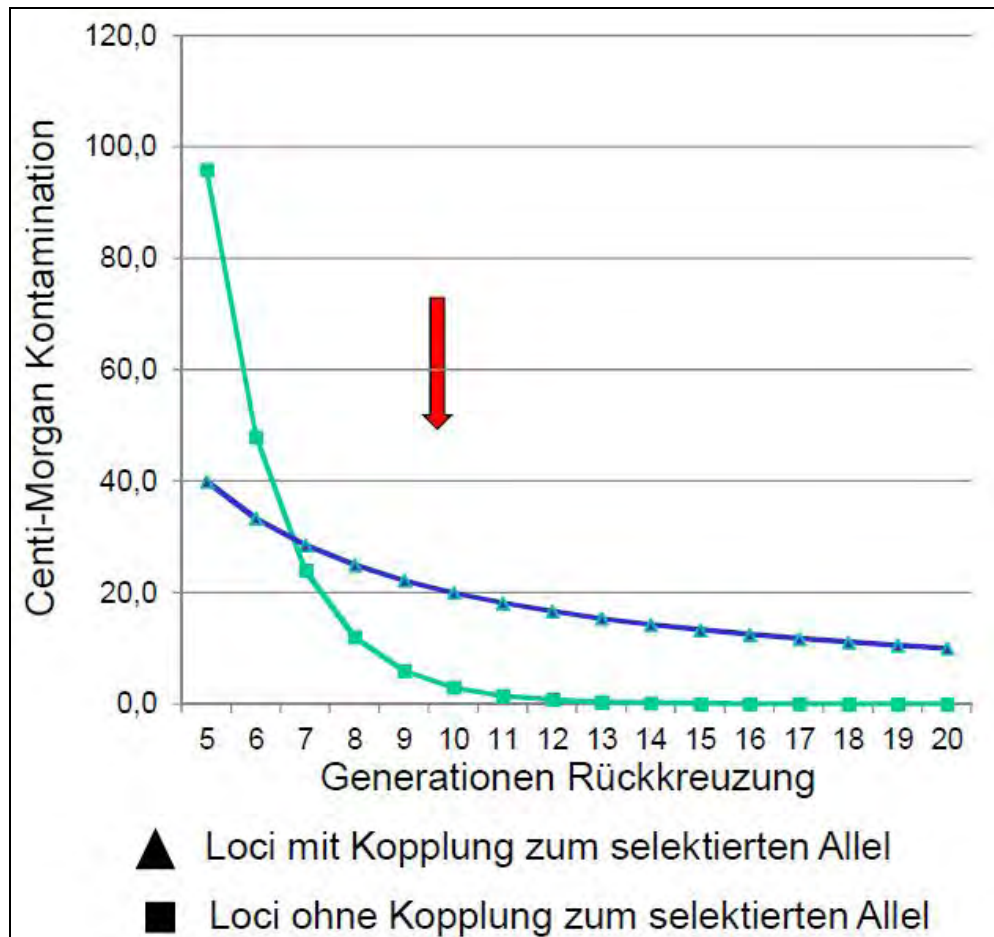


Abbildung 2. Kontamination eines kongenen Stamms durch Donorstammanteile. Dargestellt ist die Kontamination in Centi-Morgan (cM) durch gekoppelte (Dreiecke) sowie ungekoppelte (Quadrate) Donorstammanteile von Generation N5 bis N20. In der N10-Generation (roter Pfeil) beträgt die Kontamination durch gekoppelte Donorstammanteile 20 cM, dies entspricht etwa 1,3 % des haploiden Genoms. Die Kontamination durch ungekoppelte Donorstammanteile beträgt in der Generation N10 etwa 0,2 % des haploiden Genoms, entsprechend etwa 3 cM. Die Abbildung zeigt deutlich, dass die Kontamination eines kongenen Stamms in erster Linie durch die gekoppelten Donorstammanteile verursacht wird. Die Abbildung wurde freundlicherweise von der Universität Mainz zur Verfügung gestellt. [Centi-Morgan ist die genetische Maßeinheit für die Rekombinationsfrequenz zwischen zwei Loci. Ein Abstand von 1 cM liegt zwischen zwei Loci vor, wenn in 100 Meiosen 1 Crossing-over-Ereignis stattfindet. 1 cM entspricht bei Maus und Ratte etwa 2 Mega-Basenpaaren (Mb). Das haploide Genom von Maus und Ratte ist ca. 3000 Mb lang.]

Die Nomenklatur kongener Stämme umfasst die Bezeichnungen des Rezipienten- und des Donorstamms sowie das selektierte Allel. Die aktuellen

Nomenklaturempfehlungen können im Internet eingesehen werden (<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/index.shtml>).

3 „Speed“-kongene Stämme

Geschwindigkeit und Effizienz der Herstellung eines kongenen Stammes können durch die Verwendung eines Marker-assistierte Selektionsprotokolls (MASP, „marker assisted selection protocol“) deutlich gesteigert werden. Hierbei beschränkt sich die Selektion geeigneter Zuchttiere nicht nur auf das Vorhandensein des interessierenden Allels, sondern es erfolgt eine zusätzliche Selektion zur Maximierung von Rezipientenstammanteilen.

Die zur Selektion der optimalen Zuchttiere notwendige Charakterisierung der Nachkommen basiert auf der genomweiten Analyse genetischer Marker, die Polymorphismen zwischen den für die Zucht des kongenen Stamms verwendeten Ausgangsstämmen aufweisen. Hierzu werden Mikrosatelliten (STR, „short tandem repeats“, „MIT-Marker“) oder SNPs („single nucleotide polymorphisms“) verwendet. Mikrosatelliten bestehen aus der direkt aufeinanderfolgenden Wiederholung von Grundmotiven aus zwei, drei oder vier Nukleotiden und bilden Allele unterschiedlicher Länge aus, die nach Amplifikation mittels PCR als Fragmentlängenpolymorphismen (SSLP, „simple sequence length polymorphisms“) identifiziert werden können. SNPs sind Polymorphismen einer einzelnen Base an einem definierten Locus, die mit Hilfe mehrerer Methoden wie RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) oder Sequenzierung der entsprechenden PCR-Produkte, oder allelspezifische PCR identifiziert werden können. Im Unterschied zu Mikrosatelliten sind SNPs in der Regel dimorph, d.h. es existieren für einen spezifischen SNP nur zwei Allele.

Das Genom von Tieren der F1-Generation (= F1-Hybride bei Verwendung von Inzuchtstämmen für Donor- und Rezipientenstamm) besteht jeweils zur Hälfte aus Anteilen von Donor- und Rezipientenstamm. In der Regel wird unabhängig sowohl vom Grad der Homozygotie in Donor- und Rezipientenstamm als auch vom Grad der genetischen Übereinstimmung zwischen Donor- und Rezipientenstamm mit der Selektion in der N2-Generation begonnen.

Ein MASP wird häufig allein dazu eingesetzt, den Rezipientenstammanteil an den Loci ohne Kopplung zum selektierten Allel zu maximieren. Für diese Rezipientenstammanteile kann in der Praxis ein Wert von ca. 99,9 % bereits nach 5 - 7 Rückkreuzungsgenerationen erreicht werden (Tabelle 1). Der größte Zuchtfortschritt wird dabei in den ersten Rückkreuzungsgenerationen erzielt. Der Zeitaufwand zur Erzeugung eines kongenen Stammes durch beschleunigte Rückkreuzung beträgt bei der Maus damit i.d.R. ca. 1,5 Jahre (Markel et al. 1997, Wakeland et al. 1997, Weil et al. 1997, Visscher 1999, Wong 2002, Armstrong et al. 2006). Der Einsatz reproduktionstechnischer Maßnahmen kann den Zeitaufwand noch weiter verkürzen (z.B. Ogonuki et al. 2009).

Rückkreuzungs- Generation	Rezipientenstammanteil (%)	
	ohne MASP	mit MASP
N1 (=F1)	50,0	50,0
N2	75,0	80,8
N3	87,5	94,0
N4	93,8	99,0
N5	96,9	99,9
N6	98,4	
N7	99,2	
N8	99,6	
N9	99,8	
N10	99,9	

Tabelle 1. Einfluss eines MASP auf den Anteil des Rezipientenstamms am diploiden Genom eines kongenen Stamms, der keine Kopplung zum selektierten Allel aufweist. Die Werte ohne MASP entsprechen den theoretischen Durchschnittswerten in der Population und können mit der Formel $1-0,5^n$ berechnet werden. Die Werte mit MASP wurden für die Untersuchung von 20 männlichen Trägartieren pro Generation errechnet und experimentell verifiziert (Markel et al. 1997).

Ein MASP kann und sollte auch dazu genutzt werden, um die erhebliche Kontamination der chromosomalen Anteile zu minimieren, die mit dem selektierten Allel gekoppelt sind (Abb. 2). Ohne Verwendung eines MASP für diese Genomanteile kann die Länge (in cM) des mit dem selektierten Allel gekoppelten Donorgenomintervalls auch in diesem Fall ab der Rückkreuzungsgeneration N5 mit der Formel $200 / n$ geschätzt werden. Um das gekoppelte Donorgenom erheblich zu vermindern, ist die Untersuchung einer großen Tierzahl mit den entsprechenden genetischen Markern notwendig. Diese Untersuchung kann in die beschleunigte Rückkreuzung integriert werden oder im Anschluss an die Erstellung des kongenen Stammes erfolgen. Für kongene Stämme mit einer Donorstammkontamination von 20 cM um das selektierte Allel wurde geschätzt, dass die gekoppelte Donorstammkontamination in zwei weiteren Zuchtschritten auf 5 cM verringert werden kann, wenn in jeder Generation 50 Merkmalsträger in den Selektionsprozess zur Minimierung der Donorstammkontamination einer Seite des kongenen Intervalls eingesetzt werden (Silver 1995).

Zur Durchführung der beschleunigten Rückkreuzung sind neben einem geeigneten Protokoll zur Testung auf das zu übertragende Allel im Hinblick auf die Kosten-Nutzen-Abwägung vor allem die Markerauswahl, die Markerdichte, die Differenzierung zwischen Heterosomen (Geschlechtschromosomen) und Autosomen, die Anzahl der für die Selektion erforderlichen Tiere sowie die Anzahl an Rückkreuzungsgenerationen zu berücksichtigen.

3.1 Markerauswahl

Die polymorphen Marker werden so gewählt, dass sie das gesamte Genom in der Regel außer die Geschlechtschromosomen (siehe 3.3) gleichmäßig abdecken. Zur Identifizierung der Crossing-over-Ereignisse während der Meiose sind pro Chromosom mehrere polymorphe Marker zu untersuchen, zu deren Auswahl für Maus und Ratte mehrere Datenbanken zur Verfügung stehen (siehe Internetadressen) und Markersets für eine Vielzahl von Inzuchtstämmen publiziert sind (Maus: z.B. Schalkwyk et al. 1999, Witmer et al. 2003, Szatkiewicz et al. 2008, Cox et al. 2009; Ratte: z.B. Bryda und Riley 2008, STAR Consortium 2008). Daneben bieten kommerzielle Dienstleister Tests mit etablierten Markersets als auch die individuelle Zusammenstellung und Testung von Markersets an.

3.2 Markerdichte

In Bezug auf die Markerdichte gilt ein Abstand von weniger als 20 cM als empfehlenswert. Bei einer Gesamtgenomgröße der Maus von mehr als 1500 cM entspricht das einem Markerset von mindestens 80 gleichmäßig über das Genom verteilten Loci. Eine Computersimulation hat aufgezeigt, dass bei Markerabständen von 10 cM und 25 cM die Wahrscheinlichkeit des Auftretens doppelter Crossing-over-Ereignisse und damit von Kontaminationen durch Donor-DNA vergleichbar gering ist (Wakeland et al. 1997). Allerdings beschrieb eine andere Arbeitsgruppe eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen unerkannter Donorgenomanteile und rät zu einer Markerdichte von 10 cM (Armstrong et al. 2006).

Während der Rückkreuzung werden sukzessiv Genomanteile des Rezipientenstamms fixiert. Die fixierten Anteile brauchen in den Folgegenerationen prinzipiell nicht mehr mit Markern getestet werden. Daher kann von Generation zu Generation entschieden werden, ob die Markeranzahl reduziert wird und damit Kosten eingespart werden oder ob eventuell zusätzlich weitere Marker untersucht werden (z.B. zur Reduktion der gekoppelten Donorstammkontamination). Am Ende des Rückkreuzungsprojekts ist eine genomweite genotypische Endkontrolle des erstellten „Speed“-kongenen Stammes empfehlenswert.

3.3 Geschlechtschromosomen

Sofern sich das interessierende Allel auf einem Autosom befindet, werden die Geschlechtschromosomen des Rezipientenstamms bei Verwendung des in Abbildung 1 aufgezeigten Zuchtschemas in der F1- und N2-Generation fixiert. Die Verwendung spezifischer Marker für Geschlechtschromosomen ist in diesem Fall nicht erforderlich.

Liegt das interessierende Allel auf dem Y-Chromosom, müssen auch in der ersten Kreuzungsgeneration männliche Trägartiere verwendet werden. Das X-Chromosom des Rezipientenstamms wird bereits in der F1-Generation fixiert. Somit ist die Verwendung spezifischer Marker für Geschlechtschromosomen auch in diesem Fall nicht erforderlich. Eine Besonderheit der Lage des interessierenden Allels auf dem Y-Chromosoms ist, dass die Selektion auf das Allel vollständig entfallen kann, da in

allen Generationen alle männlichen Nachkommen Trägertiere des interessierenden Allels sind. Das Y-Chromosom des kongenen Stammes besteht vollständig aus Donorstammgenom.

Liegt das interessierende Allel auf dem X-Chromosom, ist anzuraten, dass in allen Rückkreuzungsgenerationen weibliche Trägertiere des interessierenden Allels verwendet werden. Nur so ist gewährleistet, dass das X-Chromosom in jeder Generation die Möglichkeit zur Rekombination hat und so die Größe des auf den kongenen Stamm übertragenen gekoppelten Donorstammanteils möglichst stark reduziert werden kann. Hier empfiehlt sich die Verwendung spezifischer Marker für das X-Chromosom.

3.4 Anzahl der zu testenden Tiere pro Generation

Da der Genomanteil des Rezipientenstamms unter den Nachkommen eine Streuung aufzeigt, die einer Normalverteilung um den theoretischen Durchschnittswert entspricht, steigt mit der Anzahl der getesteten Tiere die Wahrscheinlichkeit, ein Individuum mit relativ hohem Genomanteil des Rezipientenstamms zu finden. Üblicherweise werden pro Generation ca. 10 - 20 Merkmalsträger mittels MASP untersucht und es werden diejenigen 2 - 4 Tiere zur weiteren Rückkreuzung ausgewählt, die den höchsten Anteil an Rezipienten-DNA zeigen (Abb. 3). Die Untersuchung von Tierzahlen von mehr als 30 - 50 bringt keine nennenswerten Vorteile (Markel et al. 1997). In der Regel werden männliche Merkmalsträger verwendet, um durch Anpaarung an mehrere weibliche Tiere des Rezipientenstamms eine hohe Anzahl an Nachkommen erzeugen zu können (Abb. 1). Auswahl und Verpaarung von mehr als einem Merkmalsträger dienen der Vorbeugung potenzieller Fertilitätsprobleme.

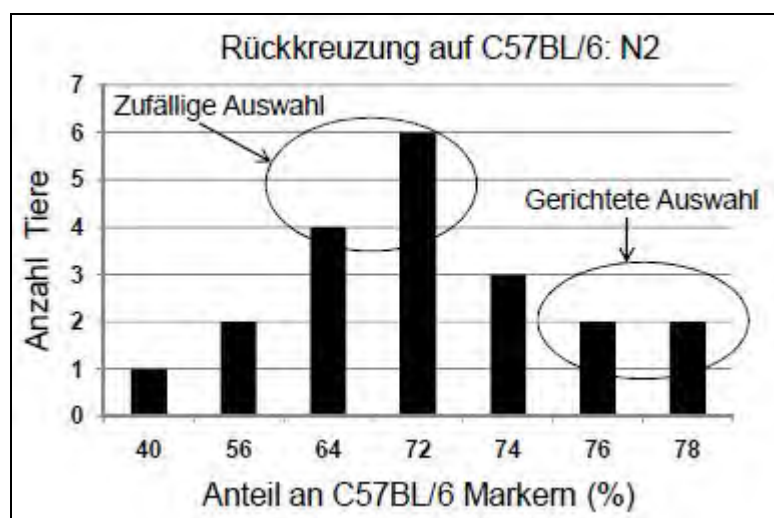


Abbildung 3. Beispiel einer Rückkreuzung auf den C57BL/6-Inzuchtstamm, Rückkreuzungsgeneration N2. Es wurden insgesamt 20 N2-Tiere mittels MASP untersucht. Dargestellt ist die Anzahl an Tieren nach ihren verschiedenen Rezipientenstammanteilen. Der

Rezipientenstammanteil wurde auf das diploide Genom der Tiere bezogen und errechnet sich theoretisch mit der Formel $1-0,5^n$ (n = Rückkreuzungsgeneration). Für die N2-Generation beträgt der theoretische Wert 75 %. Die Abbildung zeigt, dass der Rezipientenstammanteil einer Normalverteilung um den theoretischen Durchschnittswert folgt. Bei zufälliger Auswahl der Zuchttiere für die nächste Rückkreuzungsgeneration ist die Wahrscheinlichkeit am größten, ein Individuum mit durchschnittlichem Genomanteil des Rezipientenstamms auszuwählen. Durch gerichtete Auswahl mittels MASP können gezielt diejenigen Tiere selektiert werden, die die höchsten Rezipientenstammanteile aufweisen.

Zur Auswahl der optimalen Tiere für die Zucht der nächsten Rückkreuzungsgeneration kann die größte Anzahl an vollständigen Rezipientenchromosomen oder der höchste Gesamtanteil an Rezipientengenom berücksichtigt werden. Simulationsmodelle zeigen für beide Fälle einen ähnlichen Erfolgsfortschritt der Rückkreuzung (Weil et al. 1997). Tabelle 2 zeigt eine nach dem letztgenannten Kriterium durchgeführte Selektion. Daneben sind ggf. gekoppelte Loci des kongenen Intervalls und/oder projektspezifische, nicht gekoppelte Loci zu beurteilen.

Marker-Bezeichnung	chromosomale Position (cM)	N2-1	N2-2	N2-3	N2-4	N2-5	N2-6	N2-7	N2-8	N2-9	N2-10
Chr1-1	10	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0	1,0	0,5
Chr1-2	21	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	0,5
Chr1-3	37	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5
Chr1-4	47	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
Chr1-5	54	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
Chr1-6	67	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
Chr1-7	94	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
Chr1-8	108	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0
↕											
Chr19-1	15	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	0,5
Chr19-2	34	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	0,5
Chr19-3	47	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Chr19-4	52	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	0,5	1,0
Chr19-5	56	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0
C57BL/6 Anteil (%)		71,6	82,7	70,9	77,3	75,0	78,4	77,3	71,8	84,1	79,8
Mittelwert der C57BL/6 Anteile (%)		76,9									

Tabelle 2. Ausschnitt (nur für die Chromosomen 1 und 19) der Auswertung eines MASP. Die Rückkreuzung erfolgte auf den Inzuchtstamm C57BL/6. Dargestellt sind die MASP-Ergebnisse von 10 getesteten Tieren (N2-1 bis N2-10) der Rückkreuzungsgeneration N2 für 8 Marker auf Chromosom 1 (Chr1-1 bis Chr1-8, grau unterlegt) und 5 Marker auf Chromosom 19 (Chr19-1 bis Chr19-5, blau unterlegt). Die Werte der Chromosomen 2 bis 18 (Doppelpfeil) sind nicht dargestellt. Für jedes Tier und jeden Marker wird der Rezipientenstammanteil des diploiden Genoms angegeben. Ein gewünschter homozygoter Genotyp (2× Rezipientenstammallel) wird durch die Zahl 1,0 und ein heterozygoter Genotyp (Donorstammallel + Rezipientenstammallel) durch die Zahl 0,5 dargestellt. Der experimentell ermittelte Durchschnittswert des Rezipientenstammanteils am diploiden Genom liegt im vorliegenden Beispiel bei 76,9 % (rot unterlegt, theoretisch erwartet: 75 %). Individuum Nr. N2-9 zeigt den höchsten Anteil und liegt mit 84,1 % (gelb unterlegt) deutlich über dem Mittelwert.

3.5 Anzahl der Rückkreuzungsgenerationen

Ein „Speed“-kongener Stamm kann innerhalb von 5 – 6 Generationen mit einer Kontaminationsrate der nicht gekoppelten Genorte, die der von konventionellen kongenen Stämmen entspricht, erzeugt werden (Tab. 1). Dies stellt eine erhebliche Zeitersparnis dar. Für solche „Speed“-kongenen Stämme gehen Simulationsuntersuchungen der Arbeitsgruppe von Armstrong et al. (2006) jedoch von einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen unerkannter, nicht gekoppelter Donorgenomanteile aus. Deshalb empfiehlt diese Gruppe, bei „Speed“-kongenen Stämmen nach der Verwendung eines MASP noch 1 - 2 weitere Rückkreuzungsanpaarungen auf den Rezipientenstamm anzufügen. Sofern die gekoppelten Donorstammanteile nicht in das MASP mit einbezogen wurden, besitzen die Nachkommen früher Rückkreuzungsgenerationen „Speed“-kongener Tiere noch erhebliche Donorgenomanteile um das selektierte Allel. Der Anteil liegt in der N5-Nachkommengeneration bei ca. 40 cM.

4 Praktische Probleme bei der Herstellung „Speed“-kongener Stämme

4.1 Marker sind nicht informativ für die ausgewählten Stämme

Im Internet stehen Datenbanken zur Verfügung, die Informationen über polymorphe Marker von Inzuchtstämmen anbieten. Jedoch werden von Experimentatoren auch laborspezifische Substämme oder nicht gelistete Inzuchtstämmen verwendet. Dadurch sind oft nicht alle ausgewählten Marker informativ für die eigenen Untersuchungen. Abhilfe schafft der Test der Marker in den Ausgangsstämmen und der entsprechenden F1 Generation.

4.2 Die informativen Marker sind nicht gleichmäßig im Genom verteilt

Bei der Auswahl der Marker ist darauf zu achten, dass sie gleichmäßig über das Genom verteilt sind und der durchschnittliche Abstand zwischen den Markern auf dem Chromosom etwa 10 - 25 cM (siehe 3.2) beträgt. Insbesondere bei der Verwendung von Mikrosatelliten finden sich dafür in den Datenbanken nicht immer geeignete Marker.

Hier kann es hilfreich sein, informative Mikrosatelliten und SNPs für die Genotypisierung zu kombinieren. Alternativ ist mit Hilfe von Datenbanken im sequenzierten Genom von Maus oder Ratte nach Mikrosatelliten und SNPs zu suchen, für die noch keine Primer existieren, und die gegebenenfalls detektierten Marker für die gewählten Stämme selbst zu testen.

4.3 Niedrige Reproduktionsleistung der Tiere

Die Entwicklung eines „Speed“-kongenen Stammes unter Einsatz von MASP macht nur Sinn, wenn ausreichend viele Nachkommen für die Genotypisierung und für die Zucht zur Verfügung stehen. Dafür muss die Reproduktionsleistung der Kreuzungspartner ausreichend sein oder es müssen genug Zuchtpaare angesetzt werden, um genügend Nachkommen zu generieren.

Oftmals wirken sich der genetische Hintergrund, eine Mutation, Umweltfaktoren oder der Hygienestatus negativ auf die Reproduktionsleistung aus. Diese Faktoren können das Paarungsverhalten, die Wurfgröße und das Aufzuchtverhalten beeinträchtigen. Einen ersten Anhaltspunkt für die zu erwartende Reproduktionsleistung bietet der Kolonie-Index¹ der Ausgangsstämme. Ein weiteres Hindernis bei der Entwicklung kongener Stämme kann eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses oder eine Verschiebung der Genotypen in den Rückkreuzungspopulationen darstellen.

Beispiele:

-Das mutierte Gen *Dpp4^m* sollte von dem Inzuchtstamm F344-*Dpp4^m* in die Inzuchtstämme DA und LEW.Cg-*RT1^{av1}* eingekreuzt werden. Für beide Stammkombinationen (F344-*Dpp4^m* vs DA und F344-*Dpp4^m* vs LEW.Cg-*RT1^{av1}*) standen ausreichend genetische Marker zur Verfügung, um den genetischen Hintergrund der jeweiligen Rückkreuzungsgenerationen zu überprüfen. Während der kongene Stamm DA.F344-*Dpp4^m* in der N6 einen homogenen genetischen Hintergrund aufwies, war die Reproduktionsleistung der Kreuzung (F344-*Dpp4^m* × LEW.Cg-*RT1^{av1}*) × LEW.Cg-*RT1^{av1}* so gering, dass die Generation N3 nicht erreicht wurde. Daher wurde alternativ der kongene Inzuchtstamm DA.F344-*Dpp4^m* als Donorstamm eingesetzt, um die *Dpp4* Mutante in den Stamm LEW.Cg-*RT1^{av1}* einzukreuzen. In der N6 hatte der Stamm LEW.Cg (F344)-*RT1^{av1}* *Dpp4^m* einen homogenen genetischen Hintergrund.

-Der Versuch, das Transgen Il-18bp des Mausinzuchtstammes B6-Tg(Il-18bp) in den Stamm MRL-FasLpr einzukreuzen, scheiterte nach der Generation N6, weil mit zunehmender Rückkreuzungsgeneration die Mütter ihre Würfe vollständig auffraßen.

-Für die Entwicklung des kongenen Inzuchtstammes MRL.Cg-Fas^{lpr} Il-18^{tm1Aki}/Ztm konnten 56 informative Mikrosatellitenmarker ermittelt werden. In jeder Generation wurden ca. 40 Nachkommen generiert, von denen die Hälfte heterozygot für das modifizierte Interleukin-18-Allel auf Chromosom 9 waren. Die Männchen mit dem größten Anteil des Rezipientengenoms wurden für weitere Verpaarungen verwendet. Erst in der 13. Rückkreuzungspopulation wurden keine heterozygoten Genorte mehr im genetischen Hintergrund des kongenen Stammes ermittelt. Ein anschließender Test unter Einsatz von 27 SNPs zeigte bei zwei Tieren jedoch immer noch einen heterozygoten Genort auf Chromosom 7.

¹ Der Kolonie-Index bezeichnet die mittlere Anzahl an Nachkommen pro Weibchen und Zeiteinheit.

5 Zusammenfassung

Zur konventionellen Generierung eines kongenen Stamms wird ein interessierendes Allel i.d.R. für 10 Generationen von einem Donorstamm-Hintergrund auf einen Rezipienten-Hintergrund zurückgekreuzt. Dabei erfolgt eine Selektion ausschließlich auf das Vorhandensein des interessierenden Allels. Bei „Speed“-kongenen Stämmen wird darüber hinaus in jeder Generation ab N2 ein Marker-assistiertes Selektionsprotokoll (MASP) zur Maximierung der Rezipientenstammanteile verwendet. Zur Erstellung von „Speed“-kongenen Tieren wird im Hinblick auf die Kosten-Nutzen-Abwägung üblicherweise ein genomweites Markerset mit einem mittleren Abstand der benachbarten Marker von 10 - 20 cM verwendet und pro Generation werden 10 - 20 männliche Merkmalsträger untersucht. Damit können schon nach 5 – 6 Kreuzungsgenerationen „Speed“-kongene Stämme generiert werden, deren Anteil an Donorstammgenom ohne Kopplung zum interessierenden Allel dem konventioneller kongener Stämme entspricht. Bei nachgewiesener Fixierung einzelner Genomanteile des Rezipientenstammes können in den nächsten Rückkreuzungsgenerationen zusätzliche Marker verwendet werden. Dringend anzuraten ist die Verwendung von weiteren Markern zur Reduktion des Donorstammgenoms, das das selektierte Allel flankiert. Zur Reduzierung des Restrisikos, dass nach der Erstellung eines „Speed“-kongenen Stamms mit Hilfe des verwendeten Markersets noch unerkannte Donorgenomanteile vorhanden sind, ist in Erwägung zu ziehen, noch 1 - 2 zusätzliche Rückkreuzungsanpaarungen auf den Rezipientenstamm durchzuführen. Daneben stellt die Zucht und anschließende phänotypische Untersuchung mehrerer unabhängiger kongener Stämme für ein ausgewähltes Allel in demselben Rezipienten-Inzuchtstamm eine mögliche Lösung für das Problem unerkannter Donorgenomanteile im kongenen Stamm dar.

6 Internetadressen für polymorphe genetische Marker

6.1 Maus

CIDR Center for Inherited Disease Research (<http://www.cidr.jhmi.edu>) u.a.

-„Mouse microsatellite resources“

(http://www.cidr.jhmi.edu/mouse/mouse_resources.html) mit Liste informativer Marker

(http://www.cidr.jhmi.edu/download/CIDR_mouse.xls) und

-„Mouse whole genome SNP genotyping: Linkage scans and congenic/consomic line construction“

(http://www.cidr.jhmi.edu/mouse/mouse_snp.html)

Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>)

The Jackson Laboratory (<http://www.jax.org/index.html>) u.a.

- “MGI Database” (<http://www.informatics.jax.org>):
- SNP query
(<http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=snpQF>)
- „RFLP/PCR polymorphism query“
(http://www.informatics.jax.org/searches/polymorphism_form.shtml)
- „MPD - Mouse Phenome Database, mit Verweisen auf SNP Datenbanken
(<http://phenome.jax.org/>)
- CGD - Center of Genome Dynamics (<http://cgd.jax.org/tools/tools.shtml>):
verschiedene Tools, u.a. „Mouse map converter“ für den Abgleich von
genetischer (cM) und physikalischer (bp) Kartierung.

NCBI National Center for Biotechnology Information: „Mouse genome view“
(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=10090)

6.2 Ratte

Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>)

RGD Rat Genome Database (<http://rgd.mcw.edu>)

The Wellcome Trust Centre for Human Genetics: Rat Mapping Resources
(http://www.well.ox.ac.uk/rat_mapping_resources)

7 Literatur

Armstrong NJ, Brodnicki TC, Speed TP (2006) Mind the gap: analysis of marker-assisted breeding strategies for inbred mouse strains. *Mamm Genome* 17, 273-287

Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MFW, Fisher EMC (2000) Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet* 24, 23-25

Behringer R (1998) Supersonic congenics? *Nat Genet* 18, 108

Berry ML, Cutler Linder C (2007) Breeding systems: considerations, genetic fundamentals, genetic background, and strain types. In *The mouse in biomedical research - v.1. History, wild mice, and genetics*. Edited by Fox JG, Barthold SW, Davisson MT, Newcomer CE, Quimby FW, Smith AL. Academic Press, Burlington, p. 53-78

Bryda EC, Riley LK (2008) Multiplex microsatellite marker panels for genetic monitoring of common rat strains. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 47, 37-41

Canzian F (1997) Phylogenetics of the laboratory rat *Rattus norvegicus*. *Genome Res* 7, 262-267

Cox A, Ackert-Bicknell CL, Dumont BL, Ding Y, Bell JT, Brockmann GA, Wergedal JE, Bult C, Paigen B, Flint J, Tsaih SW, Churchill GA, Broman KW (2009) A new standard genetic map for the laboratory mouse. *Genetics* 182, 1335-1344

Hedrich HJ (2000) *History, Strains and Models in The Laboratory Rat* Edited by Krinke GJ, Elsevier, London, p 3 - 16.

Landa V, Zidek V, Pravenec M (2010) Generation of rat "supersonic" congenic/conplastic strains using superovulation and embryo transfer. *Methods Mol Biol* 597, 267-275

Lusis AJ, Yu J, Wang SS (2007) The problem of passenger genes in transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2100-2103

Markel P, Shu P, Ebeling C, Carlson GA, Nagle DL, Smutko JS, Moore KJ (1997) Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nat Genet* 17, 280-284

Ogonuki N, Inoue K, Hirose M, Miura I, Mochida K, Sato T, Mise N, Mekada K, Yoshiki A, Abe K, Kurihara H, Wakana S, Ogura A (2009) A high-speed congenic strategy using first-wave male germ cells. *PLoS ONE* 4, e4943

Petkov PP, Ding Y, Cassell MA, Zhang W, Wagner G, Sargent EE, Asquith S, Crew V, Johnson KA, Robinson P, Scott VE, Wiles MV (2004) An efficient SNP system for mouse genome scanning and elucidating strain relationships. *Genome Res* 14, 1806-1811

Schalkwyk LC, Jung M, Daser A, Weiher M, Walter J, Himmelbauer H, Lehrach H (1999) Panel of microsatellite markers for whole-genome scans and radiation hybrid mapping and a mouse family tree. *Genome Res* 9, 878-887

Silver LM (1995) *Mouse genetics: concepts and applications*. Oxford University Press, New York, NY. <http://www.informatics.jax.org>

STAR Consortium (2008) SNP and haplotype mapping for genetic analysis in the rat. *Nat Genet* 40, 560-566

Szatkiewicz JP, Beane GL, Ding Y, Hutchins L, Pardo-Manuel de Villena F, Churchill GA (2008) An imputed genotype resource for the laboratory mouse. *Mamm Genome* 19, 199-208

Visscher PM (1999) Speed congenics: accelerated genome recovery using genetic markers. *Genet Res* 74, 81-85

Wakeland E, Morel L, Achey K, Yui M, Longmate J (1997). Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking). *Immunol Today* 18, 472-477

Weil MM, Brown BW, Serachitopol DM (1997) Genotype selection to rapidly breed congenic strains. *Genetics* 146, 1061-1069

Witmer PD, Doheny KF, Adams MK, Boehm CD, Dizon JS, Goldstein JL, Templeton TM, Wheaton AM, Dong PN, Pugh EW, Nussbaum RL, Hunter K, Kelmenson JA,

Rowe LB, Brownstein MJ (2003) The development of a highly informative mouse simple sequence length polymorphism (SSLP) marker set and construction of a mouse family tree using parsimony analysis. *Genome Res* 13, 485-491

Wong GT (2002) Speed congenics: applications for transgenic and knock-out mouse strains. *Neuropeptides* 36, 230-236

8 Autoren

Jutta Davidson, Dirk Wedekind, Kurt Reifenberg, Reinhart Kluge, Bernhard Aigner