



GV-SOLAS

Gesellschaft für Versuchstierkunde
Society for Laboratory Animal Science

Fachinformation

**aus dem Ausschuss für Genetik und
Labortierzucht**

Zucht von Doppelmutanten

Stand Januar 2009

verfasst von:

Kurt Reifenberg, Reinhart Kluge

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	3
2.	Kombination von zwei Differential-Allelen.....	3
2.1.	Ohne chromosomale Kopplung	3
2.2.	Mit chromosomaler Kopplung.....	4
3.	Schlussfolgerungen.....	6

1. Einleitung

Die vorliegende Publikation wurde vom Ausschuss für Genetik und Labortierzucht der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) erstellt und beschreibt geeignete Zuchtverfahren, um an distinkten Genorten lokalisierte Differential-Allele in neuen Tierstämmen zu kombinieren.

Der wissenschaftlichen Gemeinschaft steht bereits heute eine breite Vielfalt von Nagermodellen zur Verfügung, die homologe Rekombinationen spezifischer Gene oder spontane bzw. induzierte Mutationen (nachfolgend als Differential-Allele bezeichnet) tragen. Da anzunehmen ist, dass weiterhin in breitem Umfang neue Nagermutanten erzeugt werden, ist auch für die Zukunft mit einem starken Anstieg der verfügbaren kongenen oder koisogenen Maus- und Rattenstämme zu rechnen. Insbesondere die Erstellung konditionaler Modelle erfordert die züchterische Kombination spezifischer Differential-Allele in separaten Tierstämmen.

2. Kombination von zwei Differential-Allelen

Viele wissenschaftliche Fragestellungen erfordern die Kombination von zwei interessierenden Differential-Allelen in einem neuen Tierstamm. Für die nachfolgende Erläuterung des Zuchtverfahrens werden zwei hypothetische Genorte „*Locus1*“ bzw. „*Locus2*“ eingeführt, an denen die Gene *Gen1* bzw. *Gen2* lokalisiert sind. Das interessierende Differential-Allel von *Gen1* wird als *Gen1^{mut}* (mut = mutiert) bezeichnet, das korrespondierende Wildtyp-Allel wird *Gen1^{wt}* (wt = Wildtyp) genannt. Entsprechend werden die Differential-Allele von *Gen2* als *Gen2^{mut}* bzw. *Gen2^{wt}* bezeichnet. Es stehen zwei Parentalstämme zur Verfügung, die alternativ das Allel *Gen1^{mut}* bzw. das Allel *Gen2^{mut}* in homozygoter Form tragen. Auswahl und Effizienz des Zuchtverfahrens, das zur Kombination der Allele *Gen1^{mut}* und *Gen2^{mut}* in einem neuen Tierstamm anzuwenden ist, hängen davon ab, ob die betroffenen Genorte *Locus1* bzw. *Locus2* auf demselben Chromosom liegen (chromosomale Kopplung) oder auf unterschiedlichen Chromosomen positioniert sind (keine chromosomale Kopplung; freie Segregation).

In der „Mouse Genome Informatics“ (MGI) Datenbank (<http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=markerQF>) kann leicht eruiert werden, auf welchem Chromosom ein spezifischer muriner Genort lokalisiert ist.

2.1. Ohne chromosomale Kopplung

Bei fehlender chromosomaler Kopplung der hypothetischen Gene *Gen1* und *Gen2* kann ein einfaches Zuchtverfahren eingesetzt werden, bei dem ein „*Outcross*“ mit einem „*Intercross*“ kombiniert werden. Die Effizienz des Zuchtverfahrens ergibt sich in diesem Fall allein aus der zufälligen Allel-Segregation.

„Outcross“

Hierzu werden vorzugsweise homozygote¹ Trägartiere des Differential-Allels *Gen1^{mut}* (Genotyp: *Gen1^{mut/mut} Gen2^{wt/wt}*) mit vorzugsweise homozygoten Trägern des Differential-Allels *Gen2^{mut}* (Genotyp: *Gen1^{wt/wt} Gen2^{mut/mut}*) gekreuzt:

$$\text{Gen1}^{\text{mut/mut}} \text{Gen2}^{\text{wt/wt}} \times \text{Gen1}^{\text{wt/wt}} \text{Gen2}^{\text{mut/mut}}$$

Aus diesem *Outcross* resultieren ausschließlich heterozygote Tiere² des Genotyps *Gen1^{mut/wt} Gen2^{mut/wt}*.

„Intercross“

Die *Outcross*-Nachkommen des Genotyps *Gen1^{mut/wt} Gen2^{mut/wt}* werden nun miteinander verpaart:

$$\text{Gen1}^{\text{mut/wt}} \text{Gen2}^{\text{mut/wt}} \times \text{Gen1}^{\text{mut/wt}} \text{Gen2}^{\text{mut/wt}}$$

Es entstehen 9 unterschiedliche Genotypen, deren Häufigkeit sich aus den Mendelschen Gesetzen ergibt. Der zum Aufbau einer homozygoten Doppelmutanten-Züchterforderliche Genotyp *Gen1^{mut/mut} Gen2^{mut/mut}* muss durch eine Typisierung festgestellt werden; er wird mit einer Häufigkeit von 1/16 (= 6,25%) erwartet. Sollte der *Intercross* zu wenige Zuchttiere des gewünschten Genotyps *Gen1^{mut/mut} Gen2^{mut/mut}* erbringen, ist es ratsam, in einem Zwischenschritt auch die *Intercross*-Genotypen *Gen1^{mut/mut} Gen2^{mut/wt}* und *Gen1^{mut/wt} Gen2^{mut/mut}* zum Aufbau der homozygoten Doppelmutante heranzuziehen.

2.2. Mit chromosomaler Kopplung

Bei chromosomaler Kopplung (Syntenie) der hypothetischen Gene *Gen1* und *Gen2* kann ebenfalls das unter 2.1 beschriebene Zuchtverfahren herangezogen werden. Sollen syntenische Allele miteinander kombiniert werden, sind chromosomale Rekombinationsprozesse zum Aufbau einer Doppelmutantenzucht erforderlich. Da solche Prozesse von den Mendelschen Regeln nicht berücksichtigt werden, können die Erfolgsaussichten der zu verwendenden Zuchtschemata nicht aus der Mendelschen Genetik abgeleitet werden.

„Outcross“

Das *Outcross* erfolgt entsprechend den Angaben unter 2.1. Es resultieren heterozygote Tiere des Genotyps *Gen1^{mut/wt} Gen2^{mut/wt}*, bei denen die interessierenden Allele *Gen1^{mut}* und *Gen2^{mut}* auf den unterschiedlichen homologen Chromosomen positioniert sind (Abb. 1A).

¹ Sofern keine homozygoten Trägartiere verfügbar sind, können auch heterozygote Tiere eingesetzt werden. Für diese Fälle muss das Zucht-schema entsprechend angepasst werden.

² Bei Verwendung homozygoter Ausgangstiere entstehen beim *Outcross* ausschließlich heterozygote Tiere des gewünschten Genotyps, so dass eine Genotypisierung der Nachkommen entfallen kann. Bei Verwendung heterozygoter Ausgangstiere entstehen hingegen unterschiedliche Nachkommen-genotypen, die durch Typisierung diskriminiert werden müssen

„Intercross“

Auch bei Syntenie der hypothetischen Genorte *Locus1* und *Locus2* werden die *Outcross*-Nachkommen des Genotyps $Gen1^{mut/wt} Gen2^{mut/wt}$ anschließend in einem *Intercross* miteinander verpaart:

$Gen1^{mut/wt} Gen2^{mut/wt} \times Gen1^{mut/wt} Gen2^{mut/wt}$

In Abb. 1B sind für das interessierende Chromosom die haploiden Genotypen der *Intercross*-Keimzellen dargestellt. Ein Teil der Keimzellen enthält rekombinierte Chromosomen, die die Allele $Gen1^{mut}$ und $Gen2^{mut}$ kombiniert tragen (Abb. 1B, mit Pfeil markiertes Chromosom C). Daneben gehen aus der Meiose aber auch nicht-rekombinierte Chromosomen (Abb. 1B, Chromosomen A und B) sowie rekombinierte Chromosomen, die die Wildtyp-Allele $Gen1^{wt}$ und $Gen2^{wt}$ miteinander kombinieren (Abb. 1B, Chromosom D), hervor.

Abb. 1C zeigt die beim *Intercross* entstehenden möglichen diploiden Genotypen der Nachkommenschaft. Die mit Pfeilen markierten Genotypen (C, F, H und I) tragen das gewünschte rekombinierte Chromosom, das die Allele $Gen1^{mut}$ und $Gen2^{mut}$ verbindet. Bei Verwendung der üblicherweise eingesetzten, PCR-basierten, qualitativen Genotypisierungsprotokolle können dabei die mit schwarzen Pfeilen markierten Genotypen C, F und H am Fehlen der entsprechenden Wildtyp-Allele $Gen1^{wt}$ bzw. $Gen2^{wt}$ identifiziert werden. Im Gegensatz dazu kann der mit weißem Pfeil markierte rekombinante Genotyp I nicht sicher vom nicht-rekombinanten Genotyp B unterschieden werden. Die Häufigkeit, mit der ein gewünschtes rekombinantes Chromosom beim *Intercross* entsteht, ist einerseits abhängig vom Abstand der beiden hypothetischen Genorte *Locus1* und *Locus2* [$\Delta(Locus1-Locus2)$]. Hierbei gibt der in cM³ angegebene Abstand der Genorte⁴ die prozentuale Wahrscheinlichkeit für eine meiotische Rekombination der Gene an. Andererseits ist zu berücksichtigen, dass mit gleicher Wahrscheinlichkeit auch unerwünschte, i.e. die beiden Wildtyp-Allele kombinierenden, chromosomale Rekombinanten

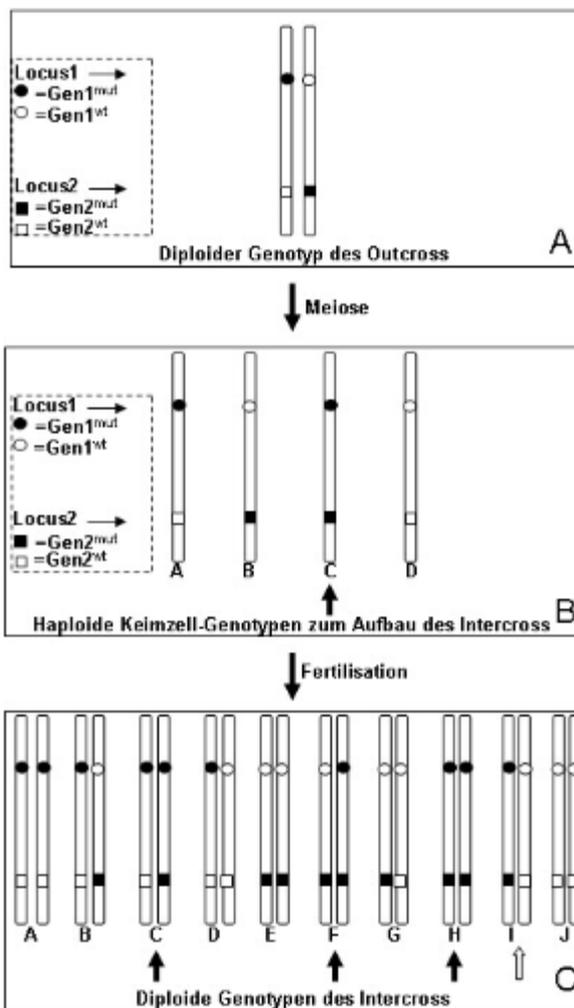


Abb. 1: (Erklärung im Text)

³ Die Einheit Centimorgan (cM) wurde eingeführt, um chromosomale Abstände zwischen Genorten anzugeben. Zwei Loci haben einen Abstand von 1 cM, wenn die Rekombinationsrate bei den Nachkommen 1 % beträgt. Die Einheit geht auf Thomas Hunt Morgan zurück, der bei der Spezies *Drosophila* erstmals ein Konzept zur Kopplung von Genorten erarbeitet hat.

⁴ Die chromosomale Position (in bp oder cM) muriner Genorte kann in der „Mouse Genome Informatics“ Datenbank (<http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=markerQF>) eruiert werden

(zum Beispiel Genotyp D in Abb. 1C) entstehen können. Dadurch halbiert sich die ursprüngliche Wahrscheinlichkeit p für das Auftreten einer erwünschten Intercross-Rekombinante. Sie kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$P = [\Delta(\text{Locus1-Locus2})] / 2$$

(Fallbeispiel: Es sollen mutierte Allele des murinen Ncf1 (neutrophil cytosolic factor 1) und Aldh2 (Aldehyde dehydrogenase 2) Gens kombiniert werden. Beide Loci liegen auf Chromosom 5. Die genaue Position des Ncf1-Gens lautet gemäß MGI-Datenbank 74 cM oder 134 695 923 bp (Basenpaare) bis 134 705 495 bp. Die genaue Position des Aldh2 lautet 122 016 036 bp bis 122 043 833 bp. Da die Position des Aldh2-Locus nicht in cM angegeben wurde, kann der Abstand der beiden Loci lediglich in bp errechnet werden; er beträgt also ca. 12 Mbp. Unter der vereinfachenden Annahme, dass 1 cM ca. 1,5 Mbp entsprechen, ergibt sich ein Abstand zwischen Ncf1 und Aldh2 von ca. 8 cM. Bei den *Intercross*-Nachkommen werden die gewünschten rekombinierten Chromosomen deshalb mit einer Frequenz von 4% entstehen.)

3. Schlussfolgerungen

Beide genetischen Ausgangssituationen (2.1 keine Kopplung der Zielallele bzw. 2.2 Kopplung derselben) bedingen zunächst einen hohen züchterischen Aufwand mit mindestens zwei Zuchtgenerationen und einer (besonders für den Fall der Kopplung) hohen Zahl an Zuchtpaaren, um sicher zum gewünschten Erfolg zu kommen, nämlich die Differentialallele zweier Loci homozygot in einem Tierstamm zu etablieren. Der Aufwand und der Tiereinsatz ist jedoch begründet, da nur auf diesem Weg ein entsprechendes Tiermodell weiter propagiert und genutzt werden kann.

Haftungsausschluss

Die Nutzung und Verwendung der Veröffentlichungen (Fachinformationen, Stellungnahmen, Hefte, Empfehlungen, u. ä.) der Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS und die Umsetzung der darin enthaltenen Informationen und Inhalte erfolgt ausdrücklich auf eigenes Risiko der jeweiligen Nutzer*innen oder Verwender*innen.

Die GV-SOLAS und auch die Autor*innen können für etwaige Unfälle und Schäden jeder Art, die sich durch die Nutzung der Veröffentlichung ergeben, keine Haftung übernehmen.

Die GV-SOLAS übernimmt keine Haftung für Schäden jeglicher Art, die durch die Nutzung der Webseite und das Herunterladen der Vorlagen entstehen. Ebenfalls haftet die GV-SOLAS nicht für unmittelbare oder mittelbare Folgeschäden, Datenverlust, entgangenen Gewinn, System- oder Produktionsausfälle.

Haftungsansprüche gegen die GV-SOLAS und die Autor*innen für Schäden materieller oder ideeller Art, die durch die Nutzung oder Nichtnutzung der Informationen bzw. durch die Nutzung fehlerhafter und/oder unvollständiger Informationen verursacht wurden, sind grundsätzlich ausgeschlossen.

Schadenersatzansprüche sind daher sowohl gegen die Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS wie auch gegen die Autor*innen ausgeschlossen.

Die Werke inklusive aller Inhalte wurden unter größter wissenschaftlicher Sorgfalt erarbeitet. Gleichwohl übernehmen die GV-SOLAS und die Autor*innen keinerlei Gewähr und keine Haftung für die Aktualität, Korrektheit, Vollständigkeit und Qualität der bereitgestellten Informationen, ebenso nicht für Druckfehler.

Es kann keine juristische Verantwortung sowie Haftung in irgendeiner Form für fehlerhafte Angaben und daraus entstandene Folgen von der GV-SOLAS und den Autor*innen übernommen werden.

Für die Inhalte von den in diesen Veröffentlichungen abgedruckten Internetseiten sind überdies ausschließlich die Betreiber der jeweiligen Internetseiten verantwortlich.

Die GV-SOLAS und die Autor*innen haben keinen Einfluss auf Gestaltung und Inhalte fremder Internetseiten und distanzieren sich daher von allen fremden Inhalten.