

**Gesellschaft für  
Versuchstierkunde**

Society for Laboratory  
Animal Science

**GV-SOLAS**

---

## **Ausschuss für Genetik und Labortierzucht**

### **Zucht von Doppelmutanten**

#### **Inhaltsverzeichnis:**

<b>1. Einleitung</b> .....	2
<b>2. Kombination von zwei Differential-Allelen</b> .....	2
2.1. Ohne chromosomale Kopplung .....	3
2.2. Mit chromosomaler Kopplung .....	4
<b>3. Schlussfolgerungen</b> .....	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<sup>mut</sup>* (mut = mutiert) bezeichnet, das korrespondierende Wildtyp-Allel wird *Gen1<sup>wt</sup>* (wt = Wildtyp) genannt. Entsprechend werden die Differential-Allele von *Gen2* als *Gen2<sup>mut</sup>* bzw. *Gen2<sup>wt</sup>* bezeichnet. Es stehen zwei Parentalstämme zur Verfügung, die alternativ das Allel *Gen1<sup>mut</sup>* bzw. das Allel *Gen2<sup>mut</sup>* in homozygoter Form tragen. Auswahl und Effizienz des Zuchtverfahrens, das zur Kombination der Allele *Gen1<sup>mut</sup>* und *Gen2<sup>mut</sup>* in einem neuen Tierstamm anzuwenden ist, hängen davon ab, ob die betroffenen Genorte *Locus1* bzw. *Locus2* auf dem selben 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 homozygote<sup>1</sup> Trägartiere des Differential-Allels *Gen1<sup>mut</sup>* (Genotyp: *Gen1<sup>mut/mut</sup> Gen2<sup>wt/wt</sup>*) mit vorzugsweise homozygoten Trägern des Differential-Allels *Gen2<sup>mut</sup>* (Genotyp: *Gen1<sup>wt/wt</sup> Gen2<sup>mut/mut</sup>*) gekreuzt:

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

Aus diesem Outcross resultieren ausschließlich heterozygote Tiere<sup>2</sup> des Genotyps *Gen1<sup>mut/wt</sup> Gen2<sup>mut/wt</sup>*

### „Intercross“

Die Outcross-Nachkommen des Genotyps *Gen1<sup>mut/wt</sup> Gen2<sup>mut/wt</sup>* werden nun miteinander verpaart:

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

Es entstehen 9 unterschiedliche Genotypen, deren Häufigkeit sich aus den Mendelschen Gesetzen ergibt. Der zum Aufbau einer homozygoten Doppelmutanten-Zucht erforderliche Genotyp *Gen1<sup>mut/mut</sup> Gen2<sup>mut/mut</sup>* 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<sup>mut/mut</sup> Gen2<sup>mut/mut</sup>* erbringen, ist es ratsam, in einem Zwischenschritt auch die Intercross-Genotypen

---

<sup>1</sup> Sofern keine homozygoten Trägartiere verfügbar sind, können auch heterozygote Tieren eingesetzt werden. Für diese Fälle muss das Zuchtschema entsprechend angepasst werden.

<sup>2</sup> 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 Nachkommengentypen, die durch Typisierung diskriminiert werden müssen.

$Gen1^{mut/mut} Gen2^{mut/wt}$  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).

### „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:

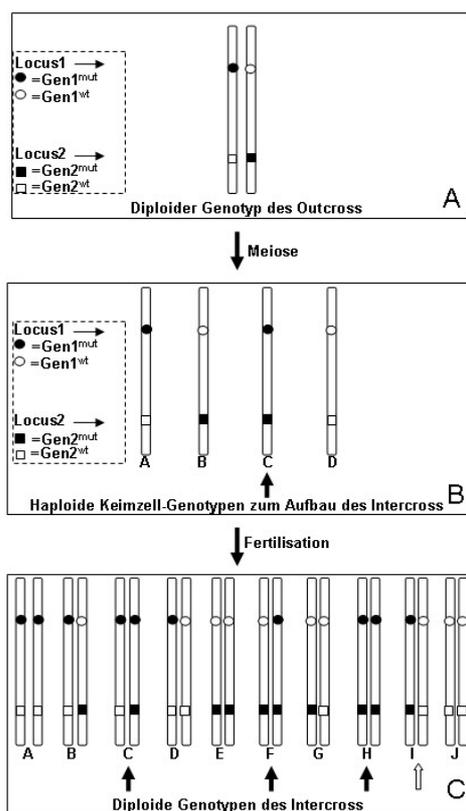
$$Gen1^{mut/wt} Gen2^{mut/wt} \times Gen1^{mut/wt} Gen2^{mut/wt}$$

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 Ge-

notypen 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  $cM^3$  angegebene Abstand der Genorte<sup>4</sup> 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 (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:

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



**Abbildung 1: (Erklärung im Text)**

<sup>3</sup> 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.

<sup>4</sup> 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.

(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.

**Autoren: Kurt Reifenberg, Reinhart Kluge**