

## Bestimmung des genetischen Hintergrunds von Mauslinien

Verschiedene Inzuchtstämme und Substämme enthalten bekannte und sehr wahrscheinlich noch eine Vielzahl unbekannter Mutationen, die z.T. erheblichen Auswirkungen auf den Phänotyp haben können. Das bekannteste Beispiel ist eine Deletion des *Nnt*-Gens bei den weit verbreiteten Substämmen C57BL/6J (Jax) und C57BL6/JRj, wogegen andere Substämme von C57BL/6J diese Mutation nicht besitzen. Daraus ergibt sich, dass es beispielsweise bei der Verwendung von C57BL/6 nicht ausreicht, lediglich auf den Zusatz „J“ oder „N“ zu verweisen. Sowohl „J“ und „N“ besitzen mehrere Substämme, die sich wiederum genetisch voneinander unterscheiden (JBomTac, JOlaHsd, JCrI, JRj, JRccHsd, NTac, NCrI, NHsd, NRj).

Für die Reproduzierbarkeit von Studien mit knock-out, knock-in oder transgenen Linien ist ein eindeutig definierter genetischer Hintergrund unabdingbar. Bei der Erzeugung einer genetisch modifizierten Mauslinie werden oft unterschiedliche Stämme einbezogen. Die anschließende Rückführung auf einen definierten genetischen Hintergrund erfolgt dann über mehrere Rückkreuzungsgenerationen. Ein vorzeitiger Abbruch der Rückkreuzung oder der Erhalt von Mauslinien aus anderen Forschergruppen werfen häufig die Frage auf, ob und zu welchem Grad solche Tiere tatsächlich einen definierten genetischen Hintergrund besitzen.

Darüber hinaus werden im Verlauf der Generierung genetisch modifizierter Mauslinien genetische Elemente eingesetzt, wie beispielsweise Rekombinasen, Resistenzgene für Antibiotika, fluoreszierende Proteine usw. Gelegentlich verbleiben solche Elemente unerkannt in der Mauslinie, was den Ausgang von Experimenten sowie das Wohlbefinden der Tiere beeinflussen kann.

Eine Antwort auf diese Frage kann die Bestimmung des genetischen Hintergrunds geben. Diese kann in zwei verschiedenen Stufen erfolgen: eine grobe Abschätzung des IST-Zustandes oder die detaillierte Genotypisierung des Gesamtgenoms mit Hilfe von hochinformativen STR-Markern (Short Tandem Repeats, Mikrosatelliten).

Als optimale Lösung bietet sich in beiden Fällen an, pro Mauslinie 3 Tiere zu analysieren, davon mindestens 2 Männchen. Diese Anzahl ist normalerweise ausreichend, um sowohl den genetischen Hintergrund relativ zu den kommerziell erhältlichen Stämmen und Substämmen zu definieren, als auch die genetische Heterogenität innerhalb der Mauslinie zu bewerten.

### 1 Die kleine Variante: C57BL/6-spezifische Mutationen und Y-Haplotyp

Die „kleine Variante“ umfasst die Analyse von speziellen Mutationen, die charakteristisch für C57BL/6 und deren Substämme sind. Die Ergebnisse ermöglichen eine Zuordnung zu „J“ oder „N“ sowie eine weiterführende Zuordnung zu Substämmen. Ergänzend wird der STR-Haplotyp für das Y-Chromosom bestimmt, mit dem alle Substämme von C57BL/6 voneinander unterschieden werden können. Über diesen Haplotypen kann man prüfen, ob die Mauslinie tatsächlich auch das korrekte Y-Chromosom besitzt.

Die Analyse C57BL/6-spezifischer Mutationen umfasst folgende Marker (siehe auch Abbildung 1):

- Mutation *Crb1*<sup>rd8</sup>, liegt bei allen Substämmen von C57BL/6N vor,
- Mutation DIP1606, zur Unterscheidung einzelner Substämme von C57BL/6N,
- Mutation DIP686, liegt bei allen Substämmen von C57BL/6J vor,
- Mutation *Nnt*, spezifischer Marker für C57BL/6JCrI und C57BL/6JRj,
- Mutation *Sncal*, spezifischer Marker für C57BL/6JOlaHsd.
- Mutation *Dock2*, spezifischer Marker für C57BL/6NHsd

Einen gemischten genetischen Hintergrund erkennt man daran, dass bei den C57BL/6-spezifischen Mutationen heterozygote Loci festgestellt werden, bei denen sowohl das Allel des Wildtyps als auch die Mutante nachweisbar sind. Hierbei kann es sich um einen gemischten Hintergrund zwischen C57BL/6 „J“ und „N“

handeln, oder um Gemische zwischen C57BL/6 und einem anderen Mausstamm bzw. eine Konstellation mit allen drei Varianten.

Die Stärke des Gesamtbefundes ist vor allem darin zu sehen, dass die Aussage hinsichtlich der C57BL/6-spezifischen autosomalen Marker mit der Analyse von Y-chromosomalen STR-Loci verknüpft wird. Gerade letzteres erweist sich immer wieder als Fehlerquelle, da viele transgene Linien nach wie vor das Y-Chromosom des ursprünglichen Donorstammes besitzen. Mauslinien, bei denen ein komplettes Chromosom ausgetauscht vorliegt, werden in der Genetik als consome Stämme bezeichnet. Das Vorhandensein eines falschen Y-Chromosoms ist nicht nur ein „Schönheitsfehler“, sondern kann zu erheblichen phänotypischen Auswirkungen bei nachfolgenden Generationen führen, die von der Häufigkeit und Intensität konventionellen genetischen Effekten ähneln können (Transgenerationseffekte, siehe Nelson *et al.*, 2010. *Epigenomics* 2(4) 513-521).

Abbildung 1: Analyseschema für die Zuordnung zu Substämmen von C57BL6

	<i>Crb 1<sup>rdB</sup></i>		DIP 686		DIP 1606			<i>Nnt</i>		<i>Snca</i>		<i>Dock 2</i>		
	wt	mut	wt	mut	wt	mutA	mutB	wt	mut	wt	mut	wt	mut	
C57BL/6N		x	x				x	x		x		x		NTac, NRj
		x	x			x		x		x		x		NCrI, NJ
		x	x			x		x		x			x	NHsd
C57BL/6J	x			x		x			x	x		x		J (Jax), JRj
	x			x		x		x			x	x		JOlaHsd
	x			x		x		x	x		x			JBomTac, JRccHsd
	x		x		x			x		x		x		non-C57BL/6

  

x	allele detected
	allele not detected

Es wird darauf hingewiesen, dass die Analyse der C57BL/6-spezifischen Mutationen lediglich ein Abbild über den genetischen Zustand der entsprechenden genomischen Regionen der Chromosomen 1, 6, 11, 13 und 16 ergibt. Aussagen über andere Chromosomen oder für andere Bereiche auf den genannten Chromosomen können nicht getroffen werden. Eine Abschätzung des mengenmäßigen Anteils an fremder DNA ist ebenfalls nicht möglich. Für viele Situationen ist eine solche Aussage dennoch völlig ausreichend.

Ist jedoch ein Gesamtüberblick über alle chromosomalen Bereiche notwendig, einschließlich einer zahlenmäßigen Bewertung, so empfiehlt sich die komplette Genotypisierung des Gesamtgenoms mittels STR-Marker – die „große Variante“.

## 2 Die große Variante: Genotypisierung mittels STR-Marker

Die Genotypisierung des Gesamtgenoms basiert auf der Analyse von 230 - 250 STR-Markern (Short-Tandem-Repeats, Mikrosatelliten), die in regelmäßigen Abständen über alle Chromosomen verteilt vorliegen. Die Selektion unserer STR-Marker erfolgte unter dem Aspekt der bestmöglichen Unterscheidung zwischen nahe verwandten Substämmen. Zusätzlich erfolgt die Analyse der C57BL/6-spezifischen Mutationen und die Bestimmung des Y-chromosomalen Haplotyps.

Inzuchtstämme der Maus sind weitestgehend homozygot. Für jeden Marker kann daher das spezifische Allel bestimmt werden, welches typischerweise bei einem konkreten Stamm bzw. Substamm vorhanden ist. Diese sog. Consensus-Allele sind in einer Datenbank hinterlegt. Substämmen von C57BL/6 weisen zwischen „J“ und

„N“ bei mehr als 120 STR-Loci unterschiedliche Allele auf. Zwischen unterschiedlichen Inzuchtstämmen der Maus beträgt die die Anzahl an informativen Markern ca. 200.

Die im Ergebnis der Genotypisierung gewonnenen Analysedaten werden mit den Consensus-Allelen der verschiedenen Stämme und Substämme abgeglichen. Als weiteres Bewertungskriterium wird die Anwesenheit/Abwesenheit von C57BL/6-spezifischen Mutationen einbezogen. Auf dieser Basis ergibt sich ein Gesamtbild, welches die Grundlage für die Zuordnung einer Probe zu einem Stamm/Substamm darstellt und eine zahlenmäßige Bewertung des mengenmäßigen Anteils an „fremder DNA“ ermöglicht.

### **3 Kombinierte Variante (empfohlen)**

Die Erfahrung zeigt, dass bei transgenen Linien im Hinblick auf die BL6-spezifischen Mutationen häufig ein gemischter Hintergrund vorliegt. Nicht selten werden unter drei Proben von ein und derselben Linie beispielsweise folgende Genotypen bestimmt:  $Nnt^{mut}/Nnt^{mut}$  (Probe 1),  $Nnt^{wt}/Nnt^{mut}$  (Probe 2) und  $Nnt^{wt}/Nnt^{wt}$  (Probe 3). Würde nur eine einzige Probe untersucht werden, so ergäbe sich lediglich bei Probe 2 ein Hinweis auf einen gemischten Hintergrund. Bei Probe 1 und Probe 3 dagegen würde man zu einer fehlerhaften Bewertung der tatsächlichen Gesamtsituation kommen. Daraus folgt, dass bei Untersuchung von lediglich einer Probe pro Linie keine fundierte Aussage möglich ist und unter Umständen eine falsche, trügerische Sicherheit vorspielt.

Unsere Empfehlung ist daher, dass pro zu testenden Stamm/Linie die DNA von mindestens 3 Tieren untersucht werden sollte, darunter ein bis zwei männliche (Y-Chromosom). Alle drei DNA-Proben werden analog der kleinen Variante auf die bekannten Phänotyp-relevanten Mutationen untersucht, zusätzlich wird eine dieser Proben entsprechend der großen Variante mit 250 STR-Markern genotypisiert. Auf dieser Basis ergibt sich ein Gesamtbild, welches die Grundlage für die Zuordnung einer Probe zu einem Stamm/Substamm darstellt und eine zahlenmäßige Bewertung des mengenmäßigen Anteils an „fremder DNA“ ermöglicht.

### **4 Test auf Anwesenheit/Abwesenheit von genetischen Elementen (PLUS)**

Zusätzlich zur Bestimmung des genetischen Hintergrunds kann auf die Anwesenheit von 11 verschiedenen genetischen Elementen getestet werden, die häufig bei der Erzeugung von genetisch modifizierten Linien zum Einsatz kommen. Es handelt sich um die Rekombinasen Cre, iCre, Dre, FLPe, FLPo und Vika, das Neomycin Resistenzgen (Neo), lacZ, IRES (internal ribosome entry site) sowie fluoreszierende Proteine GFP und RFP. Dieser ergänzende Test kann bei allen Varianten der Genotypisierung durchgeführt werden (kleine, große, kombinierte) und wird bei der Auftragserteilung über den Zusatz **PLUS** kenntlich gemacht.

### **5 Untersuchungsmaterial**

Als Proben können Biopsien der Schwanzspitzen, Ohrstanzen oder auch bereits extrahierte DNA zugesandt werden. Die Analyseergebnisse erhalten Sie in der Regel innerhalb von 10 Tagen.