

## 5. Zucht und Genetik

(das vorliegende Manuskript lehnt sich an die Publikation „Zimmermann F, Weiss J, Reifenberg K (2000) Breeding and assisted reproduction techniques, In: „The handbook of experimental animals: the rat“ (ed: Krinke G. J.) Academic Press, London, 177-198“ an.)

### 5.1 Allgemeine Einführung in die Genetik

Wie bei anderen Säugerspezies umfasst auch das haploide Genom der Versuchstierspezies Maus und Ratte 3 Milliarden DNA-Basepaare. Diejenigen DNA-Regionen, die für bestimmte Genprodukte –meist Proteine- kodieren, werden als Gene bezeichnet. Die charakteristische DNA-Sequenz eines Gens kann geringfügige Variationen aufweisen, die Einfluss auf die genetische Funktion haben können. Diese alternativen Formen eines Gens werden als Allele bezeichnet. Ein Gen befindet sich auf einer charakteristischen chromosomalen Region, die als genetischer Locus bezeichnet wird.

Im Gegensatz zu den Autosomen, die als Paare morphologisch identischer Partnerchromosomen auftreten, weisen die Geschlechtschromosomen der Säuger, das X- und das Y-Chromosom, signifikante morphologische Unterschiede auf. Diese werden deshalb auch als Heterosomen bezeichnet. Die überwiegende Mehrzahl an Genen, die sich auf den Heterosomen befinden, kommt entweder nur auf den X-Chromosom oder nur auf dem Y-Chromosom vor. Den meisten dieser Gene fehlt ein Pendant auf dem Partnerheterosom. Bisher wurden nur sehr wenige Gene identifiziert, die sich sowohl auf dem X- als auch auf dem Y-Chromosom befinden. Die kleine heterosomale Region, die diese Gene trägt, wird als pseudoautosomale Region bezeichnet. Die Nomenklatur der pseudoautosomalen Region ist mit Bedacht ausgewählt, da sich die Heterosomen bezüglich dieser chromosomalen Region wie Autosomen verhalten. Männliche Säuger tragen von den meisten heterosomal vererbten Genen lediglich ein einziges Allel. Lediglich die wenigen heterosomalen Gene, die in der pseudoautosomalen Region lokalisiert sind, existieren bei männlichen Tieren in zwei Allelen.

Ein diploider Organismus, der zwei identische Allele eines bestimmten Gens trägt, wird als homozygot bezeichnet. Trägt ein Organismus zwei unterschiedliche Allele, so sprechen wir von Heterozygotität. Die spezielle Situation bei männlichen Säugern, dass die meisten heterosomal gebundenen Gene in einem einzigen Allel existieren, wird als Hemizygotität bezeichnet. Durch die Entwicklung der Transgentechnologie musste die Definition der Hemizygotität jedoch erweitert werden. Die Mikroinjektion von geeigneten linearen DNA-Konstrukten in den Pronukleus befruchteter Eizellen kann zur Integration der transgenen DNA-Sequenzen an einer nicht vorhersehbaren chromosomalen Stelle des Empfängergenoms führen, wodurch ein neuer genetischer

Locus entsteht. Transgene Tiere können den neu erworbenen Locus auf einem einzigem Autosom und nicht auf dem Partnerchromosom tragen. Da diese Situation der der meisten heterosomal gebundenen Gene männlicher Säuger, die ja ebenfalls nur einen Genlocus aufweisen, sehr ähnlich ist, wird sie ebenfalls als Hemizygotität bezeichnet.

In diploiden Organismen kommt es beim Transfer der genetischen Information von der vorhergehenden zur nächsten Generation zu einer Reduktion des diploiden parental Genoms ( $2n$ ) auf das haploide Genom der Gameten. Der spezielle Zellteilungstyp, der diese Genomreduktion erreicht, wird als Meiose bezeichnet. Im Verlauf der Meiose werden die beiden parental Allele jedes heterozygoten Locus gleichmäßig auf die Keimzellen verteilt. Also werden 50% der Gameten das eine und 50% das andere Allel tragen. Diese Vererbungsregel wurde bereits von Mendel entdeckt und wird als zufällige Segregation bezeichnet. Mendel entdeckte ebenfalls bereits das Gesetz der unabhängigen Vererbung. Dieses Gesetz besagt, dass die Segregation zweier unterschiedlicher Gene unabhängig voneinander verläuft. Heute weiß man allerdings, dass das Gesetz der unabhängigen Vererbung lediglich für solche Gene gilt, die sich auf unterschiedlichen Chromosomen befinden. Für Gene, die auf demselben Chromosom liegen, existieren kompliziertere Vererbungsregeln. In diesen Fällen ist die Aufteilung der Allele von komplexen chromosomalen Rekombinationen während der Meiose abhängig. Während alle autosomalen Partnerchromosomen und die zwei X-Chromosomen weiblicher Säuger häufig rekombinieren, ist die Situation bezüglich der von männlichen Säugern getragenen X- und Y-Chromosomen anders. Da sich das meiotische Rekombinationspotential dieser Chromosomen auf die kleine pseudoautosomale Region beschränkt, sind Rekombinationsereignisse, falls sie überhaupt stattfinden, sehr selten.

## 5.2 Nomenklatur zur Kreuzung von Versuchstieren

Es wurde ein spezielles Nomenklatorsystem etabliert, um Kreuzungen zwischen Versuchstieren, die ein standardisiertes Genom tragen, zu beschreiben. Das System berücksichtigt meist den Genotyp eines einzelnen Gens oder einer Gruppe von Genen der beiden Paarungspartner. Zur Vereinfachung wird das System nachfolgend für ein einzelnes imaginäres Gen mit dem Allelrepertoire A and a beschrieben.

Beim Incrossing werden homozygote Tiere des Genotyps A/A bzw. a/a miteinander verpaart. Durch die Incrossing-Kombinationen A/A x A/A or a/a x a/a werden Nachkommen produziert, die wiederum den parental Genotyp A/A bzw. a/a tragen. Das Incrossing wird benutzt, um ingezüchtete Tierstämme zu propagieren.

Ein Intercross wird erreicht, indem heterozygote A/a Tiere untereinander verpaart werden. Das Intercross A/a x A/a wird Tiere des Genotyps A/A, A/a and a/a erzeugen, wobei diese Genotypen ein Verhältnis von 1:2:1 aufweisen werden.

Die Kreuzung von homozygoten A/A oder a/a Tieren mit einem heterozygoten A/a Partner wird als Backcrossing bezeichnet. Die Backcross A/A x A/a oder a/a x A/a werden Tiere der Genotypen A/A und A/a oder a/a und A/a erzeugen. Eine Serie hintereinandergeschalteter Backcross muss durchgeführt werden, um ein bestimmtes interessierendes Gen oder eine Gengruppe von einem unerwünschten Donorstamm auf einen erwünschten ingezüchteten Rezipientenstamm zu übertragen.

Verpaarungen zwischen homozygoten A/A und a/a Tieren werden als Outcrossing bezeichnet. Das Outcross A/A x a/a wird heterozygote A/a Tiere erzeugen. Neben anderen Zwecken dienen Outcross dazu, Hybriden herzustellen.

### 5.3 Ingezüchtete Stämme

Per Definitionem wird ein Stamm als ingezüchtet bezeichnet, wenn er für 20 oder mehr aufeinanderfolgende Generationen einer Bruder x Schwester Inzucht (= BSI) unterworfen wurde (Festing and Staats, 1973). Paarungskombinationen, bei denen Eltern mit Nachkommen gekreuzt wurden, können das BSI-Zuchtregiment ersetzen, wenn die Verpaarung mit dem jüngeren der beiden Elternteile erfolgt. Bei der Durchführung eines BSI-Zuchtregiments erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmter genetischer Locus homozygot wird, ständig. Diese Wahrscheinlichkeit wird als Inzuchtkoeffizient  $F_t$  bezeichnet. Für eine bestimmte Generation t, berechnet sich  $F_t$  nach folgender Formel (Falconer 1989):

$$F_t = 0.25 (1 + 2F_{t-1} + F_{t-2})$$

Für Stämme, die für 20, 40 bzw. 60 Generationen einer Bruder-Schwester-Inzüchtung unterliegen, nimmt  $F_t$  Werte von 0.986335, 0.999803 bzw. 0.999997 an. Für einige Zwecke ist es günstiger die Zunahme von  $F_t$  pro Generation anzugeben. Dieser wert wird als  $\Delta F$  bezeichnet.  $\Delta F$  berechnet sich nach der Formel:

$$\Delta F = (F_t - F_{t-1}) / (1 - F_{t-1})$$

$\Delta F$  ist gleich 0.250, 0.167, 0.200 bzw. 0.188 für die ersten vier Generationen von BSI. In späteren Generationen erreicht  $\Delta F$  einen konstanten wert von 0.191. Der Inzuchtkoeffizient gibt die

Wahrscheinlichkeit dafür an, dass ein einzelner (beliebiger) genetischer Locus in homozygoter Form vorliegt. Da jedoch nicht einzelne Gene sondern Blöcke von verbundenen Genen von einer auf die nachfolgende Generation übertragen werden, ist der Anteil des gesamten Genoms der nach einer BSI-Serie in homozygoter Form vorliegt (=fixiert ist) immer geringer als er durch den Inzuchtkoeffizienten wiedergegeben wird. Der Anteil fixierter Loci im Genom ingezüchteter Tiere hängt nicht nur von der Anzahl durchgeführter BSI-Generationen sondern auch von der Genomgröße und zu einem geringeren Ausmaß von der artspezifischen Chromosomenanzahl ab (Stam, 1980). Für eine Tierart der Genomgröße 2500cM und einer haploiden Chromosomenzahl von 20 hat Fisher (1965) abgeschätzt, dass nach 60 Generationen aufeinanderfolgender BSI Tiere mit einer 99%-igen Fixierung auftreten. Dieser Wert gilt wahrscheinlich ebenfalls für ingezüchtete Maus- und Rattenstämme, da diese Spezies ähnliche Genomgrößen aufweisen. So wird in der Rat Genome Database [<http://ratmap.gen.gu.se/>] die Größe des Rattengenoms auf 2250cM geschätzt; das haploide Rattengenom ist in 21 Chromosomen organisiert. Die Genomgröße der Maus beträgt 1650 cM, die genetische Information ist hier auf 20 Chromosomen verteilt. Folglich tragen ingezüchtete Maus- und Rattenstämme selbst nach 60 Generationen aufeinanderfolgender BSI noch einen beträchtlichen Anteil an Restheterozygotität. Um verbleibende heterozygote Loci ingezüchteter Tiere eventuell doch noch zu fixieren, werden Inzuchtstämme nicht nur mittels BSI erzeugt, sondern ebenfalls durch BSI propagiert. Es können jedoch Selektionsdrücke wirken, die heterozygote Genotypen favorisieren. In solchen Fällen nämlich, in denen homozygote Tiere eine reduzierte Lebensfähigkeit oder Fertilität aufweisen, können trotz des durch BS-Inzucht erzeugten Drucks zur Homozygotität heterozygote Verhältnisse persistieren (Hayman and Mather, 1953).

Zuchtkolonien ingezüchteter Stämme werden in Nucleuskolonien (NC), pedigrierte Expansionskolonien (PEC) and Multiplikationskolonien (MC) unterteilt (Hedrich, 1990a). Die NC ist ein sich selbst erhaltendes System, das dazu dient, den Inzuchtstamm zu konservieren. Es wird eine strenge Bruder x Schwester-Inzuchtpaarung durchgeführt. Solche NC-Kolonien haben meist eine geringe Größe von 10-30 Zuchtpaaren und alle Tiere stammen von einem gemeinsamen früheren Zuchtpärchen ab. In der Regel werden zwei bis drei Sublinien des gemeinsamen Ahnenpaares erzüchtet, die dann 3 bis 7 Generationen lang erhalten werden. Die divergierenden Sublinien werden sorgfältig bezüglich Fortpflanzungserfolg und bestimmter genetischer Daten kontrolliert. Wenn genügend Daten über die Sublinien vorliegen, wird eine dieser Linien ausgesucht, um den Inzuchtstamm weiter zu propagieren während die anderen Sublinien von der NC ausgeschlossen werden. Pro Woche kann eine Maus- oder Ratten-NC etwa 10 bis 15 Tiere produzieren. Werden mehr Tiere benötigt, muss eine pedigrierte Expansionskolonien (PEC) gesetzt werden. Die

Zuchttiere einer PEC stammen ausnahmslos von der NC ab. Wie die NC, wird auch die PEC durch Bruder x Schwester Verpaarung propagiert. Da PECs primär dazu dienen, Zuchttiere für Multiplikationskolonien (MC) zu produzieren, entspricht ihre Größe der der zu versorgenden MCs. MCs werden nicht durch Bruder x Schwester Verpaarung propagiert, sondern die Zuchttiere werden zufällig zusammengesetzt. MCs dienen dazu, genügende Tierzahlen für die tierexperimentelle Forschung zu erzeugen.

### **Genetische Variabilität von Inzuchtstämmen**

Forscher, die mit ingezüchteten Tieren arbeiten, müssen sich der Tatsache bewusst sein, dass der Genpool eines vorgegebenen Inzuchtstammes nicht völlig stabil ist, sondern Schwankungen unterliegt. Die Instabilität des Genpools kann durch folgende drei Faktoren bedingt sein.

**Residualheterozygotität:** Auch ein stark ingezüchteter Tierstamm, der für 60 oder noch mehr Generationen durch Bruder-Schwester-Inzucht propagiert wurde, kann durchaus noch heterozygote Loci aufweisen. Während der Weiterzucht des Stammes durch BSI können solche Loci fixiert werden. Die Fixierung vormals heterozygoter Loci stellt einen Faktor dar, der zu Schwankungen im Genepool ingezüchteter Stämme führt.

**Mutation:** Ein anderer Faktor, der den Genepool ingezüchteter Tierstämme beeinflusst, ist das spontane Auftreten von Mutationen. Die genaue Mutationsrate einzelner Gene ist meist unbekannt. Die Häufigkeit des Auftretens von Mutationen im Genepool ingezüchteter Stämme kann jedoch abgeschätzt werden. Die durchschnittliche Mutationsrate eines eukaryoten Organismus, die als  $u$  bezeichnet wird, wird auf etwa  $10^{-5}$  pro Gamete and pro Locus geschätzt (Ohno 1972). Dieser Wert berücksichtigt jedoch nicht die Tatsache, dass die Mutationsrate vom jeweiligen genetischen Locus, vom Geschlecht und vom Alter abhängt (siehe Review-Artikel von Crow, 1997). Da bei einem durch Bruder x Schwester Inzucht geführten Inzuchtstamm jede Generation von genau zwei Tieren begründet wird, ist jedes autosomale Gen im Genepool mit nur 4 Allelen repräsentiert. Deshalb beträgt in einem Inzuchtstamm die Mutationsrate eines bestimmten genetischen Locus  $4 \times u$ . Die Wahrscheinlichkeit der Fixierung einer erworbenen Mutation ist in starkem Ausmaß davon abhängig, ob selektive Kräfte auf das mutierte Allel wirken. Ohne den Einfluss einer Selektion weisen neue Mutationen eine 25%ige Wahrscheinlichkeit auf, im Genpool des Inzuchtstammes fixiert zu werden. Folglich ist die Wahrscheinlichkeit für den Austausch eines gegebenen Allels durch ein mutiertes Allel pro Bruder x Schwester Inzuchtgeneration gleich der Mutationsrate  $u$  (Falconer, 1989). Da das Säuger genom etwa 30.000 Gene umfasst, werden pro Generation ca. 0,3 Mutationen im Genpool, eines Inzuchtstamms fixiert. Es ist unklar, inwiefern die aufgeführte Abschätzung der Mutationsrate von Inzuchtstämmen die tatsäch-

lichen Verhältnisse widerspiegelt. Bailey (1977) hat für die Spezies Maus gezeigt, dass tatsächlich in jeder dritten Generation eine Mutation fixiert wird.

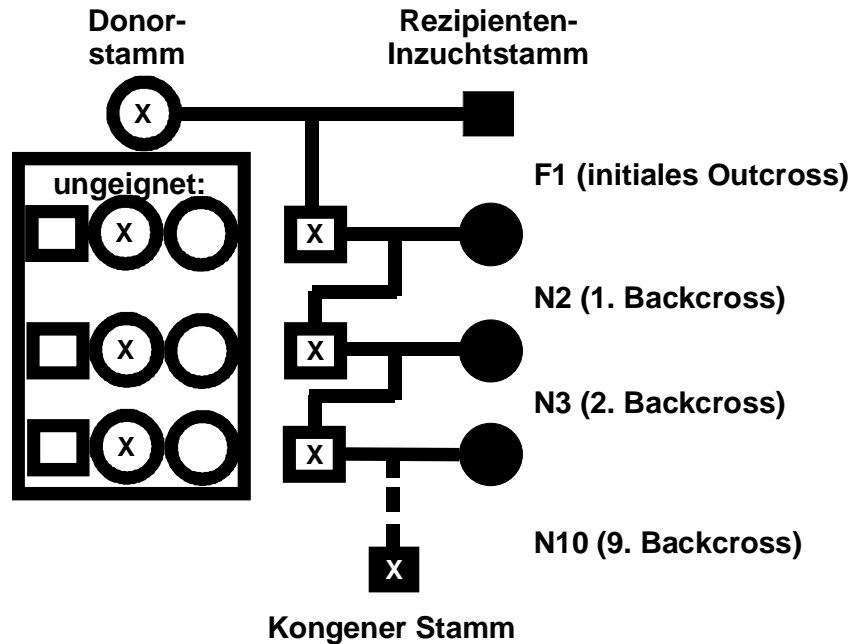
**Genetische Kontamination:** Genetische Kontaminationen von Inzuchtstämmen resultieren aus der unbeabsichtigten Einführung fremder Gene durch Outcrossing. Im Gegensatz zu den Mechanismen der Fixierung vormals heterozygoter Loci und des Erwerbs von Mutationen, ist die genetische Kontamination prinzipiell vermeidbar. Das nachweislich häufige Auftreten von genetischen Kontaminationen ingezüchteter Stämme in der Vergangenheit zeigt jedoch, dass es sehr schwierig ist, ein akzidentelles Outcrossing sicher zu verhindern. Das Risiko der genetischen Kontamination ist in solchen Tierhaltungen besonders hoch, in denen viele unterschiedliche Inzuchtstämmen, die dieselbe Fellfarbe aufweisen, in großer Nähe zueinander gezüchtet werden. Personen, denen die Zucht ingezüchteter Tiere anvertraut ist, sind verpflichtet, alle nur möglichen Maßnahmen zu ergreifen, um das Risiko des Auftretens genetischer Kontaminationen zu minimieren. Dies impliziert die sichere Identifikation von Zuchttieren und das Training und die kompetente Beaufsichtigung der Tierpfleger. In Tierhaltungen, in denen eine breite Vielfalt von ingezüchteten Varianten propagiert wird, muss ein genetisches Monitoring-System etabliert werden, um die Authentizität der Stämme zu kontrollieren. Es existiert geeignete Literatur (Hedrich 1990b), die sich spezifisch mit Programmen zur Durchführung eines genetischen Monitoring befasst. Die Kryokonservierung ingezüchteter Stämme von Mäusen oder Ratten in der Form von gefrorenen Präimplantationsembryonen ist heute unproblematisch möglich. Diese Technik erlaubt es, eine Art "backup" des Genepools eines ingezüchteten Stamms zu erstellen, so dass im Fall einer genetischen Kontamination der authentische Stamm wieder hergestellt werden kann. Zusammenfassend muss konstatiert werden, dass die Veränderung des Genpools ingezüchteter Stämme durch die Fixierung residualer heterozygoter Loci und durch die Akquirierung von Mutationen nicht zu vermeiden ist. Der genetische Status ingezüchteter Stämme wird zudem durch die Möglichkeit der genetischen Kontamination bedroht. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren wurden eindeutige Regeln erstellt, ab welchem Zeitpunkt ein ingezüchteter Stamm in neue Substämmen unterteilt werden muss (Festing and Staats, 1973). Diese Regeln sind insbesondere von solchen Personen zu befolgen, denen die Zucht von Inzuchtstämmen anvertraut wurde.

## 5.4 Koisogene Stämme

Ingezüchtete Stämme tragen ein standardisiertes Genom und repräsentieren deshalb ideale Träger von erwünschten Mutationen. Mutationen von Nagetiergenen können entweder spontan entstehen oder durch die Behandlung mit mutagenen Substanzen verursacht werden (Russell et al, 1979) oder durch ionisierende Strahlung entstehen (Green and Roderick, 1966). Weiterhin können durch Pronukleus-Mikroinjektion geeigneter DNA-Konstrukte direkt transgene Sequenzen in das Genom ingezüchteter Mäuse oder Ratten eingeführt werden. Weiterhin konnte für die Spezies Maus eine Technik entwickelt werden, durch homologe Rekombination embryonaler Stammzellen gezielte Veränderungen im Genom vorzunehmen (Gene Targeting). Ein koisogener Stamm wird erzeugt, indem ein ingezüchtetes Tier eine Mutation bzw. eine gentechnische Veränderung (Tragen, „knock-out“ oder „knock-in“) in die nächste Generation vererbt. Jedes koisogene Stammsystem besteht aus dem originären Inzuchtstamm in der nicht-mutierten oder nicht-gentechnisch-veränderten Form sowie dem koisogenen Partnerstamm, der das mutierte Allel oder die gentechnische Veränderung trägt. Das koisogene Stammsystem verfügt somit über denselben genetischen Hintergrund, unterscheidet sich jedoch lediglich bezüglich eines spezifischen genetischen Locus. Diese Eigenschaften machen koisogene Stammsysteme zu idealen Modellen zur Analyse der Phänotypen, die durch Mutationen oder durch gentechnische Veränderungen hervorgerufen werden. Koisogene Stämme sollten durch Bruder x Schwester Inzuchtung propagiert werden.

## 5.5 Kongene Stämme

Ein kongener Stamm wird erzeugt, indem ein spezifischer genetischer Locus von einem unerwünschten Donorstamm auf einem erwünschten Rezipienteninzuchtstamm übertragen wird. Der übertragene genetische Locus wird als Differentiallocus bezeichnet und kann ein spezielles interessierendes Allel oder eine ganze Gruppe verbundener interessierender Gene wie den Haupt-histokompatibilitätskomplex (MHC) umfassen. Die Funktion des Donorstamms besteht darin, den Differentiallocus zur Verfügung zu stellen. Folglich muss der Donorstamm nicht notwendigerweise ingezüchtet sein und es ist irrelevant, ob das Differentialgen in homozygoter oder heterozygoter Form vorliegt. Im Gegensatz dazu liefert der Rezipientenstamm den neuen genetischen Hintergrund für die Differentialregion; dieser Stamm muss ingezüchtet sein. Der Transfer des Differentiallocus auf den Rezipientenstamm wird durch Zuchtmaßnahmen erreicht, deren prinzipielles Konzept von George Snell entwickelt wurde (Snell 1978). Heutzutage wird in fast allen Fällen das sogenannte NX-Zuchtschema angewandt, um kongene Stämme zu erzeugen (Flaherty, 1981).



**Abbildung 5.1 NX-Zuchtschema zur Erzeugung kongener Stämme**

Der Donorstamm trägt einen gewünschten Differentiallocus X, der sich jedoch auf einem unerwünschten genetischen Hintergrund befindet (durch weiße Füllung der Symbole dargestellt). Der Rezipienteninzuchtstamm trägt zwar den erwünschten genetischen Hintergrund (durch schwarze Füllung der Symbole dargestellt), ihm fehlt jedoch das Differentialallel X. Durch konsequente Kreuzung von X-Trägertieren auf Tiere des Rezipienteninzuchtstamms wird ein kongener Stamm erzeugt. Der Kongenstamm vereint das Differentialallel X mit dem gewünschten genetischen Hintergrund des Rezipienteninzuchtstamms ( □ : Männchen, O: Weibchen).

Wie in der Abbildung 3.1 dargestellt, besteht das NX-Zucht-konzept aus zwei Komponenten. Zunächst wird ein Outcrossing zwischen Donor- und Rezipientenstamm durchgeführt, um das Differentialallel überhaupt in den Genpool des Empfängerstammes einzubringen. Durch das initiale Outcross wird nicht nur der gewünschte Differentiallocus übertragen, das Outcross führt leider zur breiten Einführung unerwünschter Donorstammallele. Deshalb werden anschließend viele Backcrosse auf den Rezipientenstamm durchgeführt, um die kontaminierenden Donorstammallele wieder durch Rezipientenstammgene zu ersetzen. In jeder Backcrossgeneration werden heterozygote oder hemizygoten Träger des Differentiallocus von Nicht-Trägertieren selektiert. Nur die Trägertiere werden mit Repräsentanten des Rezipienten-Inzuchtstammes verpaart. Die erste Outcrossgeneration wird als Generation 1 (F1) bezeichnet, die erste Backcrossgeneration als Generation 2 (N2), die zweite Backcrossgeneration als Generation 3 (N3), u.s.w. Per definitionem (Greenhouse et al, 1990) sind 10 Kreuzungen des Differentialallels auf den Rezipienteninzuchtstamm erforderlich, um die resultierende Variante als kongen bezeichnen zu dürfen. Dabei



wird das initiale Outcross als 1. Generation (F1) gezählt. Ist das übertragene Gen dominant, können einmal etablierte kongene Stämme durch weiteres Backcrossing zum Rezipientenstamm gezüchtet werden. Alternativ kann der kongene Stamm auch durch Bruder x Schwester Inzuchtung propagiert werden.

### **Abschätzung der genetischen Kontamination kongener Stämme**

Obwohl das NX Zuchtsystem zu einem extensivem Ersatz unerwünschter Donorstammallele durch erwünschte Rezipientenstammgene führt, sollte im Auge behalten werden, dass kongene Stämme eine beträchtliche residuale genetische Kontamination durch Donorstammallele aufweisen. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass der Ersatz von Donorstammallelen mit chromosomaler Verbindung (Linkage) zum Differentiallocus durch Rezipientenstamm-Material von chromosomalen Rekombinationsereignissen abhängt. Im Gegensatz dazu sind keine meiotischen Rekombinationen erforderlich, um Donorstammallele ohne Linkage zum Differentiallocus durch Rezipientenmaterial zu verdrängen. Deshalb müssen Versuche, das Ausmaß der residualen Kontamination kongener Varianten durch Donorstammallele abzuschätzen, unterscheiden, ob eine chromosomale Verbindung zum Differentiallocus vorliegt oder nicht. Unter der Annahme, dass alle Gene des Donor- und Rezipientenstammes polymorph sind, werden diejenigen Tiere, die aus dem initialen Outcross resultieren, Genome tragen, die ausschließlich heterozygote Loci aufweisen. In denjenigen Genomteilen, die keine Linkage zum Differentiallocus haben, wird jedes Backcrossing den Anteil heterozygoter Loci um 50% reduzieren. Folglich kann bezüglich der Loci ohne Linkage zum Differentialgen für eine bestimmte Backcrossgeneration  $n$  der Anteil an Heterozygotität durch die Formel  $0.5^{n-1}$  berechnet werden. Gemäß dieser Formel werden kongene Tiere, die für 10 Generationen ( $n=10$ ) mit dem Rezipienten-Inzuchtstamm gekreuzt wurden, 0.20% heterozygoter Loci an jenen Stellen des Genoms tragen, die ohne Linkage zur Differentialregion sind. Dieser Wert wird allgemein als akzeptabel bewertet. Die Kontaminationsrate kongener Stämme durch Donorstammallele ist jedoch an demjenigen Chromosom, das den Differentiallocus trägt, kritischer zu bewerten. Dieses Chromosom wird, zusammen mit der eigentlichen Differentialregion, ein chromosomales Fragment des Donorstammes erwerben, das eine beträchtliche Größe aufweist. Die Größe des Segmentes  $L_n$  (in cM) kann für eine bestimmte Anzahl  $n$  von Kreuzungen zum Rezipienteninzuchtstamm nach folgender Formel abgeschätzt werden (Flaherty, 1981):

$$L_n \text{ (cM)} = 200 \times (1 - 2^{-n})/n$$

Für alle Werte, in denen  $n$  größer als 5 ist, kann diese Formel vereinfacht werden zu (Bartlett and Haldane, 1935):

$$L_n = 200/n$$

Beide angegebenen Formeln basieren auf der Annahme, dass der Differentiallocus sich nicht am chromosomalen Ende befindet. Mit Hilfe der Formeln kann die Größe des chromosomalen Donorsegments, das den Differentiallocus flankiert, abgeschätzt werden. Für kongene Stämme, die für 10 bzw. 20 Generationen mit dem Rezipienten-Inzuchtstamm gekreuzt wurden, ergeben sich Werte von 20 cM bzw. 10 cM. Bei einer Größe des Maus- bzw. Rattengenoms von 1650 cM bzw. 2250 cM, entspricht dies immerhin ca. 1.0 % bzw. 0.5 % des kongenen Genoms.

Die aufgeführten Kalkulationen zeigen, dass neu etablierte kongene Stämme ein beträchtliches Ausmaß an residualer genetischer Kontamination durch Donorstammallele tragen. Werden kongene Stämme durch weiteres Backcrossing propagiert, so wird diese Kontaminationsrate weiter abnehmen. In solchen Fällen jedoch, in denen kongene Stämme durch Bruder x Schwester Inzuchtung weitergezüchtet werden, werden diese heterozygoten Loci zum Teil fixiert werden. Da die Donor- und Rezipientenstammallele heterozygoter Loci eine gleiche Fixierungswahrscheinlichkeit aufweisen, werden 50% der Loci durch unerwünschte Donorstammallele besetzt werden. Diese kontaminierenden Donorstammregionen werden über das gesamte Genom kongener Tiere, die durch Vollgeschwisterverpaarung propagiert werden, verteilt sein. Sie werden als sogenannte „Passenger Loci“ bezeichnet. Von wesentlich größerer Bedeutung ist jedoch, dass in allen kongenen Stämmen eine beträchtliche Kontamination vorliegt, die durch das den Differentiallocus flankierende Donor-Chromosomenfragment verursacht wird. Es ist deshalb wichtig zu wissen, dass kongene Stämme keineswegs koisogenen Stämmen entsprechen. Ein koisogener Stamm unterscheidet sich vom Partnerstamm lediglich bezüglich eines einzigen genetischen Locus. Deshalb können in koisogenen Stammsystemen gefundene phänotypische Unterschiede eindeutig auf den Differentiallocus zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich ein kongener Stamm vom Rezipienteninzuchtstamm nicht nur bezüglich des Differentiallocus, sondern auch bezüglich der Passenger Loci sowie bezüglich einer Vielzahl von Donorstammallele, die sich in dem den Differentiallocus flankierenden Donor-Chromosomensegment befinden. Deshalb müssen phänotypische Unterschiede, die in kongenen Stammsystemen beobachtet wurden, nicht notwendigerweise durch das Differentialallel verur-

sacht sein; sie können ebenfalls die Folge der residualen Kontamination durch Donorstammallele darstellen.

### **Situation der Geschlechtschromosomen bei kongenen Stämmen**

Ein Faktor, der bei der Herstellung kongener Stämme berücksichtigt werden muss, ist die spezielle Situation der Geschlechtschromosomen. Wenn sich der Differentiallocus auf einem Autosom befindet, muss die Einführung beider Heterosomen des Rezipienten-Inzuchtstammes durch sorgfältige Auswahl des Geschlechts der Verpaarungspartner, die zum Outcrossing und Backcrossing verwandt werden, gewährleistet werden. Während beim initialen Outcross männliche Tiere des Rezipienteninzuchtstammes mit Donorstammweibchen verpaart werden, werden in den nachfolgenden Backcrossen Rezipientenstammweibchen mit männlichen Trägern des Differentiallocus angepaart. Diese Geschlechterkombination garantiert einerseits, dass das Y-Chromosom des Rezipientenstammes beim initialen Outcross in den kongenen Stamm eingeführt wird und bei allen nachfolgenden Backcrossen erhalten bleibt. Andererseits gewährleistet die Auswahl männlicher Trägertiere des Differentiallocus zur Durchführung der weiteren Backcrosse zum Rezipienten-Inzuchtstamm, dass der kongene Stamm nicht-rekombinierte X-Chromosomen des Rezipientenstammes erhält. Wenn der Differentiallocus, der auf einen neuen kongenen Stamm übertragen werden soll, sich auf einen X-Heterosom befindet, muss das Backcrossing durchgeführt werden, indem weibliche Trägertiere des Differentiallocus mit Männchen des Rezipienteninzuchtstammes angepaart werden. Diese Modifikation des Zuchtschemas ermöglicht meiotische Rekombinationen zwischen Donor- und Rezipientenstamm X-Chromosomen. Würde das Zuchtschema für autosomal-gebundene Differentialloci angewandt werden, um X-chromosomal gebundene Allele zu übertragen, so würden die resultierenden Tiere das gesamte X-Chromosom des Donorstammes tragen. Solche Stämme werden als konsomisch bezeichnet. Die Etablierung eines konsomischen Stammes ist in solchen Fällen unvermeidbar, in denen ein Y-chromosomal gebundener Differentiallocus auf einen neuen Rezipientenstamm übertragen werden soll.

### **5.6 Sogenannte “Speed-kongene“ Stämme**

“Konventionelle“ kongene Stämme werden erzeugt, indem Trägertiere des Differentiallocus für mindestens 10 aufeinander folgende Generationen auf einen Rezipienteninzuchtstamm gekreuzt werden. Da die Generationszeit von Maus und Ratte etwa 3 Monate beträgt, beansprucht die Erzeugung eines konventionellen kongenen Stammes folglich eine Zeitspanne von ca. 3 Jahren. Dieser beträchtliche Zeitfaktor spornte zu Überlegungen an, wie kongene Stämme durch den Einsatz

zusätzlicher Selektionskriterien eventuell in kürzerer Zeit erzeugt werden könnten. Das solchen Überlegungen zugrunde liegende Konzept besteht darin, nicht nur positiv auf die Transmission der Differentialregion, sondern zusätzlich negativ gegen die Übertragung unerwünschter Donorgene zu selektieren. Diese zusätzliche negative Selektion erfordert eine genügend große Anzahl genetischer Polymorphismen zwischen Donor- und Rezipientenstamm. Die Polymorphismen müssen zusätzlich so beschaffen sein, dass sie schnell und ökonomisch bestimmt werden können. Mit der Entdeckung von Mikrosatellitenmarkern (Miesfeld et al, 1981, Hamada et al, 1982) konnte ein genomisches Element ausgemacht werden, das all die oben aufgeführten Kriterien erfüllt. Mikrosatelliten, die auch als "Simple Sequence Repeats (SSR)" bezeichnet werden, bestehen aus Tandem-Wiederholungen von DNA-Grundmotiven, die aus 2 bis 4 Basenpaaren aufgebaut sind. Mikrosatelliten finden sich sehr häufig in allen Säugergenomen und zeigen einen extremen intraspezifischen Polymorphismus, der durch die Anzahl an Wiederholungen des zugrundeliegenden DNA-Motivs charakterisiert ist. Wichtigerweise können Mikrosatelliten-Polymorphismen sehr leicht durch PCR-Amplifikation des gesamten Locus detektiert werden. Dazu werden Primer eingesetzt, die homolog zu den spezifischen DNA-Sequenzen sind, die den Locus flankieren. Variationen in der Länge der PCR-Produkte, die als "Simple Sequence Length Polymorphisms (SSLPs)" bezeichnet werden, können leicht durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Mikrosatelliten haben sich als ein ideales genetisches Werkzeug herausgestellt, um die Erzeugung kongener Stämme zu beschleunigen. Mittels Computersimulationen (Weil et al, 1997, Markel et al, 1997) konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz selektiver Zuchtstrategien, die auf der Auswertung von Mikrosatelliten-Polymorphismen basieren, kongene Nagerstämme in deutlich weniger Generationen hergestellt werden können, als dies beim Backcrossing ohne negative Selektion der Fall wäre. Lander and Schork (1994) haben für derartige beschleunigt hergestellte kongene Stämme den Terminus "Speed-Kongene" eingeführt. Während "speed-kongene" Mausstämme heute bereits routinemäßig erzeugt werden (Serreze et al, 1996), ist die Herstellung "speed kongener" Rattenstämme noch unüblich. Die Technik wird sich jedoch in demselben Ausmaß bei der Ratte durchsetzen, in dem geeignete Mikrosatelliten-Marker für diese Spezies charakterisiert werden. Kürzlich haben James and Lindpaintner (1997) eine Vielzahl von Internetadressen publiziert, in denen detaillierte Informationen über Ratten-Mikrosatelliten verfügbar sind.

## 5.7 Segregierende Inzuchtstämme

Koisogene und kongene Stämme werden häufig durch Bruder x Schwester Inzuchtung propagiert. Manchmal führt jedoch die Homozygotität des interessierenden Differentialgens solcher Stämme zur Beeinträchtigung der Fertilität oder Lebensfähigkeit. In diesen Fällen kann der Stamm ebenfalls durch Vollgeschwister-Verpaarung geführt werden; das Differentialgen wird jedoch in einen heterozygoten Status gezwungen. Heterozygotität kann einerseits entweder durch Backcrossing oder durch Intercrossing erzwungen werden. Beim Backcrossing werden heterozygote und homozygote Träger des Differentialgenes untereinander gepaart; beim Intercrossing werden heterozygote Träger gekreuzt. Ein Beispiel eines segregierenden Inzuchtstammes sind kongene Mäuse, die das rezessive *nu*-Allel tragen, das eine Immunodefizienz (T-Zelldefekt) induziert. Da *nu/nu* Weibchen häufig Probleme bei der Jungenaufzucht haben, wird dieser Stamm in vielen Fällen derart propagiert, dass homozygote *nu/nu* Männchen mit heterozygoten *nu/+* Weibchen verpaart werden.

## 5.8 Hybriden

Hybriden werden erzeugt, indem Angehörige zweier unterschiedlicher Inzuchtstämme miteinander verpaart werden (Outcrossing). Folglich tragen Hybriden je einen haploiden Chromosomensatz von jedem Parentalstamm. Da das X- bzw. das Y-Chromosom männlicher Hybriden ausschließlich von maternalen bzw. paternalen Parentalstamm abstammt, ist bei Hybriden anzugeben, welcher Inzuchtstamm als paternaler bzw. maternaler Elternstamm verwandt wurde. Das spezifische Genom eines F1-Hybriden kann nur erzeugt werden, indem die parentalen Inzuchtstämme untereinander verpaart werden. Folglich ist es erforderlich, dass die zur Herstellung von Hybriden erforderlichen Parentalstämme ständig zur Verfügung stehen. Werden F1-Hybriden untereinander verpaart (Intercrossing), führen zufällige Segregation und unabhängige Vererbung heterozygoter Loci zu F2-Tieren, die im Gegensatz zum F1-Hybriden nicht mehr genetisch einheitlich sind.

Ingezüchtete Tiere und Hybriden zeigen beide die Eigenschaft der genetischen Uniformität (Isogenität). Im Gegensatz zum hohen Ausmaß an Homozygotität, das für ingezüchtete Tiere charakteristisch ist, zeigen Hybriden jedoch ein starkes Maß an Heterozygotität. Für eine Vielzahl von Merkmalen und Spezies zeigen ingezüchtete Tiere eine stärkere phänotypische Variation im Vergleich zu nicht-ingezüchteten Individuen (Livesay, 1930, Hyde, 1973). Bezüglich solcher Merkmale stellen Hybriden eine geeignete Alternative zu den Inzuchttieren dar, da sie die Faktoren der genetischen Einheitlichkeit und der geringeren Merkmalsvariabilität kombinieren. Ein

anderer Grund für den verbreiteten Einsatz von Hybriden in der biomedizinischen Forschung liegt in ihrer hohen Viabilität und Fertilität im Vergleich zu ingezüchteten Tieren.

### 5.9 Rekombinante Inzuchtstämme

Das Zuchtschema zur Erzeugung rekombinanter Inzuchtstämme (RI) beginnt mit einem Outcrossing von zwei bekannten Inzuchtstämmen, die als Progenitorstämme bezeichnet werden. Die resultierenden F1-Hybriden werden untereinander verpaart (Intercrossing), um eine große Anzahl von F2-Tieren zu erzeugen. Die F2-Tiere werden nun jeweils in zufälliger Weise paarweise miteinander verpaart. Jedes Paar dient dabei als Begründer eines neuen Inzuchtstammes. Folglich müssen die Nachkommen jedes gesetzten F2-Paares getrennt gehalten werden und zwei dieser Tiere werden in zufälliger Weise ausgesucht, um die erste Generation einer konsekutiven Bruder x Schwester Inzucht zu begründen. Zwanzig aufeinanderfolgende Generationen Vollgeschwisterverpaarung müssen mit den Nachkommen jedes einzelnen F2-Paares durchgeführt werden, um den resultierenden Stamm als RI-Stamm bezeichnen zu können. Das beschriebene Zuchtschema wird für eine bestimmte Kombination an Progenitorstämmen eine breite Palette neuer RI-Stämme erzeugen. Unterschiedliche RI-Stämme, die mit denselben Progenitorstämmen erzeugt wurden, werden demselben RI-Stammset zugesprochen. Jeder Stamm eines bestimmten RI-Sets wird vielfach rekombinierte Chromosomen tragen, die jeweils aus Fragmenten beider Progenitorstämme zusammengesetzt sind. Wichtigerweise trägt jeder einzelne Stamm des RI-Sets ein einheitliches Muster an chromosomalen Rekombinationen, das bei der weiteren Propagierung des Stammes durch Vollgeschwisterpaarung stabil vererbt wird. Es ist das Verdienst von Donald Bailey, die enorme Bedeutung rekombinant ingezüchteter Stämme für genetische Analysen erkannt zu haben (Bailey, 1971, Bailey 1981). Das wichtigste Einsatzgebiet von RI-Stämmen liegt in der Bestimmung von chromosomalen Positionen sowie in Linkage-Analysen. Um den genauen Genlocus eines neu klonierten Gens zu bestimmen (mapping) werden die Progenitorstämme existierender RI-Sets daraufhin untersucht, ob ein Polymorphismus des interessierenden Gens vorliegt. Gelingt es, für die Progenitoren eines RI-sets alternative Allele zu diskriminieren, so werden alle RI-Stämme dieses Sets typisiert. Prinzipiell sollten 50% der RI-Stämme das eine und 50% das andere Allel tragen. Das Resultat dieser Analyse wird als Stammverteilungsmuster (strain distribution pattern = SDP) des spezifischen Locus bezeichnet. Das SDP eines einzelnen Locus ist noch nicht informativ. Je mehr SDPs jedoch für ein bestimmtes Set von RI-Stämmen vorliegen, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein neues Gen kartiert werden kann, indem das Locus-spezifische SDP mit dem von bekannten Genen verglichen wird. Geeignete Computerprogramme zur Analyse solcher Fragestellungen sind verfügbar (Manly,

1993). Werden die SDPs zweier definierter Loci zur Durchführung einer Linkage-Analyse miteinander verglichen, so wird das Resultat üblicherweise durch die Begriffe Konkordanz und Diskordanz beschrieben. Zwei unterschiedliche genetische Loci werden innerhalb eines bestimmten RI-Stammsets als konkordant angesehen, wenn diese Stämme ausschließlich Allele des einen Progenitorstammes tragen. Trägt ein bestimmter RI-Stamm Allele beider Progenitoren, so werden diese Loci als diskordant bezeichnet. Für eine bestimmte Kombination nicht-verbundener Gene sollten jeweils 50% der RI-Stämme eines bestimmten Sets Konkordanz bzw. Diskordanz aufweisen. Andererseits sollten bei zwei Loci, die sehr nahe auf einem Chromosom zusammenliegen, etwa 100% der RI-Stämme eines bestimmten Sets Konkordanz und fast keine Stämme Diskordanz aufweisen. Für Loci, die weniger nahe beieinanderliegen, sollten sich dazwischenliegende Werte für Konkordanz und Diskordanz ergeben. Die Termini N und i bezeichnen die Gesamtzahl an RI-Stämmen, die auf Diskordanz untersucht wurden sowie die Anzahl an tatsächlich diskordanten Stämmen. Der Anteil  $R = i/N$  bezeichnet die Diskordanzebene, die in einem oder mehreren Sets von RI-Stämmen ermittelt wurde. Wichtigerweise reflektiert die Diskordanzebene, die für zwei bestimmte Loci in RI Sets ermittelt wurde, die mittlere Entfernung der beiden Loci. Nach Haldane and Weddington (1931) kann die Wahrscheinlichkeit für eine Rekombination zwischen zwei verbundenen Loci r, die ja ein direktes Maß für den genetischen Abstand der beiden Loci darstellt, nach folgender Formel errechnet werden:

$$r = R / (4-6R)$$

Diese Formel erlaubt die direkte Abschätzung des Abstandes zweier genetischer Loci (in cM/100) durch die Bestimmung des Diskordanzanteils R, der in einem oder in mehreren Sets von RI-Stämmen auftritt. Zur weiteren Information über RI-Stämme empfehlen wir die hervorragende Publikation von Silver (1995).

### **5.10 Ausgezüchtete Stocks (Auszuchtstämme)**

Bei Auszuchtstämmen soll eine breite genetische Variabilität aufrechterhalten und so die genetische Situation einer natürlichen Population nachgeahmt werden. Ausgezüchtete Tiere werden üblicherweise eingesetzt, um pharmakologische Wirkungen von Testsubstanzen zu evaluieren sowie das toxikologische Potential von Chemikalien zu prüfen. Ausgezüchtete Stämme können ebenfalls als Ausgangsmaterial für Selektionsexperimente dienen. Bei der Zucht von Auszuchtstämmen müssen folgende Punkte berücksichtigt werden:

- 1) Auszuchtstämme müssen als geschlossene Population propagiert werden. Das unkontrollierte Einbringen neuer Tiere und somit neuer genetischer Information in solche Populationen ist nicht zulässig.
- 2) Der Verlust von Allelen aus dem ursprünglichen Genpool des Auszuchtstamms muss auf ein minimales Maß reduziert werden.
- 3) Innerhalb eines Auszuchtstamms muss die Bildung von Sublinien mit deutlichen Unterschieden der Allelfrequenzen vermieden werden.

Das Ausmaß, in dem Allelverlust und Sublinienbildung vermieden werden können, wird durch folgende Parameter bestimmt (Rapp, 1972):

**Populationsgröße:** Der Faktor, der primär für die Abnahme der durchschnittlichen Heterozygotität verantwortlich ist, ist die sogenannte effektive Populationsgröße. Diese wird definiert als die Anzahl an Zuchttieren, die tatsächlich Nachkommen für die nächste Zuchtgeneration liefern. Durch die Anwendung von Computersimulationen konnte Eggenberger (1973) zeigen, dass eine effektive Populationsgröße von 400 Tieren erforderlich ist, um den Verlust von Allelen aus dem Genpool eines Auszuchtstamms auf ein zu vernachlässigendes Maß zu reduzieren. Es sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass ein einmal in einem ausgezüchteten Genpool stattgefundenen Allelverlust nicht durch Zuchtmaßnahmen kompensiert werden kann. Deshalb ist die Sanierung des Hygienestatus kontaminierter Auszuchtstämme durch die Technik des Embryotransfers aus genetischer Sicht kritisch zu bewerten. Da die Anzahl an übertragenen Embryonen meist limitiert ist, ist bei solchen Anlässen häufig ein Flaschenhalseffekt der Populationsgröße zu beobachten, der zu einer kritisch zu beurteilenden Zunahme der durchschnittlichen Homozygotität des Stammes führt.

**Generationenfolge:** Da der Verlust von Allelen aus dem Genpool eines Auszuchtstamms beim Generationenwechsel stattfindet, sollten die Zuchtpaare so selten wie möglich ausgetauscht werden. Durch diese Maßnahme kann der Prozess der kontinuierlichen Abnahme der durchschnittlichen Heterozygotität der Auszucht-Population signifikant abgebremst werden.

**Auswahl der Zuchttiere:** Die künstliche Selektion auf spezifische Phänotypen muss bei der Zucht von Auszuchtstämmen strikt vermieden werden (Eggenberger, 1973). Falls starke Selektionskräfte wirken, werden innerhalb weniger Zuchtgenerationen bestimmte Allele im Genpool des Auszuchtstamms fixiert. Diese Regel gilt auch bezüglich des Züchterfolgs und der Wachstumsgeschwindigkeit. Obwohl eine Selektion bei diesen Parametern aus ökonomischer Sicht natürlich sehr attraktiv ist, darf dies keine Zielsetzung bei der Zucht eines standardisierten Auszuchtstamms sein.



**Zuchtsystem:** In der Vergangenheit wurden eine Vielzahl von Zuchtsystemen auf ihre Tauglichkeit überprüft, ein hohes Maß an durchschnittlicher Heterozygotität innerhalb einer Population zu bewahren.

Bei der randomisierten Zucht oder Zufallszucht werden neue Zuchttiere in zufälliger Weise aus dem Nachkommenpool ausgesucht. Dies bedeutet, dass jedes Tier eine gleich große Chance auf Anpaarung mit einem anderen Tier der Population hat (Falconer, 1989). Die Verpaarung von nahen Angehörigen kann dabei prinzipiell nicht vermieden werden, was jedoch zu einem starkem Inzucht-bedingten Heterozygotitätsverlust der Population führt. Aus diesem Grunde kann die Zufallsverpaarung nicht als Zuchtverfahren zum Propagieren von Auszuchtstämmen empfohlen werden.

Das Zuchtsystem der Pedigrierung basiert auf der maximalen Vermeidung von Inzucht durch die Verpaarung wenig verwandter Tiere (Wright, 1921). Diese pedigrierten Systeme erfordern Kenntnisse über den Verwandtschaftsgrad der Paarungspartner; folglich muss ein Stammbaum (Pedigree) der Kolonie geführt werden, was ein sehr arbeitsintensives Unterfangen darstellt. Es hat sich gezeigt, dass pedigrierte Zuchtsysteme zwar eine geringe initiale Verlustrate der durchschnittlichen Heterozygotität aufweisen; dass die Homozygotierate der Population jedoch mit steigender Generationenzahl deutlich zunimmt. Deshalb sind pedigrierte Zuchtsysteme nicht für Auszuchtstämme geeignet.

Als zur Minimierung des Heterozygotitätsverlusts von Auszuchtstämmen optimale Zuchtverfahren haben sich sogenannte Rotationszuchtsysteme erwiesen. Bei diesen Zuchtverfahren werden die Zuchtpartner nicht nach dem Prinzip der Randomisierung oder Pedigrierung ausgewählt, sondern mit Hilfe eines mathematischen Schemas festgelegt.

Als sehr simples Rotationszuchtverfahren kann das sogenannte "circular-pair-mating" System (Kimura and Crow, 1963) angesehen werden, das in der nachfolgenden Tabelle 3.1 erläutert wird.

		<b>n (Anzahl der Zuchtpaare)</b>							
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>4</b>	<b>F1</b>	4/1	1/2	2/3	3/4				
	<b>F2 etc</b> <b>(wie F1)</b>	<b><u>4/1</u></b>	1/2	2/3	3/4				
<b>5</b>	<b>F1</b>	5/1	1/2	2/3	3/4	4/5			
	<b>F2 etc</b> <b>(wie F1)</b>	5/1	1/2	2/3	3/4	4/5			
<b>6</b>	<b>F1</b>	6/1	1/2	2/3	3/4	4/5	5/6		
	<b>F2 etc</b> <b>(wie F1)</b>	6/1	1/2	2/3	3/4	4/5	5/6		

**Tabelle 5.1 “Circular pair mating” nach Kimura and Crow (1963)**

Dieses Zuchtsystem arbeitet mit Zuchtpaaren, die ständig (permanent) verpaart bleiben. Jeder Zuchtkäfig erhält eine Nummer n. Die Anzahl an Zuchtpaaren bzw. Zuchtkäfigen wird beim Generationenwechsel konstant gehalten. Das Zuchtschema ist für 4 (obere 2 Zeilen), 5 (mittlere 2 Zeilen) und 6 (untere 2 Zeilen) Zuchtpaare aufgeführt. F charakterisiert die jeweilige Generation. Die Felder der Tabelle bestehen aus Kombinationen von Käfignummern. Dabei spezifiziert die erste bzw. zweite Zahl die Nummer der Zuchtkäfige der vorhergehenden Generation, aus denen beim Generationenwechsel die neuen Männchen bzw. Weibchen zu rekrutieren sind. So bedeutet beispielsweise die in der Tabelle fett und unterstrichen dargestellt Zahlenkombination **4/1**, dass das Zuchtpaar 1 der Generation F2 rekrutiert wird, indem ein männlicher Nachkomme aus dem Zuchtkäfig 4 der vorherigen Generation mit einem weiblichen Nachkommen aus dem Zuchtkäfig 1 der vorherigen Generation verpaart wird.

Obwohl das circular-pair-mating System durchaus praktikabel ist, wird es selten eingesetzt, um Auszuchtpopulationen zu propagieren. Rotationszuchtsysteme, die üblicherweise zur Zucht von Auszuchtstämmen eingesetzt werden, sind das System nach Poiley (Poiley, 1960), das System nach Robertson (Falconer 1967), das System nach Falconer (Falconer 1967) und das Han-Rotationssystem (Rapp, 1972). Diese vier Systeme sind dadurch charakterisiert, dass die Auszuchtpopulation in eine Anzahl gleich großer Blöcke unterteilt wird. Während bei den anderen

drei Systemen die Anzahl an Blöcken frei gewählt werden kann, erlaubt das System von Robertson nur die Auswahl von 4 oder 8 oder 16 oder 32 etc Blöcken. Die Gesamtanzahl an Blöcken wird für alle nachfolgenden Generationen konstant gehalten. Ein einzelner Block besteht aus einer gleichgroßen Anzahl an männlichen und weiblichen Zuchttieren, wie z.B. ein einzelnes Zuchtpaar oder üblicherweise einer Vielzahl von Zuchtpaaren. Um Zuchttiere für die nächste Generation zur Verfügung zu stellen, muss die Nachkommenschaft eines Blocks streng von den Nachkommen eines anderen Blocks getrennt werden. Die einzelnen Rotationszuchtssysteme legen nun Regeln fest, wie beim Übergang von einer Zuchtgeneration auf die nachfolgende neue Zuchttiere für einen bestimmten Zuchtblock aus der Nachkommenschaft der vorgehenden Blockgeneration zu rekrutieren sind. In der nachfolgenden Tabelle 3.2 wird das Han-Rotationssystem vorgestellt. Den an den Rotationszuchtssystemen nach Poiley, Robertson und Falconer interessierten Leser verweisen wir auf Zimmermann et al. (1990).

		<b>m (Zuchtblöcke)</b>							
	<b>F</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>5</b>	<b>F1</b>	5/1	1/2	2/3	3/4	4/5			
	<b>F2</b>	4/1	5/2	1/3	2/4	3/5			
	<b>F3</b>	2/1	3/2	4/3	5/4	1/5			
	<b>F4</b>	3/1	4/2	5/3	1/4	2/5			
	<b>F5</b> <b>(wie F1)</b>								
<b>6</b>	<b>F1</b>	6/1	1/2	2/3	3/4	4/5	5/6		
	<b>F2</b>	5/1	<u>6/2</u>	1/3	2/4	3/5	4/6		
	<b>F3</b>	3/1	4/2	5/3	6/4	1/5	2/6		
	<b>F4</b> <b>(wie F1)</b>								

**Tabelle 5.2 Han-Rotationssystem nach Rapp (1971)**

Das System ist für  $m = 5$  Blöcke (obere 4 Zeilen) und  $m = 6$  Blöcke (untere 3 Zeilen) dargestellt. F charakterisiert die jeweilige Zuchtgenerationen. Die Zellen der Tabelle gibt Kombinationen von Blocknummern wieder. Die erste bzw. die zweite Nummer der Zahlenkombination spezifiziert, von welchen Blöcken der vorhergehenden Generation männliche bzw. weibliche Zuchttiere zu rekrutieren sind. So bedeutet beispielsweise die in der Tabelle fett und unterstrichen dargestellte Zahlenkombination 6/2, dass der Zuchtblock 2 der Generation F2 rekrutiert wird, indem

männliche Nachkommen des Zuchtblocks 6 der vorherigen Generation mit weiblichen Nachkommen des Zuchtblocks 2 der vorherigen Generation verpaart werden.

Eggenberger (1973) konnte zeigen, dass das Rotationszuchtssystem von Poiley, das System von Robertson, das System von Falconer und das Han-Rotationssystem in gleicher Weise geeignet sind, um ein hohes Maß an durchschnittlicher Heterozygotität in Auszuchtstämmen zu konservieren. Das Rotationssystem nach Poiley kann jedoch nicht empfohlen werden, da es zur Bildung von Sublinien führt.

### **5.11 Embryotransfer bei der Spezies Maus**

In modernen Maus- und teilweise auch in Rattenhaltungen spielt die Technik des Embryotransfers eine herausragende Rolle (Hogan et al., 1994). Bei dieser Methode werden von Spendertieren Embryonen gewonnen, die dann *in vitro* zur Durchführung embryonaler Manipulationen zur Verfügung stehen. Die für die biomedizinische Forschung wohl wichtigste embryonale Manipulation besteht darin, gentechnische Veränderungen in murine Embryonen einzubringen. Aus solchen Experimenten resultieren entweder transgene Tiere oder sogenannte „knock-out“ bzw. „knock-in“ Mäuse“. Da es nicht möglich ist, die Embryonen nach erfolgter Manipulation *in vitro* zu einem lebensfähigen Tier zu kultivieren, müssen sie zur Weiterentwicklung wieder in dieselbe Umgebung zurückgebracht werden, der sie auch entnommen wurden: den weiblichen Reproduktionstrakt. Bei den Spezies Maus und Ratte erfolgt der Embryotransfer auf scheinträchtige (pseudogravide) Empfängerweibchen. Der Transfer erfolgt bei diesen Spezies im Rahmen eines operativen Eingriffs, bei dem die Bauchhöhle eröffnet wird. Da die Spezies Maus in der biomedizinischen Forschung eine herausragende Rolle spielt, werden nachfolgend die Technik und die Anwendungsgebiete des Embryotransfers für diese Spezies aufgeführt.

#### **Gewinnung von Embryonen:**

Zur Gewinnung von Mausembryonen sind weibliche Spendertiere und zeugungsfähige (fertile) Böcke notwendig. Die Spenderweibchen werden üblicherweise mit Hormonen behandelt, um einerseits zuverlässig eine Ovulation auszulösen (Zyklussynchronisation) und um andererseits eine möglichst erhöhte Ovulationsrate („Superovulation“) auszulösen. Häufig werden noch nicht geschlechtsreife Mausweibchen mit Hormonen behandelt. Zur Hormonbehandlung kommen Substanzgemische zum Einsatz, die als PMSG (pregnant mare serum gonadotrophin) und HCG (human chorionic gonadotrophin) bezeichnet werden. PMSG enthält vorwiegend Follikel-Stimulierendes-Hormon (FSH), HCG vorwiegend Luteinisierendes-Hormon (LH). Zur Hormon-

behandlung werden die Tiere zunächst mit PMSG und 48 Stunden später mit HCG behandelt. Dabei werden jeweils 5-10 Einheiten (Units) der Hormonpräparate intraperitoneal verabreicht. Die Injektionszeitpunkte müssen mit dem Licht/Dunkel-Rhythmus der Tierhaltung abgestimmt werden. Die Verabreichung erfolgt etwa zur Mitte der Helligkeitsperiode. Nach der HCG-Injektion werden die Weibchen mit den fertilen Männchen verpaart. In der kommenden Dunkelperiode erfolgen Ovulation und Begattung. Die Begattung kann anhand eines sogenannten Vaginalpfropfes erkannt werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass das Ejakulat von Nagetieren aufgrund der besonderen Zusammensetzung der Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen in der weiblichen Scheide koaguliert und temporär einen Vaginalpfropf bildet. Der erste Tag nach der Dunkelperiode, in der Ovulation und Begattung stattgefunden haben, wird üblicherweise als Tag 0,5, der zweite als Tag 1,5 u.s.w. bezeichnet. An den Tagen 0,5 bis 2,5 der Trächtigkeit (Gravidität) können die Embryonen aus dem Eileiter (Ovidukt) gespült werden, wobei sich die Embryonen an Tag 0,5 bis zum 1-Zellstadium, am Tag 1,5 bis zum 4-Zellstadium und am Tag 2,5 bis zum 8-Zellstadium entwickeln. An den Tagen 3,5 und 4,5 können die Embryonen aus der Gebärmutter (Uterus) gewonnen werden. Solche Embryonen haben ein fortgeschritteneres Entwicklungsstadium (Morula, Blastozyste) erreicht. Zur Embryonengewinnung müssen die Spendermäuse getötet werden. Die Stammeszugehörigkeit der Spendertiere richtet sich nach der Fragestellung des jeweiligen Experiments. Zur Herstellung von transgenen Tieren durch DNA-Injektion in 0,5 Tage alte Embryonen werden üblicherweise FVB-Inzuchttiere oder (B6 x DBA/2)F1 Hybriden herangezogen. Zur Herstellung von Knockout-Tieren werden meist B6-Embryonen eingesetzt.

### **Übertragung von Embryonen auf Empfängerweibchen:**

Um geeignete Empfängerweibchen für Embryotransfers bei der Maus zur Verfügung zu stellen, sind scheinträchtige (pseudogravide) Empfängerweibchen und zeugungsunfähige (sterile oder vasktomierte) Böcke notwendig. Als Empfängerweibchen bei Embryotransfers kommen ganz allgemein nur solche Weibchen in Frage, deren Geschlechtsorgane sich in einem geeigneten Stadium befinden. Im Maussystem kann die Weiterentwicklung der Embryonen gewährleistet werden, indem pseudogravide Tiere als Empfänger eingesetzt werden. Hormon-behandelte Mausweibchen stellen ungeeignete Embryonenempfänger, da diese Behandlung zu einer Hyperstimulation des weiblichen Genitaltrakts führt und die embryonale Implantation beeinträchtigt. Scheinträchtige Mäuse werden erzeugt, indem Weibchen mit natürlichem Zyklus mit vasktomierten Männchen verpaart werden. Nur solche Weibchen, die sich im Östrus befinden tolerieren die Begattung. Da die Zykluslänge bei der Maus 4-5 Tage und die Östruslänge ca. 1 Tag betragen,

befinden sich ca. 20 – 25% einer Weibchenpopulation im Östrus. Bei östrischen Weibchen erfolgen Ovulation und Begattung in der Dunkelperiode nach Verpaarung. Die erfolgreiche Begattung kann wiederum am Vorhandensein eines Vaginal-Propfes erkannt werden. Der erste Tag nach der Dunkelperiode, in der Ovulation und sterile Begattung stattgefunden haben, wird als Tag 0,5 der Pseudogravidität bezeichnet. Beim Embryotransfer werden nur dann gute Angangsraten erzielt, wenn als Empfängerweibchen Tiere bestimmter Stämme eingesetzt werden. Als geeignet haben sich Auszuchtweibchen (z.B. NMRI) sowie (B6 x DBA/2)F1 Hybriden erwiesen.

### **Erzeugung vasktomierter Männchen**

Zur Vasektomie werden die Samenleiter des Männchens durchtrennt. Dazu muss die Bauchhöhle eröffnet werden. Da die Hoden nicht entfernt werden, wird unverändert männliches Sexualhormon, das Testosteron, gebildet. Die Samenflüssigkeit vasktomierter Männchen ist lediglich insofern verändert, als der Spermienanteil fehlt; die Libido wird durch den Eingriff nicht dauerhaft gestört. Nach der Vasektomie benötigen die Männchen jedoch eine mehrwöchige Erholungszeit, bis sie sich vollständig vom Eingriff erholt haben und wieder Interesse an Weibchen zeigen. Auch bei den vasktomierten Männchen ist die Stammeszugehörigkeit nicht gleichgültig. Die Verwendung von Auszuchttieren wie NMRI führt meist zu Problemen, da die Tiere frühzeitig verfetten. Als geeigneter haben sich (B6 x DBA/2)F1 Hybriden erwiesen.

### **Abstimmung von Spender- und Empfängerseite (Synchronisation des Embryotransfers):**

Mausembryonen, die 0,5, 1,5 oder 2,5 Tage alt sind, werden in den Eileiter (Ovidukt) von 0,5 Tage scheinträchtigen Ammen übertragen (Ovidukttransfer). Mausembryonen, die 3,5 oder 4,5 Tage alt sind, werden in die Gebärmutter (Uterus) von 2,5 Tagen scheinträchtigen Ammen übertragen (Uterustransfer). Die Einhaltung der aufgeführten Synchronisation ist sehr wichtig, um optimale Effizienzen zu erreichen. Die Transferkonstellation, die durchgeführt wird, ist abhängig von der Zielsetzung des Experiments. So werden zur Herstellung transgener Mäuse Embryonen an Tag 0,5 der Gravidität gewonnen, manipuliert (DNA-Injektion in den Pronukleus) und anschließend in Tag 0,5 scheinträchtige Weibchen übertragen. Zur Herstellung von „knock-in“ oder „knock-out“ Mäusen werden Embryonen an Tag 3,5 der Gravidität gewonnen, manipuliert (Injektion von gentechnisch veränderten embryonalen Stammzellen) und anschließend in Tag 2,5 scheinträchtige Weibchen übertragen. Zur Sanierung des Hygienestatus von Mausvarianten via Embryotransfer werden die Embryonen an Tag 1,5 akquiriert und in Tag 0,5 scheinträchtige Weibchen transferiert. Zur Kryokonservierung von Mausvarianten in Embryonenform werden

die Embryonen an Tag 1,5 entwickelt und weggefroren. Nach erfolgreichem Auftauen werden diese Embryonen in Tag 0,5 pseudogravide Empfänger übertragen.

### **Embryotransfer**

Beim Ovidukttransfer werden die Embryonen mit einer feinen Glaskapillare in die natürliche Öffnung des Eileiters eines Empfängertiers übertragen. Embryonen, die aus der Gebärmutter des Spenders gewonnen wurden, werden auch in die Gebärmutter der Amme übertragen. Hierzu wird die Gebärmutter mit einem feinen Instrument punktiert und die Embryonen mit Hilfe einer Glaskapillare übertragen. In der Regel werden diese Eingriffe beidseits durchgeführt, d.h. es werden Embryonen in linke(n) und rechte(n) Eileiter bzw. Gebärmutter transferiert. Die Anzahl der übertragenen Embryonen wird so gewählt, dass eine Wurfgröße von etwa 10 Tieren (in der Regel) nicht überschritten wird.

## **5.12 Anwendungsgebiete des Embryotransfers bei der Spezies Maus**

### **Embryotransfer als Maßnahme der Sanierung des Hygienestatus**

Zur Sanierung des Hygienestatus stehen prinzipiell zwei Methoden zur Auswahl. Einerseits können geburtsreife Jungmäuse einer kontaminierten Mutter unter sterilen Bedingungen durch Kaiserschnitt entwickelt werden (die Mutter wird bei diesem Vorgehen getötet). Die durch Kaiserschnitt entwickelten Jungtiere werden dann Ammen eines geeigneten Hygienestatus untergelegt. Neben dem Kaiserschnitt ist auch der Embryotransfer eine geeignete Methode, um einen Mäusestamm aus einer unhygienischen Tierhaltung in eine SPF- oder Gnotobiotik-Tierhaltung zu überführen. Dazu werden Embryonen des kontaminierten Stammes gewonnen und unter sterilen Bedingungen auf ein Empfängerweibchen der Gnotobiotik- oder SPF-Tierhaltung übertragen.

### **Kryokonservierung und Embryobanking**

Mäuse- und Ratten-Präimplantationsembryonen können unproblematisch in einer Art und Weise eingefroren werden, die mit hoher Effizienz eine Revitalisierung erlaubt (DaCruz, 1991). In Flüssigstickstoff eingelagerte Embryonen (Embryonenbank) benötigen wenig Platz sind vermutlich unbegrenzt haltbar. Mit Hilfe der Kryotechnik können „Backups“ von Mausvarianten hergestellt werden, die es erlauben, Stämme im Falle mikrobiologischer bzw. genetischer Kontaminationen auf adäquatem Hygieneniveau bzw. in der ursprünglichen Form zu reetablieren. Die Kryotechnik ermöglicht weiterhin, temporär nicht benötigte Mäuse- oder Rattenstämme ausschließlich in Embryonenform zu bewahren. In diesem Fall ist die Aufrechterhaltung einer Zuchtkolonie nicht

mehr erforderlich; mithin kann die Kryotechnik dazu beitragen, Haltungsressourcen effizienter zu nutzen.

### **Herstellung transgener Tiere**

Durch die Anwendung molekulargenetischer Methoden ist es heute unproblematisch möglich, neue funktionsfähige Gene (Transgene) *in vitro* zu erzeugen. Werden solche DNA-Konstrukte in geeigneter Form (linearisiert, geeigneter Puffer, geeignete Konzentration) in den Vorkern (Pronukleus) von 1-zelligen Maus- oder Rattenembryonen mikroinjiziert, so kommt es bei etwa 10 bis 40 % der derart manipulierten Embryonen zu einer stabilen Integration der Transgen-DNA in das Genom der Empfängertiere. Das chromosomale Integrationsereignis ist durch folgende Merkmale charakterisiert:

- Die Transgen-Integration findet i. d. R. an einer einzigen Integrationsstelle des Mausgenoms statt. Der chromosomale Ort der Transgen-Integration ist nicht vorhersagbar, d. h. die Integration erfolgt zufällig an einem beliebigen Ort des Mausgenoms.
- Es kommt i. d. R. zur Integration mehrerer Kopien des Transgens; bei Integration von mehrerer Kopien weisen diese i. d. R. eine head-to-tail Anordnung auf. Somit integriert zumeist ein Transgen-Konkatamer in das Mausgenom. Die Kopienzahl von Transgenen kann zwischen 1 und mehreren Hundert variieren.

Das charakteristische Integrationsereignis, das in einem bestimmten manipulierten Embryo stattfindet (charakterisiert durch einen spezifischen Integrationsort und eine bestimmte Kopienzahl) wird nach Weiterentwicklung des transgenen Embryos zur Geschlechtsreife stabil nach Mendelschen Regeln vererbt. Jeder Embryo, bei dem eine Transgen-Integration stattgefunden hat, begründet mithin einen eigenen Tierstamm. Es muss berücksichtigt werden, dass die Expression einer Transgensequenz in sehr starker Weise vom spezifischen Integrationsort und der Kopienanzahl beeinflusst. Hinzu kommt, dass durch die Transgenintegration eventuell die Funktion eines murinen Genes beeinträchtigt werden kann (Insertionsmutagenese). Diesen Fakten muss dadurch Rechnung getragen werden, dass mit einem spezifischen Transgenkonstrukt mehrere transgene Stämme erstellt werden. Sofern mehrere der etablierten Stämme einen spezifischen Effekt zeigen, kann mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass dieser auf der Transgenität beruht.



## **Herstellung von „knock-in“ und „Knock-out“ Tieren (derzeit nur bei der Spezies Maus verfügbar)**

Die Voraussetzung für die Herstellung von sogenannten knock-out und knock-in Tieren wurden durch die Entdeckung der homologen DNA-Rekombination und der Entwicklung embryonaler Stammzellen geschaffen.

Embryonale Stammzellen (ESC) werden aus frühen Embryonen (Präimplantationsembryonen) gewonnen und können *in vitro* propagiert werden. Sie besitzen die Fähigkeit, sich in jeden beliebigen Zelltyp (z.B. Herzzellen, Muskelzellen, Knorpelzellen, aber auch Keimzellen) differenzieren zu können, die als Pluripotenz bezeichnet wird. Dabei kann die Differenzierung der ESC durch Faktoren der Zellkultur entweder unterdrückt oder in Gang gesetzt werden. Werden undifferenzierte ESC in Embryonen, meist des Blastozystenstadiums, injiziert, beteiligen sie sich an der Organogenese. Dabei entstehen sogenannte chimäre Tiere, die von zwei unterschiedlichen Zelltypen gebildet werden, und zwar solchen, die sich aus den ESC gebildet haben, und solchen, die vom Empfängerembryo abstammen. Über die Herstellung von chimären Tieren kann das genetische Material der ESC in die Keimbahn von Tieren eingebracht werden.

Bei der homologen Rekombination kommt es zu einem DNA-Austausch zwischen identischen DNA-Bereichen (homologe Sequenzen). Wird also ein DNA-Konstrukt, welches homologe und nicht-homologe Sequenzen umfasst, in eine Zelle eingebracht, so kann es zu einer homologen Rekombinationsereignis kommen, bei dem die nicht-homologen Sequenzen in das Zellgenom eingeschleust werden. So können gezielt Gene inaktiviert oder verändert werden (gene targeting, Joyner et al., 1993). Da homologe Rekombinationen sehr selten sind, muss das Targeting-DNA-Konstrukt, welches zur Einleitung des Vorgangs in die Zellen eingeschleust wird, sogenannte Marker enthalten, die eine Vorselektion solcher Zellen erlauben, bei denen das gewünschte homologe Rekombinationsereignis tatsächlich stattgefunden hat.

Indem embryonale Stammzellen für homologe Rekombinationsexperimente eingesetzt werden, können gentechnisch veränderte Tiere generiert werden, bei denen spezifische Gene gezielt verändert wurden. Hierbei wird ein DNA-Konstrukt, mit dem das gewünschte Zielgen verändert werden soll, *in vitro* in die Zellen eingebracht (übliche Methode: Elektroporation). Mit Hilfe bestimmter Selektionstechniken kann nun *in vitro* festgestellt werden, welche ESC-Zellklone die gewünschte spezifische gentechnische Veränderung tragen. Diese Stammzellen werden in Empfängerembryonen injiziert. Die embryonalen Stammzellen und die Empfängerembryonen werden dabei so gewählt, dass unterschiedliche Fellfarbengene getragen werden. So können chimäre Tiere, bei denen sich die gentechnisch veränderten ESC an der Organogenese beteiligt haben, an der Zweifarbigkeit des Fells erkannt werden. Die Mehrzahl der heute bei der Spezies Maus ver-

fügbaren ESC stammen vom Inzuchtstamm 129 ab, der Träger des dominanten agouti-Fellfarbenallels ist. Gentechnisch veränderte ESC des Stamms 129 werden üblicherweise in Blastozysten des Inzuchtstammes C57BL/6, der das non-agouti-Fellfarbenallel trägt, injiziert. Die resultierenden Fellfarben-chimären Tiere werden dann auf C57BL/6 Tieren zurückgekreuzt. So können diejenigen Nachkommen der Fellfarbenschimären, die die gentechnische Veränderung in heterozygoter Weise tragen, wiederum anhand der Fellfarbe von den nicht gentechnisch veränderten Wurfgeschwistern unterschieden werden. Durch homologe Rekombination können Tierstämme erstellt werden, bei denen spezifische Gene entweder inaktiviert (knock-out) oder verändert (knock-in) wurden. Da Knock-out-Allele üblicherweise einen rezessiven Erbgang aufweisen, kommt es bei den heterozygoten gentechnisch veränderten Chimärennachkommen in der Regel noch nicht zur Ausbildung des Gendefekts. Meist wirkt sich die genetische Inaktivierung erst bei homozygoten Trägertieren aus.

### **Bewertung der Generierung gentechnisch veränderter Tiere nach Deutschem Tierschutzgesetz (TSchG)**

Im § 7 des Tierschutzgesetzes werden Tierversuche in folgender Weise definiert:

„Tierversuche im Sinne dieses Gesetzes sind Eingriffe oder Behandlungen zu Versuchszwecken

1. an Tieren, wenn sie mit Schmerzen, Leiden, oder Schäden für diese Tiere oder
2. am Erbgut von Tieren, wenn sie mit Schmerzen, Leiden oder Schäden für die erbgutveränderten Tiere oder deren Trägertiere verbunden sein können“

Diese Formulierung stellt klar, dass Eingriffe am Genom von Tieren dann Tierversuche darstellen, wenn sie zu Versuchszwecken durchgeführt werden und mit Schmerzen, Leiden oder Schäden der erbgutveränderten Tiere oder deren Trägertiere (Nachkommen) verbunden sind.

Selbstverständlich fallen alle Eingriffe an den zur Herstellung gentechnisch veränderter Tierstämme erforderlichen Embryonenspendern und Embryonenempfängern unter die Genehmigungspflicht. Eine gewisse Unsicherheit besteht jedoch bezüglich der neu generierten gentechnisch veränderten Tiere selbst. Da vor Beginn des Experiments nur schwer sicher ausgeschlossen werden kann, dass eine spezifische gentechnische Veränderung möglicherweise zu Schmerzen, Leiden oder Schäden der Trägertiere führt, werden üblicherweise die erste und zweite Generation neu hergestellter gentechnisch veränderter Tiere in den Schutzbereich der gesetzlichen Vorschriften über Tierversuche gestellt. Dabei geht der Gesetzgeber davon aus, dass diese beiden ersten Tiergenerationen dazu genutzt werden zu eruieren, ob eine Belastung der Trägertiere durch die

spezifische gentechnische Veränderung vorliegt. Die Weiterzucht der gentechnisch veränderten Tiere über die 2. Generation hinaus wird üblicherweise nicht mehr als Tierversuch sondern als Zuchtmaßnahme zum Erhalt des Tierstamms gewertet. Hierfür gelten die Bestimmungen des siebenten Abschnitts des Deutschen Tierschutzgesetzes Gesetzes, die sich auf die Zucht, die Haltung und den Handel von Wirbeltieren zu Versuchszwecken beziehen. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass die Zucht und Haltung von Tieren einem behördlichen Erlaubnisvorbehalt (§11 TSchG) unterliegen. Weiterhin muss darauf hingewiesen werden, dass „es verboten ist, Wirbeltiere zu züchten oder durch bio- oder gentechnische Maßnahmen zu verändern, wenn damit gerechnet werden muss, dass bei der Nachzucht, den bio- oder gentechnisch veränderten Tieren selbst oder deren Nachkommen erblich bedingt Körperteile oder Organe für den artgemäßen Gebrauch fehlen oder untauglich oder umgestaltet sind und hierdurch Schmerzen, Leiden oder Schäden auftreten“. Zudem „ist es verboten, Wirbeltiere zu züchten oder durch bio- oder gentechnische Maßnahmen zu verändern, wenn damit gerechnet werden muss, dass bei den Nachkommen a) mit Leiden verbundene erblich bedingte Verhaltensstörungen oder mit Leiden verbundene erblich bedingte Aggressionssteigerungen auftreten oder b) jeder artgemäße Kontakt mit Artgenossen bei ihnen selbst oder einem Artgenossen zu Schmerzen oder vermeidbaren Leiden oder Schäden führt oder c) deren Haltung nur unter Bedingungen möglich ist, die bei ihnen zu Schmerzen oder vermeidbaren Leiden oder Schäden führen.

### 5.13 Literatur

- Armstrong, D. T. and Opavsky, M. A. (1988). Superovulation of immature rats by continuous infusion of follicle stimulating hormone. *Biol. Reprod.* 39, 511-518
- Bailey, D. W. (1971). Recombinant inbred strains, an aid to finding identity, linkage, and function of histocompatibility and other genes. *Transplantation* 11, 325-327
- Bailey, D. W. (1977). Genetic drift: the problem and its possible solution by frozen embryo storage. *Ciba Found. Symp.* 52, 291-303
- Bailey D. W. (1981). Recombinant inbred strains and bilineal congenic strains. In "The mouse in Biomedical Research" (eds Foster H.L., Small, J.D. and Fox, J.G.) Vol 1, pp. 223-239. Academic Press, New York
- Baker, D. E. J. (1979). Reproduction and Breeding. In "The laboratory rat" (eds Baker, H. J., Lindsey J. R., and Weisbroth SH), Vol 1, pp. 153-168. Academic Press, New York
- Bartlett, M. S. and Haldane, J. B. S. (1935). The theory of inbreeding with forced heterozygosis. *J. Genet.* 31, 327-340
- Biery, K. A., Seidel, G. E. and Elsdon, R. P. (1986). Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenol.* 25, 140
- Chupin, D. and DeReviere, M. M. (1986). Quick freezing of rat embryos. *Theriogenol.* 26, 157-166
- Crow, J. F. (1997). The high spontaneous mutation rate: Is it a health risk? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8380-8386
- DaCruz G. M., Der Einfluß des Einfrierverfahrens auf die Revitalisierungsrate von Mausembryonen, *Vet Med Diss*, Hannover, 1991
- DeFeo, V. J. (1966). Vaginal-cervical vibration: a simple and effective method for the induction of pseudopregnancy in the rat. *Endocrinol.* 79: 440-442
- Eggenberger, E. (1973). Model populations for assessment of rotation systems in experimental animal breeding. *Z. Versuchstierkd.* 15, 297-331
- Falconer, D. S. (1967). Genetic aspects of breeding methods. In "UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals" 3rd edition, (ed Lane-Petter, W.) pp. 72-96. Livingstone, Edinburgh
- Falconer, D. S. (1989). Introduction to quantitative genetics. Longman Scientific & Technical, New York
- Festing, M. F. and Staats J. (1973). Standardized nomenclature for inbred strains of rats. Fourth listing. *Transplantation* 16, 221-245

- Fisher, R.A. (1965). *The Theory of Inbreeding*, 2nd ed., Oliver and Boyd, Edinburgh
- Flaherty, L. (1981). Congenic strains. In "The mouse in Biomedical Research", (eds Foster, H. L., Small, J. D. and Fox, J. G.) Vol 1, pp 215-222. Academic Press, New York
- Fraser, L. R. and Drury, L.M. (1975) The relationship between sperm concentration and fertilization in vitro of mouse eggs. *Biol. Reprod.* 13, 513-518
- Green, E. L. and Roderick, T. H. (1966) Radiation Genetics. In "Biology of the laboratory mouse" (ed Green, E. L.) pp. 165-185. McGraw-Hill, New York
- Greenhouse, D. D., Festing, M. F., Hasan, S. and Cohen, A. L. (1990). Catalogue of inbred strains of rats In "Genetic monitoring of inbred strains of rats" (ed Hedrich, H. J.) pp. 410-480. Gustav Fischer, Stuttgart
- Haldane, J. B. S. and Waddington, C. H. (1931). Inbreeding and linkage. *Genetics* 16, 357-374
- Hamada, H., Petrino, M. G. and Kakunaga, T. (1982). A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6465-6469
- Hayman, B. I. and Mather, K. (1953). The progress of inbreeding when homozygotes are at a disadvantage. *Heredity* 7, 165-183
- Hedrich, H. J. (1990a). Colony management In "Genetic monitoring of inbred strains of rats" (ed Hedrich, H. J.), pp. 11-22. Gustav Fischer, Stuttgart
- Hedrich, H.J. (1990b). Genetic monitoring of inbred strains of rats. Gustav Fischer, Stuttgart
- Hedrich, H. J. and Reetz, I. C. (1990). Cryopreservation of rat embryos In "Genetic monitoring of inbred strains of rats" (ed Hedrich, H. J.), pp. 274-288. Gustav Fischer, Stuttgart
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E. (1994). *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Hyde, J. S. (1973). Genetic homeostasis and behaviour: analysis, data, and theory. *Behaviour Genetics* 3, 233-245
- James, M. R. and Lindpaintner, K. (1997). Why map the rat? *Trends Genet.* 13, 171-173
- Joyner A. L. *Gene Targeting: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1993.
- Kimura, M. and Crow, J. F. (1963). On the maximum avoidance of inbreeding. *Genet. Res. Cambridge* 4, 399-415
- Krag, K. T., Koehler, I. M. and Wright, R. W. (1985). A method for freezing early murine embryos by plunging directly into liquid nitrogen. *Theriogenol.* 23, 199
- Lander, E. S. and Schork, N. J. (1994). Genetic dissection of complex traits. *Science* 265, 2037-2048

- Livesay, E. A. (1930). An experimental study of hybrid vigor or heterosis in rats. *Genetics* 15, 17-54
- Manly, K. F. (1993) A Macintosh program for storage and analysis of experimental genetic mapping data. *Mamm. Genome* 4, 303-313
- Markel, P., Shu, P., Ebeling, C., Carlson, G. A., Nagle, D. L., Smutko, J. S. and Moore, K. J. (1997). Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nat. Genet.* 17, 280-284
- Mayer, J. F. and Fritz, H. I. (1974) The culture of preimplantation rat embryos and the production of allophenic rats. *J. Reprod. Fertil.* 9, 99-102
- Miesfeld, R., Krystal, M. and Arnheim, N. (1981). A member of a new repeated sequence family which is conserved throughout eucaryotic evolution is found between the human delta and beta globin genes. *Nucleic. Acids Res.* 9, 5931-5947
- Ohno, S. (1972). Simplicity of mammalian regulatory systems. *Dev. Biol.* 27, 131-136
- Poiley, S. M. (1960). A systematic method for breeder rotation for noninbred laboratory animal colonies. *Proc. Anim. Care Panel* 10, 159-166
- Rafferty, Jr K. A. (1970). *Methods in experimental embryology of the mouse.* Johns Hopkins Press, Baltimore
- Rall, W. F. and Fahy, G. M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313, 573-575
- Rapp, K. G. (1972) HAN-rotation, a new system for rigorous outbreeding. *Z. Versuchstierkd.* 14,133-142
- Rouleau, A. M. J, Kovacs, P. R., Kunz, H. W. and Armstrong, D. T. (1993) Decontamination of rat embryos and transfer to specific pathogen-free recipients for the production of a breeding colony. *Lab. Anim. Sci.* 43, 611-615
- Ruelicke, T. and Autenried, P. (1995). Potential of 2-cell mouse embryos to develop to term despite partial damage after cryopreservation. *Lab. Anim.* 29, 320-326
- Russell, W. L., Kelly, P. R., Hunsicker, P. R., Bangham, J. W., Maddux, S. C. and Phipps, E. L. (1979) Specific locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 5918-5922
- Serreze, D. V., Chapman, H. D., Varnum, D. S., Hanson, M. S., Reifsnnyder, P. C., Richard, S. D., Fleming, S. A., Leiter, E. H. and Shultz, L. D. (1996) B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice. *J. Exp. Med.* 184, 2049-2053
- Silver, L. M. (1995). *Mouse genetics.* Oxford University Press, New York

- Snell, G. D. (1978). Congenic resistant strains of mice. In "Origins of Inbred mice" (ed Morse, H. C.), pp 1-31. Academic Press, New York
- Stam, P. (1980). The distribution of the fraction of the genome identical by descent in finite random mating populations. *Genet. Res.* 35, 131-155
- Sullivan, N. and Ouhibi, N. (1995). Preimplantation rat embryology: chimeric and transgenic strategies. In "Strategies in transgenic animal Science" (eds Monastersky, G. M. and Robl, J. M.), pp. 37-55. ASM press, Washington D.C.
- Takeda, T., Elsdon, R. P. and Seidel, G. E. (1984). Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenol.* 21, 266
- Toyoda, Y. and Chang, M. C. (1974). Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J. Reprod. Fert.* 36, 9-22
- Villalon, M., Ortiz, M. E., Aguayo, C., Munoz, J. and Croxatto, H. B. (1982). Differential transport of fertilized and unfertilized ova in the rat. *Biol. Reprod.* 26, 337-341
- Voipio, H. M. and Nevalainen, T. (1998). Improved method for vaginal plug detection in rats. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 25, 5-9
- Weil, M. M., Brown, B. W., Serachitopol, D. M. (1997). Genotype selection to rapidly breed congenic strains. *Genetics* 146, 1061-1069
- Whittingham, D. G. (1971). Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fertil. (suppl.)* 14, 7-21
- Whittingham, D. G. (1975). Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. Fert.* 43, 575-578
- Whittingham, D. G., Wood, M., Farrant, J., Lee, H. and Halsey, J. A. (1979). Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C. *J. Reprod. Fert.* 56, 11-21
- Willadsen, S. M. (1977). Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing. In "The freezing of mammalian embryos" (eds Elliot, K. and Whelan, J.), pp. 175-189. Elsevier, Amsterdam
- Williams, T. J. and Johnson, S. E. (1986). A method for one-step freezing of mouse embryos. *Theriogenol.* 26, 125-133
- Wood, M. J. and Whittingham, D. G. (1981). Low temperature storage of rat embryos. In "Frozen storage of laboratory animals" (ed Zeilmaker, G. H), pp.119-128. Gustav Fischer, Stuttgart
- Wright, S. (1921). Systems of mating. *Genetics* 6: 11-178
- Yang, W. H. (1968). Induction of pseudopregnancy in rats by vaginal tampon. *Endocrinol.* 82: 423-425

Zimmermann F, Weiss J, Reifenberg K (2000) Breeding and assisted reproduction techniques,  
In: „The handbook of experimental animals: the rat“ (ed: Krinke G. J.) Academic Press,  
London, 177-198