

GENETSKI NADZOR INBRIDIRANIH LINIJ

Martina PERŠE ^{a)}, Simon HORVAT ^{b)} in Damjana ROZMAN ^{c)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Medicinska fak., Inštitut za patologijo, Medicinski eksperimentalni center, Zaloška 4, SI-1000 Ljubljana, Slovenija, e-pošta: martina.perse@mf.uni-lj.si.

^{b)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, prof.dr., e-pošta: simon.horvat@bfro.uni-lj.si.

^{c)} Univ. v Ljubljani, Medicinska fak., Inštitut za biokemijo, Center za funkcijsko genomiko, Zaloška 4, SI-1000 Ljubljana, Slovenija, prof.dr., e-pošta: damjana.rozman@mf.uni-lj.si.

Delo je prispelo 02. februarja 2007, sprejeto 26. oktobra 2007.

Received February 02, 2007, accepted October 26, 2007.

IZVLEČEK

Z razvojem molekularne genetike so postale inbridirane linije učinkovito in nepogrešljivo orodje v biomedicinskih raziskavah. Njihova uporabnost sega od raziskovanja osnovnih mehanizmov delovanja genov in genskega uravnavanja do razvoja modelov za človeške bolezni, ki so nepogrešljivi pri raziskovanju patofizioloških, biokemičnih in molekularnih mehanizmov nastanka in razvoja bolezni kot tudi pri razvijanju novih terapevtskih sredstev. Zato je povsem razumljivo, da so zahteve po uniformnih in avtentičnih živalih znotraj genetsko standardiziranih linij upravičene in s stališča verodostojnosti rezultatov nujne. Namen prispevka je opozoriti na potencialne vire genetskega razhajanja med linijami in predstaviti metode, ki se lahko uporabljajo pri genetskem nadzoru glodalcev (predvsem laboratorijskih miši in podgan) tako v vzrejni kot poskusni enotah.

Ključne besede: molekularna genetika / biomedicinske raziskave / inbridirane linije / genetska razhajanja / genetska variabilnost / genetski nadzor / genetski označevalci / genetski polimorfizmi / laboratorijske miši / laboratorijske podgane

GENETIC MONITORING OF INBRED STRAINS

ABSTRACT

With the advent of molecular genetics, inbred strains became one of the most powerful tools in biomedical research. Their applications are numerous and range from investigating basic mechanisms of genes and gene regulation to the generation of models of human diseases, which can be used for pathophysiological, biochemical, molecular and therapeutic studies. Therefore, the need for uniform and authentic animals within the genetically standardized strains is understandable and from the perspective of validity of results also necessary. The purpose of this article is to outline the potential sources of genetic variation of rodent (mainly mouse and rat) colonies and to describe the methods used to monitor or control this variation. These methodologies may be applied in both breeding centres and individual research laboratories.

Key words: molecular genetics / biomedical research / inbred strains / genetic drift / genetic variability / genetic monitoring / genetic markers / genetic polymorphisms / laboratory mice / laboratory rats

UVOD

V osemdesetih letih prejšnjega stoletja je veliko raziskovalcev poročalo o genetskem razhajanju (angl. genetic variability; genetic drift) znotraj inbridiranih linij oziroma podlinij

podgan in miši med različnimi komercialnimi rejami ali celo znotraj posamezne reje. Eden takih primerov je bila WKY inbridirana linija podgan, ki so jo raziskovalci uporabljali pri študijah povišanega krvnega tlaka in se pri tem soočali z nasprotujočimi si rezultati (Kurtz in sod., 1989). Genetske razlike so odkrili tudi pri podlinijah, ki izvirajo iz linije 129/SvJ, ki je služila kot vir pluripotentnih embrionalnih matičnih celic za razvoj miši s ciljno mutacijo (Threadgill in sod., 1997). Prav tako je prišlo do genetskega razhajanja pri kongenih linijah na C57BL/6 in DBA ozadju (Lovell in sod., 1984). Protislovne rezultate so dobili tudi raziskovalci zaradi neupoštevanja genetskih razlik med podlinijami C57BL/6 linije (Wotjak, 2003; Specht in Shoepfer, 2001). Predvideva pa se, da obstaja še veliko več primerov, kjer je genetsko razhajanje znotraj genetsko standardiziranih linij povzročilo protislovne rezultate in so zato le-ti ostali neobjavljeni.

Opisani primeri po eni strani pričajo, da znotraj izogenih linij prihaja do genetskih razhajanj, kar ima lahko negativne učinke pri vrednotenju raziskovalnih podatkov. Uporaba linij oziroma podlinij, ki niso genetsko definirane lahko vodi do nezanesljivih, celo neuporabnih rezultatov, in je pogosto vzrok za neponovljivost poskusov znotraj ali med institucijami. Po drugi strani pa ti isti primeri povdarjajo pomembnost uspešne genetske kontrole pri zagotavljanju uniformnosti in avtentičnosti genetsko standardiziranih linij.

V prispevku smo se osredotočili na genetski nadzor inbridiranih linij, ki so med genetsko standardiziranimi linijami pri znanstvenoraziskovalnem delu zastopane že od samega začetka genetskih raziskav na sesalcih. Zato ne preseneča dejstvo, da so se metode dokazovanja genetske istovetnosti razvijale v odvisnosti od zahtev uporabe inbridiranih linij (Silver, 1995). Danes so inbridirane linije med najpogostejše uporabljenimi linijami tako v imunoloških, onkoloških kot tudi v genetskih raziskavah, kjer služijo kot izvirne linije za razvoj drugih genetsko standardiziranih linij kot so koizogene, rekombinantne, kongene ter mutirane. Zato se opisane metode lahko smiselno uporabljajo pri genetskem nadzoru vseh naštetih linij.

INBRIDIRANE LINIJE IN PODLINIJE

Izraz inbridirana linija opredeljuje homozigotne osebke, ki so parjeni v ožjem sorodstvu in so zaradi tega genetsko identični z izjemo razlik med spoloma (Ločniškar, 1999). Inbridirana linija nastane po vsaj 20 zaporednih generacijah inbridinga (brat x sestra; izjemoma starši x potomci) iz enega izvornega para (International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice and Rat Genome and Nomenclature Committee, 2005). Izogenost, homozigotnost in dolgoročna genetska stabilnost omogočata vzrejo in uporabo inbridiranih linij širom po svetu, neodvisno od kraja in časa. Znotraj inbridiranih linij naj bi bila genetska variabilnost minimalna, zaradi česar je tudi fenotipska variabilnost za večino lastnosti bistveno manjša kot pri genetsko variabilnih osebkih, še posebno za lastnosti, ki so značilne za posamezno linijo (Festing, 1999). Zato lahko govorimo o za linijo značilnem fenotipu (poznana življenjska doba ter glavne patološke, imunološke, fiziološke, vedenjske in biokemične značilnosti posamezne linije). Posamezna linija je označena s kodo, ki omogoča njeno razpoznavnost širom po svetu (za podrobnejšo razlago glej (Perše in Rozman, 2006)).

Kljub vsem naštetim lastnostim prihaja med osebki znotraj inbridirane linije do genetskega razhajanja, ki ima lahko za posledico nastanek novih linij oziroma podlinij. Zato so nastala jasna pravila, ki določajo, kdaj lahko govorimo o linijah oziroma podlinijah (Festing in sod., 1999a). Če namreč ločeno vzrejamo živali iste linije med F_{20} in F_{40} oziroma katerokoli standardno inbridirano linijo za več kot 20 generacij govorimo o podliniji. V prvem primeru je v genomu inbridiranih linij še dovolj heterozigotnih lokusov, da lahko z nadaljnim inbridingom botrujejo nastanku genetsko različnih osebkov, v drugem primeru pa je zelo verjetno, da bo prišlo do genetske raznolikosti zaradi novih spontanah mutacij, ki se bodo fiksirale. Ne glede na prejšnji

dve pravili, pa govorimo o nastanku podlinije vedno, kadar se odkrije genetske razlike med živalmi znotraj linije (International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice and Rat Genome and Nomenclature Committee, 2005).

GENETSKA RAZHAJANJA ZNOTRAJ INBRIDIRANIH LINIJ

Dejavniki, ki lahko vodijo do genetskih razhajanj so rezidualna heterozigotnost, kopičenje in fiksacija spontanij mutacij ter genetska kontaminacija (Sharp in sod., 2002; Zimmermann in sod., 2000; Hardy, 2004).

Rezidualna heterozigotnost

Izračunali so, da so živali po 20 zaporednih generacijah inbridinga v povprečju homozigotne na 98,6 % lokusih, medtem ko je preostali del genoma še vedno heterozigoten. Ta ostanek genetske variabilnosti imenujemo rezidualna heterozigotnost (Beck in sod., 2000; Festing, 2003; Sharp in sod., 2002; Zimmermann in sod., 2000). Čeprav se rezidualna heterozigotnost z nadaljnjim inbridingom zmanjšuje, je le-ta še vedno lahko vzrok genetskemu razhajanju. Najbolj očitno je to sicer takrat, ko pride do ločene vzreje živali znotraj linije že kmalu po njenem nastanku, kar ima za posledico nastanek novih linij. Najbolj poznani primeri nastalih linij, ki izvirajo iz iste linije, sta liniji DBA/1 in DBA/2, ki se danes genetsko razlikujeta na večjem številu lokusov zaradi relativno velike rezidualne heterozigotnosti ob času njune ločitve (Mouse Genome Database, 2006). Rezidualna heterozigotnost je tudi vzrok raznolikosti med živalmi iste linije ali podlinije, ki se vzrejajo v ločenih rejah, saj se z nenehnim inbridingom lahko na heterozigotnih lokusih pri potomcih fiksirajo alternativni aleli, ki tako vodijo v nova razhajanja znotraj linije ali podlinije. (Zimmermann in sod., 2000).

Mutacije

Do razhajanj lahko pride tudi zaradi spontanij mutacij. Nekateri avtorji poročajo, da je verjetnost fiksacije mutacije na kateremkoli delu genoma pri inbridiranih linijah zaradi homozigotnosti in izogenosti majhna in še manjša na kodirajočih ali regulatornih področjih (Festing, 2003; Sharp in sod., 2002). Drugi ocenjujejo, da pride v genomu inbridiranih linij miši do fiksacije mutacije v vsaki tretji generaciji, pri podganah pa celo pri vsaki generaciji (Zimmermann in sod., 2000). V preteklosti je opisanih kar nekaj primerov nastanka povsem novih linij zaradi spontanij mutacij. Med njimi sta danes najbolj poznani liniji debelih (mutacija »obese«, Pennisi, 2000) in golih miši (mutacija »nude«, Flanagan, 1966). In ne le to, v vodilnem laboratoriju genetskih raziskav na miših (The Jackson Laboratory) osebje pri redni oskrbi dveh milijonov miši vsako leto identificira okoli 75–80 miši, ki se fenotipsko razlikujejo od sovrstnic (spremenjen zunanji videz, rast, razvojne anomalije, spremenjeno obnašanje ipd.). Miši, na katerih odkrijejo potencialno mutacijo, nato ustrezno parijo, da ugotovijo, če je mutacija dedna (lahko je tudi somatska) in kakšen je način dedovanja (monogeno, recesivno, dominantno ipd.). Ugotovili so, da je spremenjen fenotip pri takih pregledih kar v 75 % primerov posledica spontanij mutacij v genomu (Silver, 1995). Če torej nastane mutacija na področju genoma, ki ima za posledico na zunaj opazno spremembo fenotipa, se lahko žival takoj izloči iz reje ali poskusa. V primeru, da mutacija navzven ni očitno opazna, lahko ostane prikrita dalj časa (Festing, 2003). Slednje se je zgodilo pri C57BL/6J^{OlA}Hsd podliniji (C57BL/6J linija, ki jo vzrejajo v Harlanu v Veliki Britaniji), pri kateri so mutacijo, delecijo α -synuclein lokusa, odkrili šele raziskovalci povsem nepričakovano, ko se je ta že prenesla na večino svojih potomcev (Specht in Schoepfer, 2001).

Genetska kontaminacija

Genetska kontaminacija predstavlja najpomembnejši in najpogostejši vzrok genetskih razhajanj in se ji je, za razliko od prvih dveh, moč izogniti. Do genetske kontaminacije lahko pride zaradi nenačrtnih parjenj živali različnih linij med seboj, nepoznavanja značilnosti izogenih linij in genetske nomenklature. Nenamerna parjenja so najpogostejše posledica človeške napake pri označevanju oziroma identifikaciji kletk ali živali (npr. napake pri aplikaciji ali odčitavanju ušesnih števil-k-zarez, kovinskih značk ali tetoviranja, napačno vstavljeni podkožni identifikacijski mikročipi). Kadar gre za živali s podobnimi oznakami kot so C57BL/6 in C57BL/10 ali DBA/1 in DBA/2 ali CBA/J in CBA/Ca itd., ki so si tudi fenotipsko zelo podobne, je nevarnost napake zelo velika. Napake pri označevanju se lahko odkrijejo le, če imajo živali v kletkah drugačno barvo dlake kot bi jo morale imeti glede na označbo kletk. Če pa so si živali fenotipsko podobne, ostane napaka prikrita (Sharp in sod., 2002). Tovrstne človeške napake naredijo pri izogenih linijah veliko več škode kot jo naredijo neizogibne spremembe, ki so posledica rezidualne heterozigotnosti ali mutacije. Zato je povsem razumljivo, zakaj je poznavanje pravil poimenovanja linij tako zelo pomembno, še posebno danes, v času naraščajočega števila genetskih raziskav. Uporaba standardiziranih pravil poimenovanja linij in podlinij je namreč nujna, saj je na ta način omogočena razpoznavnost med njimi že iz same oznake. Zgovoren primer, ki to potrjuje, je odkritje genetske kontaminacije pri 129/SvJ podliniji (Threadgill in sod., 1997), kateri je z namenom boljšega razločevanja podlinij in njihove raznolikosti sledila sprememba nomenklature za vse 129 podlinije (Festing in sod., 1999b).

GENETSKI NADZOR

Kadar vzrejamo ali parimo več različnih linij v istem laboratoriju ali celo v istem prostoru (še posebej, če imamo v reji živali z enako barvo dlake), je nevarnost genetske kontaminacije velika. Pri preprečevanju genetske kontaminacije si lahko pomagamo z natančnim vodenjem rodovniških evidenc, uporabo barvnih kartončkov z natisnjenimi oznakami linije oziroma podlinije, takojšnjim izločanjem pobeglih živali. Genetsko kontaminacijo lahko bistveno zmanjšamo tudi z izbiro sistema vzreje. V ta namen je zelo učinkovit tako imenovani piramidalni sistem vzreje. V tem sistemu imamo tri fizično ločene vzreje za določeno inbridirano linijo s čimer lahko zagotovimo veliko število genetsko uniformnih živali z najmanjšim možnim številom generacij (za podrobnejšo razlago glej Hardy, 2004).

Tudi izobraževanje osebja, ki oskrbuje laboratorijske živali, v smislu poznavanja osnovnih fizioloških značilnosti linij s katerimi dela, lahko prispeva k zmanjševanju človeških napak (Sharp in sod., 2002). Toda v primeru, da pride do nenamernega križanja dveh linij z enakim fenotipom, kontaminacija ostane prikrita (Van Zutphen in sod., 2005). Tudi večletne izkušnje rejcev laboratorijskih glodalcev kažejo, da zgolj skrbno gospodarjenje in dosledno upoštevanje vzrejnih metod, ne morejo v celoti preprečiti človeških napak. Slednje potrjuje nedavno odkriti primer genetske kontaminacije C57BL/6N podlinije pri komercialnem rejcu (Nitzki, 2007).

Inbridirane linije se med seboj razlikujejo, razlike pa se lahko izražajo kot navzven vidne fenotipske razlike (morfološki označevalci), variante proteinov (biokemični in imunološki označevalci) ali razlike v zaporedju DNA (molekularni označevalci). Vse razlike, ki se jih da na katerikoli način določati (morfološko, biokemično, imunološko, molekularno) so t.i. genetski označevalci, ki so sestavni elementi genetskega kartiranja in se hkrati izkoriščajo tudi za kontrolo genetske uniformnosti oziroma avtentičnosti izogenih linij (Mouse Genome Database, 2006).

V nadaljevanju so opisane metode, ki se uporabljajo pri genetskem nadzoru inbridiranih linij. Najprej so na kratko predstavljene metode, ki temeljijo na fenotipsko izraženih razlikah med

inbridiranimi linijami, nato pa metode, ki temeljijo na odkrivanju razlik med linijami na ravni DNA.

Morfološki označevalci

Vsako odstopanje od morfoloških znakov linije je lahko znak genetske kontaminacije ali mutacije (Sharp in sod., 2002). To lahko zelo usposobljeno in izurjeno osebje ugotovi že pri rokovanju in opazovanju živali (Balk, 1992), kot je to praksa v The Jackson Laboratory. Vidna odstopanja znotraj inbridiranih linij so (Mouse Genome Database, 2006):

- sprememba barve dlake živali, njene velikosti, oblike ali teže;
- spremembe obnašanja živali znotraj linije;
- spremembe v fizioloških parametrih;
- spremembe reproduktivnih lastnosti značilnih za linijo – reproduktivne lastnosti so sicer pod velikim vplivom okolja (imajo nizko heritabiliteto) zato niso tako zanesljiv parameter za ugotavljanje možnih genetskih sprememb znotraj linij.

Po razmahu genomskih projektov v prejšnjem desetletju so v zadnjem času vse bolj v ospredju tako imenovani fenomski (angl. phenome) projekti. Namen teh projektov je razviti standardizirano metodologijo določanja fenotipskih podatkov (anatomske, fiziološke in vedenjske značilnosti), da bi povečali uporabnost teh podatkov med različnimi vzrejnimi centri oziroma laboratoriji in dosegli spletne vire, ki bi vse te podatke zbrali na enem mestu. Tako so pri miših (The mouse Phenotype Database Integration Consortium, 2007; Svenson in sod., 2007; Bogue in Grubb., 2004) in pri podganah (Mashimo in sod., 2005) fenomski projekti proizvedli ogromno koristnih meritev, ki lahko raziskovalcem omogočijo primerjanje fenotipov med linijami in podlinijami, identificiranje modelov za nove lastnosti ali bolezni in poiskati pravi model za njihovo študijo. Toda pri vsem naštetem se je treba zavedati, da zgolj z opazovanjem morfoloških znakov in merjenjem fenotipskih podatkov genetske kontaminacije v večini primerov ni mogoče odkriti, zato se je za uspešen nadzor potrebno poslužiti drugih razpoložljivih metod (Sharp in sod., 2002).

Imunološki označevalci

Klasična metoda za dokaz genetske uniformnosti je transplantacija kože med živalmi znotraj linije in ugotavljanje sprejetja oziroma zavrnitve presadka. Živali znotraj inbridirane linije so homozigotne in izogene (tudi za pglavitni histokompatibilnostni kompleks) in imajo tkiva antigensko enaka oziroma histokompatibilna (tkivno skladna), zato ne pride do sprožitve imunskega odziva oziroma zavračanja presadka (Vozelj, 2000). Tako lahko s pomočjo te metode ugotavljamo spremembe na histokompatibilnostnem lokusu, ki nastanejo kot posledica genetske kontaminacije, rezidualne heterozigotnosti ali fiksacije nove spontane mutacije (Sharp in sod., 2002).

Čeprav je metoda občutljiva, enostavna in ne zahteva veliko opreme, je njena največja pomanjkljivost dolgotrajnost (Balk, 1992; Sharp in sod., 2002). Presadke je treba opazovati vsaj 100 dni, predno lahko naredimo oceno o histokompatibilnosti (Balk, 1992; Sharp in sod., 2002). Slabost je tudi ta, da lahko pride do zavrnitve tkiva zaradi slabega celjenja (Balk, 1992) ali medsebojnega poškodovanja presadka. Za preprečevanje slednjega, je za izvedbo te metode potrebno živali nekaterih linij (C57BL/10) nastaniti individualno (Sharp in sod., 2002).

Metoda ne omogoča razlikovanja med sorodnimi linijami (Balk, 1992) oziroma F1 hibridi in njihovimi starši. Kadar namreč parimo miši dveh različnih inbridiranih linij, dedujejo vsi potomci F1 en haplotip od vsakega starša. Posledično potomstvo F1 sprejme presadke od obeh staršev, kar oteži odkrivanje kontaminacije (Vozelj, 2000). S to metodo tudi ni mogoče preveriti avtentičnosti (Van Zutphen in sod., 2005) oziroma vira kontaminacije (Balk, 1992). Zato se je

poleg presajanja kože potrebno poslužiti še drugih metod, ki so opisane v nadaljevanju (Balk, 1992).

Imunološke označevalce lahko ugotavljamo s pomočjo mikrocitotoksičnega testa (limfocitni antigeni), hemaglutinacijskega testa (H2 haplotip in drugi eritrocitni antigeni) ter mešane limfocitne reakcije (določevanje poglavitnih in šibkejših histokompatibilnostih antigenskih razlik pri glodalcih) (Balk, 1992; Sharp in sod., 2002).

Biokemični označevalci

Med biokemične označevalce spadajo alelne variante encimov (izoencimi) ali proteinov, ki se med seboj razlikujejo po fizikalnih ali funkcijskih značilnostih, kot je elektroforetska mobilnost ali encimska aktivnost. Pri genetskem nadzoru so uporabni tisti, ki so med linijami polimorfni in diskriminatorni in so razporejeni po vseh kromosomih genoma (Balk, 1992).

Alelne variante encimov ali proteinov so označene z malimi črkami npr. a,b,c, itd. Za homozigotne linije je značilno, da imajo le en tip variante vsakega označevalca, zaradi česar lahko za vsako posamezno linijo določimo za linijo specifičen vzorec alelnih variant (Sharp in sod., 2002). Za ločevanje linij, ki se danes v raziskavah najpogosteje uporabljajo, običajno zadošča poleg barve dlake le 4–5 različnih biokemičnih označevalcev, medtem ko 10 različnih biokemičnih označevalcev že omogoča ustvariti za linijo značilni vzorec označevalcev in tako nudi dovolj informacij za ugotovitev genetske kontaminacije in pogosto tudi njenega izvora (Sharp in sod., 2002). Podrobni protokoli za 17 pogosto uporabljenih mišjih biokemičnih označevalcev so dostopni na spletu (<http://eanimal.snu.ac.kr/collaboration/gmonitoring/gmonitoring.htm>).

Prednosti metode identifikacije izoencimov so hitra in tehnično enostavna izvedba. Mnogi izoencimi so izraženi v številnih tkivih, zato lahko za določitev nekaterih izoencimov zadošča le odvzem krvi. Ker pa vedno ni mogoče izvesti testiranja biokemičnih označevalcev brez evtanazije živali, se testi običajno izvajajo na senilnih razplodnih živalih (angl. retired breeders). Kar sočasno predstavlja časovno oviro pri ugotavljanju genetske kontaminacije. Pomanjkljivost je tudi ta, da testi niso uporabni za razločevanje nekaterih sorodnih podlinij (Sharp in sod., 2002). Zaradi zgoraj naštetih pomanjkljivosti in razvoja učinkovitejših molekularnih označevalcev (spodaj) se biokemični označevalci danes vse redkeje uporabljajo za potrebe rednega genetskega nadzora.

Molekularni označevalci

Razvoj molekularnega kloniranja in pomnoževanja kratkih DNA odsekov z verižno reakcijo polimeraze (PCR) je omogočil razvoj novih pristopov za nadzor uniformnosti in avtentičnosti inbridiranih linij s pomočjo genetskih označevalcev, kot so polimorfizmi dolžin restrikcijskih fragmentov-PCR označevalci, mikrosateliti in polimorfizmi enega baznega para.

Polimorfizmi dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP)

Minisateliti: Z odkritjem restrikcijskih encimov je bilo omogočeno iskanje označevalcev na ravni DNA (Silver, 1995). Restrikcijski encimi prepoznajo zanje značilno zaporedje DNA in ga cepijo, kar povzroči razkosanje DNA na različno dolge fragmente. Pri tej vrsti označevalca uporabljamo restrikcijske encime, ki ne režejo znotraj minisatelitne ponovitve S pomočjo elektroforeze, ki omogoči razslojevanje DNA fragmentov po dolžini, in prenosom fragmentov na membrano (prenos po Southernu) ter hibridizacijo membrane z označeno multilokusno sondo, ki je običajno zaporedje osnovnega motiva minisatelita, dobimo za posamezno inbridirano linijo značilen vzorec dolžin restrikcijskih fragmentov ali DNA prstni odtis. Razlike med prstnimi

odtisi DNA osebkov so znotraj genetsko heterogene populacije velike, medtem ko se raznolikost med sorodnimi linijami zmanjšuje (Silver, 1995). Različno dolgi fragmenti DNA so namreč lahko posledica prisotnosti ali odsotnosti restrikcijskih mest v zaporedju DNA, zamenjave ene baze, ki povzroči nastanek novega ali uničenje obstoječega restrikcijskega mesta ter delecij ali insercij med dvema restrikcijskima mestoma (Balk, 1992). Večinoma pa so polimorfizmi pri teh označevalcih posledica različnega števila ponovitev minisatelitnega zaporedja (Aker in Huang, 1996), kar ima za posledico različne dolžine fragmentov tudi v primeru, ko polimorfizmov na restrikcijskih mestih ni. Pogostnost polimorfizmov minisatelitov, ki so posledica večjega ali manjšega števila ponovitev osnovnega minisatelitnega elementa (10^{-3} na lokus na gameto) je precej višja od pogostnosti klasičnih točkovnih mutacij (10^{-5} – 10^{-6} na lokus na gameto pri človeku; Jeffreys in sod., 1988) oziroma ocenjene povprečne pogostnosti mutacij pri miših (1.8×10^{-10} mutacij na nukleotid na generacijo; Drake in sod., 1998). To pomeni, da lahko s temi označevalci lažje najdemo genetske razlike tudi med sorodnimi linijami in podlinijami. Predvideva se, da je večja pogostnost mutacij pri minisatelitih kot tudi pri mikrosatelitih posledica neenakega prekrivanja (angl. unequal crossingover) nesestrskih kromatid med mejozo, ki botruje nastanku novih alelov, ki se razlikujejo med seboj le po številu ponovitev motiva osnovnega zaporedja.

Ker imajo živali znotraj izogene linije enak genotip (z izjemo razlik med spoloma v spolnih kromosomih), lahko s sočasno detekcijo 10–40 nevezanih in visoko polimorfnihih lokusov dobimo za posamezno linijo značilen vzorec dolžin restrikcijskih fragmentov ali DNA prstni odtis. To je prednost te metode, saj lahko tako z enim testom določimo polimorfizme na multiplih lokusih in razlikujemo linije od podlinij ter tudi podlinije med seboj (Mannen in sod., 1994). V kolikor pride pri testirani živali do spremenjenega za linijo značilnega DNA prstnega odtisa, žival ne pripada testirani liniji. S primerjanjem različnih vzorcev lahko ugotovimo njen izvor (Balk, 1992). Za izvedbo testa živali ni potrebno evtanazirati, saj običajno za pripravo DNA zadošča košček repa, ušesa ali prsta (Charles River Laboratories, 2002). Slaba stran te metode za rutinski genetski nadzor je dejstvo, da je postopek časovno zahteven, da potrebujemo relativno visoko kvalitetno DNA, da navadno uporabljamo radioizotope za označevanje DNA sond. Prav slednje lastnosti so razlog, da danes RFLP-minisatelitno metodo za rutinski nadzor inbridiranih linij izpodrivajo novejša in učinkovitejša metode kot so mikrosateliti in SNP označevalci.

Enolokusni RFLP z metodo po Southernu: Ta označevalec prav tako temelji na razlikah v dolžini restrikcijskih fragmentov, ki nastanejo zaradi polimorfizmov na mestih restrikcijskih encimov. Genomska DNA osebkov inbridiranih linij se razreže z izbranimi restrikcijskimi encimi, razsloji na agarozni elektroforezi, prenese na membrano s prenosom po Southernu, hibridizira z označeno DNA sondo za določen lokus ter v primeru označevanja DNA sond z radioizotopi, podvrže vizualizaciji rezultatov z autoradiografijo. Ta metoda je bila zelo razširjena za genetsko kartiranje laboratorijskih živali (predvsem miši in podgan) ter izvajanje genetskega nadzora v 80 in 90-tih letih prejšnjega stoletja. Danes se jo zaradi relativne neučinkovitosti (naenkrat pregledujemo le en lokus) in dragega postopka redkeje uporablja za rutinski genetski nadzor, je pa še vedno v rabi pri genetskem nadzoru specifičnih lokusov ali induciranih mutacij (transgenski modeli ipd.). Glede učinkovitosti določanja genetskih razlik med linijami in podlinijami sodi ta metoda med povprečne, kar sta nazorno pokazala Knight in Dyson (1990), ki sta med linijami NOD in C57BL/10 testirala 22 različnih restrikcijskih encimov in našla 30 % polimorfnihih lokusov. Nekoliko večji je odstotek polimorfizmov teh označevalcev med linijami ki izvirajo iz *M. musculus* in *M. spretus* oziroma *M.m.castaneus* – tako je Avner in sod. (1988) ugotovil, da lahko, če primerjamo inbridirane linije, ki izvirajo iz *M. musculus* ali iz *M. spretus*, s tipično DNA sondo, pričakujemo polimorfen RFLP lokus z več kot 90 % verjetnosti.

RFLP-PCR: Osnova te metode je enaka kot je opisano zgoraj, le da postopek bistveno poenostavi vključitev metode PCR. Z metodo PCR pomnožimo del odseka genoma, kjer testiramo prisotnost RFLP označevalca in PCR produkt obdelamo z restrikcijskimi encimi. Sledi razslojevanje produktov na agaroznem ali poliakrilamidnem gelu in barvanje DNA z etidijevim bromidom. Ta metoda je bistveno hitrejša in cenejša od RFLP metode po Southernu, ker temelji na učinkoviti reakciji PCR. Poleg tega ni potrebno imeti na razpolago velikih količin visoko kvalitetne DNA kot je to potrebno za RFLP metodo po Southernu. Za genetski nadzor celega genoma v primerjavi s spodaj naštetimi metodami tudi RFLP-PCR metoda še vedno ni dovolj učinkovita. Zato se danes v glavnem uporablja za genetski nadzor specifičnih lokusov oziroma mutacij (Horvat in Bunger, 1999) ter prisotnosti oziroma odsotnosti transgenskih vključkov (Liu in sod., 2006).

Mikrosatelitni polimorfizmi (angl. Simple Sequence Length Polymorphism; SSLP)

Mikrosateliti so kratka ponavljajoča se zaporedja DNA, ki se dedujejo kodominantno in so visoko polimorfni glede na število ponovitev osnovnega motiva mikrosatelita. Podobno kot pri zgoraj opisanih minisatelitih, je višja pogostnost mutacij na teh lokusih rezultat neenakega prekrivanja kromatid v mejozi, lahko pa so tudi posledica zdrsa polimeraze med podvojevanjem DNA, ko polimeraza »preskoči« določeno ponovitev mikrosatelita in tako nastane alel s krajšo dolžino. Genomske lokacije nukleotidnih zaporedij mikrosatelitov so znotraj vrst ohranjene, medtem ko je število ponovitev teh zaporedij različno in značilno za posamezno linijo oziroma podlinijo (primer za miši v preglednici 1). Vsak mikrosatelit je običajno obdan z edinstvenimi, neponavljajočimi se zaporedji v genomu (enolokusna sekvenca). Na teh področjih določimo PCR začetne oligonukleotide, ki so običajno 20bp dolga zaporedja komplementarna edinstveni DNA na bočnih področjih mikrosatelita.

Določanje dolžine mikrosatelitnih zaporedij je učinkovito orodje genetskega nadzora inbridiranih linij, saj so ti označevalci visoko polimorfni tudi med sorodnimi podlinijami. Ključni dejavnik pri rutinskem testiranju inbridiranih linij je izbor ustreznih mikrosatelitnih označevalcev. Pomembno je, da pri genetskem nadzorovanju izberemo tiste mikrosatelitne označevalce (pregl. 1), ki so med linijami oziroma podlinijami v reji diskriminatorni (Festing, 2003).

Preglednica 1. Dolžina mikrosatelitov na posameznih lokusih med različnimi mišjimi linijami. Odebeljene številke označujejo alelne razlike. Simbol označevalca **DNMitN** pomeni: D – nepoimenovan DNA označevalec; N – številka kromosoma; Mit – laboratorijska koda; N – številka lokusa. Tako D1Mit308 označuje 308 MIT mikrosatelitni označevalec, ki se nahaja na kromosomu 1 (povzeto po www.harlan.com).

Table 1. The length of microsatellite loci between different mouse strains. The bolded numbers indicate alelic differences. These markers are denoted by symbols **DNMitN**, where the D indicates an anonymous DNA marker; N – the number of the chromosome; Mit – the Laboratory Registration Code; N – the number of the locus. For example, D1Mit308 is the 308 MIT microsatellite marker assigned to chromosome 1.

Mišja linija	D1Mit 308	D5Mit 79	D6Mit 102	D9Mit 18	D11Mit 236
C57BL/6NHsd	150 bp	106 bp	146 bp	180 bp	106 bp
CBA/JCrHsd	160 bp	106 bp	126 bp	210 bp	106 bp
A/JOlaHsd	160 bp	106 bp	140 bp	210 bp	106 bp
BALB/cAnNHsd	160 bp	136 bp	140 bp	213 bp	118 bp

Tehnika vključuje odvzem vzorca tkiva (košček repa, ušesa), pripravo DNA in pomnoževanje enega ali več mikrosatelitov z uporabo enolokusnih PCR začetnih oligonukleotidov. Ločevanje velikosti mikrosatelitov omogoča elektroforeza na agaroznem gelu ali poliakriamidnem gelu skupaj z vzorci živali z znanim genotipom. Različno dolgi aleli prepotujejo različne dolžine. Če proge niso v enaki vrsti pomeni, da genotipa nista identična (Sharp in sod., 2002).

Pri miših je prva objava izolacije in kartiranja seta mikrosatelitov (Dietrich in sod., 1992) pomenila prelomnico v genomskih raziskavah in nudila možnost prehoda rutinskega genetskega nadzora od relativno neučinkovitih RFLP tehnik na nadzorovanje z mikrosateliti. Izolirali so set 317 mikrosatelitnih lokusov med seboj oddaljenih v povprečju 4,3 cM in ugotovili, da je pričakovana stopnja polimorfnosti med najpogostejše uporabljenimi linijami miši 50 %. Čeprav baze podatkov na spletu (npr. MGI: http://www.informatics.jax.org/menus/strain_menu.shtml) danes vsebujejo precej večje število mikrosatelitnih lokusov in omogočajo iskanje polimorfnih označevalcev med željenimi linijami in podlinijami miši, je za potrebe genetskega nadzora koristneje uporabiti preverjene sete mikrosatelitov iz originalne literature. Mikrosatelitni označevalci so namreč lahko s praktičnega vidika določanja v laboratoriju bolj ali manj robustni in učinkoviti, zato nam lahko preverjeni rezultati v originalni literaturi pri izbiri seta mikrosatelitov za naše potrebe prihranijo veliko časa. V objavi Dietricha in sod. (1992) je bila detekcija mikrosatelitov z radioaktivnimi označenimi oligonukleotidnimi začetniki še vedno sorazmerno neučinkovita in tehnično zahtevna. Zato so raziskovalci začeli iskati učinkovitejše in uporabniku bolj prijazne pristope, kot je uporaba fluorescence v danes že standardnih laserskih DNA analizatorjih za detekcijo mikrosatelitov (Rhodes in sod., 1997). Nadgradnja tega sistema je delo Witmerja in sod. (2003), ki so razvili set 314-ih visoko polimorfnih mikrosatelitnih označevalcev in jih optimizirali s tako imenovano multipleks PCR, ki omogoča hkratno določanje večjega števila mikrosatelitov v isti reakciji z uporabo štirih različnih fluorescenčnih barvil. V zadnjem času se pojavljajo tudi protokoli optimizirani za določen tip celic kot je na primer sperma (Kato in sod., 2005), kar je zelo uporabno pri genetskem nadzoru kriopreserviranih spolnih celic.

Tudi pri podganah so se mikrosateliti izkazali za zelo učinkovite molekularne označevalce pri rutinskem genetskem nadzoru. Prva objava s 134 podganjimi mikrosateliti (Serikawa in sod., 1992) je sprožila pravo revolucijo pri kartiranju podganjega genoma in omogočila učinkovit genetski nadzor standardnih linij podgan po celotnem genomu. Nedavno je bil objavljen članek (Mashimo in sod., 2006), kjer so razvili visoko polimorfen set mikrosatelitov primeren tudi za uporabo v rutinskem genetskem nadzoru podganjih linij.

Polimorfizmi enega baznega para (angl. Single Nucleotide Polymorphism; SNP)

Polimorfizmi enega baznega para ali SNP predstavljajo vrsto polimorfizmov, ki so najbolj gosto in enakomerno razporejeni po genomu in omogočajo odkrivanje genetske osnove za lastnosti, ki so se fiksirale v določeni liniji kot posledica selekcijskega parjenja ali mutacije (Petkov in sod., 2004).

Med inbridiranimi linijami miši je bilo že v eni od prvih objav (Wiltshire in sod., 2003) opisanih preko 70.000 SNP. V povprečju so takrat izračunali 14 SNP na 10 kb, vendar pa je porazdelitev SNP polimorfizmov v genomu neenakomerna. Obstajajo odseki z visoko stopnjo (40 SNP na 10 kb) in odseki z nizko stopnjo SNP polimorfizma (0,5 SNP na 10kb). Pri primerjanju genomov različnih inbridiranih linij (129, C3H, BALB z B6) se je izkazalo, da predstavljajo odseki z nizko stopnjo SNP kar 2/3 genoma. Enako distribucijo kaže tudi stopnja SSLP polimorfizma, vendar pa so SSLP polimorfni tudi na področjih z nizko stopnjo SNP polimorfizma, kar se sklada z njihovo visoko mutacijsko naravo (Wade in sod., 2002). SNP, ki se dedujejo vezano, predstavljajo haplotip. Kar 30–60 % vseh haplotipov v genomu imajo linije

med seboj enake. Ti predstavljajo regije genoma iz katerih lahko sklepamo na skupno poreklo posameznih linij (Wiltshire in sod., 2003).

V The Jackson Laboratory so vpeljali sistem nadzora genetskega ozadja inbridiranih linij miši, ki temelji na analizi visoko polimorfni SNP. Metoda naj bi bila zanesljiva, enostavna, obsežna in ekonomična tudi za manjše ustanove (Petkov in sod., 2004a, 2004b). Na osnovi predhodno opravljenih testov pri 48-ih linijah, so določili distribucijo 235 srednje do visoko polimorfni označevalcev (kjer se redkejši alel pojavlja med linijami s frekvenco 0,1 ali več), ki so bili vsaj 2 cM narazen (od 3.8 do 13.5 cM). Na ta način so hoteli izbrati le tiste SNP, ki ne pripadajo istemu haplotipu. Prednost pri izboru so imeli tisti SNP, ki so bili opaženi pri več kot petih linijah in katerih najmanj pogosti tip alelov je bil določen pri vsaj dveh linijah. Ti kriteriji pa so bili bolj ohlapni za področja z nizko stopnjo SNP polimorfizma (Petkov in sod., 2004).

Za določitev minimalnega števila označevalcev so se poslužili statističnih analiz. Da bi lahko z 99 % gotovostjo dobili vsaj tri razlike med dvema linijama, so morali testirati živali z vsaj 26 označevalci. Za kontrolo genetskega ozadja so izbrali set 28 visoko informativnih SNP, razporejenih po vseh kromosomih. Nekaj izmed njih tudi specifičnih za ločevanje med sorodnimi linijami. Z izborom so dosegli vzorec, kjer se 98 % testiranih linij med seboj razlikuje v treh ali več označevalcih (Petkov in sod., 2004).

V posodobljenih bazah podatkov danes zasledimo že več kot milijon SNP označevalcev (glej SNP baze podatkov pri miših), kjer je najkoristnejša baza na spletni strani The Jackson Laboratory (<http://www.jax.org/phenome/snp.html>), ki združuje SNP označevalce iz različnih virov in ponuja orodja za navzkrižno primerjanje. Čeprav je večina teh primerjav ponujena za 16 danes najpogosteje uporabljenih linij miši, ima baza dostop do SNP podatkov za več kot 125 različnih linij. Pri podganah je število SNPjev in genotipiziranih linij podgan precej manjše kot pri miših, vendar se tudi pri podganah pojavljajo objave (Zimdahl s sod., 2004, Smits in sod., 2005) ter baze podatkov za SNP genotipe (SNP baze podatkov pri podganah), ki bodo podobno kot pri miših kmalu postale najbolj koristne za izbiro in uporabo označevalcev za genetski nadzor tudi pri tej vrsti laboratorijskih živali.

PREPREČEVANJE GENETSKIH RAZHAJANJ ZNOTRAJ LINIJ

Če torej želimo preveriti uniformnost in avtentičnost živali posamezne linije, se lahko poslužimo zgoraj opisanih metod. Toda sočasno se moramo zavedati, da so metode genetskega nadzora usmerjene predvsem v preprečevanje genetskih kontaminacij linij oziroma podlinij in ne odkrivanju mutacij ali razlik zaradi rezidualne heterogenosti. Če se hočemo izogniti vsem dejavnikom genetskega razhajanja znotraj linij, se moramo poslužiti metode shranjevanja embrijev (Van Zutphen in sod., 2005).

Danes je mogoče sesalske embrije shranjevati z uporabo posebnih tehnik, ki vključujejo zamrzovanje in shranjevanje preimplantacijskih embrijev v tekočem dušiku. Ta proces shranjevanja embrijev na zelo nizki temperaturi imenujemo kriopreservacija. Tehnika je vsestransko uporabna. Poslužujejo se jo v smislu preprečevanja izumrtja dragocenih inbridiranih linij, do katerega bi lahko prišlo zaradi fatalne bolezni (vnos patogenov) ali nesreče (požar) v reji. Omogoča zagotavljati nenehno dostopnost sicer redko uporabljenih linij brez potrebe po vzdrževanju živali v vzrejnih centrih. Kar se je pokazalo zelo dobrodošlo tudi pri genetsko spremenjenih živalih, katerih število linij močno narašča. Prav tako se jo lahko poslužimo za začetek vzreje gnotobiotičnih živali ali živali prostih specifičnih patogenov. In nenazadnje, služi tudi kot sredstvo preprečevanja genetskega razhajanja znotraj linij, saj s kriopreservacijo embrijev vplivamo na zmanjšanje števila generacij in s tem posledično zmanjšujemo verjetnost pojava dejavnikov, ki so vzrok genetskemu razhajanju znotraj linij (Van Zutphen in sod., 2005).

GENETSKI NADZOR V PRAKSI

Ker so inbridirane linije homozigotne za celoten genom je relativno enostavno poiskati lokuse, ki se razlikujejo med različnimi inbridiranimi linijami. Za ugotavljanje avtentičnosti inbridiranih linij (pregl. 2) je ponavadi dovolj, da določimo 5–6 polimorfni genetskih označevalcev, ki so nevezani (ležijo na različnih kromosomih). Na ta način lahko z veliko verjetnostjo odkrijemo možno genetsko kontaminacijo.

Preglednica 2. Princip izbire števila genetskih označevalcev za izvajanje genetskega nadzora: primer spodaj prikazuje, da s 6 polimorfnimi nevezanimi genetskimi označevalci lahko z 98,5 % verjetnostjo ugotovimo, če sta pregledani inbridirani liniji genetsko kontaminirani

Table 2 Principle for selecting the number of markers for genetic monitoring: example below demonstrate that with 6 polymorphic non-linked markers one can detect genetic contamination in two inbred lines with 98.5% probability

Genetski označevalec ¹	Alel Inbridirane Linije št. 1	Alel Inbridirane Linije št. 2	Kumulativna verjetnost, da lahko odkrijemo genetsko kontaminacijo	
A	A1	A2	$(1-(0,5)^1)$	50 %
B	B2	B1	$(1-(0,5)^2)$	75 %
C	C1	C2	$(1-(0,5)^3)$	87 %
D	D1	D2	$(1-(0,5)^4)$	93 %
E	E2	E1	$(1-(0,5)^5)$	97 %
F	F2	F1	$(1-(0,5)^6)$	98,5 %

¹ genetski označevalci so ne-vezani (ležijo na različnih kromosomih)

Izbrane sete šestih (ali več) genetskih označevalcev (pregl. 2) je potrebno menjati vsako generacijo. Priporoča se, da na vsake 3–4 generacije pregledamo vsaj 2 genetska označevalca na vsak kromosom. S tovrstnim genetskim nadzorom, beleženjem fenotipskih podatkov (telesne mase, reprodukcija, barva dlake) imamo veliko možnost določanja kontaminacij in izbire takih staršev, ki po genotipu in fenotipu ustrezajo značilnostim določene inbridirane linije oziroma podlinije laboratorijskih živali.

Od vseh v tem prispevku naštetih metod genetskega nadzora, so danes uporabljene v glavnem metode določanja SNP genotipov, mikrosatelitov ter PCR-RFLP. Prvi dve sta v rabi predvsem za pregled genetske variabilnosti po celotnem genomu, tretja metoda je uporabna, ko opravljamo genetsko kontrolo samo za majhno število lokusov, specifičnih mutacij ali transgenih vključkov. V Sloveniji imamo v glavnem manjše vzrejne in poskusne centre. Čeprav pravila nomenklature navajajo, da ločena vzreja določene linije lahko vodi v razvoj podlinije po 20 generacijah, pa večji vzrejni centri kot so The Jackson Laboratory in Charles Rivers Laboratories opozarjajo, da lahko pride do razvoja podlinij že po 10 generacijah inbridinga ali že samo po treh generacijah naključnih parjenj. V primeru, da vzrejni centri in poskusne enote nimajo vpeljanega rednega genetskega nadzora, ter ustreznih sistemov piramidalne vzreje priporočamo, da za poskusne namene kupujejo inbridirane linije od komercialnih vzrejnih centrov z ustreznimi mikrobiološkimi in genetskimi certifikati. V raziskovalnih člankih lahko namreč uporabimo ime neke linije (npr. C57BL/6J, ki jo sicer dobimo le v The Jackson Laboratory) samo v primeru, če uporabimo živali, ki so bile vzrejene v naših vzrejnih enotah do 10 generacij inbridinga ali do treh generacij naključnih parjenj. V nasprotnem primeru je potrebno laboratorij registrirati, s čimer k oznaki linije dodeli tudi dodatna koda. Pogosto se inbridirane linije uporabljajo tudi za

povratna križanja za ohranjanje transgenih modelov v določenem genetskem ozadju. Tudi v tem primeru veljajo zgornja pravila in potreba po genetskem nadzoru in ustreznem sistemu vzreje.

Raziskovalci v poskusih pogosto uporabljajo linije, ki so jih razvili sami bodisi z umetno selekcijo ali fiksacijo spontanah oziroma induciranih mutacij. Tudi pri teh linijah veljajo enaka pravila glede nastanka podlinij in pomena genetskega nadzora. Še več, ker so bile te linije razvite znotraj poskusne enote in z njimi razpolaga le njihov laboratorij, se v primeru genetske kontaminacije ali nesreče tak vir ne more nadomestiti s ponovnim nakupom iz drugih vzrejnih centrov. Za te primere priporočamo, poleg striktnega izvajanja vzreje po piramidalnem sistemu, ločeni vzreji in rednem genetskem nadzoru temeljnih kolonij tudi program kriopreservacije in hranjenja zamrznjenih zarodkov na vsaj dveh lokacijah.

Metodološko in cenovno je za manjše vzrejne centre, kot jih imamo v Sloveniji najprimernejša metoda za rutinski genetski nadzor še vedno uporaba mikrosatelitnih označevalcev določenih na gelski elektroforezi. V ta namen lahko uporabimo agarozne gele (navadno 3–4 %), v zadnjem času pa so zelo učinkoviti tudi sistemi, kjer kupimo že vnaprej narejene gele, ki imajo precej krajši čas detekcije (e-geli – Invitrogen). Če je volumen dela večji se lahko uporabijo mikrosateliti v multipleks PCR reakcijah (več mikrosatelitov naenkrat) na fluorescenčnih DNA analizatorjih (npr. Applied Biosystems). Z ustanovitvijo centra za biočipe v Sloveniji (center za funkcijsko genomiko in biočipe na Medicinski fakulteti; <http://cfgbc.mf.uni-lj.si/>) smo tudi v Sloveniji pridobili tehnološko infrastrukturo, ki bo omogočala razvoj in uporabo SNPjev za genetski nadzor laboratorijskih živali, sploh za tiste raziskovalce in centre, ki izvajajo množično genotipiziranje. Če je namen le občasni genetski nadzor manjšega števila živali in center oziroma laboratorij nima ekspertize na področju genetskega nadzora je učinkoviteje, da se v tem primeru poslužujemo sodelovanja z domačimi ali tujimi laboratoriji, ki imajo že vpeljan sistem rutinskega genetskega nadzora ali komercialnih servisov specializiranih za rutinski genetski nadzor (Komerčni servisi za genetski monitoring).

ZAKLJUČKI

Danes imamo torej na voljo veliko število različnih metod genetskega nadzora, s pomočjo katerih lahko zagotovimo uniformnost in avtentičnost inbridiranih linij. Običajno je izbor metod odvisen od števila in sorodnosti linij oziroma podlinij, ki jih imamo v laboratoriju. Toda poleg zanesljivosti metode so pri rutinskem nadzoru pomembni tudi drugi dejavniki kot so enostavnost, hitrost, zmogljivost (sočasno testiranje večjega števila vzorcev) in ekonomičnost. Na podlagi pregledane literature na tem področju ugotavljamo, da v večjih vzrejnih centrih za genetski nadzor uporabljajo večinoma SNP označevalce, v manjših centrih in individualnih laboratorijih pa večinoma mikrosatelitne označevalce. Druge vrste označevalcev, ki smo jih opisali v prispevku se uporablja vse redkeje in v glavnem kot dopolnilo SNP ali mikrosatelitnim označevalcem.

ZAHVALA

Za so-financiranje se zahvaljujemo Agenciji za raziskovalno dejavnost (ARRS) in Ministrstvu za zdravje za projekt CRP V3-0365.

SUMMARY

Today, there are many different genetic monitoring methods to assure uniformity and purity of inbred strains. Each of these methods has its advantages, but usually selection of the methods depends on the number and the level of genetic relatedness between the strains or substrains in

the facility. However, besides reliability of the method, there are also other factors important for implementation of the method in the facility such as the total assay time per animal or locus, technical simplicity of the method, ability to scale up the method for a high through-put analyses and cost efficiency. On the basis of reviewed literature on the topic of genetic monitoring we conclude that today, large breeding centres tend to use primarily SNP markers whereas smaller breeding facilities or individual animal labs still prefer microsatellites. Other types of markers described herein are being used less frequently and usually only complementary to the SNP or microsatellite-based genetic monitoring.

VIRI

- Aker, M./ Huang, H.V. Extreme heterogeneity of minor satellite repeat arrays in inbred strains of mice. *Mamm. Genome*, 7(1996), 62–64.
- Avner, P./ Amar, L./ Dandolo, L./ Guenet, J.L. Genetic analysis of the mouse using interspecific crosses. *Trends Genet.*, 4(1988), 18–23.
- Balk, M.W. Rodent genetics and genetic quality control for inbred and F1 hybrid strains. *Buletin*, 1992.
- Beck, J.A./Lloyd, S./ Hafezparast, M./ Lennon-Pierce, M./ Eppig, J.T./ Festing, M.F./ Fisher, E.M. Genealogies of mouse inbred strains. *Nat. Genet.*, 24(2000), 23–25.
- Bogue M.A./ Grubb, S.C. The Mouse Phenome Project. *Genetica*, 122(2004), 71–74.
- Charles River Laboratories. Background strain characterization: Who is that mouse?. *The Sentinel*, Summer, 2002.
- Dietrich, W./ Katz, H./ Lincoln, S.E./ Shin, H.S./ Friedman, J./ Dracopoli, N.C./ Lander, E.S. A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics*, 131(1992), 423–447.
- Festing, M.F. Laboratory animal genetics and genetic quality control. V: *Handbook of laboratory animal science: essential principles and practices* (ur.: Hau, J./ van Hoosier, G.L.). Boca Raton, CRC Press LLC, 2003, 173–203.
- Festing, M.F. Warning: the use of heterogeneous mice may seriously damage your research. *Neurobiol. Aging*, 20(1999), 237–244.
- Festing, M.F./ Simpson, E.M./ Davisson, M.T./ Mobraaten, L.E. Revised nomenclature for strain 129 mice. *Mamm. Genome*, 10(1999a), 836.
- Flanagan, S.P. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res.*, 8(1966), 295–309.
- Hardy, P. Gnotobiology and breeding techniques. V: *The laboratory mouse* (ur.: Hedrich, H.J.) London, Academic Press, 2004, 409–433.
- Horvat, S./ Bunker, L. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay for the mouse leptin receptor (*Lepr*(db)) mutation. *Lab. Anim.*, 33(1999), 380–384.
- International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice and Rat Genome and Nomenclature Committee. Rules for nomenclature of mouse and rat strains (on line). Mouse Genome Database, Mouse Genome Informatics Web Site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. World Wide Web, 2005.
- Kaloh, H./ Yoshino, S./ Inui, Y./ Honda, S./ Takabayashi, S. Microsatellite genotyping for genetic quality testing using sperm cells in the mouse. *Exp. Anim.*, 54(2005), 373–376.
- Knight, A.M./ Dyson, P.J. Detection of DNA polymorphisms between two inbred mouse strains-limitations of restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Mol Cell Probes.*, 4(1990), 497–504.
- Komercialni servisi za genetski monitoring:
<http://www.elchrom.com/public/index.php?page=52>; <http://www.cidr.jhmi.edu/index.html>;
<http://www.taconic.com/wmspage.cfm?parm1=1426>;
http://www.criver.com/research_models_and_services/genetic_testing_services/index_gts.html;
<http://www.illumina.com/pages.ilmn?ID=163>;
http://www.identigene.com/SWIMX/Products/mouse_genotyping.asp ALI
http://www.biopioneerinc.com/bpr/index.php?target=categories&category_id=239
- Kurtz, T.W./ Montano, M./ Chan, L./ Kabra, P. Molecular evidence of genetic heterogeneity in Wistar-Kyoto rats: implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 13(1989), 188–192.
- Liu, K./ Hipkens, S./ Yang, T./ Abraham, R./ Zhang, W./ Chopra, N./ Knollmann, B./ Magnuson, M.A./ Roden, D.M. Recombinase-mediated cassette exchange to rapidly and efficiently generate mice with human cardiac sodium channels. *Genesis*, 44(2006), 556–564.
- Ločniškar, F. Katalog znanj: splošna živinoreja, biološke osnove, genetika z enciklopedičnim opisom pojmov in gesli v slovenščini, angleščini in nemščini, Domžale, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, 1999.
- Lovell, D.P./ Totman, P./ Bigelow, S.W./ Nebert, D.W./ Hoffman, H.A./ Greig, J.B./ Festing, M.F. An investigation of genetic variation within a series of congenic strains of mice. *Lab. Anim.*, 18(1984), 291–297.

- Mannen, H./ Tsuji, S./ Fukuta, K./ Goto, N. Identification of sublines of inbred strains of mice and assessment of genetic relationships between substrains or sublines by DNA fingerprinting. *Jikken Dobutsu*, 43(1994), 521–526.
- Mashimo, T./ Voigt, B./ Kuramoto, T./ Serikawa, T. Rat Phenome Project: the untapped potential of existing rat strains. *J. Appl. Physiol.*, 98(2005), 371–379.
- Mashimo, T./ Voigt, B./ Tsurumi, T./ Naoi, K./ Nakanishi, S./ Yamasaki, K./ Kuramoto, T./ Serikawa, T. A set of highly informative rat simple sequence length polymorphism (SSLP) markers and genetically defined rat strains. *BMC Genet.*, 4(2006), 19–27.
- Mouse Genome Database, Mouse Genome Informatics, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, 2006.
- Nitzki, F./ Kruger, A./ Reifenberg, K./ Wojnowski, L./ Hahn, H. Identification of a genetic contamination in a commercial mouse strain using two panels of polymorphic markers. *Lab. Anim.*, 41(2007), 218–28.
- Pennisi, E. A mouse chronology. *Science*, 288(2000), 248–257.
- Perše, M./ Rozman, D. Značilnosti in pravila poimenovanja inbridiranih linij miši. *Vet. Nov.*, 32(2006), 23–29.
- Petkov, P.M./ Cassell, M.A./ Sargent, E.E./ Donnelly, C.J./ Robinson, P./ Crew, V./ Asquith, S./ Haar, R.V./ Wiles, M.V. Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse. *Genomics*, 83(2004a), 902–911.
- Petkov, P.M./ Ding, Y./ Cassell, M.A./ Zhang, W./ Wagner, G./ Sargent, E.E./ Asquith, S./ Crew, V./ Johnson, K. A./ Robinson, P./ Scott, V.E./ Wiles, M.V. An efficient SNP system for mouse genome scanning and elucidating strain relationships. *Genome Res.*, 14(2004b), 1806–1811.
- Rhodes, M./ Dearlove, A./ Straw, R./ Fernando, S./ Evans, A./ Greener, M./ Lacey, T./ Kelly, M./ Gibson, K./ Brown, S.D./ Mundy, C. High-throughput microsatellite analysis using fluorescent dUTPs for high-resolution genetic mapping of the mouse genome. *Genome Res.*, 7(1997), 81–86.
- Serikawa, T./ Kuramoto, T./ Hilbert, P./ Mori, M./ Yamada, J./ Dubay, C.J./ Lindpainter, K./ Ganten, D./ Guenet J.L./ Lathrop, G.M./ Beckmann, J.S. Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics*, 131(1992), 701–721.
- Sharp, J.J./ Sargent, E.E./ Schweitzer, P.A. Genetic monitoring. V: Laboratory animal medicine (ur.: Fox, J.G./ Andersen, L.C./ Loew, F.M./ Quimby, F.W.). San Diego, California, Academic Press, 2002, 1117–1128.
- Silver, L.M. Mouse genetics: Concepts and applications. Oxford, University Press, 1995.
- Smits B.M.G./ Guryev, V./ Zeegers, D./ Wedekind, D./ Hedrich, H.J./ Cuppen, E. Efficient single nucleotide polymorphism discovery in laboratory rat strains using wild rat-derived SNP candidates. *BMC Genomics*, 6(2005), 170–179.
- SNP baze podatkov pri miših:
<http://phenome.jax.org/pub-cgi/phenome/mpdcgi?rtn=snp/door>; <http://mousesnp.roche.com/>;
<http://www.well.ox.ac.uk/rmott/mouse/inbreds/>; SNP baze podatkov pri podganah; <http://cascad.niob.knaw.nl/>;
http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/index.html.
- Specht, C.G./ Schoepfer, R. Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC. Neurosci.*, 2(2001), 11.
- Svenson, K.L./ Von Smith, R./ Magnani, P.A./ Suetin, H.R./ Paigen, B./ Naggert, J.K./ Li, R./ Churchill, G.A./ Peters, L.L. Multiple Trait Measurements in 43 Inbred Mouse Strains Captures the Phenotypic Diversity Characteristic of Human Populations. *J. Appl. Physiol.*, 2007, E-pub pred tiskanim člankom.
- The Mouse Phenotype Database Integration Consortium. Integration of mouse phenome data resources. *Mamm. Genome*, 18(2007), 157–163.
- Threadgill, D.W./ Yee, D./ Matin, A./ Nadeau, J.H./ Magnuson, T. Genealogy of the 129 inbred strains: 129/SvJ is a contaminated inbred strain. *Mamm. Genome*, 8(1997), 390–393.
- Van Zutphen, L.F.M./ Hedrich, H.J./ van Lith, H.A./ Prins, J.B. Genetic standardization. V: Principles of laboratory animal science (ur.: Van Zutphen, L.F.M./ Baumans, V./ Beynen, A.C.). Amsterdam, Elsevier, 2005, 129–147.
- Vozelj, M. Temelji imunologije. Ljubljana, DZS, 2000.
- Wade, C.M./ Kulbokas, E.J./ III, Kirby, A.W./ Zody, M.C./ Mullikin, J.C./ Lander, E.S./ Lindblad-Toh, K./ Daly, M.J. The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature*, 420(2002), 574–578.
- Wiltshire, T./ Pletcher, M.T./ Batalov, S./ Barnes, S.W./ Tarantino, L.M./ Cooke, M.P./ Wu, H./ Smylie, K./ Santrosyan, A./ Copeland, N.G./ Jenkins, N.A./ Kalush, F./ Mural, R.J./ Glynne, R.J./ Kay, S.A./ Adams, M.D./ Fletcher, C.F. Genome-wide single-nucleotide polymorphism analysis defines haplotype patterns in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100(2003), 3380–3385.
- Witmer, P.D./ Doheny, K.F./ Adams, M.K./ Boehm, C.D./ Dizon, J.S./ Goldstein, J.L./ Templeton, T.M./ Wheaton, A.M./ Dong, P.N./ Pugh, E.W./ Nussbaum, R.L./ Hunter, K./ Kelmenson, J.A./ Rowe, L.B./ Brownstein, M.J./ The development of a highly informative mouse Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP) marker set and construction of a mouse family tree using parsimony analysis. *Genome Res.*, 13(2003), 485–491.
- Wotjak, C.T. C57BL/6J/BOX? The importance of exact mouse strain nomenclature. *Trends Genet.*, 19(2003), 183–184.

- Zimdahl, H./ Nyakatura, G./ Brandt, P./ Schulz, H./ Hummel, O./ Fartmann, B./ Brett, D./ Droege, M./ Monti, J./ Lee, Y.A./ Sun, Y./ Zhao, S./ Winter, E.E./ Ponting, C.P./ Chen, Y./ Kasprzyk, A./ Birney, E./ Ganten, D./ Hubner, N. A SNP map of the rat genome generated from cDNA sequences. *Science*, 303(2004), 807.
- Zimmermann, F./ Weiss, J./ Reifenberg, K. Breeding and assisted reproduction techniques. V: *The laboratory rat* (ur.: Krinke, G.J.). London, Academic Press, 2000, 177–198.