

Ontwikkelingen in de proefdiergenetica

#2. De nieuwe generatie co-isogene stammen

Hein A. van Lith en Frauke Ohl

Departement Dier, Wetenschap en Maatschappij, Afdeling Proefdierkunde,
Faculteit der Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht, Postbus 80.166, 3508 TD Utrecht

Samenvatting

Een inteeltstam die genetisch identiek (isogeen) is aan een andere inteeltstam, behalve voor één locus, wordt een co-isogene lijn of stam genoemd. Co-isogene lijnen ontstaan met regelmaat als gevolg van een spontane mutatie in een gen. Zulke stammen kunnen ook ontstaan als een gen gemodificeerd wordt middels de embryonale stamceltechniek. Chemisch-geïnduceerde mutanten op een inteeltachtergrond kunnen eveneens als co-isogeen beschouwd worden.

Inleiding

In het *Handboek Proefdierkunde* wordt in hoofdstuk 7 een definitie gegeven van een co-isogene lijn/stam (1): 'Wanneer in een inteeltstam een mutatie optreedt kan deze mutant in een sublijn naast de oorspronkelijke inteeltstam in stand worden gehouden. Een dergelijke sublijn, die zich dus slechts in één gen onderscheidt van de originele stam, wordt aangeduid als co-isogene lijn. Dergelijke co-isogene lijnen zijn erg waardevol omdat men hierdoor over dieren beschikt die in elk opzicht identiek zijn aan de dieren van de inteeltstam, met uitzondering van het ene gen waarin men met name geïnteresseerd is.'

In deze definitie heeft men het over een mutatie. Zo'n mutatie kan spontaan zijn opgetreden, maar kan ook geïnduceerd worden in het laboratorium (2). In het laatste geval kan dit in co-isogene lijnen resulteren. In de volgende paragrafen zullen de verschillende categorieën van co-isogene lijnen de revue passeren.

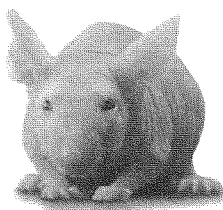
Spontane mutanten

Er zijn talloze voorbeelden van co-isogene lijnen die ontstaan zijn door spontane mutaties. Bij het Jackson Laboratory in Bar Harbor (vs) zijn verscheidene spontane mutanten te verkrijgen. Details hierover staan op de website van dit laboratorium (www.jax.org/mmr/index.html). Ook andere proefdierbedrijven leveren co-isogene lijnen die ontstaan zijn door spontane mutaties.

Bekende historische voorbeelden zijn de naakte muis (voor het eerst beschreven in 1968) en de naakte rat (voor het eerst beschreven in 1978) (afb. 1). Het autosomale recessieve allel voor naaktheid (Engels: nude) veroorzaakt in homozygote toestand bij muizen en ratten haarloosheid en afwezigheid van de thymus. Omdat de thymus ontbreekt kunnen er geen rijpe T-lymfocyten aangeemaakt worden. Dit leidt tot een vorm van immunodeficiëntie waarbij homologe transplantaten (van individuen



Afbeelding 1. Naakte proefdieren.
Boven: een co-isogene naakte muis
en een gewoon, behaard exemplaar.
Onder: co-isogene naakte rat.

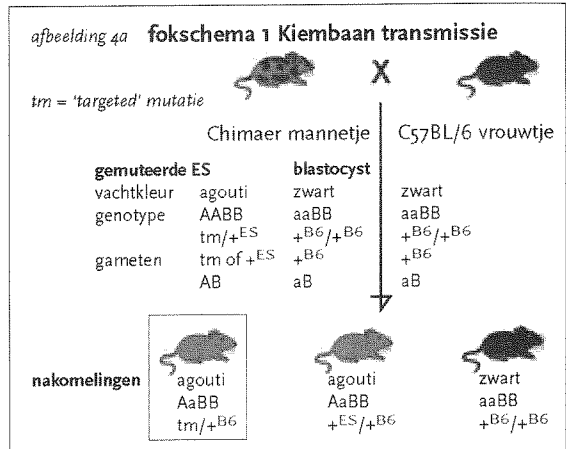
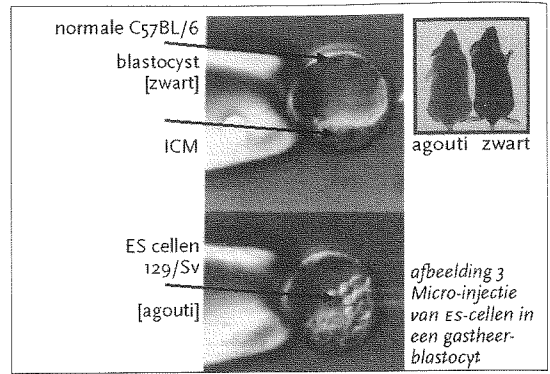
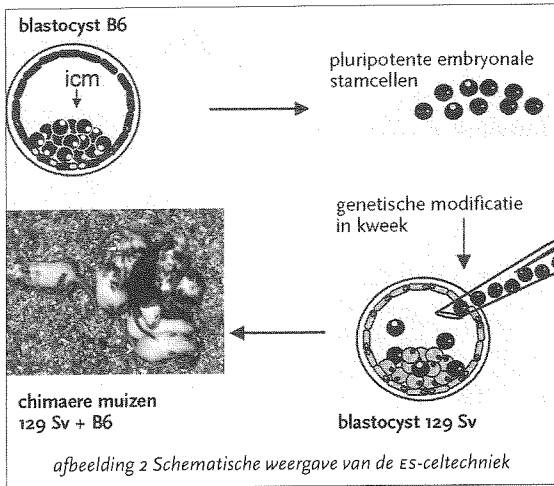


van dezelfde soort) en heterologe organen, weefsels of cellen van een vreemde diersoort pas na heel lange tijd worden afgestoten. Immunodeficiente dieren, zoals de naakte muis en rat, worden gebruikt om de (bij)werkingen van geneesmiddelen te bestuderen zonder dat het immuunsysteem hierbij interfereert (3). Overigens heeft het nude-allel de code *Fox1^{nu}* gekregen, waarbij *Fox1* staat voor 'forkhead box N1'.

Genetische modificatie via embryonale stamcellen

In het verleden heeft Biotechniek reeds aandacht besteed aan het maken van transgene dieren door middel van genetische modificatie van embryonale stamcellen (ES-cellen) (4). Middels deze techniek is het mogelijk om gericht veranderingen aan te brengen in genen. In afbeelding 2 is de procedure nog eens schematisch weergegeven.

In het algemeen worden ES-cellen uit blastocysten van een 129 inteeltstam (agouti = grijs/bruine vacht kleur) geïsoleerd. Om nog onbekende redenen produceren de



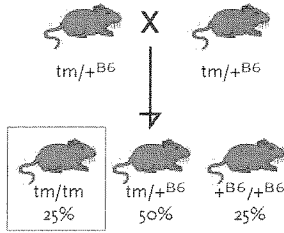
129 substammen ES-cellen die levensvatbaar zijn na het elektroporatie en implantatie-proces (5). Bij elektroporatie wordt een suspensie van losse cellen samen met het opgeloste DNA in een speciale elektrodekamer gebracht waarna een korte spanningspuls wordt gegeven. Hierdoor ontstaan tijdelijk openingen in de membranen die de cel en zijn kern omgeven, waar de relatief grote DNA-moleculen door naar binnen kunnen komen, zodat ze in het genoom kunnen integreren. Bij de ES-cellen van andere inteeltstammen van de muis en die van de rat is dat niet het geval. Vervolgens probeert men via homologe recombinatie het te bestuderen gen te veranderen. Succesvol genetisch gemodificeerde ES-cellen worden hierna geselecteerd en deze cellen worden dan door middel van micro-injectie in een gastheerblastocyst, die doorgaans afkomstig is van een C57BL/6-stam (non-agouti; zwarte vachtkleur), gebracht (Afb. 3). De geïnjecteerde blastocysten worden in de uterus van een draagmoeder (meestal een C57BL/6-vrouwtje; vanwege de goede verzorging van de pups) geplaatst. Na de geboorte verraaft een chimaere muis zich door het vlekkenpatroon van de vacht. Indien bij een chimaere muis de geslachtcelvormende cellen afstammen van de genetisch veranderde ES-cel (de zogenaamde kiembaan chimaera) kan het gemodificeerde allel worden overgedragen op de nakomelingen. Door middel van een fokprogramma kan de ingebrachte mutatie homozygoot gemaakt worden. Hierbij wordt een chimaer-mannetje doorgaans gekruist met een C57BL/6-vrouwtje (Afb. 4). Echter als je een 129-vrouwtje zou gebruiken, dan is de lijn die homozygoot is voor het gemodificeerde allel coisogeen t.o.v. de oorspronkelijke 129-inteeltstam.

jaar staat het stofje sterk in de belangstelling. Wanneer ENU intraperitoneaal geïnjecteerd wordt in mannelijke muizen ontstaan in de spermatogoniale stamcellen hoofdzakelijk puntmutaties in het DNA (6). De ENU-behandelde mannelijke muizen (Go-muizen genoemd) worden gepaard met een groot aantal niet-behandelde vrouwtjes. Het is immers de bedoeling dat een grote groep nakomelingen geboren wordt. Deze zogenaamde G1-generatie bestaat al gauw uit 14000 tot 26000 dieren (7) waarvan ieder individu een potentieel interessant en unieke mutant is. Bij dominante mutaties zijn de mutanten onder de nakomelingen direct zichtbaar door een afwijkend fenotype. Of een nakomeling afwijkt van de wild-type dieren wordt overigens op statistische gronden besloten. Bij een recessieve mutatie zijn nog twee generaties extra nodig voor de mutanten op basis van een afwijkend fenotype geïdentificeerd kunnen worden (G3-generatie; Afb. 6). Als de afwijking interessant genoeg is om mee verder te gaan, dan staat in feite slechts één afwijkende nakomeling aan de basis van de op te zetten lijn.

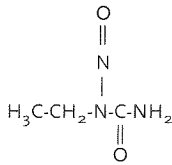
Bij ENU-mutagenese staat dus het (afwijkende) fenotype van de dieren centraal: de Engelse term hiervoor is 'phenotype-driven'; ofwel van fenotype naar gen., Bij dieren die ontstaan zijn door genetische modificatie via ES-cellen is het veranderde genotype het vertrekpunt:

afbeelding 4.b

fokschema 2 Het maken van homozygote mutanten



afbeelding 5 De mutagene stof
N-ethyl-N-nitrosourea [ENU]



‘genotype-driven’; ofwel van gen naar fenotype. Vermelenswaard is dat onder andere het Hubrecht Laboratorium in Utrecht er in geslaagd is om met behulp van deze techniek ook mutanten bij de rat te maken (8). De mutatie-frequentie door ENU is afhankelijk van de (intelt)stam, de toegediende dosis en het doseringsschema. Als per locus de mutatie-frequentie van ENU 1 op 1000 is en de muis en de rat 25000 genen bezitten, dan betekent dit dat een nakomeling 25 gemutageniseerde genen bezit. Echter als met een geselecteerde mutant doorgefokt wordt zal per generatie 50% van de

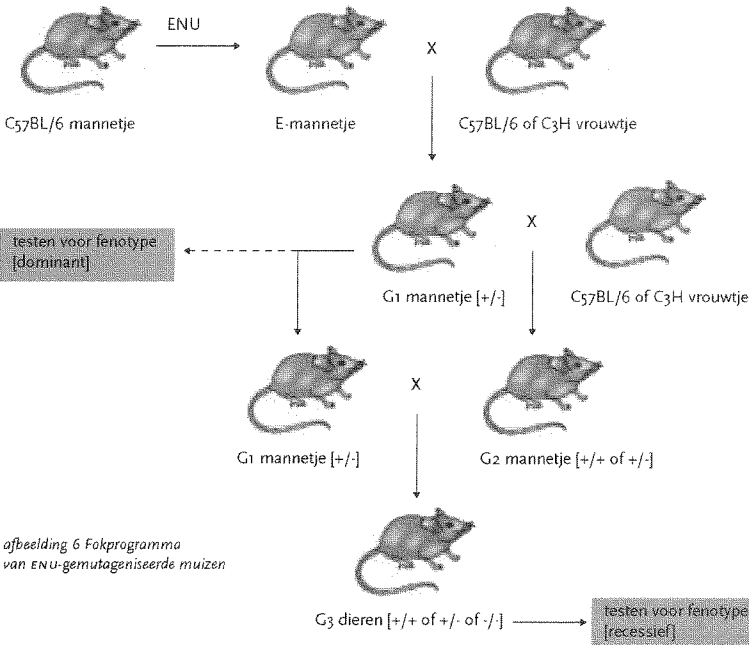
mutaties verdwijnen en uiteindelijk zal alleen de mutatie overblijven met het afwijkende fenotype waarop geselecteerd wordt. Dit betekent dat als alleen met dieren van een bepaalde inteltstam (bijvoorbeeld C_3HeB/FeJ) wordt gewerkt (7) de geselecteerde mutanten ook te beschouwen zijn als een co-isogene lijn, mits natuurlijk geen andere mutaties aanwezig zijn.

Nomenclatuurregels voor co-isogenen lijnen

Een co-isogene lijn wordt weergegeven met de volledige naam van de stam waarmee de lijn co-isogeen is. Dit wordt gevolgd door een liggend streepje. Vervolgens komt er (cursief) het gen-symbool met daarbij het gemuteerde allel in superscript, althans als de allelische variant ontstaan is door een spontane of chemisch-geïnduceerde mutatie. Een voorbeeld is de $C_57BL/6J-Tyr^{c-2J}$ co-isogene lijn; het betreft hier een spontane mutatie van het tyrosinase (= albino) locus in de $C_57BL/6J$ -inteltstam. De mutatie heeft als gevolg dat in haren en ogen het pigment ontbreekt. Ofwel het is een $C_57BL/6J$ -lijn die albino is. Een ander voorbeeld is de $C_3H/R1-bt^{tR}$ stam. Deze mutatie ontstond als gevolg van de chemische stof ENU. Het effect van deze mutatie is dat dieren met een agouti vacht (dat is de normale vachtkleur van de $C_3H/R1$ -stam) nu ineens een witte band (Engels: belt; vandaar de afkorting *bt*) om het lichaam hadden. Met andere woorden dieren van deze co-isogene lijn zijn in feite een soort Lakenvelder muizen.

Indien het gaat het om een co-isogene lijn die ontstaan is via de *es*-celtechniek, dan begint de allel-code (in superscript en cursief) met de letters *tm* (de afkorting van ‘targeted mutation’). Vervolgens komt er een serienummer van de genetische modificatie. Dit wordt ten slotte gevolgd door de registratiecode van het laboratorium of de onderzoeker.

$129S7/SvEvBrd-Fyn^{tm1Sor}$ is een voorbeeld van zo’n co-isogene lijn. De modificatie van het *Fyn*-gen (de gencode staat voor *Fyn* proto-oncogene) vond plaats met behulp van *es*-cellen en werd uitgevoerd door Philippe Soriano. De chimaere dieren werden gepaard met de $129S7/SvEvBrd$ -stam en het gemodificeerde allel werd vervolgens in homozygote toestand gebracht. Het resultaat was uiteindelijk een co-isogene lijn.



afbeelding 6 Fokprogramma van ENU-gemutageniseerde muizen

Soms kan de mutatie alleen in stand gehouden worden door middel van het paren van heterozygote dieren. Dit is helaas niet uit de naam van de stam te halen.

Ten slotte

Met de komst van de nieuwe generatie co-isogene lijnen heeft het biomedisch onderzoek krachtige diermodellen in handen om de moleculair-biologische mechanismen van complexe processen te bestuderen. De verwachting is dat het gebruik van deze categorie van proefdieren de komende jaren sterk zal toenemen. De belangrijkste zorg van critici is, niet alleen de grote aantallen dieren die hiermee gemoeid zijn, maar waarschijnlijk ook dat de hiervoor genoemde technologieën bij proefdieren leiden tot (onvoorziene) aantasting van hun welzijn. Net als bij andere (gemodificeerde) proefdieren (9) is bewaking van het welzijn van deze categorie dieren dan ook belangrijk.

Literatuur

- 1 Van Zutphen LFM, Prins JB, Van Lith HA (2003) *Genetische standaardisatie*. In: Handboek Proefdierkunde. Proefdieren, dierproeven, alternatieven en ethiek. Redactie: Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC. Vierde druk. Elsevier gezondheidszorg, Maarssen; pp 142-163.
- 2 Van Lith HA (2002) *Basale (proefdier) genetica*. VIII. Mutatie en inteelt. *Biotechniek* 41: 137-140.
- 3 Juul P, Christensen HB, Hougen HP, Svendsen O, Thygesen P, Rygaard J (1992) *Athymic experimental animals in pharmacological research*. *Toxicology Letters* 64/65: 85-92.
- 4 Wieringa B, Steeghs K, Sistermans E, van Deursen J (1991) *De transgene muis als model voor erfelijke aandoeningen*. *Biotechniek* 30: 6-9.
- 5 Simpson EM, Linder CC, Sargent EE, Davisson MT, Mobraaten LE, Sharp JJ (1997) *Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice*. *Nature Genetics* 16: 19-27.
- 6 Cordes SP (2005) *N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis: boarding the mouse mutant express*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69: 426-439.
- 7 Inamdar MS (2001) *Functional genomics the old-fashioned way: chemical mutagenesis in mice*. *BioEssays* 23:116-120.
- 8 Smits BMG, Mudde J, Plasterk RHA, Cuppen E (2004) *Target-selected mutagenesis of the rat*. *Genomics* 83: 332-334.
- 9 Spruijt BM, Van Lith HA (2005) *Welzijn van genetisch-gemodificeerde dieren*. In: *Transgene dieren; Cahiers Bio-Wetenschappen en Maatschappij* 24e jaargang, nr 2, 40-43.

De Universiteit Utrecht is een universiteit met veel verschillende disciplines. Op tal van terreinen werken deze nauw met elkaar samen. Juist op het grensvlak van de verschillende vakgebieden zijn de ontwikkelingen uiterst interessant. Bij de Universiteit Utrecht is wetenschap nooit af. Laat staan je eigen ontwikkeling.

De Universiteit Utrecht is op korte termijn op zoek naar medewerkers, die zich herkennen in deze open, gedreven en multidisciplinaire cultuur. In concreto gaat het om:

» HOOFD DIERVERZORGING

De afdeling dierverzorging van het departement Geneeskunde van Gezelschapsdieren van de faculteit der Diergeneeskunde bestaat uit de onderdelen Dierverpleging, Intensive Care en Vogels en Bijzondere Dieren en de Audiovisuele Dienst. De nadruk van uw functie ligt op het dagelijks leidinggeven aan het personeel van de afdeling. U draagt zorg voor een goede planning, coördinatie en uitvoering. U streeft daarbij naar een hoge kwaliteit en een efficiënt verloop van de werkprocessen rondom de patiënten en de eigen onderwijs- en onderzoeksdieren. U hebt een HAS-diploma (of vergelijkbaar) en relevante werkervaring waarvan minimaal vier jaar leidinggevend. U bent communicatief en sociaal vaardig en in staat om een team op inspirerende wijze te leiden. Het salaris voor deze fulltime aanstelling bedraagt maximaal € 3.162,- bruto per maand.

Meer informatie: drs. J.H. van Beem, manager bedrijfsvoering, (030) 253 1703.

Kijk voor de uitgebreide vacaturetekst op WWW.UU.NL/VACATURES

//»: Wetenschap is nooit af_



Universiteit Utrecht