

Genetyka i modyfikacje genetyczne gatunków zwierząt laboratoryjnych

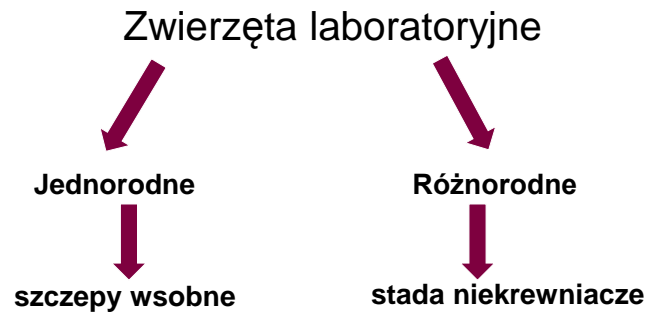
Dr inż. Katarzyna Góral-Radziszewska
Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych



Od osób pracujących ze zwierzętami wymaga się zarówno znajomości biologii gatunku i podstaw genetyki jak też praktycznych umiejętności związanych z obserwacją zwierząt i umiejętnościami wnioskowania.

Np. mała liczebność w miocie może być wynikiem:

- wsobności,
- niewłaściwego żywienia,
- złych warunków hodowlanych.



Droga pozyskiwania obu grup zwierząt to HODOWLA

Hodowlę można zdefiniować jako wpływanie poprzez selekcję i dobór na częstość poszczególnych alleli, a przez to również na częstość genotypów w populacji.

Obie techniki można stosować zarówno przy tworzeniu **szczepów wsobnych**, a więc ze zróżnicowanej populacji utworzyć jednolite genetycznie grupy zwierząt, a także przy tworzeniu **stad zwierząt genetycznie zróżnicowanych**, charakteryzujących się względnie stałą zmiennością w kolejnych pokoleniach.

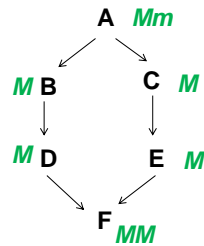


Dobór do kojarzeń

Istnieją dwie zasadnicze metody doboru zwierząt do kojarzeń, obie związane ze standaryzacją genetyczną zwierząt używanych w eksperymencie:

- **hodowla wsobna (inbred)** - wytworzenie i prowadzenie szczipów wsobnych
- **hodowla niekrewniacza (outbred)** - wytwarzanie i prowadzenie stad niekrewniaczych

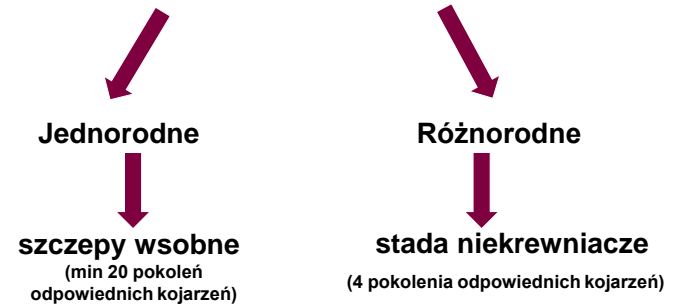
Obie te metody powinny być prowadzone w zamkniętych populacjach co przy zastosowaniu właściwej metody kojarzeń prowadzi do zmniejszenia a nawet ograniczenia zmian frekwencji alleli i genotypów w kolejnych pokoleniach.



współczynnik inbredu to występowanie w genotypie osobnika par genów w stanie homozygotycznym, powstałe jako skutek pokrewieństwa jego rodziców



Zwierzęta laboratoryjne



Model 1 locus

Mamy 2 identyczne osobniki heterozygotyczne.
Zakładając losowość kojarzeń otrzymamy:

	A	a
A	AA	Aa
a	Aa	aa

homozygoty 2/4



Gdy 2 osobniki różnią się między sobą tak, że każdy ma inny układ alleli to:

P $A a^t \times A^w a$

F1

	A	a^t
A^w	$A^w A$	$A^w a^t$
a	Aa	$a^t a$

Homozygoty = 0



w skali całego stada:

	A^w	A	a^t	a
A^w	$A^w A^w$	$A^w A$	$A^w a^t$	$A^w a$
A	$A^w A$	AA	$A a^t$	Aa
a^t	$A^w a^t$	$A a^t$	$a^t a^t$	$a^t a$
a	$A^w a$	Aa	$a^t a$	aa

to otrzymamy 4/16 homozygot czyli $F_1 = 1/4$



Uogólniając :

współczynnik inbredu w pokoleniu potomnym otrzymanym ze stada wyjściowego (w którym $F = 0$) jest odwrotnie proporcjonalny do liczby różnorodnych gamet lub odwrotnie proporcjonalny do podwojonej liczebności populacji

wartość tę określamy jako

przyrost inbredu na pokolenie $\Delta F = 1/(2N)$

gdzie N= liczebność populacji



Przyjmuje się, że populację można uznać za będącą w równowadze genetycznej, gdy ΔF (przyrost inbredu na pokolenie) jest mniejszy od 1%.

Aby spełnić ten warunek populacja musi składać się przynajmniej z **26 samicy i 26 samców** wtedy:

$$\Delta F = 1/2 \times 52 = 1/104 = 0,0096 = 0,96\%$$



W praktyce ekonomiczniej jest kojarzyć jednego samca z 2 – 3 samicami - należy wtedy obliczyć **efektywną liczebność stada (Ne)**.

Ne - jest to średnia harmoniczna z podwojonej liczebności samic (F) i samców (M) .

$$\frac{1}{Ne} = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{2M} + \frac{1}{2F} \right)$$

$$Ne = \frac{4MF}{M + F}$$

$$\Delta F = \frac{1}{2Ne}$$



Hodowla niekrewniacza (stada outbred)

- Celem hodowli niekrewniaczej jest zapobieganie wzrostowi inbrodu w kolejnych pokoleniach, czyli zachowanie zmienności genetycznej na jak najwyższym poziomie.
- Będzie to możliwe wtedy, gdy zastosujemy kojarzenia, w których:
 - każdy osobnik będzie miał szansę pozostawić po sobie potomstwo;
 - każdy osobnik będzie miał większą szansę na spotkanie osobnika o odmiennym genotypie niż podobnym do własnego.

Aby to mogło być spełnione, populacja musi być odpowiednio liczna.



Wnioski:

przyrost inbrodu na pokolenie będzie mniejszy gdy:

- 1) liczebność osobników w stadzie będzie większa
- 2) przy tej samej liczebności kojarzenia będą monogamiczne

- Najmniejsze stado niekrewniacze powinno być złożone z 64 osobników hodowlanych, w tym samców nie może być mniej niż 16 sztuk.
- Kojarzenie powinno być prowadzone zawsze według jednakowego systemu.
- W stadach niekrewniaczych powinno się utrzymywać taką samą liczebność stada z pokolenia na pokolenie.



Wytwarzanie stad niekrewniaczych

Można je uzyskiwać ze stad zamkniętych lub otwartych z udziałem szczepów wsobnych lub dzikich zwierząt.

Sposób wytworzenia stada wpływa na zmienność genetyczną, jaką będzie się ono charakteryzowało.

Bezpieczna forma tworzenia stad to:

- krzyżowanie kilku niezinbredowanych populacji zróżnicowanych wewnętrznie i niespokrewnionych ze sobą (im bardziej odległe genetycznie tym zmienność większa);
- krzyżowanie kilku szczepów wsobnych (najlepiej o różniących je cechach).



Systemy kojarzeń:

- a) monogamiczne (32 pary)
- b) poligamiczne (16 samców z 2 lub 3 samicami)
- c) bez monitorowania pochodzenia
- d) z monitorowaniem pochodzenia

Celem jest zapewnienie zmienności cech na możliwie stałym poziomie w kolejnych pokoleniach.



- z unikaniem pokrewieństwa

P A_____B C_____D $F_0 = 0$ pokolenie t-3

F_1 E, K G, H $F_1 = 0$ pokolenie t-2

ExG, ExH, KxG, KxH

F_2 S Z W Y $F_2 = 0$ pokolenie t-1

F_3 S x Y Z x W
J L $F_J = F_L = 1/2(1 + F_{t-3})$ t

$F_4 = 1/8(1 + 4F_{t-1} + 2F_{t-2} + F_{t-3}) = 1/8(1 + 0 + 0 + 0) = 0,125$



Można też kojarzyć potomstwo między sobą:

- całkowicie losowo

P A_____B C_____D $F_0 = 0$

F_1 E, K G, H $F_1 = 0$

ExK, GxH, ExG, ExH, KxG, KxH

ΔF w $F_2 = 0,125 = 12,5\%$



Rotacyjny system Falkonera (samce x samice)

1 pokol. 1x2, 2x3, 3x4 4x5.....15x16, 16x1

2 pokol. 1x3, 2x4, 3x5, 4x6.....14x16, 15x1, 16x2

3 pokol. 1x4, 2x5,3x6, 4x7.....13x16,14x1, 15x2, 16x3

4 pokol. 1x5, 2x6, 3x7, 4x8.....14x2, 15x3, 16x4

.....

15 pokol. 1x16,2x1, 3x2, 4x3.....14x13, 15x14,

16x15. itd.

Numer 1 w kolejnych pokoleniach wyznaczany jest przez samce.



Ad. a) rotacyjny system Poleya

numer rodziny w pokoleniu t		Nr rodziny w pok. t+1
samce	samice	
14	16	1
15	1	2
16	2	3
1	3	4
2	4	5
3	5	6
4	6	7
5	7	8
6	8	9
7	9	10
.	.	.
.	.	.
.	.	.
12	14	15
13	15	16

b) system Robertsona

numer rodziny w pokoleniu t		Nr rodziny w pok. t+1	
samce	samice	samce	samice
1	2	1	1
2	4	3	2
3	6	5	3
4	8	7	4
5	10	9	5
6	12	11	6
7	14	13	7
8	16	15	8
9	1	2	9
10	3	4	10
.	.	.	.
.	.	.	.
.	.	.	.
13	14	15	16
14	15	16	13

Nazewnictwo stad niekrewniaczych

Komisja Standaryzacji i Nomenklatury Zwierząt Laboratoryjnych pojęcie **stado (stock)** zarezerwowała dla populacji heterozygotycznych hodowanych według jednego z zaprezentowanych systemów. Zwierzęta uzyskiwane przy takich systemach hodowli noszą nazwę stad outbredowych - **stad niekrewniaczych**.

Nazwa dla stada może być przyznana dopiero po 4 pokoleniach hodowli niekrewniaczej, czyli po ustaleniu się zmienności genetycznej, na którą wcześniej mogły mieć wpływ heterozja, prenatalny i postnatalny wpływ matki.

Rotacyjny system hanowerski

- Uważany za najlepszy system chroniący przed wzrostem inbrodu.
- Jego podstawową cechą jest to, że odległość między rodzinami (numerami klatek), z których pochodzą samce i samice (t) w każdym kolejnym pokoleniu (t+1) wzrasta dwukrotnie.
- Tworzenie numeracji w nowym pokoleniu zawsze związane jest z numerem pokolenia matki z pokolenia t.

Nazwa kodowa stada powinna składać się z 2-4 dużych liter alfabetu poprzedzonych skrótem nazwy kodowej np. instytutu, w którym wprowadzono stado.

np.

Brw:PGCI

[Instytut: stado]

Szczepy wsobne

Szczep wsobny to grupa zwierząt reprezentujących jeden gatunek, charakteryzujących się jednorodnością genotypową i homozygotycznością.

• uzyskuje się metodą kojarzenia zwierząt w bliskim pokrewieństwie (brat x siostra) przez minimum 20 kolejnych pokoleń. Można również stosować system kojarzenia rodzic x potomek pod warunkiem, że za każdym razem do kojarzenia używać się będzie młodszego z rodziców.

Szczep wsobny powinien być oznaczony jedną lub kilkoma dużymi literami alfabetu łacińskiego. Przed ustaleniem symbolu dla nowego szczepu należy zapoznać się z wykazem już istniejących zarejestrowanych szczepów.
<http://dels.nas.edu/global/ilar/Lab-Codes>



Podszczep to grupa zwierząt wyodrębniona ze szczepu wsobnego, różniąca się od niego genetycznie w wyniku działania czynników przypadkowych lub zamierzonych.

Uzyskiwanie podszczepu:

1. po oddzieleniu części zwierząt ze szczepu wsobnego między 20 a 40 pokoleniem i dalszym ich hodowaniu w najbliższym pokrewieństwie, jako odrębnej gałęzi szczepu wsobnego
2. po oddzieleniu części zwierząt ze szczepu wsobnego po 40 pokoleniu i dalszym ich hodowaniu w najbliższym pokrewieństwie przez przynajmniej 100 pokoleń
3. po przeniesieniu pary ze szczepu wsobnego do innego laboratorium do dalszego namnażania i hodowli
4. po stwierdzeniu genetycznych różnic między niezależnie hodowanymi gałęziami szczepu wsobnego



Otrzymywanie szczepów wsobnych

Wsobność (inbred) to homozygotyczność uzyskana w wyniku kojarzeń krewniczych.

Stopień inbredu określa współczynnik wsobności F, wyrażający prawdopodobieństwo homozygotyczności osobnika.

O wsobności można mówić wtedy, gdy rodzice są ze sobą spokrewnieni np.:

$$A_1A_2 \times A_3A_4 \quad F_0 = 0$$

$$F_1 \quad A_1A_3, \quad A_1A_4, \quad A_2A_3, \quad A_2A_4 \quad F_1 = 0 \quad \text{ale} \quad R_{xy} = 0,5$$

ale kojarząc już osobnika $A_1A_3 \times A_1A_4$

można otrzymać: $A_1A_1, \quad A_1A_3, \quad A_1A_4, \quad A_3A_4$

$\frac{1}{4}$ osobników homozygotycznych pod względem danego allelu.

$$F_2 = 0,25$$



przy dowolnie wybranych osobnikach z pokolenia F_1 :

	samce	A_1A_3	A_1A_4	A_2A_3	A_2A_4
samice	gamety	A_1	A_2	A_3	A_4
A_1A_3	A_1	A_1A_1	A_1A_2	A_1A_3	A_1A_4
A_1A_4	A_2	A_2A_1	A_2A_2	A_2A_3	A_2A_4
A_2A_3	A_3	A_3A_1	A_3A_2	A_3A_3	A_3A_4
A_2A_4	A_4	A_4A_1	A_4A_2	A_4A_3	A_4A_4

prawdopodobieństwo wsobności osobnika X, gdy nie wiemy jakie gamety pod względem interesującej nas cechy przekazali rodzice, można obliczyć jako proporcję liczby homozygot do wszystkich zygot czyli:

$$F_x = 4/16 = 1/4$$



Kształtowanie się współczynnika inbredu w kolejnych pokoleniach

Pokolenie (t)	Kojarzenie pełnego rodzeństwa $F_t = 1/4 (1 + 2F_{t-1} + F_{t-2})$
0	0
1	0,25
2	0,375
3	0,5
4	0,594
5	0,672
6	0,734
7	0,785
8	0,826
9	0,859
10	0,886
11	0,908
12	0,926
13	0,94
14	0,951
15	0,961
16	0,968
17	0,974
18	0,979
19	0,983
20	0,986



Skutki hodowli wsobnej

- brak zmienności genetycznej,
- brak alleli letalnych,
- depresja inbredowa (osłabienie odporności, obniżenie zdolności reprodukcyjnych).

Wyprowadzaniu szczepów wsobnych powinna towarzyszyć **selekcja na żywotność** (wybierać należy na następne pokolenia osobniki z dużych i zdrowych miotów).



Reprodukcja szczepów wsobnych

Szczepy wsobne są utrzymywane w hodowli bankowej w celu kontynuowania hodowli szczepu. Zadaniem hodowli bankowej jest:

1. prowadzenie dalszej hodowli według systemu kojarzeń brat x siostra, lub kojarzenie z rodzicem;
2. jak najdłużej utrzymać na stałym poziomie charakterystyczne dla szczepu właściwości;
3. prowadzenie rodowodu, w taki sposób aby w każdym pokoleniu była tylko jedna para rodzicielska, czyli od pierwszej pary rodzicielskiej do ostatniego pokolenia można byłoby poprowadzić jedną linię;
4. zwierzęta bankowe muszą być znakowane i co 3 pokolenia testowane pod względem genetycznej jednorodności i charakterystycznych cech.



Stado reprodukcyjne – metoda „świąteł ulicznych” Lane-Pettera

- Zwierzęta wybrane do hodowli stanowią „białe światło”;
- Ich potomstwo tworzy „światło zielone”;
- Następne pokolenia to światło „żółte” i „czerwone”

I pokolenie „światło białe”	do hodowli
II pokolenie „światło zielone”	do hodowli
III pokolenie „światło żółte”	do hodowli
IV pokolenie „światło czerwone”	do doświadczeń

- 1) Nie można kojarzyć zwierząt pochodzących z różnych „świąteł”
- 2) Nie można przeznaczać do dalszej hodowli zwierząt ze „światła czerwonego”
- 3) Możliwe kojarzenia poligamiczne
- 4) Brak konieczności kojarzeń b x s



Nazewnictwo

- Podszczep oznaczamy symbolem szczepu rodzicielskiego, następnie kreską pochyłą i odpowiednim symbolem podszczepu.
- Symbol ten stanowi zwykle skrót nazwiska badacza lub nazwy ośrodka, w którym podszczep został wyhodowany. Powinien być wyrażony jedną lub kilkoma literami, z których tylko pierwsza może być literą dużą. Wyjątkowo dopuszcza się jako symbol podszczepu cyfrę lub małą literę. Przy przenoszeniu podszczepu do nowego laboratorium poprzedni symbol podszczepu może być zastąpiony nowym lub można pozostawić oba symbole, co pozwala na odtworzenie historii podszczepu.

C3H/AW

- podszczep hodowany w Instytucie Onkologii w Warszawie (W) sprowadzony z Instytutu Raka w Amsterdamie (A)

A/W

- podszczep szczepu A prowadzony w Instytucie Onkologii w Warszawie



Nazewnictwo cd.

Outbred

- Wistar Hannover (HsdBrIHan:WIST)
- Wistar (CrI:WI)
- Long Evans (CrI:LE)

Inbred

- Wistar Albino Glaxo (WAG/OlaHSD)
- Wistar Kyoto (WKY/NHsd)
- Long Evans (LE/CpbHsd)



Nazewnictwo mieszańców szczepów wsobnych

Mieszance F₁

[BALB/cJ x DBA/2J] F₁ skrót CD2F1

szczep matki szczep ojca



Mieszance F₂

[(BALB/cJ x DBA/2J)F1 x (BALB/cJ x DBA/2J)F1]F2

lub (BALB/cJxDBA/2J)F2 skrót CD2F2



Mieszzańce międzyszczepowe F₁

A x B AB F1 (DBA/2 x C57BL/6)F1 D2B6F1	B x A BA F1 (C57BL/6 x DBA/2)F1 B6D2F1
---	---



Zalety mieszańców:

- heterozja (wzrost oporności na choroby i stres, większe mioty, większa żywotność);
- biorca tkanek przy przeszczepach;
- większa żywotność przy działaniu szkodliwych mutacji, promieniowania, leków, patogenów czy hormonów.



Mieszzańce F₂

(C57BL/6JWx129)F₂

Zastosowanie:

- genetyczna kontrola dla myszy przenoszących mutacje (*knockouts*) z wykorzystaniem podanych szczepów (F₂ są lepsze do tego celu niż F₁ – segregacja genów);
- do mapowania genetycznego cech, którymi różnią się szczepy wyjściowe;
- do określania genów warunkujących cechy ilościowe.



Populacja mozaikowa

- Grupa zwierząt z kilku wsobnych szczepów i ich dwukierunkowych mieszańców w tym samym wieku

	Samce ze wsobnych szczepów	A	B	C	D
Samce ze wsobnych szczepów					
A	AA	AB	AC	AD	
B	BA	BB	BC	BD	
C	CA	CB	CC	CD	
D	DA	DB	DC	DD	

Mioty otrzymane z krzyżowania i krzyżowania

- Zastosowanie w badaniach:
 - nad specyficzną reakcją danego szczepu;
 - specyficzną reakcją danego mieszańca (12 typów)
 - szacowanie heterozji;
 - szacowanie efektu matecznego;
 - szacowanie ogólnej i specyficjnej zdolności krzyżowniczej;
 - badanie wpływu genów sprzężonych z płcią.



Szczep kongeniczny i koizogeniczny

- Dwa szczepy kongeniczne różnią się krótkim odcinkiem jednego chromosomu.
- Dwa szczepy koizogeniczne różnią się jednym genem.
- Otrzymuje się je na drodze szeregu krzyżówek genetycznych połączonych z równoczesną selekcją.

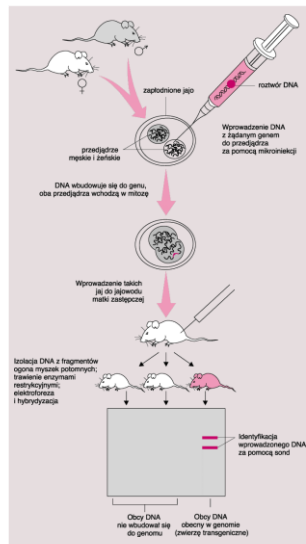
Nazewnictwo

Część pierwsza to pełny lub skrócony symbol szczepu tła genetycznego, a druga zawiera skrócony symbol szczepu lub stada dawcy, albo też symbol określający gen wprowadzony ze szczepu dawcy.

C3H.B10 - szczep tła C3H, szczep dawca C57BL/10 (B10)
C57BL/10-H-2^d - szczep różni się od szczepu tła haplotypem: H-2^d



Otrzymywanie zwierząt transgenicznych



www.wiwi.pl



Zwierzęta transgeniczne

Zwierzęta laboratoryjne, które są tak modyfikowane genetycznie, że zmiany są dziedziczne.

Nazewnictwo

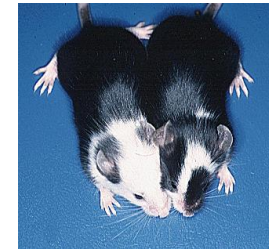
TgN(xxxxx)#Bri

Tg – wskazuje, że linia myszy jest transgeniczna
N – transgen został wprowadzony przez niehomologiczną wstawkę

(xxxxx) – oznaczenie wstawionego genu

– kolejny numer danej linii

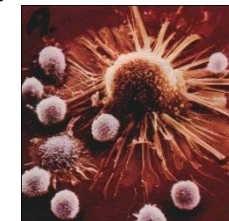
Bri – kod laboratorium, w którym otrzymano daną linię myszy



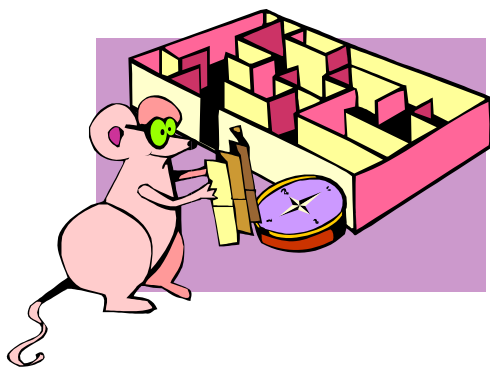
Do czego są używane?

Przykładowe badania przeprowadzone na transgenicznych myszach dotyczyły chorób:

- Nowotworowych
- Nadwagi
- Chorób serca
- Cukrzycy
- Artretyzmu
- Starzenia
- Choroby Parkinsona



"Naturalni zabójcy" rozpoczynają walkę z nowotworem. © Jim Thomas



Dziękuję