



Strategie minimalizacji wpływu dryfu genetycznego i maksymalizacji powtarzalności wyników w badaniach prowadzonych z wykorzystaniem myszy

Autor:

Janine Low-Marchelli, PhD, Senior Technical Information Scientist, The Jackson Laboratory

Tłumaczenie:

dr inż. Marta Gajewska
Zakład Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie

Streszczenie

Dryf genetyczny występuje w każdej hodowli myszy laboratoryjnych i ma potencjalnie negatywny wpływ na powtarzalność wyników eksperymentów oraz naukowe wnioski wyciągane na ich podstawie. Mutacje spontaniczne, na skutek dryfu utrwalone w hodowanej populacji mogą przez lata być niezauważane, aż do chwili analizowania cech, na które te mutacje oddziałują. Chociaż nie można go całkowicie zatrzymać, wpływ dryfu genetycznego może być zminimalizowany poprzez staranne i przemyślane zarządzanie hodowlą. Ponieważ poszczególne hodowle mogą się różnić wielkością i stosowaną strategią hodowlaną, używanie właściwego nazewnictwa szczepów wsobnych myszy, włącznie z nomenklaturą odszczepów, daje korzyści szeroko rozumianemu środowisku naukowemu.

Znaczenie stabilności genetycznej w badaniach myszy laboratoryjnych

Dla przeciętnego badacza tło genetyczne myszy, z którymi pracuje, może nie być szczególnie istotne, a często zdaje się wcale nie mieć znaczenia. Głównym celem badacza jest przecież zrozumienie procesu chorobowego, opublikowanie wyników i uzyskanie funduszy na kolejne badania. Trzeba jednak pamiętać, że kluczowe dla powodzenia tych działań jest utrzymanie stabilności genetycznej i ograniczenie wpływu dryfu genetycznego na badaną populację zwierząt. Myszy laboratoryjne to unikatowe elementy badań naukowych. Jako żywe organizmy podlegają zmianom na przestrzeni swego życia, a także, co istotne, z pokolenia na pokolenie. Poza tym, dziedziczne zmiany sekwencji DNA są podstawą zmienności międzygatunkowej i motorem ewolucji. Trzeba pamiętać, że zmiany w DNA powstają nawet przy braku presji selekcyjnej (ewolucyjnej). Początkowo te mutacje zdają się być cichymi, nieistotnymi fluktuacjami w genetycznym obrazie osobnika. Jednakże te, wydawałoby się nieznaczące zmiany z czasem stają się znaczącym źródłem niewytłuma-

czalnych przypadków braku powtarzalności eksperymentów. Badacze myszy mają zatem dylemat. Z jednej strony pozyskiwanie myszy do badań wymaga ich hodowli, ale ta niesie ze sobą ryzyko rozprzestrzenienia zmienności genetycznej, a co a tym idzie – rozprzestrzenienia braku powtarzalności w eksperymentach. Z jednego doświadczenia na drugie, z jednej publikacji na drugą, zmienność danych stanowi nieprzewidywalny element procesu naukowego.

Celem tego artykułu jest przekazanie badaczom informacji dotyczących znaczenia wpływu dryfu genetycznego na proces badań, wskazanie najlepszych dróg minimalizacji jego oddziaływania i zaproponowanie działań skierowanych na odwrócenie jego skutków, jeśli już narósł on w danej hodowli. Użycie oficjalnego nazewnictwa szczepów wsobnych myszy i szczegółowa informacja dotycząca pokolenia hodowlanego, przekazywana w publikacjach i wnioskach grantowych, to podstawowe działania badaczy, które mogą promować powtarzalność badań i odpowiedzialne wykorzystanie zwierząt w badaniach.

Sposoby zwiększania się dryfu genetycznego i jego występowanie w hodowlach myszy laboratoryjnych

Proces uwsobniania (kojarzenia w pokrewieństwie) to bardzo skuteczna metoda minimalizacji zmienności genetycznej w każdym locus mysiego genomu. Prowadzi do ujednolicenia fenotypu i tworzy podstawy powtarzalności doświadczeń. Jednorodność genetyczna umożliwia porównywanie pojedynczych zmiennych pomiędzy grupami badanymi i eksperymentalnymi, a zatem umożliwia przypisanie konkretnych rezultatów działaniu badanego czynnika. Tak jak gatunki dziko żyjące, populacje szczepów wsobnych myszy utrzymywane w izolacji zmieniają się z czasem. Spontaniczne mutacje mogą przybierać kształt polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP), delecji, insercji, duplikacji i innych błędów zachodzących w trakcie replikacji DNA oraz podczas mejozy. Ten proces przypadkowego powstawania, zanikania i utrwalania spontanicznych



mutacji w populacji nosi nazwę dryfu genetycznego (Lee Silver 1995). To jak silnie dryf genetyczny wpływa na zwierzęta z danej hodowli jest zmienne i trudne do zdefiniowania, ale wydaje się, że oddziaływanie to może mieć istotne znaczenie dla różnych cech utrzymywanych zwierząt. Przeciętna długość trwania mysiego pokolenia to 3-4 miesiące, ponieważ myszy osiągają dojrzałość płciową w wieku 5-8 tygodni. Potomstwo pojawia się zazwyczaj po trzech tygodniach od kojarzenia. Bazując na częstości zachodzenia mutacji spontanicznych określonej na podstawie analizy zmian genów umaszczenia u ponad miliona myszy, szacuje się, że jedna mutacja wpływająca na fenotyp zwierzęcia powstaje średnio co 1,8 pokolenia (Drake i wsp. 1998, Russell i Russell 1996). Ryzyko użycia do hodowli myszy noszącej spontaniczną mutację germinálną, a więc możliwą do przekazania potomstwu jest większe w małych populacjach, niż w dużych (Rys. 1A). W przypadku dowolnej mutacji germinálnej połowa spośród potomstwa nosiciela będzie również nosicielami tej mutacji (Rys. 1B). U zwierząt szczepowych, kojarzonych wsobnie, statystycznie istnieje 25% szans na to, że mutacja zostanie utrwalona w populacji (jako genotyp homozygotyczny) (Chamary i Hurst, 2004; Drake i wsp. 1998).

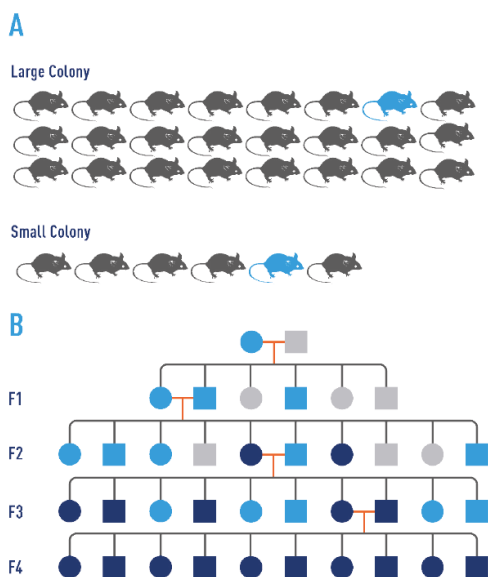


Fig 1. Ryzyko rozprzestrzenienia się spontanicznej mutacji jest większe w małych niż dużych stadach hodowlanych.

A) Prawdopodobieństwo użycia myszy będącej nosicielem danej mutacji (oznaczone kolorem jasnoniebieskim) do hodowli jest wyższe w małym stadzie, niż w licznym.

B) W każdym cyklu hodowlanym jest 25% szans na to, że nowa mutacja zostanie utrwalona w populacji. Na przykład, zgodnie z prawami Mendla, w pokoleniu F1 pojawi się 50% zwierząt typu dzikiego (oznaczonych kolorem szarym) i 50% heterozygot (jasnoniebieskie). Jeżeli losowo do dalszej hodowli zo-

staną wybrane 2 heterozygoty, to w pokoleniu F2 pojawi się 25% osobników typu dzikiego, 50% heterozygot i 25% homozygot (ciemnoniebieskie). Proces ten może być tak długo kontynuowany, aż wszystkie osobniki w stadzie będą homozygotyczne pod względem mutacji (F3, F4). Należy jednak pamiętać, że dryf genetyczny ma charakter losowy – populacja może dryfować w dowolnym kierunku, w zależności od tego, jakie będą genotypy zwierząt wybranych do hodowli. Stąd prawdopodobieństwo, że mutacja zostanie utrwalona w całej kolonii hodowlanej jest takie samo jak to, że zostanie z niej w całości usunięta.

Sygnaly działania dryfu genetycznego - określanie podszczepów

Podszczep, to boczne odgałżenie szczepu wsobnego, w którym podejrzewa się albo już stwierdzono istnienie różnic genetycznych w porównaniu do szczepu wyjściowego (<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml#substrains>). Ponieważ dryf genetyczny może w różny sposób działać w różnych dwóch populacjach danego szczepu wsobnego, określenie podszczepu jest kluczowym elementem prawidłowej nomenklatury. Podszczechy są oznaczane poprzez dodanie unikalnego kodu, nadawanego przez The Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (<http://dels.nas.edu/global/ilar/Lab-Codes>). Kod laboratorium określa instytut, pracownię lub badacza, który wytworzył lub jest odpowiedzialny za utrzymanie danego szczepu (Tab. 1). Ponieważ kody laboratoriów są dodawane kolejno do symbolu szczepu, na podstawie nomenklatury można określić pochodzenie danego szczepu. Na przykład: szczep C57BL/6NJ był utrzymywany przez wiele lat w The National Institute of Health, USA (N), a obecnie jego hodowla jest kontynuowana w The Jackson Laboratory, USA (J) (Rys. 3). Poprzez zastosowane rozszerzenie, nazewnictwo odszczepów daje ogólną wskazówkę, że pomiędzy dwoma podszczechami istnieją różnice genetyczne.

Kod laboratorium	Hodowca
CrI	Charles River Laboratories
Hsd	Envigo (formerly Harlan Laboratories)
J	The Jackson Laboratory
N	National Institutes of Health
Rj	Centre D'Elevage R. Janvier
Tac	Taconic Farms, Inc.

Tab 1. Najpowszechniejsze kody laboratoryjne (symbole laboratoriów) spotykane w oznaczeniach podszczechów myszy.

The Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) nadaje unikatowe oznaczenia instytutów, laboratoriów czy indywidualnych badaczy tworzących lub/i utrzymujących kolonie hodowlane myszy laboratoryjnych.



Przypuszczalne różnice genetyczne – liczba pokoleń

Każdy szczep, który jest hodowany w izolacji od szczepu rodzicielskiego przez 20 kolejnych pokoleń (ok. 5-6 lat), należy podejrzewać o istnienie różnic genetycznych, a w co za tym idzie określać mianem podszczepu. Co więcej, liczby generacji się sumują, tzn. jeśli 2 ośrodki uzyskały myszy z tego samego źródła (wspólnego przodka) i hodują je przez 10 pokoleń, to każdy ośrodek posiada podszczep, względem drugiego, ponieważ oba szczepy dzieli łącznie 20 pokoleń. Pierwsze szczepy wsobne (m.in. C57BL/6, DBA, C3H, BALB, CBA) wykorzystywane w badaniach biologicznych, zostały wyprowadzone około 100 lat temu i do dnia dzisiejszego pozostają jednymi z najczęściej wymienianych w publikacjach. Ponieważ szczepy te liczą obecnie ponad 200 pokoleń i są hodowane przez liczne instytucje na całym świecie, należy założyć, że dryf genetyczny wystąpił w tym czasie we wszystkich tych szczepach. Ze względu na wpływ dryfu genetycznego jest możliwe, że obserwacje uzyskiwane na tych zwierzętach różnią się od wyników uzyskanych na zwierzętach szczepu rodzicielskiego.

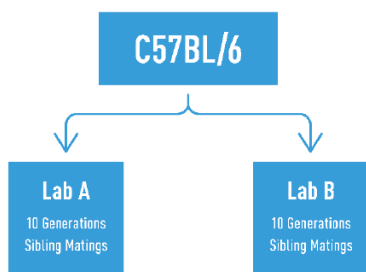


Fig 2. Powstawanie podszczepów.

Podszcypy powstają po 20 pokoleniach niezależnej hodowli. Jeśli nawet żadne z laboratoriów indywidualnie nie prowadzi hodowli od 20 pokoleń, to podszcypy A i B są oddzielone de facto przez 20 generacji niezależnej hodowli (pokolenia hodowlane sumują się). Dodawanie kodów laboratoriów do symboli szczepów pozwala na wstępne oszacowanie, czy dryf genetyczny może wpływać na oceniane podszcypy.

Wykryte różnice genetyczne - definiowanie podszczepów na podstawie obserwowanych różnic fenotypowych

Podszcypy mogą również być definiowane po zaobserwowaniu różnic fenotypowych pomiędzy dwoma hodowanymi grupami zwierząt danego szczepu. Nawet, jeśli mutacje spontaniczne prowadzą do zmiany fenotypu, często pozostają przez lata niezauważone (jeśli zmiana ta nie dotyczy morfologii utrzymywanych myszy). Najczęściej wówczas, kiedy mutacja jest już utrwalona w formie homozygotycznej badacze lub wyjątkowo

docieklive osoby opiekujące się daną grupą zwierząt stwierdzają, że z myszami, którymi się zajmują „coś jest nie tak”. Zmiany takie wykrywane są przypadkowo i często zależą od profilu badań, jakie prowadzi dane laboratorium. Identyfikacja działania dryfu genetycznego polega w tym przypadku na zrozumieniu, że nieoczekiwane rezultaty są czymś więcej, niż tylko „błędami eksperymentu”. W dalszej kolejności, powinno to prowadzić do identyfikacji mutacji odpowiedzialnej za obserwowane zmiany (i w konsekwencji – zdefiniowania nowego podszczepu).

Na przykład rodzicielski szczep C3H dał początek dwóm podszcypom hodowanym w The Jackson Laboratory przez różnych badaczy, którzy przez wiele lat nie zauważali różnic między tymi zwierzętami. Dr Walter Heston hodował ten szczep w latach 30-tych XX wieku (obecnie podszczep znany jest jako C3H/HeJ). W roku 1962 Heston przekazał część swoich zwierząt innemu badaczowi z Jackson Laboratory – ich nowym hodowcą stał się dr Henry Outzen (obecnie to podszczep C3H/HeOuJ). W późnych latach 60-tych stwierdzono, że szczep Hestona jest oporny na działanie lipopolisacharydu (LPS), podczas gdy szczep Outzena pozostał wrażliwy na tę substancję. Później mutacja odpowiedzialna za obserwowaną różnicę została zmapowana w genie Tlr4, który jest zaangażowany w rozpoznawanie patogenu i aktywację układu immunologicznego (Poltorak i wsp. 1998a, Watson i wsp. 1978). Do czasu, gdy substytucja C/A w 2342 nukleotydzie genu Tlr4 została odkryta, utrwalono ją w podszcypie Hestona, prawdopodobnie pomiędzy rokiem 1958 a 1966 (Poltorak i wsp. 1998b). Jest prawdopodobne, że gdyby zwierzętom z podszcypem Hestona nigdy nie podano LPS, mutacja w genie Tlr4 nie zostałaby zidentyfikowana, a wnioski z badań dotyczących immunologii w tym szczepie byłyby wysoce kontrowersyjne.



Znane sekwencje genomowe są specyficzne dla podszczepów.

Oprócz przypadkowych odkryć, jedyną drogą do definitywnego zidentyfikowania czy dryf genetyczny wystąpił w populacji, jest sekwencjonowanie DNA badanego szczepu i porównanie go z genomami referencyjnymi. Samica ze szczepu C57BL/6J była pierwszą myszą, której genom został w całości zsekwenconowany przez the Mouse Genome Sequencing Consortium (Chinwalla i wsp. 2002). Do tej pory genomy 15 innych najczęściej używanych szczepów wsobnych zostały zsekwenconowane. Wszystkie one reprezentują podszcypy „J”, czyli oznaczone oficjalnym kodem ILAR dla The Jackson Laboratory (Adams i WSP 2015). www.ensembl.org/Mus_musculus?info?Strains (Tab. 2). Genomy ponad 20 następnich szczepów zostały zsekwenconowane, dzięki czemu zidentyfikowano obecne w nich polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP), insercje, delecje i warianty strukturalne różniące je od referencyjnego genomu C57BL/6J (Frazer i WSP 2007 i www.sanger.ac.uk/science/data/mouse-genomes-project).

Obecnie znane SNP dla określonych podszczepów można wyszukiwać i porównywać w Mouse Phenome Database (MPD) – bazie danych zawierającej szereg danych fenotypowych i genetycznych, dotyczących większości szeroko używanych szczepów wsobnych myszy (<http://phenome.jax.org>).

Szczep myszy, Pełna nomenklatura	JAX® kod szczepu	Sekwencjonowanie w Ensembl	Dane fenotypowe w MPD	Objęte GSP
C57BL/6J	000664	•	237	•
129S1/SvImJ	002448	•	133	•
A/J	000646	•	177	
AKR/J	000648	•	114	
B6.129P2-Apoe ^{tm1Unc} /J	002052	•	7	•
BALB/cJ	000651	•	93	
BALB/cByJ	001026		118	•
C3H/HeJ	000659	•	158	•
C57BL/6NJ	005304	•	2	•
CAST/EiJ	000928	•	97	
CBA/J	000656	•	110	•
DBA/1J	000670		36	•
DBA/2J	000671	•	166	•
FVB/NJ	001800	•	133	•
LP/J	000676	•	84	
NOD/ShiLtJ	001976	•	106	•
NOD.CB17-Prkdc ^{scid} /J	001303	•	8	•
NZO/HILtJ	002105	•	49	
PWK/PhJ	003715	•	43	
SPRET/EiJ	001146	•	34	
WSB/EiJ	001145	•	67	



Wpływ tła genetycznego na wnioski z badań

Jak to przedstawiono wcześniej na przykładzie szczepu C3H, w podszczepach mogą pojawiać się mutacje spontaniczne o potencjalnie istotnym wpływie na wyniki badań. Jeśli eksperymenty nie są odpowiednio kontrolowane pod względem użycia właściwego podszczepu, może to doprowadzić do fatalnych konsekwencji. Jak badacz może określić, który z podszczepów jest „najlepszy” do jego badań, jeśli takie spontaniczne mutacje mogą powstawać zarówno w wielkim repozytorium, jak i w odosobnionym laboratorium? Niestety, nie ma na pytanie prostej odpowiedzi. Najlepszym sposobem określenia, czy tło genetyczne ma znaczenie, jest ocena kolejnych eksperymentów i porównanie osiągniętych wyników. Ponieważ nie jest możliwe przetestowanie wszystkich istniejących podszczepów pod kątem badanego problemu, kolejnym sposobem zrozumienia potencjalnego wpływu tła genetycznego na wnioski z badań, jest poleganie na obserwacjach poczynionych przez innych badaczy, ich wnioskach przedstawionych w recenzowanych czasopismach i kontynuacja badań na wskazanych przez nich podszczepach.

Podszczepy C57BL/6

Jest pewne, że różnice podszczepowe występują u wszystkich szczepów wsobnych. Jak do tej pory szczep C57BL/6 jest najczęściej pojawiającym się w publikacjach, z ponad 37 000 wpisami w bazie PubMed (Tab. 3). Z tego powodu w niniejszej publikacji skupimy się na znanych różnicach w rodzinie podszczepów C57BL/6. Obecnie we wspomnianej bazie znajduje się ponad 16 000 rekordów odnoszących się do oryginalnego podszczepu, pochodzącego z Jackson Laboratory C57BL/6J. Kolejne wpisy odnoszą się do podszczepów wyprowadzonych z oryginalnego C57BL/6J. Niemal 1200 fraz dotyczy podszczepów wywodzących się od szczepu C57BL/6N. Oczekuje się, że użycie podszczepów pochodzących od C57BL/6N gwałtownie zwiększy się w najbliższych latach, gdy 20 000 genów zostanie zmodyfikowanych w komórkach embrjonalnych, pochodzących od myszy C57BL/6N przez International Knockout Mouse Consortium (IKMC) (<http://www.mousephenotype.org>). Oryginalny podszczep C57BL/6J z The Jackson Laboratory został przekazany do the National Institute of Health (NIH) w 1951 roku. Tamtejszy podszczep (C57BL/6N) trafił następnie do kilku instytucji, w tym do Charles River Laboratories w roku 1974 (C57BL/6NCrI), do Harlan (obecnie Envigo, C57BL/6NHsd) – dwukrotnie, w roku 1974, a następnie w 1988, oraz do Taconic (C57BL/6NTac) w roku 1991. W roku 2005 podszczep N powrócił do The Jackson Laboratory i jest znany jako C57BL/6NJ. Obecnie podszczep C57BL/6J oddziela ponad 100 generacji od każdego z podszczepów C57BL/6N (Rys. 3).

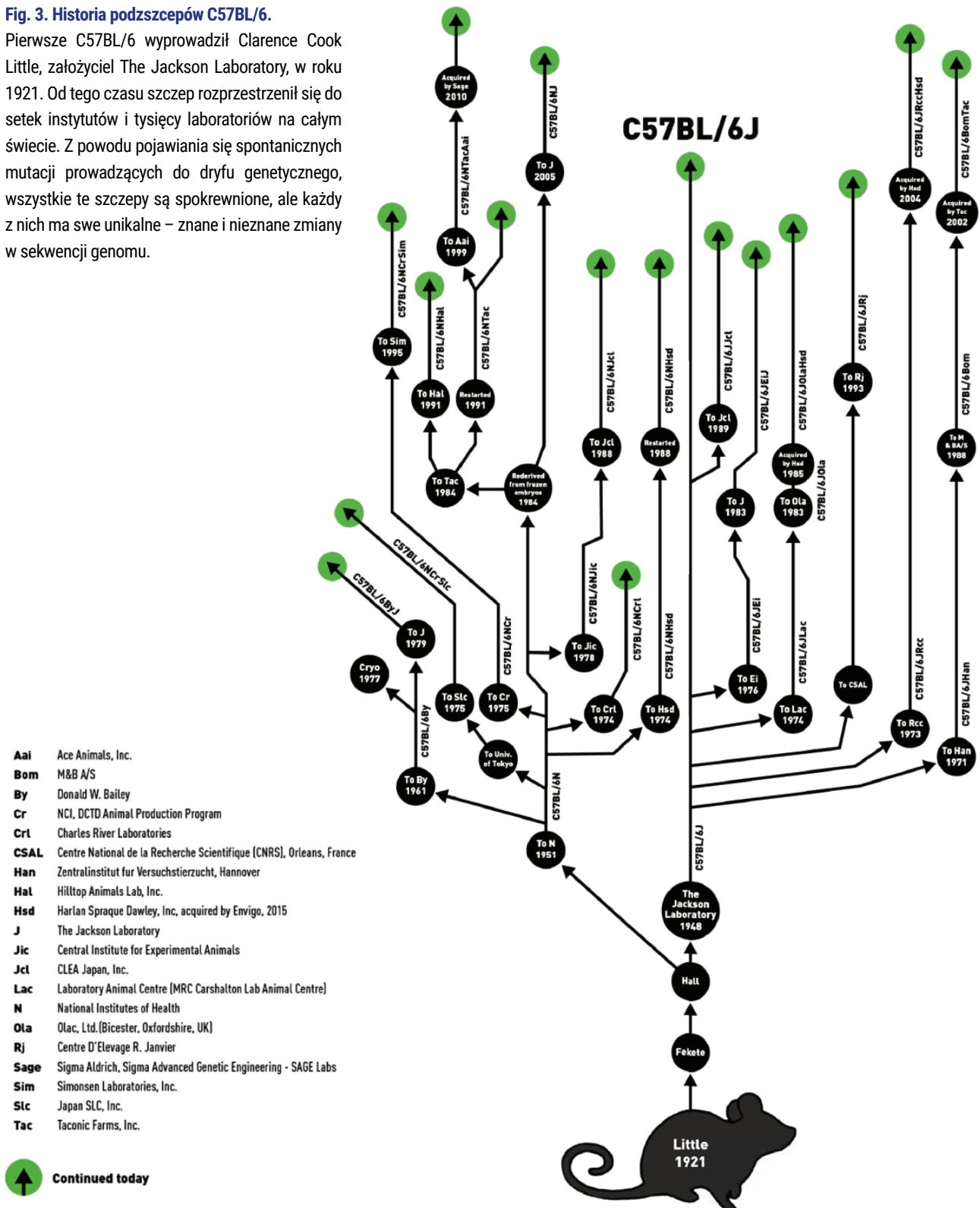
Szukana fraza	Wpisy PubMed
C57BL/6	37122
C57BL/6ByJ	112
C57BL/6J	16390
C57BL/6J0laHsd	53
C57BL/6JBomTac	11
C57BL/6JRj	7
C57BL/6N	1182
C57BL/6NCrI	71
C57BL/6NJ	11
C57BL/6NHsd	41
C57BL/6NTac	78

Tab. 3. Występowanie popularnych podszczepów C57BL/6 w publikacjach naukowych na podstawie wyników przeszukania bazy PubMed.



Fig. 3. Historia podszcepów C57BL/6.

Pierwsze C57BL/6 wyprowadził Clarence Cook Little, założyciel The Jackson Laboratory, w roku 1921. Od tego czasu szczep rozprzestrzenił się do setek instytucji i tysięcy laboratoriów na całym świecie. Z powodu pojawiania się spontanicznych mutacji prowadzących do dryfu genetycznego, wszystkie te szczepy są spokrewnione, ale każdy z nich ma swe unikalne – znane i nieznanne zmiany w sekwencji genomu.





Wiele publikacji pokazuje dziedziczne różnice fenotypowe między odszczepami N i J, które to różnice są skutkiem działania dryfu genetycznego. W zależności od badanego problemu jedne podszczepty mogą być preferowane w porównaniu z innymi (Bryant, 2011). Niektóre przykłady znanych i niedawno stwierdzonych różnic przedstawiono poniżej. U myszy C57BL/6J, w porównaniu do podszczepty C57BL/6N, stwierdzono obecność zmutowanego allelu w genie *Nnt*; zaangażowanego kontrolę w glukozozależnego wydzielania insuliny (Freeman i wsp. 2006). Myszy C57BL/6J wykazują silną preferencję do pobierania alkoholu, podczas gdy u zwierząt ze szczepu C57BL/6Ncr takich skłonności nie stwierdzono (Mulligan i wsp., 2008). Mapowanie QTL u tych szczepów może przyczynić się do lepszego zrozumienia genów zaangażowanych w proces uzależnienia od alkoholu. W podszczepty C57BL/6N występuje allel *Crbrd8*, odpowiedzialny za degenerację siatkówki, podczas gdy podszczepty C57BL/6J jest nosicielem dzikiego allelu (Mattapallil i wsp. 2012). Myszy C57BL/6JolaHsd są homozygotyczne pod względem spontanicznej mutacji w genach *Snca* i *Mmrn1* (Scecht i Schoepfer, 2001, 200). Podczas gdy prawidłowy produkt genu *Snca* agreguje w układzie nerwowym w przebiegu choroby Parkinsona, delecja obecna u wspomnianego wyżej podszczepty nie prowadzi do prionozależnej synaptotoksyczności (Asuni i wsp. 2010), ale może wpływać na ogólną degenerację neuronów ruchowych (Pelkonen i Yavich, 2011, Pena – Oliver i wsp. 2012). Myszy podszczepty C57BL/6JolaHsd mają również mniejszą gęstość kości w porównaniu ze zwierzętami podszczepty C57BL/6JRccHsd (Liron i wsp. 2017). U myszy podszczepty C57BL/6NHsd występuje (nieobecna u innych podszczepty C57BL/6) mutacja genu *Dock2*, zaangażowanego w sygnalizację B-komórkową i odpowiedź immunologiczną (Mahajan i wsp. 2016). W przypadku tego ostatniego doniesienia, w jednym z laboratoriów miał miejsce ok. dziesięcioletni regres badań, jako skutek wniosków wysnutych z użycia dwóch różnych szczepów podczas badań (www.długi). W oryginalnej publikacji podano, że użyto bliżej nieokreślonego podszczepty „C57BL/6”, jako szczepu tła przy tworzeniu knockoutów genu *Siae* (Cariappa i wsp. 2009). Gen *Siae* był uważany za uczestniczący w rozwoju i przekazywaniu sygnałów limfocytów B, na co wskazywano w pierwszej publikacji w 2009 roku. Zwierzęta z mutacją genu *Siae* zostały następnie skrzyżowane z myszami podszczepty C57BL/6J, jednak osiągnięte w toku ich badań rezultaty nie potwierdziły pierwotnych wyników (Mahajan i wsp. 2016). Po paru latach dodatkowych badań kilku dostępnych podszczepty C57BL/6 wykryto, że mutacja w innym genie - *Dock2* - wystąpiła spontanicznie u myszy C57BL/6NHsd. To właśnie ta zmiana, a nie modyfikacja genetyczna genu *Siae* była kluczowa dla badanych funkcji limfocytów B. Ten przykład powinien być przestrożą, by dokładnie monitorować i rozumieć pochodzenie myszy używanych w badaniach. Ze względu na dryf genetyczny, podszczepty szczepów wsobnych nie powinny być używane zamiennie. Należy zaznaczyć, że fenotypowy efekt spontanicznych mutacji utrwalonych w wyniku działania dryfu genetycznego na konkretny projekt badawczy, zależeć może od wielu współdziałających czynników eksperymentalnych. Na przykład wykazano, że wspomniana wcześniej spontaniczna mutacja genu *Nnt* w podszczepty C57BL/6J powoduje zmniejszenie wydzielania insuliny w porównaniu do zwierząt tego

samego podszczepty, którym wprowadzono transgen z allelem typu dzikiego genu *Nnt* (Freeman i wsp. 2006). W innym badaniu (in vitro i in vivo) wykazano, że nie ma istotnych różnic w poziomie wydzielania insuliny między podszczepty C57BL/6J i C57BL/6NTac (Wong i wsp. 2010). Co więcej, genotyp w obrębie locus *Nnt* i związek z otyłością indukowaną dietą, nie jest tak bezpośredni, jak mogłoby to wynikać z zawartości tłuszczu w diecie. (Nicholson i wsp. 2010). Podobnie, dwa podszczepty J (J, JWehi) i cztery podszczepty N (NTac, NHsd, NCrI, NJ), żywione dietą niskotłuszczową, wykazywały podobny poziom wydzielania insuliny, w odpowiedzi na zmiany poziomu glukozy we krwi. Podszczepty C57BL/6NJ, żywiony dietą wysokotłuszczową, wykazywał zmniejszoną odpowiedź insulinową na obciążenie glukozą. Jednak zjawisko to nie mogło być wyjaśnione przez genotyp w locus *Nnt*, wzrost masy ciała, zwiększenie otluszczenia, pobranie paszy czy powierzchnię komórek beta (Hull i wsp. 2017). Opublikowano informacje o szeregu innych różnic między podszczepty C57BL/6. Szereg z nich to szeroko rozumiane różnice behawioralne, dotyczące m.in. odczuwania lęku, bólu czy odpowiedzi na substancje psychoaktywne (zebrane przez Bryant i wsp. 2008). Mówiąc ogólniej, różnice są stwierdzane w szeregu podstawowych pomiarów. Porównanie podszczepty C57BL/6J i C57BL/6NTac standardowym protokołem fenotypowania 413 parametrów (EMPRESS) wykonanym przez 4 niezależne ośrodki europejskie działające ramach konsorcjum European Mouse Disease Clinic (EUMODIC), wykazało, że podszczepty te różnią się w wielu obszarach, takich jak: reakcja na stres, aktywność lokomotoryczna, siła uchwytu, parametry sercowo-naczyniowe, parametry metaboliczne i biochemiczne. Podsumowując, tło genetyczne jest jednym z komponentów projektowania eksperymentu, który to może wpływać na powtarzalność i możliwość uogólniania wyników (do ogólnobiologicznych procesów). W tym kontekście niepokojące jest, że przy niemal 37000 rekordów w PubMed, większość nie zawiera informacji o podszczepty.

Zarządzanie stadem zmniejszające wpływ dryfu genetycznego

Wszystkie stada hodowlane podlegają dryfowi genetycznemu. Istnieje jednak wiele strategii hodowlanych, które mogą minimalizować dryf genetyczny, a co za tym idzie, jego wpływ na powtarzalność eksperymentów. Te strategie obejmują m.in. używanie odpowiedniego nazewnictwa, staranność prowadzenia hodowli (w tym dokumentacji hodowlanej i opisów fenotypowych utrzymywanych zwierząt) oraz krioprezerwację. Poniżej przedstawiono wybrane metody możliwe do zastosowania hodowli.

Używanie prawidłowego nazewnictwa

Użycie pełnej i prawidłowej nomenklatury, zabezpiecza przed niejasnościami i umożliwia precyzyjną identyfikację badanego podszczepty.

- Dla codziennych działań hodowlanych zaleca się używanie kolorowych, wcześniej przygotowanych naklejek z pełną nazwą, zawierającą symbol odszczepu.

Należy ich używać zarówno na zawieszkach na klatkowych i dokumentacji doświadczalnej. Naklejki z nadrukiem redukują liczbę pomyłek pojawiają-



cych się w trakcie opisów wykonywanych ręcznie i pomagają w uwzględnianiu prawidłowego nazewnictwa. Użycie naklejek lub opisów na klatkowych w różnych kolorach jest szczególnie wskazane w miejscach, gdzie przestrzeń robocza jest ograniczona, a szczepy o zbliżonych nazwach są utrzymywane w pobliżu.

- Stosowanie prawidłowego nazewnictwa w trakcie prezentacji – również w czasie wewnętrznych seminariów.
- Takie codzienne, „nieoficjalne” informacje mogą stać się łatwo „formalnymi”, kiedy trafiają do posterów, wystąpień, publikacji lub wniosków grantowych.
- Stosowanie pełnej nomenklatury, uwzględniającej pochodzenie podszczeptu przy pierwszym opisie w publikacjach i wnioskach grantowych.
- Określenie, jak szczep będzie oznaczany w tekście i ilustracjach („dalej opisywany jako...”).
- W części opisującej metodykę badań użycie pełnej nomenklatury i pochodzenia podszczeptu.
- Identyfikacja źródła, z którego pochodzą zwierzęta na podstawie takich informacji jak nazwa laboratorium, nazwa jednostki (instytut, uniwersytet itp.) lub dostawcy numer katalogowy szczepu. Wskazane jest określenie pokolenia i sposobu hodowli. Bardziej szczegółowe informacje można znaleźć w wytycznych ARRIVE (strona plus dodać wersję polską).

Uwsobnianie, rodowody i numeracja pokoleń

Uwsobnianie pozwala na szybszą identyfikację zmienionych fenotypów w stadzie. Rodowody umożliwiają łatwiejsze usuwanie nosicieli i potencjalnych nosicieli ze stada (Fig. 4). Numeracja pokoleń pozwala na skuteczne wskazanie ewentualnego ryzyka wynikającego z działania dryfu genetycznego w stadzie.

- Uwsobnianie – tylko kojarzenie brat x siostra
- Rodowody – informacja o samicy i samcu użytych do każdego pokolenia; jeżeli utrzymuje się dwie odseparowane linie danego odszczepu, nigdy nie należy ich krzyżować ze sobą.
- Numeracja pokoleń
- N – liczba pokoleń kojarzenia wypierającego (backcross)
- F – liczba pokoleń kojarzenia wsobnego (brat x siostra)
- p – poddane krioprezerwacji
- + – informacja dotycząca liczby pokoleń przed rozpoczęciem hodowli w danym ośrodku (laboratorium)
- ? – nieznaną liczbą pokoleń

Na przykład: N6F12+F8 oznacza, że szczep był 6 razy (6 pokoleń) poddany krzyżowaniu wypierającemu, następnie przez 12 pokoleń prowadzono hodowlę systemem brat x siostra, po czym zwierzęta przeniesiono do innego ośrodka, gdzie hodowano je tym samym systemem (brat x siostra) przez kolejnych 8 pokoleń. Daje to łączną liczbę 20 pokoleń hodowlanych kojarzonych w najbliższym możliwym pokrewieństwie dla danego odszczepu. Oznacza, że

dryf genetyczny prawdopodobnie zaczął już oddziaływać i właściwym wydaje się odświeżenie tła genetycznego tej grupy hodowlanej.

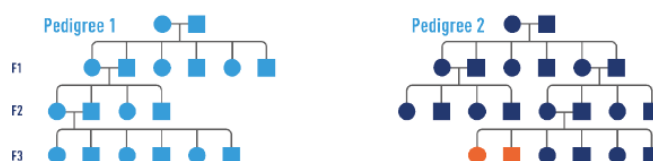


Fig. 4. Prowadzenie stada podstawowego.

Dopuszczalne jest tylko kojarzenie w najbliższym pokrewieństwie (brat x siostra) – tu przedstawione na przykładzie dwóch rodowodów stada podstawowego. Niedopuszczalne jest krzyżowanie zwierząt z różnych linii rodowodowych. Jeśli w którejś z linii pojawiają się zmienione fenotypowo osobniki, zwierzęta takie są identyfikowane i usuwane z hodowli. Linia, w której nie stwierdza się zmian fenotypowych (jasnoniebieska), może być podzielona na dwie linie potomne, bez potrzeby czasochłonnego odbudowywania kolonii bazowej de novo.

Zbieranie danych i ich regularna ocena

Dopełnieniem pracy hodowlanej powinna być szczegółowa obserwacja i wykrywanie zmian pojawiających się w fenotypie hodowanych zwierząt. Jeśli spodziewamy się wystąpienia efektów dryfu genetycznego, zmiany w fenotypie mogą dotyczyć każdej obserwowalnej lub mierzalnej cechy: pokroju, zachowania, wyników rozrodu, odczytów uzyskiwanych w trakcie eksperymentu. Identyfikacja oddziaływania dryfu genetycznego na zwierzęta hodowane lub/i eksperymentalne pozwala po pierwsze wykryć zmiany fenotypowe, po drugie podjąć działania zaradcze.

Dla niektórych szczepów wystarczające może się okazać porównanie z danymi bazowymi. Informacje takie można znaleźć w Mouse Phenome Database. Baza ta może być przeglądana, zarówno pod kątem szczepów, jak i badanych cech (<http://phenome.jax.org>) (Tab. 2).

Jeśli stwierdzono zmianę fenotypową w stadzie, dryf genetyczny jest jedną z potencjalnych przyczyn zmienności, który należy wziąć pod uwagę. Poniżej zamieszczono niektóre pytania, na które trzeba znaleźć odpowiedzi, by odnaleźć źródło obserwowanych zmian:

- Jak wiele myszy wykazuje zmieniony fenotyp? Czy mogą one być przypisane do konkretnej klatki lub odgałęzienia rodowodowego?
- Ile lat lub pokoleń dany szczep jest utrzymywany w ośrodku?
- Kiedy miało miejsce ostatnie „odświeżenie” (szczegóły w następnym rozdziale) i skąd pochodziły zwierzęta do niego użyte?

Bez dokładnych danych dotyczących utrzymywanych zwierząt, zarówno dotyczących bieżących obserwacji, jak i informacji z wcześniejszych poko-

leń, określenie, czy faktycznie doszło w danym szczepie do zmiany fenotypu może być trudne do określenia.

Odświeżenie tła genetycznego

Po 5-10 pokoleniach inbredowania stado hodowlane powinno zostać odświeżone, lub wręcz wymienione, by przeciwdziałać kumulacji efektów dryfu genetycznego. Metody odświeżenia stada mogą być następujące:

- Krzyżowanie wsteczne (backcross).
Szczepy wsobne myszy genetycznie modyfikowanych (Genetically Engineered Mutant Mouse - GEMM) mogą być kojarzone wstecznie do właściwego szczepu tła lub szczepu hybrydowego, uzyskanego z wyspecjalizowanej, zaufanej hodowli, w której stosuje się techniki ograniczające oddziaływanie dryfu genetycznego na utrzymywane tam stada. Krzyżowanie wsteczne powinno być wykonane zarówno w linii męskiej, jak i żeńskiej, aby mieć pewność, że również chromosomy płci zostały „odświeżone”. Jeśli szczep jest hodowany z wykorzystaniem heterozygot lub hemizygot kojarzonych ze zwierzętami typu dzikiego (wildtype), użycie „świeżych” zwierząt, jako „wildtype”, pozwala na proste odświeżenie tła genetycznego. Przy numerowaniu pokoleń, każde kojarzenie wsteczne lub odświeżenie jest wykazywane jako dodatkowe N (patrz wcześniejsze informacje: „Uwsobnianie, rodowody, numeracja pokoleń”).
- Zakup nowych osobników hodowlanych.
W przypadku szczepów wsobnych stado hodowlane powinno być odnowione poprzez zakup nowych par hodowlanych bezpośrednio z uznanego repozytorium lub od dostawcy, który stosuje odpowiednie metody ograniczania wpływu dryfu genetycznego.
Wykorzystanie materiału genetycznego z repozytorium.
Jedynym sposobem, by całkowicie zatrzymać dryf genetyczny, jest zatrzymanie hodowli zwierząt. Szczepy, które są wykorzystywane w niewielkim stopniu i szczepy unikatowe, powinny być poddawane krioprezerwacji (zarówno nasienie, jak i zarodki), by zapobiec negatywnemu wpływowi dryfu genetycznego, zabezpieczyć przed wygaśnięciem szczepu, a także zredukować liczbę utrzymywanych zwierząt i koszty utrzymania stada. Taki zamrożony materiał biologiczny może być wykorzystany do odtworzenia stada, w którym stwierdzono występowanie dryfu genetycznego lub stwierdzono błędy hodowlane. Może być również wykorzystany do odtworzenia hodowli, która została utracona w wyniku np. choroby lub z innych powodów.

Weryfikacja tła genetycznego

- Wykonanie skanu genomu dla określenia ryzyka kontaminacji. Skan genomu lub zastosowanie macierzy SNP może pozwolić na odróżnienie blisko spokrewnionych podszczepów jak C57BL/6J i C57BL/6N.
- Sekwencjonowanie genomu.

Macierze SNP nie zdołają zidentyfikować dryfu genetycznego wewnątrz stada hodowlanego. Jedynym sposobem upewnienia się, czy dryf faktycznie ma miejsce jest wykonanie pełnego sekwencjonowania genomu i porównanie z sekwencją referencyjną.

Zaawansowane metody ograniczania dryfu genetycznego

Jeśli dryf genetyczny występuje w każdym aktywnym stadzie hodowlanym, dlaczego poszczególne laboratoria powinny odświeżać swoje hodowle poprzez sprowadzanie zwierząt z repozytoriów lub od dostawców, w których stadach również należy się spodziewać wystąpienia dryfu? Po pierwsze: duże ośrodki hodowlane utrzymują znacznie liczniejsze kolonie hodowlane niż pojedyncze laboratoria. Dzięki swej wielkości, kolonie te są znacznie mniej narażone na wystąpienie efektu szyjki od butelki (bottleneck effect), niż małe populacje. Po drugie: wiele repozytoriów stosuje w praktyce wspomniane wyżej strategie właściwego zarządzania stadem, jak pełne nazewnictwo, hodowla rodowodowa, krioprezerwacja i inne, bardziej zaawansowane metody. By oszacować wielkość dryfu genetycznego w dużych koloniach hodowanych utrzymywanych w The Jackson Laboratory, przeprowadzono sekwencjonowanie (genomu) myszy podszczepu C57BL/6J oddzielonych 69 pokoleniami i 19 latami ciągłej hodowli. Pomiędzy tymi dwoma punktami czasowymi wykryto 669 unikalnych SNP. Spośród nich 7 zmieniło sekwencję aminokwasową powstającego białka lub miejsca splicingowego. Z powyższego badania wynika, że jedna mutacja potencjalnie wpływająca na kodowane białko, powstaje raz na 10 pokoleń (7 SNP w ciągu 69 pokoleń), przy czym nie wlicza się tu większych zmian, takich jak delecje, inwersje czy duplikacje, które również mogą wywoływać konsekwencje fenotypowe. Ponieważ przeciętny czas trwania studiów doktoranckich lub stażu podoktorskiego wynosi ok. 5 lat, kariera badawcza danego naukowca może trwać 20 lat lub więcej. W tym czasie badania są prowadzone ciągle na zwierzętach z tej samej kolonii hodowlanej bez określania szczegółowych zmian w niej zachodzących. Można się spodziewać, że w kolonii tej w sposób istotny zaznacza się dryf genetyczny. Jako repozytorium, które od wielu lat zaopatruje w zwierzęta badaczy z całego świata, The Jackson Laboratory ma wyjątkowo istotne powody, by ograniczać wpływ dryfu genetycznego tak silnie, jak to tylko możliwe. Dzięki temu badacze używający podszczepów „J” mogą pracować na zwierzętach o stabilnym, powtarzalnym genomie. Podszcypy z The Jackson Laboratory są chronione przed akumulacją efektów dryfu genetycznego przez kombinację szeregu działań. Wszystkie szczepy, posiadające kod „J” są hodowane według jednego lub obu programów stworzonych, by minimalizować wpływ dryfu genetycznego. Są to Program Stabilizacji Genetycznej (GSP – The Genetic Stability Program) i Program Kontroli Jakości Genetycznej (The Genetic Quality Control Program). Szczepy, które są dystrybuowane z symbolem „J” to zwierzęta pochodzące zarówno bezpośrednio ze zwierzętarni The Jackson Laboratory w USA, jak również szczepy „J”, namażane i dystrybuowane przez Charles



River Laboratories w Europie i Japonii. By utrzymać ciągłość (jednorodność) pomiędzy tymi hodowlami, systemy zarządzania stadem hodowlanym są regularnie oceniane i podlegają akceptacji The Jackson Laboratory. Działania te zakładają użycie identycznego materiału pochodzącego z krioprezerwacji, (który jest włączany do hodowli) lub całkowite odnawianie hodowanych kolonii. Jako całość te działania efektywnie zatrzymują zmienność podszczepów.

Program Stabilizacji Genetycznej (GSP) dla najpopularniejszych szczepów „J”

Najczęściej wykorzystywane w badaniach szczepy „J” są hodowane z użyciem unikalnej strategii, która aktywnie zabezpiecza przed narastaniem dryfu genetycznego. Urząd Patentowy USA (The US Patent and Trademark Office) przyznał The Jackson Laboratory patenty na ten system w latach 2009 i 2012 (Wiles i wsp. 2009, 2012). Szczepy hodowane zgodnie z procedurą GSP podlegają krioprezerwacji w formie 2-komórkowych zarodków. Zarodki te są stopniowo przenoszone do samic – biorczyń, a urodzone z takich cięż zwierzęta są włączane do populacji aktywnej hodowanych szczepów, by zapobiec kumulacji skutków dryfu genetycznego. Bez zastosowania procedury GSP kolonia hodowlana może być wyprowadzona od jednej pary hodowlanej kojarzonej w najbliższym możliwym pokrewieństwie (brat x siostra). 2-4 razy w roku nowa para hodowlana jest wybierana, jako bazowe zwierzęta hodowlane – protopląści kolejnych pokoleń szczepu wsobnego. Użycie tego systemu sprawia, że dzisiejsza kolonia hodowlana różni się od kolonii, z którą będziemy mieć do czynienia za jakiś czas, ze względu na działanie dryfu genetycznego. W systemie GSP grupy embrionów pochodzą z jednej kolonii bazowej. Embriony są używane do odtworzenia kolonii raz na 5 pokoleń. Takie postępowanie pozwala na ograniczenie liczby aktywnych pokoleń hodowlanych. A zatem szczepy „J” hodowane wg procedury GSP są praktycznie chronione przed dryfem genetycznym zarówno w przestrzeni (w różnych ośrodkach) jak i w czasie (Tab. 3).

Program zachowania jakości genetycznej (Genetic Quality Control Program – GQC)

Dopełnieniem systemu GSP jest program kontroli jakości genetycznej (Genetic Quality Control Program – GQC) (<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/find-and-order-jax-mice/why-jax-mice/genetic-quality-control-program>). Łączy on wiele typowych narzędzi stosowanych w hodowli szczepów wsobnych, które są wykorzystywane w poszczególnych jednostkach hodowlanych (co opisano we wcześniejszych akapitach), ale charakteryzuje się bardzo wysokim stopniem odpowiedzialności za uzyskiwane wyniki (accountability). Pracownicy odpowiedzialni za opiekę nad zwierzętami poddawani są intensywnym szkoleniom umożliwiającym identyfikację wariantów fenotypowych, takich jak barwa sierści, nietypowa wielkość lub/i masa ciała, budowa szkieletu, zachowanie, parametry rozrodu, podatność na występowanie nowotworów czy długość życia utrzymywanych zwierząt. Wszystkie myszy, których fenotyp odbiega od typowej charakterystyki danego szczepu, są poddawane dokładnym badaniom, ich rodowody są szczegółowo analizowane i – jeśli istnieje

taka konieczność- dana linia rodowodowa jest usuwana z dalszej hodowli. Dodatkowo, linie rodowodowe w hodowli bankowej danego szczepu (stado podstawowe) są odseparowane od linii, których potomstwo jest przeznaczone do dystrybucji (stado produkcyjne). Stado podstawowe jest regularnie kontrolowane pod kątem anomalii genetycznych oraz wystąpieniem kontaminacji genetycznej przy pomocy zdefiniowanego panelu SNP (Petkov i WPS 2004).

Myszy JAX hodowane przez Charles River w Europie i Japonii

The Jackson Laboratory i Charles River podpisały porozumienie na zaopatrywanie lokalnych odbiorców, wykorzystujących myszy JAX do badań biomedycznych w Europie, Japonii, Korei i Tajwanie. Bazując na protokołach hodowlanych i wytycznych dotyczących kontroli genetycznej opracowanych przez The Jackson Laboratory, Charles River hoduje w Europie i Japonii myszy JAX, które mają jakość genetyczną odpowiadającą zwierzętom utrzymywanym w The Jackson Laboratory. Bardziej szczegółowe informacje można znaleźć pod adresem: www.criver.com/jaxmice.

Podsumowanie

Dryft genetyczny jest rzeczywistym czynnikiem działającym w stadach hodowlanych myszy szczepów wsobnych i może on w istotny sposób wpływać na wyniki eksperymentów i ich powtarzalność. Choć nie potrafimy całkowicie wyeliminować dryfu genetycznego, możliwe jest wprowadzenie właściwych strategii hodowlanych, zapewniających stabilność genetyczną utrzymywanych zwierząt, zarówno w niewielkich laboratoriach, jak i dużych repozytoriach lub ośrodkach komercyjnie hodujących zwierzęta na potrzeby jednostek badawczych. Powtarzalność i jakość prowadzonych badań zależy również od właściwego i dokładnego przekazywania informacji, dotyczącej nazewnictwa i danych hodowlanych szczepów wsobnych myszy używanych w eksperymentach.

Źródła:

- Adams, D.J., Doran, A.G., Lilue, J., and Keane, T.M. (2015). The Mouse Genomes Project: a repository of inbred laboratory mouse strain genomes. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 26, 403–412.
- Asuni, A.A., Hilton, K., Siskova, Z., Lunnon, K., Reynolds, R., Perry, V.H., and O'Connor, V. (2010). Alpha-synuclein deficiency in the C57BL/6J Δ OlaHsd strain does not modify disease progression in the ME7-model of prion disease. *Neuroscience* 165, 662–674.
- Boleij, H., Salomons, A.R., van Sprundel, M., Arndt, S.S., and Ohl, F. (2012). Not all mice are equal: welfare implications of behavioural habituation profiles in four 129 mouse substrains. *PLoS One* 7, e42544.
- Bryant, C.D. (2011). The blessings and curses of C57BL/6J 129 mouse substrains. *PLoS One* 7, e42544. /6 substrains in mouse genetic studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1245, 31.
- Bryant, C.D., Zhang, N.N., Sokoloff, G., Fanselow, M.S., Ennes, H.S., Palmer, A.A., and McRoberts, J.A. (2008). Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. *J. Neurogenet.* 22, 315–331.
- Cariappa A., Takematsu H., Liu H., Diaz S., Haider K., Boboila C., Kalloo G., Connole M., Shi H.N., Varki N., Varki A., Pillai S. (2008). B cell antigen receptor signal strength and peripheral B cell development are regulated by a 9-O-acetyl sialic acid esterase. *J Exp Med.* 2009 Jan 16;206(1):125-38.
- Chamary, J.-V., and Hurst, L.D. (2004). Similar Rates but Different Modes of Sequence Evolution in Introns and at Exonic Silent Sites in Rodents: Evidence for Selectively Driven Codon Usage. *Mol. Biol. Evol.* 21, 1014–1023.
- Chinwalla, A.T., Cook, L.L., Delehaunty, K.D., Fewell, G.A., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Graves, T.A., Hillier, L.W., Mardis, E.R., McPherson, J.D., et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520–562.
- Drake, J.W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., and Crow, J.F. (1998). Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics* 148, 1667–1686.
- Frazer, K.A., Eskin, E., Kang, H.M., Bogue, M.A., Hinds, D.A., Beilharz, E.J., Gupta, R.V., Montgomery, J., Morensoni, M.M., Nilsen, G.B., et al. (2007). A sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains. *Nature* 448, 1050–1053.
- Freeman, H.C., Hugill, A., Dear, N.T., Ashcroft, F.M., and Cox, R.D. (2006). Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes* 55, 2153–2156.
- Hull, R.L., Willard, J.R., Struck, M.D., Barrow, B.M., Brar, G.S., Andrikopoulos, S., and Zraika, S. (2017). High fat feeding unmasks variable insulin responses in male C57BL/6 mouse substrains. *J. Endocrinol.* 233, 53–64.
- Liron, T., Raphael, B., Hiram-Bab, S., Bab, I.A., and Gabet, Y. (2017). Bone Loss in C57BL/6J Δ OlaHsd Mice, a Substrain of C57BL/6J Carrying Mutated Alpha-Synuclein and Multimerin-1 Genes. *J. Cell. Physiol.*
- Mahajan, V.S., Demissie, E., Mattoo, H., Viswanadham, V., Varki, A., Morris, R., and Pillai, S. (2016). Striking Immune Phenotypes in Gene-Targeted Mice Are Driven by a Copy-Number Variant Originating from a Commercially Available C57BL/6 Strain. *Cell Rep.* 15, 1901–1909.
- Mattapallil, M.J., Wawrousek, E.F., Chan, C.-C., Zhao, H., Roychoudhury, J., Ferguson, T.A., and Caspi, R.R. (2012). The Rd8 mutation of the *Crb1* gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 2921–2927.
- Mulligan, M.K., Ponomarev, I., Boehm, S.L., Owen, J.A., Levin, P.S., Berman, A.E., Blednov, Y.A., Crabbe, J.C., Williams, R.W., Miles, M.F., et al. (2008). Alcohol trait and transcriptional genomic analysis of C57BL/6 substrains. *Genes Brain Behav.* 7, 677–689.
- Nicholson, A., Reifsnnyder, P.C., Malcolm, R.D., Lucas, C.A., MacGregor, G.R., Zhang, W., and Leiter, E.H. (2010). Diet-induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant nicotinamide nucleotide transhydrogenase (*Nnt*) gene. *Obes. Silver Spring Md* 18, 1902–1905.
- Pelkonen, A., and Yavich, L. (2011). Neuromuscular pathology in mice lacking alpha-synuclein. *Neurosci. Lett.* 487, 350–353.
- Peña-Oliver, Y., Buchman, V.L., Dalley, J.W., Robbins, T.W., Schumann, G., Ripley, T.L., King, S.L., and Stephens, D.N. (2012). Deletion of alpha-synuclein decreases impulsivity in mice. *Genes Brain Behav.* 11, 137–146.
- Petkov, P.M., Cassell, M.A., Sargent, E.E., Donnelly, C.J., Robinson, P., Crew, V., Asquith, S., Haar, R.V., and Wiles, M.V. (2004). Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse. *Genomics* 83, 902–911.
- Poltorak, A., Smirnova, I., He, X., Liu, M.-Y., Van Huffel, C., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Du, X., Thompson, P., et al. (1998a). Genetic and Physical Mapping of the *Lps* Locus: Identification of the Toll-4 Receptor as a Candidate Gene in the Critical Region. *Blood Cells. Mol. Dis.* 24, 340–355.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., Huffel, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998b). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in *Tlr4* Gene. *Science* 282, 2085–2088.
- Russell, L.B., and Russell, W.L. (1996). Spontaneous mutations recovered as mosaics in the mouse specific-locus test. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 13072–13077.
- Silver, L. (1995). *Mouse Genetics: Concepts and Applications* (Oxford, New York: Oxford University Press)
- Simon, M.M., Greenaway, S., White, J.K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Wells, S., Sorg, T., Wong, K., Bedu, E., Cartwright, E.J., et al. (2013). A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biol.* 14, R82.
- Specht, C.G., and Schoepfer, R. (2001). Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC Neurosci.* 2, 11.
- Specht, C.G., and Schoepfer, R. (2004). Deletion of multimerin-1 in alpha-synuclein-deficient mice. *Genomics* 83, 1176–1178.
- Watson, J., Kelly, K., Largen, M., and Taylor, B.A. (1978). The Genetic Mapping of a Defective *Lps* Response Gene in C3H/HeJ Mice. *J. Immunol.* 120, 422–424.
- Wiles, M.V., Taft, R., and Eicher, E.M. (2009). Methods for maintaining genetic stability of inbred animal strains.
- Wiles, M.V., Taft, R., and Eicher, E.M. (2012). Methods for maintaining genetic stability of inbred animal strains.
- Wong, N., Blair, A.R., Morahan, G., and Andrikopoulos, S. (2010). The deletion variant of nicotinamide nucleotide transhydrogenase (*Nnt*) does not affect insulin secretion or glucose tolerance. *Endocrinology* 151, 96–102.