

Kutatási modellek

Stratégiák a genetikai sodródás minimalizálására és a kísérleti megismételhetőség maximalizálására az egér kutatásban

Szerző: Janine Low-Marcelli, PhD, technikai információk vezető kutatója, The Jackson Laboratory

Fordította: Pap Attila, tudományos segédmunkatárs, kísérleti állatház vezető, Debreceni Egyetem

Áttekintés/Absztrakt

A genetikai sodródás bármelyik független egér tenyész-kolóniában bekövetkezhet és megvan annak a lehetősége, hogy negatívan befolyásolja a kísérleti megismételhetőséget és a tudományos következtetéseket. A genetikai sodródás által okozott spontán mutációk évekig felismerhetetlenek maradhatnak, egészen addig, amíg azok a specifikus kutatási kérdések, amelyek ezektől a mutációktól függenek, rájuk nem világítanak. Habár nem lehet teljesen leállítani, mégis a genetikai sodródást és hatását a tudományos felfedezésekre minimálisra lehet csökkenteni körültekintő és átgondolt kolónia szervezési gyakorlatokkal. Mivel az egyes egér tenyész-kolóniák mérete és tenyésztési stratégiái különbözhetnek, az egér törzsek szaknyelvi elnevezésének teljes és pontos használata, beleértve az altörzs meghatározását is, az egész tudományos közösség hasznára van.

A genetikai stabilitás fontossága az egér kutatásban

Általában egy élettudományi kutatónak az egér genetikai háttere egy utólagos kérdés, ha egyáltalán felmerül benne ez a gondolat. Egy kutató legfőbb céljai a betegség megértése, publikálása és a pénzügyi támogatás elnyerése. Mindazonáltal ezen célok sikeres eléréséhez a genetikai stabilitás fenntartása vagy a genetikai sodródás megelőzése egy egérkolóniában nagyon fontos kellene legyen.

A laboratóriumi egerek egyedi, élő elemek a tudományos kutatásban, amelyek az életük során változnak, és még fontosabb, hogy egyik generációról a másikra is. Végül is a DNS szekvenciában bekövetkező örökölhető változások az alapja a fajok diverzitásának és az evolúciónak a természetben. Még az evolúciós nyomás hiányában is létrejönnek változások a DNS szekvenciában. Első pillantásra ezek a mutációk csendesnek tűnnek, egy egyed genetikai egyediségének jelentéktelen változásai. Ugyanakkor ezek a jelentéktelennek tűnő mutációk lehetnek a kísérletek megismételhetőségének rejtett forrásai.

A egereket használó kutatók végül is egy rejtéllyel találkoznak. A kutatáshoz használt egerek létrehozásához szükséges a tenyésztés, azonban a tenyésztéssel vele jár annak a kockázata, hogy elősegítjük a genetikai diverzitást és ezáltal a kísérletek sokféleségét. Az egyik kísérletről a másikra és az egyik publikációtól a következőig az adatok diverzitása nem vezet a tudományos előrehaladás felé.

Ennek a kéziratnak a célja, hogy megtanítsa az egér kutatókat a genetikai sodródás potenciális hatásaira a kutatás előrehaladásában, kiemelve a legjobb gyakorlatokat a sodródás

minimalizálására és megoldásokat nyújtson a sodródás visszafordítására, ha ez felmerül egy egérkolóniában. A teljes hivatalos egértörzs nomenklátúra használata és a tenyésztési információk körültekintő leírása a publikációkban és pályázati támogatási kérelmeknél néhány olyan egyszerű gyakorlat, amelyet a kutatók elsajátíthatnak, hogy elősegítsék a megismételhetőséget és a megbízható állatok felhasználását a kísérletekben.

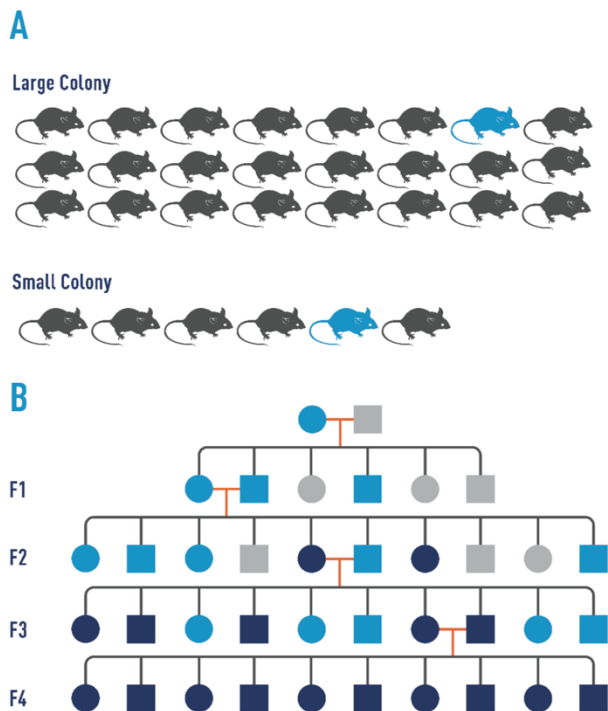
Hogyan keletkezik a genetikai sodródás és gyakorisága az egérkolóniákban

A beltenyésztés vagy a testvér pároztatás egy hatékony módszer a heterozigótaság csökkentésére az egér genom minden genetikai lokuszán, hozzájárulva a fenotípus egységesítéséhez, ami megalapozza a kísérleti megismételhetőséget. A genetikai homozigótaság elősegíti valamelyik egyedi változó összehasonlítását egy kontroll és egy kísérleti csoport között, és ezáltal tud bármilyen különbséget tulajdonítani ennek a változónak az eredményben.

A vadon élő fajokhoz nagyon hasonlóan a beltenyésztett laboratóriumi egértörzsek egymástól elszigetelten fenntartott két populációja idővel változni fog. Spontán mutációk keletkezhetnek egyedi nukleotid polimorfizmusok (SNPs), deléciók, inverziók, duplikációk és egyéb, mint például a DNS replikáció és a meiózis során bekövetkező hibák formájában. A spontán mutációk megjelenésének, eltűnésének vagy a populációban bekövetkező rögzülésének random folyamatát nevezzük genetikai sodródásnak (Lee Silver, 1995).

A genetikai sodródás sokasága jön létre bármely aktívan szaporodó kolóniában, de ez még inkább gyakorinak jósolható. Az átlag tenyész generáció hossza 3-4 hónap úgy, hogy az egerek 5-8 hetes koruk körül szexuálisan éretté válnak. Az utódok rendszerint a párzás után 3 héttel születnek meg. A spontán mutációs arányok alapján, amit több mint 1 millió egérben megmért szőrszín mutációkból számoltak ki, elmondható, hogy minden 1,8 tenyész generációban 1 fenotípusos mutáció alakulhat ki (Drake és mtsai., 1998; Russel és Russel 1996).

Annak a kockázata, hogy egy olyan egeret tenyésztünk, amely egy spontán mutációt hordoz az ivarsejtjeiben és ezáltal terjeszti ezt a mutációt, sokkal nagyobb a kis kolóniákban, mint a nagy kolóniákban (1A ábra). Egy adott csíravonal mutáció egy egérben azt eredményezi, hogy durván az utódok fele heterozigóta lesz erre a mutációra (1B ábra). Beltenyésztett tenyészkolóniákban így 25% esély van arra, hogy ezek a mutációk homozigóta formában rögzüljenek a populációban (Chamary és Hurst, 2004, Drake és mtsai., 1998).



1. ábra. Egy spontán mutáció terjedésének kockázata nagyobb a kis kolóniákban, mint a nagy kolóniákban. A) Annak a lehetősége, hogy egy olyan egeret használunk fel tenyésztéshez, ami egy adott mutációt hordoz (világoskék) nagyobb a kis kolóniákban, mint a nagy kolóniákban. B) Minden tenyésztési körben 25% esélye van annak, hogy egy új mutáció sokkal elterjedtebb lesz a populációban. Például a Mendeli öröklődés szerint az F1 generáció 50% vad típus (szürke) és 50% heterozigóta lesz az adott mutációra (világoskék). Ha véletlenül két heterozigótát használunk tenyészállatként az F2 generáció összetétele 25% vad típusú, 50% heterozigóta és 25% homozigóta (sötétkék) lesz. Ez addig folytatódhat, míg az egész kolóniában

homozigótaként fixálódik a mutáció (F3, F4). Ugyanakkor a genom bármelyik irányba sodródhat a tenyésztéshez felhasznált egerek genotípusától függően – a mutáció rögzülésének a lehetősége egyenlő annak a lehetőségével, hogy teljesen eltűnik a kolóniából.

A genetikai sodródás bekövetkezésére utaló jelek: altörzs megnevezések

Az altörzs egy beltenyésztett törzs elágazása, amely gyaníthatóan vagy tudottan genetikailag különbözik a szülői kolóniától

(<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml#substrains>).

Mivel a genetikai sodródás különbözőképpen történhet meg egy adott beltenyésztett törzs két populációjában, az altörzs elnevezése a nomenklatúra fontos része. Az altörzseket egy hozzáadott egyedi labor kóddal nevezik el, melyet az Institute for Laboratory Animal Research (ILAR, Laboratóriumi Állat Kutató Intézet) határoz meg (<http://dels.nas.edu/global/ilar/Lab-Codes>). A labor kód beazonosítja az egyedi állattörzset létrehozó vagy fenntartó intézetet, laboratóriumot vagy a kutatót (1. táblázat) Mivel a labor kódok felhalmozódnak a nomenklatúrában, a törzsek származása önmagában a névből megérthető. Például a C57BL/6NJ sokáig a National Institute of Health-ben (N) volt fenntartva és most a Jackson Laboratory (J) árulja (3. ábra). A toldalék által az altörzs elnevezés egy általános utalást ad arra, hogy genetikai variáció áll fenn két törzs között.

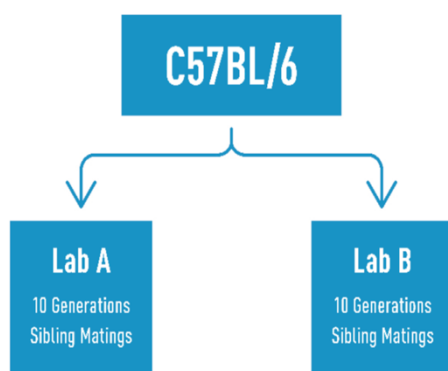
Lab Code	Organization
CrI	Charles River Laboratories
Hsd	Envigo (formerly Harlan Laboratories)
J	The Jackson Laboratory
N	National Institutes of Health
Rj	Centre D'Elevage R. Janvier
Tac	Taconic Farms, Inc.

1. táblázat. Gyakori laboratóriumi kódok az egér altörzs nomenklatúrában. Az Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) egyedi jelzéseket határoz meg és tart fent az intézeteknek, laboratóriumoknak vagy különálló kutatóknak, akik létrehoznak és fenntartanak egér kolóniákat.

Gyanús genetikai különbségek: generációs szám

Bármelyik törzs, ami a szülői törzstől elkülönülten volt fenntartva 20 egymás utáni beltenyésztett generációban (~5-6 év), vélhetően tartalmaz genetikai különbségeket, és így egy altörzsnek tekinthető. Ráadásul a tenyész generációk összeadódnak, így tehát ha két labor ugyanattól a közös apától származó egereket szerez be és 10 generáción keresztül tenyészt, akkor mindkét labornak egymástól különböző altörzse lesz, mert a két törzs egymástól már 20 generációs távolságban lesz (2. ábra).

A biológiai kutatásban használt legelső beltenyésztett egértörzseket (C57BL/6, DBA, C3H, BALB, CBA és mások) nagyjából 100 évvel ezelőtt alapították, és még a mai napig intenzíven használják őket. Mivel ezek a törzsek meghaladják a 200 beltenyésztett generációt és mivel rengeteg különböző intézet tenyészt őköt világszerte, ez idő alatt jelentős genetikai sodródás jött létre ezen törzsek mindegyikében. A genetikai sodródás következtében előfordulhat, hogy a jelenlegi altörzsekben tett megfigyelések különböznek azoktól a megfigyelésektől, amelyeket azokban a szülői beltenyésztett vonalakban találtak, amelyekből ezeket létrehozták.



2. ábra. Altörzs fejlődés. Az altörzsek 20 egymást követő generációt követő beltenyésztés után alakulnak ki. Még ezek a laboratóriumok nem haladták meg egyedileg a 20 tenyészgenerációt, mégis az A és B laboratóriumot 20 generáció választja el egymástól. A laboratóriumi kódok törzsnevekhez történő hozzárendelése általános jelzést adhat arról, hogy történt-e genetikai sodródás az egyik altörzsben a másikhoz képest.

Ismert genetikai különbségek: altörzs megnevezések a megfigyelt fenotípusos különbségek alapján

Továbbá az altörzseket akkor is megnevezik, ha a beltenyésztett egerek két csoportja között fenotípusos különbség figyelhető meg. Ha azonban ezek a spontán mutációk nem mutatnak látható fenotípusokat, gyakran miután homozigóta formában rögzültek a kolóniában és a figyelmes kolónia menedzserek vagy kutatók felismerik, hogy valami „eltűnt” az egerekből, a mutációk észrevétlenül is akár évekig fennmaradhatnak a törzsben. Így a genetikai sodródás azonosítása attól függhet, hogy az egyes laboratóriumok olyan kérdéseket tegyenek fel, amelyek megválaszolása az ilyen mutációk felismerésére támaszkodnak, hogy a váratlan eredmények többet jelentenek, mint csupán „sikertelen kísérleteket” és később azonosítják is a rendellenes fenotípusért felelős mutációt.

Például a szülői beltenyésztett C3H törzs két altörzsre vált szét két Jackson Laboratóriumi kutató által, amelyek sok éven keresztül nem tűntek különbözőnek. Dr. Walter Heston az 1930-as években tenyésztette a törzset (ma C3H/HeJ). 1952-ben Heston átadott néhány egeret egy másik Jackson Laboratóriumi kutatónak, Dr. Henry Outzennek (jelenleg C3H/HeO_uJ). Az 1960-as évek végén Heston törzsét rezisztensnek találták lipopoliszacharidra (LPS), míg Outzen törzse továbbra is érzékeny volt. Később a mutációt a Tlr4 génben azonosították, amely részt vesz a patogének felismerésében és a veleszületett immunrendszer aktiválásában (Poltorak és mtsai., 1998a; Watson és mtsai., 1978). Mire azonosították a Tlr4 gén 2342 nukleotidjában bekövetkezett C-A szubsztitúciót, ez már rögzült a Heston altörzsében, valószínűleg 1958 és 1965 között (Poltorak és mtsai., 1998b). Ha Heston C3H altörzsét soha nem kezelték volna LPS-sel, akkor lehetséges, hogy a Tlr4 mutációt nem azonosították volna és ezekben a törzsekben az alapvető immunológiai következtetések rendkívül ellentmondásosak lennének.

Az ismert genomi szekvenciák altörzs-specifikusak

A véletlenszerű felfedezésektől eltekintve a genetikai sodródás végleges azonosításának egyetlen módja a törzs szekvenálása és összehasonlítása a referencia genomokkal. Egy C57BL/6J nőstény volt az első egér, akit teljesen megszekvenált a Mouse Genome Sequencing Consortium (Egér Genom Szekvenáló Konzorcium; Chinwalla és mtsai., 2002, www.ensembl.org/Mus_musculus). A mai napig 15 másik jelentős beltenyésztett egértörzset szekvenáltak meg teljes mértékben, amelyek mindegyike „J” altörzs, ami a The Jackson Laboratory hivatalos ILAR laboratóriumi azonosító kódja (Adams és mtsai., 2015), www.ensembl.org/Mus_musculus/Info/Strains) (2. táblázat).

Mouse Strain, Full Nomenclature	JAX® Strain Number	Complete Sequence in Ensembl	Number of Datasets in MPD	Protected by GSP
C57BL/6J	000664	Y	237	Y
129S1/SvImJ	002448	Y	133	Y
A/J	000646	Y	177	
AKR/J	000648	Y	114	
B6.129P2-Apoe ^{tm1Unc} /J	002052	Y	7	Y
BALB/cJ	000651	Y	93	
BALB/cByJ	001026		118	Y
C3H/HeJ	000659	Y	158	Y
C57BL/6NJ	005304	Y	2	Y
CAST/EiJ	000928	Y	97	
CBA/J	000656	Y	110	Y
DBA/1J	000670		36	Y
DBA/2J	000671	Y	166	Y
FVB/NJ	001800	Y	133	Y
LP/J	000676	Y	84	
NOD/ShiLtJ	001976	Y	106	Y
NOD.CB17-Prkdc ^{scid} /J	001303	Y	8	Y
NZO/HiLtJ	002105	Y	49	
PWK/PhJ	003715	Y	43	
SPRET/EiJ	001146	Y	34	
WSB/EiJ	001145	Y	67	

2. táblázat: A leggyakrabban használt beltenyésztett törzsek rendelkezésre álló szekvencia- és fenotípusos jellemzési adatai altörzs-specifikusak. Csak a „J” egér altörzsek lettek teljesen megszekvenálva és letétbe helyezve az Ensembl-ben (Y = igen). Ezek közül soknak van SNP jelölése, ahon a C57BL/6J altörzs a referenciagenom. Az SNP információval együtt több ezer altörzs-specifikus fenotípusos tulajdonságot számszerűsítettek egymástól függetlenül, és elemezhetjük a Mouse Phenome Database-ben (MPD, Egér Fenom Adatbázis). E törzsek közül sok a The Jackson Laboratory szabadalmaztatott Genetikai Stabilitási Programja (GSP) által védett és ezeket a törzseket a Charles River forgalmazza Európában és Japánban.

További 20+ beltenyésztett törzset szekvenáltak „rövid leolvasási” megközelítéseket használva, hogy azonosítsák azokat az SNP-eket, indelket és a szerkezeti variációkat, amelyek a C57BL/6J egér referencia genomhoz viszonyított eltéréseket mutatnak. (Fraser és mtsai., 2007 és www.sanger.ac.uk/science/data/mouse-genomes-project).

Ezenkívül a specifikus altörzsekre jellemző ismert SNP adatok megtalálhatók és összehasonlíthatók a Mouse Phenome Database-ban (MDP), amely a leggyakrabban publikált egértörzsek genotípusos és fenotípusos adatainak együttműködéses szabványos gyűjteménye (<http://phenome.jax.org>).

A genetikai háttér befolyásolja a kutatási következtetéseket

Ahogy a C3H példájával korábban leírtuk, az altörzsek spontán mutációkat szerezhetnek, amelyek befolyásolhatják a kutatási következtetéseket. Ha ezeket a kísérleteket nem ellenőrzik megfelelően, például a megfelelő altörzs felhasználásával, a kísérletek reprodukálhatóságára ez katasztrofális következménnyel lehet. Vajon ha ezek a spontán mutációk megjelennek egy gyűjteményben, egy vendortól, vagy az egyes laboratóriumokban, honnan tudják a kutatók, hogy melyik a "legjobb" altörzs a kísérleteikhez?

Sajnos erre nincs egyszerű válasz. A genetikai háttér szempontjából döntő jelentőségű az ellenőrzött, egymás melletti kísérletek elvégzése és összehasonlítása. Mivel lehetetlen kipróbálni minden olyan altörzset, amely egy adott kísérleti eredmény céljából létezik, a genetikai háttér kutatási következtetésekre gyakorolt lehetséges hatásának megértéséhez a következő legjobb útja az, ha arra támaszkodunk, amit már más kutatók szakmai bírálaton átesett szakirodalomban leközöltek, és folytatni az ilyen ismeretekre épülő kísérleteket azonos altörzseket használva.

C57BL/6 altörzsek

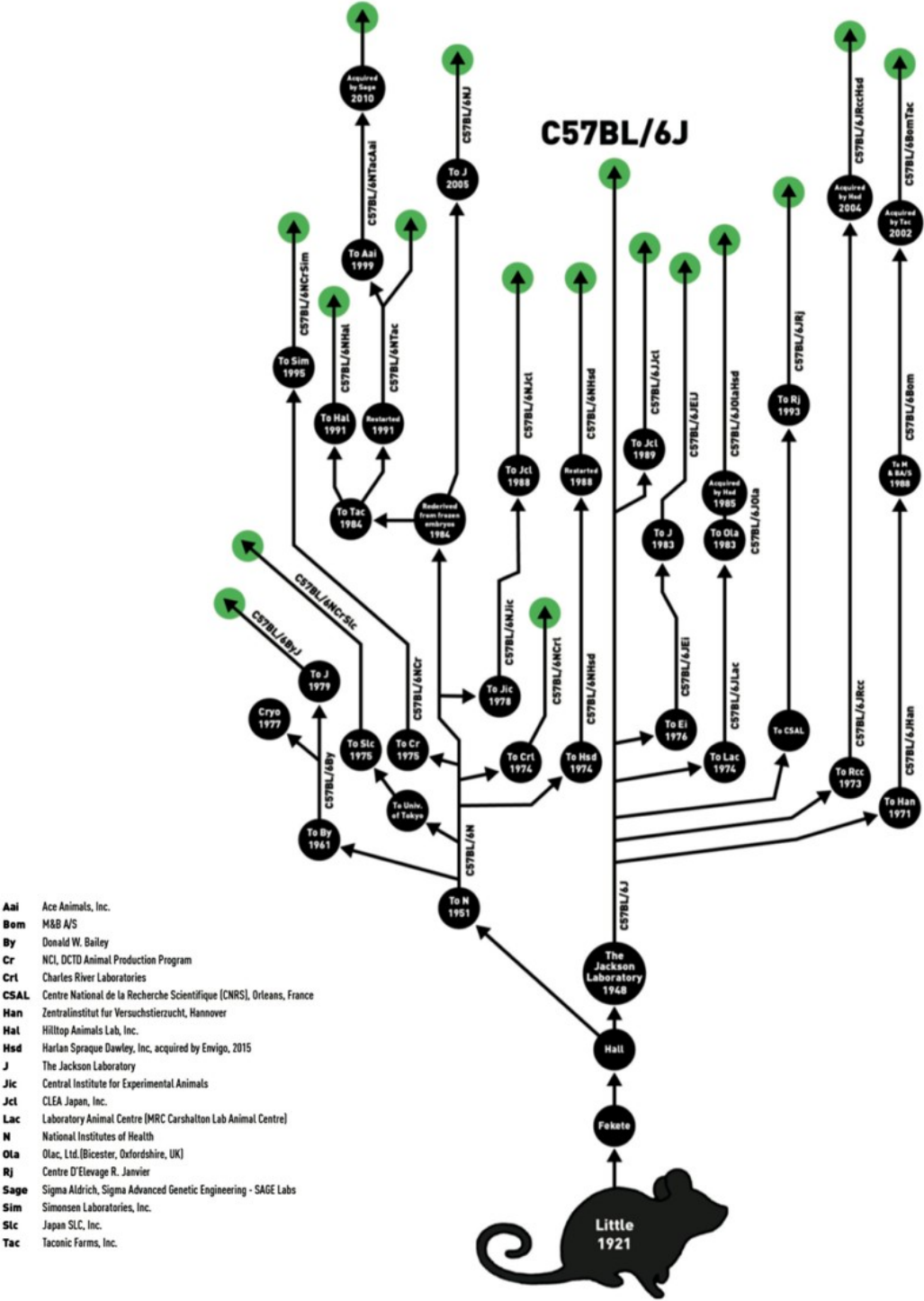
Természetesen az altörzsek különbségei az összes beltenyésztett egér törzsben léteznek. Azonban a C57BL/6 törzsek messze a világon legjobban publikáltak, több mint 37000 bejegyzéssel a PubMed-ben (3. táblázat). Ezért ez a cikk csak a C57BL/6 család leközölt különbségeire összpontosít.

Jelenleg több mint 16000 bejegyzés van, ami az eredeti Jackson Laboratory C57BL/6J altörzset használja. Néhány további bejegyzés létezik az eredeti C57BL/6J-ből származó egyéb altörzsekről. Nagyjából 1200 bejegyzésben használtak C57BL/6N eredetű altörzseket. Az elkövetkező években a C57BL/6N altörzsek használata jelentősen növekszik, mivel az egér genomjában található mind a 20000 gént célba fogják venni C57BL/6N ES sejtekben (embriónális őssejtekben) a Nemzetközi Knockout Egér Konzorcium (IKMC) projekt keretében (<http://www.mousephenotype.org/>).

Search Term	PubMed Entries
C57BL/6	37122
C57BL/6ByJ	112
C57BL/6J	16390
C57BL/6J0laHsd	53
C57BL/6JBomTac	11
C57BL/6JRj	7
C57BL/6N	1182
C57BL/6Ncrl	71
C57BL/6NJ	11
C57BL/6NHsd	41
C57BL/6NTac	78

3. táblázat. A közönséges C57BL/6 altörzsek előfordulása a publikált irodalomban. E cikk publikációja idejében az egyes C57BL/6 altörzsekre a következő keresési kifejezéseket vitték be a PubMed adatbázisba és a talált referenciák számát rögzítették.

A The Jackson Laboratory eredeti C57BL/6J altörzsét 1951-ben elküldték az Országos Egészségügy Intézetbe (National Institutes of Health, NIH). Az NIH altörzset, C57BL/6N, később több intézetbe eljuttatták, beleértve a Charles River Laboratories-t 1974-ben (C57BL/6NCrl), a Harlant (jelenleg Envigo, C57BL/6NHsd) 1974-ben és 1988-ban és a Taconic-ot (C57BL/6NTac) 1991-ben. 2005-ben az „N” altörzs visszakerült a The Jackson Laboratory-ba, és C57BL/6NJ altörzsként ismert. Jelenleg legalább 100 tenyésztésgeneráció választja el a C57BL/6J és C57BL/6N altörzseket (3. ábra).



3. **ábra.** A C57BL/6 altörzs története. Az eredeti C57BL/6 egeret Clarence Cook Little, a The Jackson Laboratory alapítója készítette 1921-ben. Azóta a törzset több száz intézetben és több ezer laboratóriumban értékesítették világszerte. A genetikai sodródáshoz vezető spontán mutációk miatt ezeknek a C57BL/6 altörzseknek mindegyike rokon, de egyedi ismert és ismeretlen különbségeket hordoz a genomi szekvenciában.

Számos publikáció született, ami bemutatja a „J” és „N” altörzsek közötti örökletes fenotípusos különbségeket, amelyek a genetikai sodródás következtében alakultak ki. A specifikus kutatási kérdéstől függően az egyes altörzsek előnyben részesülnek a többiekkel szemben (Bryant 2011). Néhány klasszikus és legújabb példát felsorolunk itt:

- A C57BL/6J egerek egy mutáns *Nnt* gént expresszálnak, amely részt vesz a glükózközvetített inzulin szekrécióban, összehasonlítva a C57BL/6N altörzsekkel (Freenam és mtsai., 2006).
- A C57BL/6J egereknek erős alkohol preferenciájuk van, míg a C57BL/6N altörzsnek nincs (Mulligan és mtsai., 2008). Az ezeket az altörzseket összehasonlító „Mennyiségi Jellemvonás Lókusz” térképezéses tanulmányok az alkohol-függőségben részt vevő gének jobb megértéséhez vezethetnek.
- A C57BL/6N altörzsek a retina degenerációs *Crbr^{dl8}* allélt hordozzák, míg a C57BL/6J altörzs vad típusú allélt hordoz (Mattapallil és mtsai., 2012).
- A C57BL/6JOLaHsd egerek homozigóták az alfa szinukleint és multimerin-1-et kódoló gének spontán deléciójára (Specht és Schoepfer, 2001, 2004). Míg az alfa-szinuklein aggregátumokat képez az idegrendszerben Parkinson-kórban, a C57BL/6JOLaHsd altörzsben a deléció nem úgy tűnik, hogy hozzájárul a prion betegség által közvetített szinaptotoxicitáshoz (Asuni és mtsai., 2010), de általában hatással lehet a motoros neuronok degenerációjára (Perkonen és Yavich, 2011; Pena-Oliver és mtsai., 2012). A C57BL/6JOLaHsd egereknek csökkent csontsűrűsége is van összehasonlítva a C57BL/6J és C57BL/6JRccHsd altörzsekkel (Liron és mtsai., 2017).
- A C57BL/6NHsd egerek egy olyan *Dock2* mutációt hordoznak, amely befolyásolja a B-sejt jelátvitelt és az immuntoleranciát, és amely nem található meg a többi fő C57BL/6 altörzsben (Mahajan és mtsai., 2016).

Ebben a legutóbbi, nemrégiben bemutatott példában egy laboratórium kb. 10 éves visszalépést mutatott a kutatás előrehaladásában azon következtetések eredményeképpen, amelyeket két különböző C57BL/6 altörzs használatával vontak le a vizsgálatok során (www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2016/may/why-it-took-2-years-for-a-harvard-research-lab-to-get-back-to-research). Az eredeti tanulmányokat egy *Siae* génkiütés létrehozásának genetikai háttereként használt meghatározhatatlan „C57BL/6” altörzzsel publikálták (Cariappa és mtsai., 2009). Amikor azt 2009-ben eredetileg publikálták, úgy gondolták, hogy a *Siae* hozzájárul a B-sejtek fejlődéséhez és a jelátvitelhez. A *Siae* mutációt később visszakeresztették a The Jackson Laboratory specifikus C57BL/6J altörzsére. Meglehető módon a C57BL/6J háttérrel végzett kísérletek nem tudták reprodukálni a laboratórium korábbi publikációját (Mahajan és mtsai., 2016). A kereskedelemben kapható számos C57BL/6 altörzs több éves további elemzését követően felfedezték, hogy egy másik génben, a *Dock2*-ben egy kópiaszám mutáció spontán kialakult a C57BL/6NHsd egerek törzsében. A *Dock2* mutációja volt a tényleges oka ezen B-

sejt funkcióknak. Ez a példa figyelmeztető történetként szolgálhat a kutatás során használt egerek eredetének szoros figyelemmel kísérése és megértése érdekében. A genetikai sodródás miatt a beltenyésztett egér altörzseket nem szabad felcserélni.

Meg kell jegyezni, hogy a specifikus kutatási kérdéson kívül a spontán mutációk fenotípusos hatásai, amelyek a genetikai eltolódás következtében merültek fel, számos hozzájáruló kísérleti tényezőtől függhetnek. Például, a C57BL/6J törzsekben lévő *Nnt* mutációról kimutatták, hogy csökkenti az inzulinszekréciót *in vitro*, összehasonlítva azokkal a C57BL/6J egerekkel, amelyeket transzgenikus vad típusú *Nnt-vel* megmentettek (Freeman és mtsai., 2006). Egy másik vizsgálatban nem mértek szignifikáns különbséget az inzulin szekrécióban *in vitro* vagy *in vivo* a C57BL/6J és a C57BL/6Ntac altörzsekben (Wong és mtsai., 2010). Ezenkívül az *Nnt* mutációs státusza és a kapcsolat az étrend által kiváltott elhízással és az inzulinreaktivitással nem egyértelmű, mivel az függhet az étrend zsírtartalmától (Nicholson és mtsai., 2010). Hasonlóképpen azt találták, hogy két „J” altörzsnek (J, JWehi) és négy „N” altörzsnek (Ntac, Nhsd, NCrl, NJ), amelyek alacsony zsírtartalmú táplálékot ettek, hasonló inzulinszekréciós profiljuk van glükózterhelésre adott válaszreakció során. Magas zsírtartalmú táp etetése esetén azonban a C57BL/6NJ altörzs csökkent inzulinválaszt mutatott a glükóz terhelésre, ami nem magyarázható az *Nnt* státusz, a súlygyarapodás, a zsírtartalom, a táplálékbevitel vagy a béta-sejt terület különbségeivel (Hull és mtsai., 2017).

Számos egyéb különbség is létezik a C57BL/6 altörzsekben. Olyan különbségeket például, mint a félelem, szorongás, fájdalom és az amfetaminokra adott reakció a szakirodalomban már lejegyezték (Bryant és mtsai., 2008). Általánosabban véve sok más alapmérés között is különbségek vannak. Különösen C57BL/6J és C57BL/6NTac altörzseket hasonlították össze egy átfogó, szabványosított 413 paramétert felölelő fenotípus-meghatározási folyamatban (EMPRESS), amelyet az Európai Egérbetegség Klinika (European Mouse Disease Clinic, EUMODIC) konzorcium négy egyedi egérközpontja készített el (Simon és mtsai., 2013). A négy fenotípus-meghatározó központban a „J” és „NTac” egerek több területen különböztek, ide értve a megijesztésre adott válaszreakciót, mozgásszervi aktivitást, kapaszkodási erőt, kardiovaszkuláris tulajdonságokat, metabolikus és klinikai kémiai paramétereiket.

Mindent összevetve a genetikai háttér a kísérleti tervezés egyik alkotóeleme, amely befolyásolja a reprodukálhatóságot és a biológiai folyamatok általánosításának képességét. Aggasztó tény, hogy a PubMed-ben közel 37.000 találat van „C57BL/6” keresésre, és ezeknek a publikációknak a többsége nem utal az altörzsre.

A genetikai sodródást korlátozó kolónia menedzsment gyakorlatok

Minden tenyészkolónia a genetikai sodródás alanya lehet. Számos olyan kolóniakezelési stratégia létezik, amelyek korlátozhatják a sodródást és így csökkentik a sodródás hatását a kísérleti reprodukálhatóságra. Ezek a stratégiák magukba foglalják a megfelelő nomenklatúra használatát, átgondolt tenyésztési gyakorlatokat és a fagyasztva tárolást. Az alábbiakban bemutatunk néhány jól bevált gyakorlatot az egér kolóniák fenntartására.

Nomenklatúra és megfelelő jelentése

Használni kell a teljes és megfelelő egértörzs nevezéktant a bizonytalanság megszüntetéséhez és az aktuálisan vizsgált altörzs pontos beazonosításához.

A napi kolóniakezeléshez használjon színes, előre nyomtatott teljes nomenklatúrájú címkéket, ideértve az altörzs jelöléseket is a ketrec kártyákon és a laboratóriumi jegyzetfüzetekben. A címkék előzetes nyomtatása csökkenti a kivitelezési hibákat és javítja a nomenklatúra megfelelőségét. Különböző színű címkék vagy ketreckártyák használata különösen fontos forgalmas, megosztott helyiségekben, ahol a közelben hasonló nomenklatúrájú és megjelenésű törzsek helyezkednek el.

Gyakorold a megfelelő nomenklatúrát a labormegbeszélés prezentációs diáin. Ezek a hétköznapi, „nem hivatalos” kommunikációk végül „formális” kommunikációkká válnak, amikor is ezeket az ábrákat és adatokat végül poszterekké, előadásokká, publikációkká és pénzügyi támogatási javaslatokká formázzák.

A kiadványokban és a pályázati ajánlatokban a teljes nomenklatúrát kell használni, beleértve az altörzs megjelöléseket is, a törzs első említésekor. Határozza meg, hogy a törzs hogyan lesz rövidítve a szövegben és az ábrákon („a továbbiakban: ...”). A módszerek részben használja a teljes nomenklatúrát és az altörzs megjelölést. Azonosítsa a törzs forrását, például a laboratórium nevét, az intézetet vagy a gyártót és a törzs katalógusszámát. Adja meg az alkalmazott generációs számokat és tenyésztési programokat (lásd alább). További javaslatokat az ARRIVE útmutatóban talál (www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines).

Beltenyésztés, törzskönyvek és generációs számok

A beltenyésztés lehetővé teszi a deviáns fenotípusok gyorsabb azonosítását a kolóniában. A törzskönyvek lehetővé teszik az érintett és potenciálisan érintett beltenyésztett egerek egyszerű eltávolítását (4. ábra). A generációs számok lehetővé teszik a genetikai sodródás lehetséges kockázatának gyors azonosítását a kolóniában.

- **Beltenyésztés** – Csak testvér pároztatás.
- **Törzskönyvek** – Minden egyes tenyésztésben használt anyát (nőstény) és apát (hím) nyilván kell tartani. Tartson két vagy több törzskönyvet egy kolónián belül, soha ne keverje össze az egyik vérvonalat a másikkal.
- **Generációs számok**

N = a keresztezett generációk száma

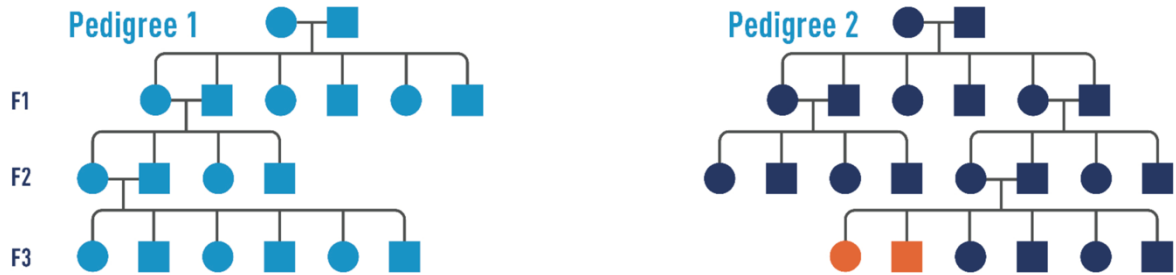
F = filiális, beltenyésztett (testvér x testvér) generációk

p = fagyasztva konzervált

+ = elkülöníti a generációs információkat az importálás előtt

? = ismeretlen generációs szám

Például az „N6F12+F8” olyan törzsre vonatkozik, amelyet hatszor átkeresztettek, 12 alkalommal testvér párosították, és egy másik laboratóriumba vitték át, ahol további 8 alkalommal testvérpárosítást végeztek. Adott, hogy az altörzsek 20 generáción belül létrejönnek az egymást követő beltenyésztés során, és valószínűleg genetikai eltolódás is történt, bölcs dolog lenne frissíteni e példa kolónia genetikai hátterét.



4. **ábra.** Törzskönyvezett kolónia fenntartása. Csak párosítsa a testvérpárokat (kör és négyzet) vagy triókat két vagy több törzskönyvben (világoskék vagy sötétkék), soha ne keverje össze az egyik törzs tenyészállatait a másikkal. Ha az eltérő fenotípusok (narancs) előfordulnak egy törzskönyvben, akkor az érintett egyedeket könnyebben azonosítják és eltávolítják. A változatlan törzskönyvet (1.törzs, világoskék) ezután két új törzsrészre lehet osztani, anélkül, hogy időt veszítenénk a *de novo* kolónia újjáépítésére.

Adatgyűjtés és rendszeres értékelés

A tenyésztési gyakorlatokon kívül a törzseket rendszeresen meg kell vizsgálni a fenotípus bármilyen változása szempontjából. Ami a genetikai eltolódást illeti, a fenotípus megváltozása bármilyen megfigyelhető és mérhető dolgot jelenthet: megjelenést, viselkedést, tenyésztési teljesítményt vagy kísérleti leolvasást, csak néhányat példaként említve. A genetikai eltolódás azonosítása a kolónia fenntartókra és a kutatókra támaszkodik, hogy először is észrevegyék a fenotípusos változást, másodsor pedig tegyenek is valamit vele.

Egyes törzsek esetében segíthet az alapvető jellemzőkkel történő összehasonlítás. A Mouse Phenom Database (Egérfenom Adatbázis) tartalmazhat olyan információt, amely törzs vagy fenotípus szerint kereshető és magában foglalja az összes adatgyűjtési protokollt (<http://fenome.jax.org>) (2. táblázat).

Ha a fenotípus megváltozott egy kolóniában, akkor a genetikai eltolódás ez egyike lehet a variabilitást okozó sok potenciális forrásnak, amit meg kell vizsgálni. Néhány kérdés, amit érdemes fontolóra venni:

- Hány egeret érint és lehet-e azonosítani valamelyik ketrecben vagy törzskönyvben?
- Hány éve vagy hány generáció óta van a kolónia a létesítményben?
- Mikor volt az utolsó frissítés (lásd a következő részt), és mi volt az eger forrása?

Gondos kolóniajegyzetek vagy referenciaadatok nélkül lehetetlen meghatározni, hogy megváltozott-e a fenotípus.

A genetikai háttér frissítése

5-10 generációs beltenyésztés után az eger kolóniákat frissíteni kell a genetikai eltolódás felhalmozódásának eltávolítása vagy megakadályozása érdekében a kolóniában. A genetikai háttér frissítésére szolgáló módszerek a következők lehetnek:

- **Visszakeresztezés.** A géntechnológiával módosított mutáns egér (GEMM) törzseket vissza lehet keresztezni a megfelelő beltenyésztett vagy hibrid egér törzsekre, amelyeket egy jó hírű tenyésztőből vagy forgalmazótól vásárolnak, aki megfelelő módszereket alkalmaz a kolóniáiban a sodródás korlátozására. A keresztezést mind a hím és női csírvonalakon keresztül kell végezni, hogy mindkét ivar nemi kromoszómája frissüljön. Ha a törzs már heterozigóta vagy hemizigóta jellegűre vissza lett keresztezve vadtypussal, egy közvetlenül a gyártótól származó beltenyésztett egeret használhatunk vadtypusú tenyészállatként, amivel a genetikai hátteret frissíthetjük. A generációs szám megjelölésekor minden egyes keresztezés vagy frissítés további N betűként szolgál (lásd az előző „Tenyésztés, családfajok, és generációs számok” részt).
- **Új tenyészállatok vásárlása.** Beltenyésztett törzsek esetén a kolóniát új, nemesítő egerekkel kell újraindítani, amelyeket közvetlenül egy megbízható egértenyésztőtől, vagy forgalmazótól vásárolnak, aki megfelelő módszereket alkalmaz a genetikai sodródás korlátozására a kolóniáiban.
- **Felélesztés fagyasztott készletből.** Az egyetlen módszer a genetikai sodródás megállítására az egerek szaporodásának megállítása. Az alacsony felhasználású és egyedi egér törzseket mindig sperma vagy embrió formájában kell fagyasztva tartósítani, hogy megvédjék a genetikai sodródástól, biztosítsák magukat a törzs elvesztése ellen, és csökkentsék az állatok felhasználási és karbantartási költségeit. Ez a fagyasztva tartósított anyag felhasználható olyan kolónia helyreállítására, amelyben sodródási vagy tenyésztési hibákat tapasztaltak, esetleg betegség vagy természeti katasztrófák miatt elvesztek.

A genetikai háttér ellenőrzése

- **Végezzen el egy genom letapogatást a szennyeződés kockázatának meghatározása érdekében.** A genom letapogatás vagy SNP array-k megkülönböztetést tehetnek lehetővé a szorosan rokon altörzsek között, mint például a C57BL/6J és a C57BL/6N között.
- **A genom szekvenálása.** Az SNP array-k nem fogják azonosítani a genetikai eltolódást egy kolónián belül. Az egyetlen módszer annak megállapítására, hogy egy törzs átesett-e sodródáson, a genomja teljes szekvenálása és összehasonlítása a referencia-szekvenciákkal.

Fejlett módszerek a genetikai sodródás korlátozására

Ha bármilyen aktívan szaporodó kolóniában bekövetkezik a genetikai sodródás, miért is tudnák az egyes laboratóriumok frissíteni kolóniájukat azáltal, hogy egereket visszavásároltak egy egér gyűjteményből vagy egy olyan eladótól, akinél szintén tapasztalható genetikai sodródás?

Az egér gyűjtemények és eladók egyrészt sokkal nagyobb kolóniákat tartanak fenn, amelyek kevésbé vannak kitéve a genetikai populáció szűk keresztmetszeteinek, mint a kis kolóniák (1A. ábra). Emellett számos tenyésztő és szállító szakmailag gyakorolja a fent említett klóniakezelési stratégiákat, például a teljes nómenklaturát, a törzskönyveket/korlátozott tenyésztést és a fagyasztva tárolást, valamint a fejlettebb módszereket.

A genetikai eltolódás becsléséhez a The Jackson Laboratory nagy termelői kolóniákban olyan C57BL/6J egereket szekvenáltak meg, amelyeket 69 beltenyésztett generáció és a 19 éves folyamatos tenyésztés választott el. A két pillanatkép között időben 669 egyedi SNP-t azonosítottak. Ezek közül az SNP-k közül hét megváltoztatta az aminosav-szekvenciát vagy megváltoztatta az RNS illesztési helyét. Tehát egy becsült mutáció, amely potenciálisan befolyásolja a fehérje működését, 10 generációnként (7 SNP/69 generáció) fordul elő, kivéve a nagyobb perturbációkat, például deléciókat, inverziókat és duplikációkat, amelyeknek mély fenotípusos következményei lehetnek. Figyelembe véve az átlagos végzős hallgató vagy posztdoktori hallgató hivatali idejét öt évben, a vezető kutató egyéni kutatói pályafutása húsz vagy annál hosszabb ideig tarthat, és a tudományos kutatás egésze határozatlan ideig folytatódhat, egy egyedi egérkolónia jelentős genetikai eltolódást szenvedhet. Az egereket világszerte sok éve forgalmazó tenyésztő és megőrző helyként a The Jackson Laboratory-nak egyedülálló kihívása van a genetikai sodródás lehető legnagyobb mértékű korlátozására, hogy az ezeket a törzseket használó kutatók továbbra is támaszkodhassanak egy stabil, reprodukálható genomra.

A Jackson Laboratory törzseit több gyakorlat kombinációja révén védik a genetikai eltolódás felhalmozódásától. Az összes törzs, amely a Jackson laboratórium „J” laboratóriumi kódját hordozza, a genetikai eltolódás korlátozására és észlelésére szolgáló két program egyikén vagy mindkettőn keresztül van fenntartva: a Genetikai Stabilitási Program (GSP) és a Genetikai Minőség Ellenőrzési Program. A „J” törzsként terjesztett törzsek magukban foglalják az összes törzset, amelyeket közvetlenül az Egyesült Államok The Jackson Laboratory épületéből szaporítanak és terjesztenek, valamint az Európában és Japánban a Charles River Laboratories által terjesztett „J” törzseket. A folytonosság fenntartása érdekében ezeken a helyeken a kolóniakezelési gyakorlatokat rendszeresen felülvizsgálják és jóváhagyják a The Jackson Laboratory által. Ez magában foglalja azonos hidegkonzervált anyag felhasználását létező élő kolóniákba történő rendszeres infúzióhoz (a következő szakaszban ismertetett GSP), vagy az élő kolóniák teljes újratehermentéséhez. Összegezve, ezek a cselekvések hatékonyan megakadályozzák az altörzs eltéréseket.

A leggyakoribb beltenyésztett „J” törzsek Genetikai Stabilitási Programja (GSP)

A leggyakrabban használt beltenyésztett „J” törzsek fenntartásához egyedülálló stratégiát alkalmaznak, amely aktívan megakadályozza a genetikai eltolódás felhalmozódását. Az amerikai szabadalmi és védjegy hivatal szabadalmi díjakat ítelt oda a The Jackson Laboratory Genetikai Stabilitási Programjára (GSP) 2009-ben és 2012-ben (Wiles és mtsai., 2009, 2012, <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/find-and-order-jax-mice/why-jax-mice/patented-geneticstability-program>). A GSP törzseket kétsejtű embrióként hidegen konzerválták, és rendszeresen újra bevitték a törzskönyvezett alapító kolóniákba, hogy elkerüljék a kumulatív genetikai eltolódást.

A GSP gyakorlata nélkül egy alapító-tenyésztelepet egyetlen testvérpár párosításából származtatnának. Évente kettő-négy alkalommal egy új testvérpár kerül kiválasztásra az alapító kolóniából, mint új alapító pár a kolónia helyreállításához. Ennek a megközelítésnek a felhasználásával egy jelenlegi alapító kolónia a genetikailag eltolódás miatt genetikailag különbözik az évekkal ezelőtti alapító kolóniától.

A GSP gyakorlata szerint a fagyasztva tartósított embriók törzskönyvezett állományai egyetlen alapító kolóniából származnak. Az embrióállományt öt generációnként az élő tenyész alapító kolónia helyreállítására használják. Az alapító kolónia időszakos visszaállítása a hidegkonzervált embriókból felélesztett egerekkel csökkenti az adott időszakban átadott

generációk számát. Ezért a GSP gyakorlatában szereplő „J” törzsek védve vannak a genetikai elvándorlás ellen a térben (különböző földrajzi helyszíneken), és ami szintén fontos, az idő során is (3. táblázat).

Genetikai minőség-ellenőrzési program

A GSP gyakorlatokon kívül az összes „J” törzset Genetikai Minőség Ellenőrzési (GQC) Programon keresztül tartják fenn (<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/findand-order-jax-mice/why-jax-mice/genetic-quality-control-program>). Ez a program integrálja a tipikus kolóniakezelési gyakorlatokat, amelyeket az egyes laboratóriumok használhatnak (ahogy korábban leírtuk), de magában foglalja a nagyon magas elszámoltathatóságot.

Az állategészségügyi szakemberek szigorú képzési programban vesznek részt a fenotípusos változatok mint például a szőrzet színének, a szokatlan testméret, a súly, a csontozat felépítése, a viselkedés, a reprodukív teljesítmény, a daganatok fogékonysága és az élettartam azonosítása érdekében. Azokat az egereket, amelyek eltérnek az adott törzsre várható tulajdonságoktól, tovább vizsgálják, a családfát nyomon követik és szükség szerint eltávolítják.

Ezen túlmenően a szaporító vonalakat fenntartják az alapító kolóniákban, amelyek külön vannak a kiterjesztő és eladásra tenyésztett kolóniáktól. A származási vonalakat rendszeresen átvizsgálják a genetikai rendellenességekre vagy a genetikai szennyeződés bizonyítására, SNP panel használatával, ami Petkov és mtsai., 2004 munkáján alapul.

A Charles River által Európában és Japánban tenyésztett JAX™ egerek

A Jackson Laboratory és a Charles River együttműködési megállapodást kötöttek a JAX™ egerek helyi ellátásának biztosítására Európában, Japánban, Koreában és Tajvanon működő orvosbiológiai kutatók számára. A The Jackson Laboratory tenyésztési protokollok és a genetikai minőség-ellenőrzési irányelvek szigorú betartását követve a Charles River Európában és Japánban olyan JAX™ egereket szaporít, amelyek genetikai minősége megegyezik a The Jackson Laboratory tenyésztésével. További információ a www.criver.com/jaxmice webhelyen található.

Következtetés

A genetikai sodródás elkerülhetetlen valóság az aktív tenyésztő egerkolóniákban, és mélyen befolyásolhatja a kutatási következtetéseket és a reprodukálhatóságot. Noha a genetikai eltolódást nem lehet teljes mértékben kiküszöbölni, a kolóniakezelési stratégiák mind a laboratóriumokban, mind a nagy egér megőrző helyeken és kereskedelmi tenyészetekben megvalósíthatók a genetikai stabilitás fenntartása érdekében. A reprodukálhatóság és a tudományos felfedezés az egér altörzs teljes nomenklatúrájának használatán és a tenyésztési információk gondos jelentésén alapul.

Referenciák

- 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_{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 r 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., Morenzoni, M.M., Nilsen, G.B., et al. (2007). A sequencebased 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-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 CopyNumber 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 specificlocus 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.