

Fachinformation

**aus dem Ausschuss für Genetik und
Labortierzucht**

Substämme von Inzuchtstämmen

Stand: Dezember 2018

Autoren:

Howard Christian Peters, Hamburg

Kurt Reifenberg, Heidelberg

Dirk Wedekind, Hannover

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1 Einleitung	3
2 Definition von Substämmen	3
2.1 Abtrennung zwischen F20 und F40.....	4
2.2 Abtrennung für 20 BSI-Generationen nach F40	4
2.3 Genetische Unterschiede	4
3 Entstehung von Substämmen	4
4 Nomenklatur von Substämmen	5
5 Unterscheidung von Substämmen	5
6 Unterschiedliche Phänotypen von Substämmen.....	8
7 Substämme und standardisierte Versuchsbedingungen	9
8 Literatur	9

1 Einleitung

Ein Inzuchtstamm wird *per definitionem* generiert, indem ein striktes Bruder-Schwester Verpaarungsschema (BSI) über eine Folge von 20 Generationen (F20) aufrechterhalten wird. Bei dem BSI-Zuchtschema nimmt der Inzuchtkoeffizient, d.h. die Wahrscheinlichkeit eines einzelnen Genlocus, in homozygoter Form vorzuliegen, kontinuierlich zu. Wie Abb. 1 zeigt, wird bei F20 ein Erwartungswert von 98,63 % erreicht. Da Inzuchtstämme nach Erreichen der F20-Generation weiterhin mittels BSI gezüchtet werden, steigt deren Inzuchtkoeffizient kontinuierlich weiter an. Er erreicht bei F40 einen Wert von 99,98 % (siehe Abb. 1), bei dem die Restheterozygotie nahezu vernachlässigt werden kann.

Die residuale Heterozygotie insbesondere zwischen F20 und F40 sowie spontane Mutationen und akzidentelle Kontaminationen sind Ursachen für eine genetische Drift von Inzuchtstämmen, die zur Entstehung von Substämmen führt.

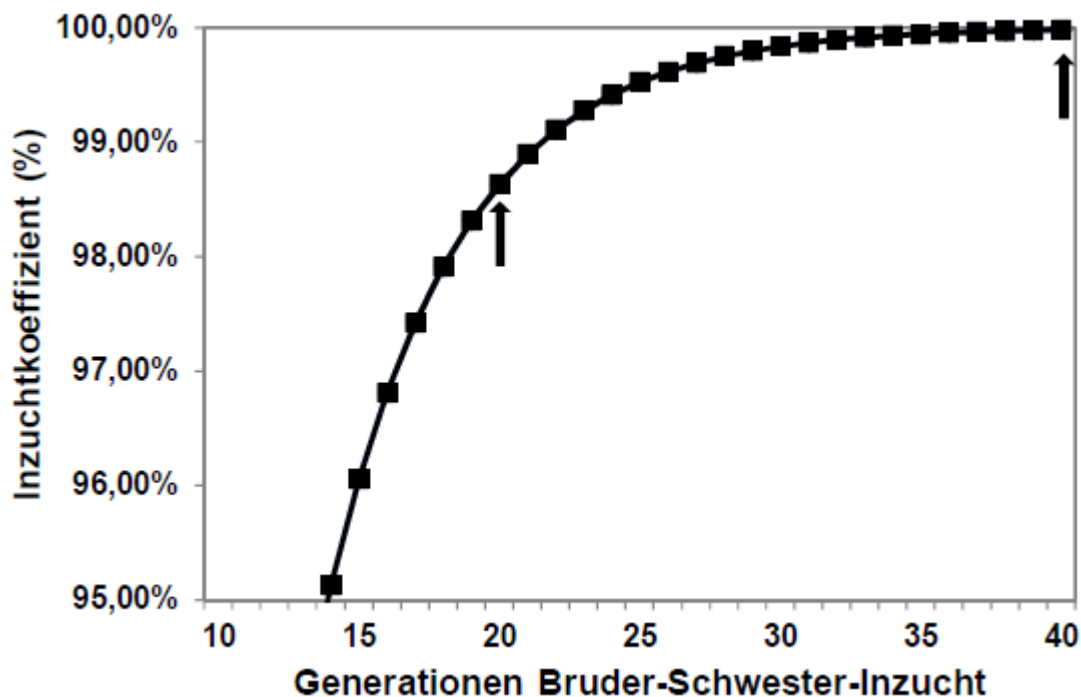


Abbildung 1: Inzuchtkoeffizient eines Inzuchtstammes im Verlauf des BSI-Zuchtschemas. Der Inzuchtkoeffizient steigt bis zur F20 (Zeitpunkt der definierten Etablierung eines Inzuchtstammes, linker Pfeil) auf eine Größe von 98,63 % und erreicht bei F40 (rechter Pfeil) einen Wert von 99,98 %. Entsprechend ist das Ausmaß der Residualheterozygotie zwischen F20 und F40 noch relativ hoch. Die Berechnung des Inzuchtkoeffizienten erfolgte nach der Formel $F_t = 0,25 (1 + 2F_{t-1} + F_{t-2})$ (Falconer 1989) und für F1 wurde ein Wert von 0,25 eingesetzt.

2 Definition von Substämmen

Ein Substamm ist ein Seitenast im Stammbaum eines Inzuchtstammes, der sich nachweislich oder mit großer Wahrscheinlichkeit genetisch von dem ursprünglichen Inzuchtstamm unterscheidet. Nachfolgend sind die Kriterien aufgeführt, die gemäß der derzeit gültigen Nomenklaturregeln (Guidelines for Nomenclature of Mouse and Rat Strains; <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml#nois>) dazu führen, dass ein neuer Substamm zu benennen ist:

2.1 Abtrennung zwischen F20 und F40

Es ist unverzüglich ein neuer Substamm zu benennen, wenn sich zwischen F20 und F40 ein Seitenast vom Ausgangsstamm abtrennt. Der Grund für diese stringente Regelung liegt darin, dass die Restheterozygotie des Inzuchtstammes zwischen F20 und F40 sehr groß ist (siehe Abb. 1), so dass die Abtrennung eines neuen Substammes vom Ausgangsstamm in diesem Generationenintervall mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Entstehung genetischer Unterschiede führt.

2.2 Abtrennung für 20 BSI-Generationen nach F40

Ein neuer Substamm wird benannt, wenn eine Seitenlinie nach Erreichen der F40-Generation des Ausgangsstammes über 20 BSI-Generationen getrennt gezüchtet wird. Dabei bedeuten 20 getrennte BSI-Generationen die Summe der Zuchtgenerationen von Ausgangsstamm und Substamm. Dies bedeutet, dass sich die Seitenlinie selbst lediglich für ca. 10 Generationen vom originären Stamm zu entfernen braucht, um als eigenständiger Substamm zu gelten. Der Grund dafür, dass erst nach 20 Zuchtgenerationen ein neuer Substamm definiert wird, liegt in der geringen Residualheterozygotie ab der F40-Generation (siehe Abb. 1). Nach der 40. Inzuchtgeneration sind es vor allem spontane Mutationen, die zu einer genetischen Drift zwischen Ausgangsstamm und Seitenast führen (Radulovic et al. 1998; Sluyter et al. 1999; Stiedl et al. 1999; Specht und Schoepfer 2001; Roth et al. 2002; Wotjak 2003).

2.3 Genetische Unterschiede

Ein neuer Substamm ist unverzüglich zu benennen, wenn zwischen züchterischem Seitenast und Ausgangskolonie *de facto* genetische Unterschiede detektiert werden können.

3 Entstehung von Substämmen

Substämmen entstehen in der Regel nicht gezielt oder gerichtet, sondern in unbeabsichtigter, ungewollter oder unerkannter Weise.

Die heutigen Inzuchtstämmen bestehen teilweise schon über Hunderte von Generationen und wurden in der Vergangenheit häufig getrennt und an andere Zuchteinrichtungen weiter gegeben. Entsprechend führen die unter 2.1 und 2.2 aufgeführten Kriterien zu einer gehäuften Substambildung. Eine Publikation vom Jackson Labor zeigt, in welche beeindruckende Substamm-Vielfalt sich der C57BL/6 Stamm im Laufe seiner Entwicklung differenziert hat <http://jackson.jax.org/rs/444-BUH-304/images/Genetic-Drift-Webinar-11May2017.pdf>.

Weitere Gründe, die in der Vergangenheit zur Entstehung von Substämmen führten, sind unbeabsichtigte genetische Kontaminationen z. B. durch Fehlverpaarungen (Naggert et al. 1995) oder schlecht dokumentierte und in Vergessenheit geratene Auszuchten, die für spezielle wissenschaftliche Fragestellungen generiert wurden (Bailey 1977; Bailey 1982; Simpson et al., 1997; Threadgill et al., 1997a; Threadgill et al. 1997b; Wotjak 2003).

Neue Substämme werden häufig auf Grund von Variationen des Phänotyps erkannt. So sind besonders viele Unterschiede zwischen Substämmen von Immunologen detektiert worden, da diese häufig mit sehr sensitiven Systemen arbeiten, die auf die geringsten genetischen Veränderungen der eingesetzten Versuchstiere deutlich reagieren (Bailey 1982). Des Weiteren ist die unterschiedliche Reaktion von verschiedenen Tierpopulationen eines Inzuchtstammes bei Verhaltenstests ein guter Indikator für die Entstehung von Substämmen (Crawley et al., 1997; Crawley und Paylor, 1997, Stiedl et al. 1999). Aber auch die Gewebekompatibilität (Simpson et al. 1997), die Tumorempfänglichkeit (Glant et al. 2001), ein abweichendes Angstverhalten (Radulovic et al. 1998; Stiedl et al. 1999) sowie unterschiedliche physiologische Reaktionen auf Anästhetika (Roth et al. 2002) und unterschiedliche Reizschwellen für Elektroimpulse zur Auslösung von epileptischen Anfällen (Yang et al. 2003) wurden in der Vergangenheit zur Diskriminierung von Substämmen herangezogen.

4 Nomenklatur von Substämmen

Ein neuer Substamm erhält als Ergänzung zu seinem Stammmamen einen zusätzlichen Laborcode, der eine eindeutige Zuordnung zu der Institution erlaubt, in der der neue Substamm gezüchtet wird. Dieser Laborcode besteht aus 1 - 5 Buchstaben, die das Institut, das Labor oder den Wissenschaftler identifizieren, der den Stamm generiert hat bzw. züchtet. So steht beispielsweise der Code „J“ für *The Jackson Laboratory*; „N“ für *National Institutes of Health* oder „CrI“ für *Charles River Laboratories*. Die Vergabe der Laborcodes erfolgt über das *Institute for Laboratory Animal Research* (ILAR, <http://dels.nas.edu/global/ilar/Lab-Codes>). Zur Benennung eines Substamms wird der Laborcode durch einen Schrägstrich getrennt an den Stammmamen angehängt (z.B. C57BL/6J, C57BL/6N). Wechselt der Stamm den Halter, wird der neue Laborcode ohne weitere Verwendung von Sonderzeichen an den originären Stammmamen angehängt (z.B. C57BL/6NCrI, C57BL/6JHanZtm). So kann man bei Kenntnis der Laborcodes schon einen kleinen Teil der Ursprungsgeschichte des Stammes erkennen. Den Richtlinien des *International Committee on Genetically Standardized Nomenclature for Mice* folgend, sind detaillierte Informationen zu der Entstehungsgeschichte des jeweiligen Stammes häufig auf den Internetseiten der kommerziellen Anbieter zu finden. So ist beispielsweise bei Charles River Laboratories zu dem C57BL/6NCrI Stamm zu finden: „Aus einer Kreuzung des Bestandes von ‚Miss Abbie Lathrop‘ entwickelt 1921 von C.C. Little. Ursprung auch der C57BL und C57L-Linien. Die Linien 6 und 10 wurden 1937 separiert; 1948 von Hall zum Jackson Lab.; vom Jackson Lab. 1951 zum NIH (32. Generation); 1974 vom NIH zu Charles River; 1975 wurde die Zucht hysterektomiert.“

5 Unterscheidung von Substämmen

Substämme eines Inzuchtstammes haben in der Regel die gleiche Fellfarbe und können äußerlich nur schwer voneinander unterschieden werden. Dagegen können die genetischen Unterschiede zwischen Substämmen desselben Inzuchtstamms durchaus deutlich sein (siehe Tabelle 2). Hauttransplantationen zwischen den zu untersuchenden Tieren stellen eine relativ einfache erste Methode dar, ohne kostspieligen Laboraufwand Substämme zu unterscheiden. Allerdings ist diese Technologie auf gut eingearbeitetes Personal angewiesen und ist sehr zeitaufwendig. Bei Hauttransplantationen von C57BL/6J auf C57BL/6N Tieren treten beispielsweise Abstoßungsreaktionen auf (siehe Empfehlung des Ausschuss für Genetik und Labortierzucht der GV-SOLAS „Zielsetzungen und Methoden des genetischen Monitoring isogener Maus- und Rattenstämme“).

Die Differenzierung von Substämmen mittels molekulargenetischer Methoden ist schneller, kann je nach Kenntnis und Laborausstattung in Eigenregie durchgeführt oder bei kommerziellen Anbietern in Auftrag gegeben werden. Die molekulargenetischen Marker, die hierfür eingesetzt werden, sind allelspezifische Oligonukleotide (ASO), Mikrosatelliten (Simple Tandem Repeats, STR) oder Single Nukleotide Polymorphisms (SNP). Allelspezifische Oligonukleotide (ASOs) können entwickelt und eingesetzt werden, wenn sich Ausgangsstamm und Substamm bekannterweise bezüglich einer spezifischen Mutation unterscheiden. Dieses ist beispielsweise bei der mitochondrialen Nnt-Defizienz des C57BL/6J Stamms (offizielle Allelbezeichnung: nicotinamide nucleotide transhydrogenase; C57BL/6J) der Fall oder bei der Deletion des Snca (Alpha-Synuclein)-Locus auf Chromosom 6 einer C57BL/6J Subpopulation, die von Harlan vertrieben wird (Specht und Schoepfer, 2001; Specht und Schoepfer, 2004; Huang et al., 2006; Aston-Mourny et al., 2007; Kim et al., 2010). Mikrosatelliten hingegen sind kurze repetitive Basenabfolgen, die insgesamt 100 bis 1500 Basenpaare lang sein können und gleichmäßig im Genom verteilt sind. Sie können leicht mittels PCR Technik und anschließender Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Bei einem SNP ist ein einziges Nukleotid im DNA Strang ausgetauscht. SNP-Polymorphismen sind wesentlich dichter über das gesamte Genom verteilt als Mikrosatellitenmarker. Der Nachweis von SNPs kann über Sequenzieretechniken oder spezielle PCR Techniken, Real Time PCR oder Microarray Techniken erfolgen.

Die molekulargenetischen Profile der meisten Maus- und Ratten-Inzuchtstämme sind in den bekannten Datenbanken (*Mouse Genome Informatics* – MGI, <http://www.informatics.jax.org/>; *Rat Genome Database* – RGD, <http://rgd.mcg.edu/>; Ensembl, <http://www.ensembl.org/index.html>) publiziert und können dort recherchiert werden. Mikrosatelliten, die zur Differenzierung von C57BL/6 Substämmen eingesetzt werden können, sind vereinzelt beschrieben. Von 823 getesteten Mikrosatellitenmarkern sind 13 als informative Marker für die Unterscheidung der Substämme C57BL/6J und C57BL/6N ermittelt worden (Hovland et al., 2000). Tabelle 1 zeigt SNP-

Polymorphismen, mit denen die J- und N-Substämme des C57BL/6 Stamms diskriminiert werden können.

Tabelle 1: SNP-Polymorphismen zwischen den C57BL/6N und C57BL/6J Substämmen (freundlicherweise von The Jackson Laboratory zur Verfügung gestellt)

SNP-Bezeichnung	Genotypen	
	C57BL/6N	C57BL/6J
08-015199792-M	C	T
11-004367508-M	A	G
13-041017317-M	C	T
15-057561875-M	G	A
19-049914266-M	T	G

Am Institut für Versuchstierkunde und Zentralen Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover wurde ein Panel von SNPs (n=39) erarbeitet, mit dessen Hilfe sich alle C57BL/6 Substämme, die auf dem europäischen Markt erhältlich sind, gut differenzieren lassen. Dieses SNP-Panel wird in Kürze publiziert werden.

Mekada et al. haben im Jahr 2009 ein Panel von 12 SNPs publiziert, mit denen Nnt-defiziente B6 Substämme unterschieden werden können.

Eine weitere Möglichkeit zur molekulargenetischen Differenzierung von Substämmen liegt in der Bestimmung von Copy Number Variations (CNV). Dabei handelt es sich um größere DNA Abschnitte, die in Inzuchtstämmen und deren Substämmen in unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen können. CNVs sind noch wenig erforscht. Da diese DNA Abschnitte aber ein bis mehrere Gene enthalten können, wird den CNV Elementen eine große Bedeutung bei der Ausprägung des Phänotyps beigemessen (Cutler et al., 2007; Watkins-Chow und Pavan, 2008). Der Nachweis von CNV erfolgt gegebenenfalls mittels Sequenzier, PCR- oder speziellen Hybridisierungstechniken.

In der Tabelle 2 sind gängige Substämme von Maus-Inzuchtstämmen sowie deren genetische und/oder phänotypische Besonderheiten aufgelistet. Die phänotypischen Unterschiede sind teilweise seit langem bekannt. Neuere Untersuchungen decken immer weitere Diversitäten zwischen den Substämmen auf. Besonders relevant ist dies für die B6 Substämme, die besonders häufig als genetischer Hintergrund für gentechnisch veränderte Loci eingesetzt werden.

Tabelle 2: Phäno- und genotypische Unterschiede zwischen Substämmen gängiger Maus-Inzuchtstämmen.

Inzuchtstamm	Substamm	Phänotyp	Genetische Ursache	Referenz
AKR				
	AKR/Cu vs AKR/J	Lymphomzellen aus AKR/J Donoren werden von AKR/Cu Rezipienten abgestoßen	MiHC	Acton et al., 1973 Zatz, 1978
BALB/c				
	BALB/cJ	70% Inzidenz für Pristan-induzierte Arthritis		
	BALB/cAn	20% Inzidenz für Pristan-induzierte Arthritis		
	BALB/cByJ	Trink und Fressverhalten (geringerer Fettkonsum)	Mutation <i>Acads^{del-J}</i>	Smith Richards et al., 2004

Inzuchtstamm	Substamm	Phänotyp	Genetische Ursache	Referenz
C57BL/6				
	C57BL/6J vs C57BL/6N	Retinadysplasie	Mutation <i>rd8</i> im Gen <i>Crb1</i>	Mattapallil et al., 2012
	C57BL/6J vs C57BL/6NCrI	Insulinsekretion, Glucosetoleranz, Diät-induzierte Adipositas	Deletion der Exone 7 –11 im Gen <i>Nnt</i>	Toye et al., 2005 Aston-Mourney et al., 2007 Wong et al., 2010
	C57BL/6J vs C57BL/6NCrI	Alkoholkonsum (größere Alkoholpräferenz des J Substamms im Vergleich zum NCrI Substamm)	unbekannt	Ramachandra et al., 2007 Mulligan et al., 2008
	C57BL/6JOla, C57BL/6NHsd vs C57BL/6NCrI	Pilocarpin induzierte Epilepsie	unbekannt	Müller et al., 2009
	C57BL/6J vs C57BL/6N vs C57BL/6CrSlc	Verhalten	unbekannt	Bothe et al., 2004 Bryant et al., 2008
	C57BL/6JNmG vs C57BL/6JOlaKun	Neuroanatomische Strukturen	unbekannt	Jamot et al., 1994
C3H				
	C3H/HeJ	Lipopolysaccharid resistent	Mutation <i>Tlr4</i> ^{Lps-d}	Dumont, 1978
CBA				
	CBA/H	Unterschiede zu anderen CBA Stämmen betrifft das hämatopoetische System, Verhalten, Immunsystem, Sterblichkeit, Wachstum, Zellmorphologie	Mutation <i>fm</i>	Hulse, 1965 http://jaxmice.jax.org/strain/000656.html
	CBA/Ki CBA/J	Degeneration der Retina	Mutation <i>Pde6</i> ^{dt1}	Keeler, 1924 http://jaxmice.jax.org/strain/000656.html
	CBA/J vs CBA/Ca		Varianten der Gene <i>Pgm-1</i> und <i>rd</i> .	Roderick, 1978
	CBA/J vs CBA/CaJ	nicht histokompatibel	MiHC	Green und Kaufer, 1965
	CBA/N vs CBA/CAnN	Unterschiedliche Expressivität von verschiedenen Oberflächenantigenen, unterschiedliche Antikörperantworten		http://jaxmice.jax.org/strain/000656.html
	CBA/Ki vs CBAStKi	Hauttransplantatabstoßung, Tumorabstoßung, unterschiedliche Inzidenzen für spontane Tumore, degenerierte Retina im CBA/Ki Substamm, Unterschiede in der Futteraufnahme, induzierte Fettleibigkeit	MiHC	http://jaxmice.jax.org/strain/000656.html
DBA				
	DBA/1 vs DBA/2		Varianten in <i>Gpd-1</i>	Roderick, 1978
	DBA/2J	Resistenz und Inzidenz für verschiedene Krankheiten	<i>Ahr</i> ^d	http://jaxmice.jax.org/strain/000671.html
	DBA/2J	beeinträchtigte Hörfähigkeit	<i>Fscn2</i> ^{Ahl8}	Johnson et al., 2008 Shin et al., 2010
	DBA/2J	beeinträchtigt Sehvermögen	Mutationen <i>Gpmb</i> ^{R150X} , <i>Typr1</i> ^{isa} , <i>Myo5a</i> ^d	Hearing et al., 1973 Chang et al., 1999
	DBA/2J	Cd94 defizient	Deletion in <i>Klr1d1</i>	Wilhelm et al., 2003

6 Unterschiedliche Phänotypen von Substämmen

Der spezifische Phänotyp isogener Tierstämme wird in vielen Fällen nicht nur von besonderen Differentialallelen (wie knock-out Allelen oder Transgenen) determiniert, sondern auch durch den genetischen Hintergrund beeinflusst.

Eine hilfreiche erste Übersicht über die bekannten Stamm- und Substamm-spezifischen Eigenschaften, sowohl die genotypischen als auch die phänotypischen, liefern die Kataloge der kommerziellen Händler bzw. des The Jackson Laboratory. Weiterführende Informationen sind den gängigen Datenbanken zu entnehmen (vgl. auch Tab.2). Die dort gelisteten bzw. publizierten Eigenschaften eines Tierstamms sollten überprüft werden, bevor mit diesem Stamm eine Versuchsreihe geplant oder sogar begonnen wird, um vorab die Eignung für die jeweilige spezifische wissenschaftliche Fragestellung sicherzustellen. So ist für C57BL/6J Mäuse bekannt, dass sie eine erhöhte Alkohol- und Morphinpräferenz besitzen (Melo et al., 1996; Philipps et al. 1994), was bedacht werden muss, wenn das Suchtverhalten bzgl. dieser Substanzen untersucht werden soll. C57BL/6NCrl Tiere hingegen konsumieren bei *ad libitum* Verfügbarkeit geringere Mengen Alkohol, zeigen aber einen robusten Alkohol-Deprivations-Effekt, d.h. nehmen nach einer Entwöhnung zeitweise deutlich mehr Alkohol auf, was ein erhöhtes Suchtverhalten und eine damit verbundene erhöhte Rückfallwahrscheinlichkeit widerspiegelt (Khisti et al., 2006).

Die phänotypischen Auffälligkeiten von Stämmen bzw. deren Substämmen erstrecken sich über alle Organe und Funktionen und können im Rahmen der vorliegenden Publikation nicht vollständig aufgelistet werden. Um die Bandbreite aufzuzeigen, werden an dieser Stelle die erhöhte Prädisposition für Alopezie (Sundberg et al., 1994), für Mikrophthalmie (Smith et al. 1994), für diätinduzierte Fettleibigkeit (Rossmeisl et al., 2003) oder für Hydrozephalus (Festings:

<http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/C57BL.shtml>) sowie das veränderte Angstverhalten (Radulovic et al., 1998; Stiedl et al., 1999), die erhöhte Mammakarzinomhäufigkeit (Hoag, 1963), die extreme Intoleranz gegenüber Alkohol und Morphinen (Philipps et al., 1994), die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber akustisch induzierten Anfällen (Fuller und Sjursen, 1967) sowie die substammspezifische Inzidenz von Hydronephrosen (Iglauer et al., 1996) erwähnt.

Ein besonders eindrucksvolles Beispiel für die fatale Auswirkung eines substammspezifischen Phänotyps wurde 2012 von Mattapallil et al. publiziert. Wissenschaftler, die mit Hilfe von unterschiedlichen Mausmodellen nach Genen suchten, die an der Entstehung von Augenerkrankungen beteiligt sind, beobachteten ein unerwartetes Vererbungsmuster des jeweiligen Augenphänotyps. Wurden die Tiere auf C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt, wurde häufig auch in Kontrolltieren ein okulärer Phänotyp beobachtet. So kam der Verdacht auf, dass der beobachtete Phänotyp nicht mit dem Kandidatengen in Zusammenhang stand, das die Wissenschaftler durch genetische Modifikation untersuchen wollten, sondern auf andere Ursachen zurückzuführen sei. Bei näherer Betrachtung fiel die Ähnlichkeit zu einem bereits 2003 beschriebenen Retina-Phänotyp auf, der durch die rd8 Mutation des *Crb1* Gens verursacht wird (Mehalow et al., 2003). Diese Mutation geht auf die Deletion eines einzelnen Nukleotids zurück und äußert sich phänotypisch in klinisch auffälligen hellen Punkten im Augenhintergrund, die histologisch mit Auffaltungen der Retina, Retinadysplasie und Retinadegeneration korrespondieren. Bei einer daraufhin durchgeführten systematischen PCR-Analyse stellte sich heraus, dass sich die rd8 Mutation in homozygoter Weise im Genom des C57BL/6N Substamms verankert hatte. Es folgte ein Screening aller kommerziell erhältlichen B6-Stämme und B6-ES Zellen mit dem Ergebnis, dass unabhängig vom Züchter alle C57BL/6N Stämme die rd8 Mutation trugen, während alle C57BL/6J Substämme frei von der Mutation waren. Unter Berücksichtigung der Geschichte des C57BL/6 Mausstamms kann die Mutation deshalb erst nach 1951 entstanden sein, da in diesem Jahr die Trennung des C57BL/6 Stamms in den J (*The Jackson Laboratory*)- und den N (*National Institutes of Health*)-Substamm erfolgte.

In diesem Zusammenhang muss auch konstatiert werden, dass die transgenen und knock-out Mausmodelle des *Knock-Out Mouse-Projects* der *University of California* (KOMP, <http://www.komp.org/>) und des *European Conditional Mouse Mutagenesis Programs* (EUCOMM; <http://www.knockoutmouse.org/about/eucomm>) ausnahmslos auf der Basis von C57BL/6N ES Zellen generiert wurden und daher die rd8 Mutation tragen.

7 Substämme und standardisierte Versuchsbedingungen

Standardisierte Versuchsbedingungen sind eine Voraussetzung für valide Forschungsergebnisse. In der tierexperimentellen Forschung ist hier ein Augenmerk auf die Umwelteinflüsse, den mikrobiologischen Status und die Genetik der Versuchstiere zu legen. In Anbetracht der Vielzahl von Labornagerstämmen mit spezifischen Mutationen kommt der Genetik heute sicherlich eine besonders herausragende Bedeutung zu.

Oftmals werden genetisch veränderte Stämme zwischen unterschiedlichen Einrichtungen weitergegeben, ohne dass adäquate Informationen über den genetischen Hintergrund, i.e. Stamm- oder Substammzugehörigkeit, vorliegen. Nicht selten werden auch verschiedene Mutationen unter Vernachlässigung der Stamm- oder Substammzugehörigkeit der Ausgangsvarianten in einer Linie zusammengekreuzt, so dass die neu entstehenden Mehrfach-Mutanten über keinen definierten und standardisierten genetischen Hintergrund mehr verfügen, und es in vielen Fällen auch gar nicht mehr möglich ist, einen geeigneten Kontrollstamm zu definieren.

Es ist deshalb dringend anzuraten, sich vor der Aufnahme von Tierexperimenten gründlich über die Historie der einzusetzenden Stämme zu erkundigen. Sofern keine sicheren Auskünfte zu erhalten sind, sollte der genetische Hintergrund gegebenenfalls selbst kontrolliert werden.

In diesem Zusammenhang muss auch auf die enorme Wichtigkeit einer korrekten Stamm- und Substamm-Nomenklatur sowie einer akkuraten Zuchtdokumentation hingewiesen werden.

8 Literatur

- Acton RT, Blankenhorn EP, Douglas TC, Owen RD, Hilgers J, et al. (1973) Variations among sublines of inbred AKR mice. *Nat New Biol* 245: 8-10.
- Aston-Mourney K, Wong N, Kebede M, Zraika S, Balmer L, et al. (2007) Increased nicotinamide nucleotide transhydrogenase levels predispose to insulin hypersecretion in a mouse strain susceptible to diabetes. *Diabetologia* 50: 2476-2485.
- Bailey DW (1977) Genetic drift: the problem and its possible solution by frozen-embryo storage. *Ciba Found Symp*: 291 - 303.
- Bailey DW (1982) How pur is an inbred strain? *Immunology Today* 3: 210 - 214.
- Bothe GW, Bolivar VJ, Vedder MJ, Geistfeld JG (2004) Genetic and behavioral differences among five inbred mouse strains commonly used in the production of transgenic and knockout mice. *Genes Brain Behav* 3: 149-157.
- Bryant CD, Zhang NN, Sokoloff G, Fanselow MS, Ennes HS, et al. (2008) Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. *J Neurogenet* 22: 315-331.
- Chang B, Smith RS, Hawes NL, Anderson MG, Zabaleta A, et al. (1999) Interacting loci cause severe iris atrophy and glaucoma in DBA/2J mice. *Nat Genet* 21: 405-409.
- Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, et al. (1997) Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)* 132: 107-124.
- Crawley JN, Paylor R (1997) A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Horm Behav* 31: 197-211.
- Cutler G, Marshall LA, Chin N, Baribault H, Kassner PD (2007) Significant gene content variation characterizes the genomes of inbred mouse strains. *Genome Res* 17: 1743-1754.
- Dumont F (1978) Bacterial lipopolysaccharide (LPS) enhances concanavalin A reactivity of thymocytes from the low-LPS-responder mouse strain C3H/HeJ. *Experientia* 34: 125-126.
- Falconer, D. S. (1989). *Introduction to quantitative genetics*. Longman Scientific & Technical, New York
- Fuller JL, Sjursen FH (1967) Audiogenic seizures in eleven mouse strains. *J Hered* 58: 135-140.
- Glant TT, Bárdos T, Vermes C, Chandrasekaran R, Valdéz JC, et al. (2001) Variations in susceptibility to proteoglycan-induced arthritis and spondylitis among C3H substrains of mice: evidence of genetically acquired resistance to autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 44: 682-692.
- Green MC, Kaufer KA (1965) A test for histocompatibility between sublines of the CBA strain of mice. *Transplantation* 3: 766-768.
- Hearing VJ, Phillips P, Lutzner MA (1973) The fine structure of melanogenesis in coat color mutants of the mouse. *J Ultrastruct Res* 43: 88-106.
- Hoag WG (1963) Spontaneous cancer in mice. *Ann N Y Acad Sci* 108: 805-831.
- Hovland DN, Cantor RM, Lee GS, Machado AF, Collins MD (2000) Identification of a murine locus conveying susceptibility to cadmium-induced forelimb malformations. *Genomics* 63: 193-201.

- Huang TT, Naeemuddin M, Elchuri S, Yamaguchi M, Kozy HM, et al. (2006) Genetic modifiers of the phenotype of mice deficient in mitochondrial superoxide dismutase. *Hum Mol Genet* 15: 1187-1194.
- Hulse EV (1965) Laboratory animals in experimental haematology. *Food Cosmet Toxicol* 3: 735-748.
- Iglauer F, Kluge R, Just U (1996) Subline dependency of hydronephrosis in hybrid laboratory mice (DBA/2JxC57BL/6J). *Journal of Experimental Animal Science* 37: 216-223.
- Jamot L, Bertholet JY, Crusio WE (1994) Neuroanatomical divergence between two substrains of C57BL/6J inbred mice entails differential radial-maze learning. *Brain Res* 644: 352-356.
- Johnson KR, Longo-Guess C, Gagnon LH, Yu H, Zheng QY (2008) A locus on distal chromosome 11 (ahl8) and its interaction with Cdh23 ahl underlie the early onset, age-related hearing loss of DBA/2J mice. *Genomics* 92: 219-225.
- Keeler CE (1924) The Inheritance of a Retinal Abnormality in White Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 10: 329-333.
- Khisti RT, Wolstenholme J, Shelton KL, Miles MF (2006) Characterization of the ethanol-deprivation effect in substrains of C57BL/6 mice. *Alcohol* 40: 119-126.
- Kim A, Chen CH, Ursell P, Huang TT (2010) Genetic modifier of mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice delays heart failure and prolongs survival. *Mamm Genome* 21: 534-542.
- Mattapallil MJ, Wawrousek EF, Chan CC, Zhao H, Roychoudhury J, et al. (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.
- Mehalow AK, Kameya S, Smith RS, Hawes NL, Denegre JM, et al. (2003) CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina. *Hum Mol Genet* 12: 2179-2189.
- Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, et al. (2009) Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim* 58: 141-149.
- Melo JA, Shendure J, Pociask K, Silver LM (1996) Identification of sex-specific quantitative trait loci controlling alcohol preference in C57BL/6 mice. *Nat Genet* 13: 147-153.
- Müller CJ, Gröticke I, Hoffmann K, Schughart K, Löscher W (2009) Differences in sensitivity to the convulsant pilocarpine in substrains and sublines of C57BL/6 mice. *Genes Brain Behav* 8: 481-492.
- Mulligan MK, Ponomarev I, Boehm SL, Owen JA, Levin PS, et al. (2008) Alcohol trait and transcriptional genomic analysis of C57BL/6 substrains. *Genes Brain Behav* 7: 677-689.
- Naggert JK, Mu JL, Frankel W, Bailey DW, Paigen B (1995) Genomic analysis of the C57BL/Ks mouse strain. *Mamm Genome* 6: 131-133.
- Phillips TJ, Dickinson S, Burkhart-Kasch S (1994) Behavioral sensitization to drug stimulant effects in C57BL/6J and DBA/2J inbred mice. *Behav Neurosci* 108: 789-803.
- Radulovic J, Kammermeier J, Spiess J (1998) Generalization of fear responses in C57BL/6N mice subjected to one-trial foreground contextual fear conditioning. *Behav Brain Res* 95: 179-189.
- Ramachandra V, Phuc S, Franco AC, Gonzales RA (2007) Ethanol preference is inversely correlated with ethanol-induced dopamine release in 2 substrains of C57BL/6 mice. *Alcohol Clin Exp Res* 31: 1669-1676.
- Roderick TH (1978) Further information on subline differences. In *Origin of inbred strains*, ed. Morse HC III, Academic Press
- Rossmesl M, Rim JS, Koza RA, Kozak LP (2003) Variation in type 2 diabetes--related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. *Diabetes* 52: 1958-1966.
- Roth DM, Swaney JS, Dalton ND, Gilpin EA, Ross J (2002) Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H2134-2140.
- Shin JB, Longo-Guess CM, Gagnon LH, Saylor KW, Dumont RA, et al. (2010) The R109H variant of fascin-2, a developmentally regulated actin crosslinker in hair-cell stereocilia, underlies early-onset hearing loss of DBA/2J mice. *J Neurosci* 30: 9683-9694.
- Simpson EM, Linder CC, Sargent EE, Davisson MT, Mobraaten LE, et al. (1997) Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat Genet* 16: 19-27.
- Sluyter F, Marican CC, Crusio WE (1999) Further phenotypical characterisation of two substrains of C57BL/6J inbred mice differing by a spontaneous single-gene mutation. *Behav Brain Res* 98: 39-43.
- Smith Richards BK, Belton BN, York B, Volaufova J (2004) Mice bearing Acads mutation display altered postingestive but not 5-s orosensory response to dietary fat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R311-319.
- Smith RS, Roderick TH, Sundberg JP (1994) Microphthalmia and associated abnormalities in inbred black mice. *Lab Anim Sci* 44: 551-560.
- Specht CG, Schoepfer R (2001) Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC Neurosci* 2: 11.

- Specht CG, Schoepfer R (2004) Deletion of multimerin-1 in alpha-synuclein-deficient mice. *Genomics* 83: 1176-1178.
- Stiedl O, Radulovic J, Lohmann R, Birkenfeld K, Palve M, et al. (1999) Strain and substrain differences in context- and tone-dependent fear conditioning of inbred mice. *Behav Brain Res* 104: 1-12.
- Sundberg JP, Cordy WR, King LE (1994) Alopecia areata in aging C3H/HeJ mice. *J Invest Dermatol* 102: 847-856.
- Threadgill DW, Matin A, Yee D, Carrasquillo MM, Henry KR, et al. (1997a) SSLPs to map genetic differences between the 129 inbred strains and closed-colony, random-bred CD-1 mice. *Mamm Genome* 8: 441-442.
- Threadgill DW, Yee D, Matin A, Nadeau JH, Magnuson T (1997b) Genealogy of the 129 inbred strains: 129/SvJ is a contaminated inbred strain. *Mamm Genome* 8: 390-393.
- Toye AA, Lippiat JD, Proks P, Shimomura K, Bentley L, et al. (2005) A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia* 48: 675-686.
- Watkins-Chow DE, Pavan WJ (2008) Genomic copy number and expression variation within the C57BL/6J inbred mouse strain. *Genome Res* 18: 60-66.
- Wilhelm BT, Landry JR, Takei F, Mager DL (2003) Transcriptional control of murine CD94 gene: differential usage of dual promoters by lymphoid cell types. *J Immunol* 171: 4219-4226.
- Wong N, Blair AR, Morahan G, Andrikopoulos S (2010) The deletion variant of nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) does not affect insulin secretion or glucose tolerance. *Endocrinology* 151: 96-102.
- Wotjak CT (2003) C57BLack/BOX? The importance of exact mouse strain nomenclature. *Trends Genet* 19: 183-184.
- Yang Y, Beyer BJ, Otto JF, O'Brien TP, Letts VA, et al. (2003) Spontaneous deletion of epilepsy gene orthologs in a mutant mouse with a low electroconvulsive threshold. *Hum Mol Genet* 12: 975-984.
- Zatz MM (1978) Resistance to transplantation of spontaneous AKR lymphoma cells by substrains of AKR mice. In vivo resistance and generation of an H-2 restricted CML response. *Cell Immunol* 36: 251-262.