



## RESEARCH MODELS

# Strategije smanjenja genetskog odstupanja (engl. genetic drift) i povećanja eksperimentalne reproducibilnosti u istraživanjima na miševima

**Autor:**

Janine Low-Marchelli, PhD,  
The Jackson Laboratory

**Sažetak:**

Genetsko odstupanje se odvija u svakoj samostalnoj mišjoj uzgojnoj koloniji i posjeduje potencijal da negativno utječe na eksperimentalnu reproducibilnost i znanstvene zaključke. Spontane mutacije uzrokovane genetskim odstupanjem mogu ostati neprimjećene godinama sve dok takve mutacije same za sebe ne postanu cilj specifičnog znanstvenog istraživanja. Makar se takve mutacije ne mogu u potpunosti spriječiti, posljedično genetsko odstupanje te njihov utjecaj na znanstvena otkrića može se umanjiti promišljenim i pažljivim gospodarenjem mišjom zajednicom.

Budući se pojedine mišje zajednice razlikuju po veličini i strategijama gospodarenja, primjena cjelovite i točne nomenklature mišjih sojeva kao i popisivanje (evidencija) izvornih podsojeva poželjna je i korisna praksa za cijelu znanstvenu zajednicu.

**Značaj genetske stabilnosti miševa, sudionika istraživanja**

Prosječnom istraživaču bioloških znanosti mišje genetsko podrijetlo nije znanstveni čimbenik o kojem detaljnije promišlja. Glavni prioriteti znanstvenika su osiguranje financiranja istraživanja, razumijevanje značajki istraživane bolesti te publiciranje rezultata istraživanja.

Ipak, uspješno postizanje ovih ciljeva moguće je jedino ako se u mišjoj koloniji na kojoj se provodi istraživanje provode mjere održavanja genetske stabilnosti te prevencije genetskog odstupanja.

Pokusni miševi su jedinstveni, živi elementi znanstvenog istraživanja i kao takvi se mijenjaju tijekom svog života,

i što je od većeg značaja, iz jedne generacije u drugu. Naposljetku, nasljedne promjene u DNK slijedu osnova su raznolikosti vrsta i evolucije u divljini. Čak i u odsustvu evolucijskog pritiska, DNK slijed je podložan promjenama.

Na prvi pogled, takve mutacije se čine tihim, beznačajnim fluktuacijama u genotipu pojedinca. Ipak, ove naizgled beznačajne mutacije mogu ozbiljno ugroziti eksperimentalnu reproducibilnost.

Znanstvenici koji provode istraživanjima na miševima suočeni su sa zagonetkom. Uzgoj miševa za potrebe provedbe *in vivo* istraživanja posjeduje svojstven rizik koji propagira genetsku raznolikost pa posljedično tome i raznolikost eksperimentalnih ishoda.

Od pokusa do pokusa, od publikacije do publikacije, raznolikost eksperimentalnih podataka i ishoda ne pogoduju znanstvenom napretku.

Svrha ovog znanstvenog rada jest educirati znanstvenike koji provode istraživanja na miševima o potencijalnim učincima genetskog odstupanja na napredak istraživanja te ponuditi i objasniti najbolje prakse sa ciljem njegovog smanjenja i poništenja ukoliko bi se utvrdila njegova pojava u mišjoj zajednici.

Detaljno izvještavanje službene nomenklature proizvođača mišjeg soja i uzgojnih postupaka kod publiciranja rezultata i prijava projekata samo su neke od jednostavnih poželjnih praksi koje mogu istraživači primijeniti a koje unapređuju reproducibilnost *in vivo* istraživanja i odgovornu primjenu životinja u istim.

## Kako dolazi do genetskog odstupanja i koja je njegova učestalost u mišjim zajednicama

Visoko srođivanje ili parenje braće i sestara (engl. inbreeding) uspješna je metoda kojom se smanjuje heterozigotnost na svakom genskom lokusu miša čime se postiže jednoliki fenotip i osiguravaju osnovne eksperimentalne reproducibilnosti.

Genetska homozigotnost omogućava usporedbu jedne varijable od interesa između kontrolne i eksperimentalne grupe te se posljedične razlike u očitanjima mogu dovesti u vezu sa varijablom koja se istražuje.

Slično principima koji su zastupljeni u divljini, genotip dvaju populacija uzgojenih identičnim „inbreeding“ postupkom u izolaciji s vremenom će se postupno promijeniti.

Spontane mutacije se mogu pojaviti u vidu polimorfizma jednog nukleotida, brisanja, inverzija, duplikacija što su tek neke od grešaka koje su utvrđene u vrijeme DNK replikacije i mejoze. Ovaj proces nasumičnih pojava, nestajanja i trajnog fiksiranja spontanih mutacija u mišjoj populaciji zovemo genetskim odstupanjem (Lee Silver, 1995). Pojavnost i količina genetskog odstupanja unutar aktivne rasplodne zajednice varira ali se pretpostavlja da je dosta česta. Prosječno trajanje aktivnog perioda rasploda u miševa je 3-4 mjeseca a spolna zrelost nastupa sa 5-8 tjedana starosti. Potomstvo obično dolazi na svijet 3 tjedna nakon parenja roditelja. Izračun mjere spontanih mutacija u populaciji od preko milijun miševa temeljen na promjenama boje krzna ukazuje na to da jedna fenotipska mutacija može nastupiti svako 1,8 rasplodnih generacija (Drake et al., 1998; Russel and Russel, 1996).

Rizik od širenja spontanе mutacije unutar rasplodne linije veći je u manjim populacijama (Figura 1A). Svaka mutacija prisutna u mišjoj roditeljskoj rasplodnoj liniji naslijediti će se u otprilike pola potomstva koje će biti heterozigotno za tu mutaciju (Figura 1B). U visoko srođenim rasplodnim mišjim zajednicama, postoji 25% šanse da se ovakve mutacije fiksiraju (postanu homozigotne) (Chamary and Hurst, 2004; Drake et al., 1998).

### A

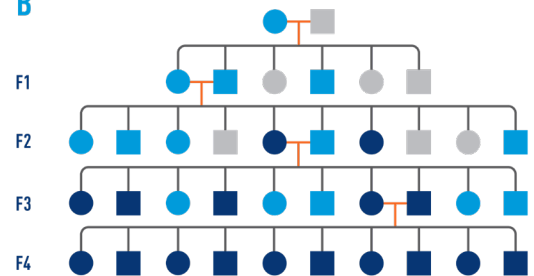
Large Colony



Small Colony



### B



**Figura 1: Rizik širenja spontanе mutacije veći je u malim nego u velikim kolonijama.**

#### A) Rizik širenja spontanе mutacije je veći u manjoj koloniji nego u velikoj koloniji.

Vjerojatnost da će se u rasplodne svrhe koristiti miš sa slučajnom mutacijom (svijetlo plava boja) je veća u manjoj nego u velikoj koloniji.

**B)** U svakom slijedećem rasplodnom ciklusu, postoji 25% šanse da će nova mutacija biti zastupljenija u mišjoj zajednici. Na primjer, Mendelsko nasljedstvo predviđa da će F1 (engl. filial\_prva generacija visoko srođenih potomaka) biti sastavljena od 50% divljih tipova (siva boja) i 50% heterozigota za mutaciju boje krzna (svijetlo plava boja).

Ako se slučajno za rasplod odabralo dva heterozigota, F2 (druga generacija visoko srođenih potomaka) će sadržavati 25% divljih, 50% heterozigota i 25% homozigota (tamno plava). Ovakva raspodjela se nastavlja sve dok cijela kolonija ne postane homozigotna za dotičnu mutaciju (F3, F4). Genom, međutim, može napraviti odmak u oba smjera ovisno o genotipu rasplodnih miševa – vjerojatnost da će se mutacija fiksirati je jednaka vjerojatnosti da će ona zauvijek nestati iz kolonije.

## Pokazatelji koji potvrđuju da je došlo do genetskog odstupanja: obilježja podsojeva

Podsoj je grana visoko srođenih sojeva za koju se sumnja ili se pouzdano zna da se genetski razlikuje od roditeljske kolonije (<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml#substrains>).

Budući genetsko odstupanje može biti različito u dvije populacije visoko srođenih miševa koji su potekli od istih roditelja, obilježje podsoja najvažnija je komponenta nomenklature. Obilježje podsoja u svom opisu sadrži jedinstveni laboratorijski kod kojeg dodjeljuje američki institut za istraživanja na laboratorijskim životinjama (ILAR engl. Institute for Laboratory Animal Research) (<https://www.nationalacademies.org/ilar/lab-code-database>).

Pomoću laboratorijskog koda identificira se laboratorij ili istraživač koji je proizveo ili održava koloniju dotičnog mišjeg soja (Tabela 1).

Budući su laboratorijski kodovi složeni, rodoslovlje soja se može pročitati iz samog naziva soja/koda.

Na primjer, američki “National Institutes of Health” (NIH engl. državni zdravstveni instituti (N)) je dugi niz godina uzgajao soj C57BL/6NJ a sada taj soj uzgaja i distribuira „The Jackson Laboratory“ (J) (Figura 3). Ekstenzija u nomenklaturi uglavnom ukazuje na to da su između dva soja potvrđene genetske razlike.

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.

**Tabela 1:** Najčešći laboratorijski kodovi koji se koriste u nomenklaturi podsojeva

ILAR dodjeljuje i održava jedinstvene identifikatore za institute, laboratorije ili pojedinačne znanstvenike koji su zaslužni za kreiranje i uspostavu rasplodne kolonije nekog novog mišjeg soja.

### Suspektne genetske razlike između rasplodnih generacija (naraštaja)

Svaki visoko srođeni soj koji se održavao neovisno od

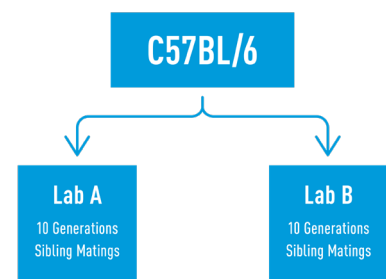
roditeljskog kroz 20 uzastopnih rasplodnih generacija (u trajanju od 5-6 godina) najvjerojatnije se genetski razlikuje od predaka pa se zato smatra podsojem.

Dodatno, uzgoj novih naraštaja/generacija ima kumulativni učinak na genetsko odstupanje pa tako, ako su dva laboratorija otkupila od uzgajivača mišje sojeve istog porijekla a potom je svaki laboratorij taj soj održavao i uzgajao kroz 10 generacija uzastopnih visoko srođenih parenja, svaki laboratorij je tako uzgojio jedinstveni podsoj koji se smatra 20 rasplodnih generacija razdvojen od onog u drugom laboratoriju (Figura 2).

Prve zajednice visoko srođenih mišjih sojeva (uključivši C57BL/6, DBA, C3H, BALB, CBA i druge) koje su korištene u biološkim istraživanjima uspostavljene su pred gotovo 100 godina i danas se često primjenjuju u iste svrhe.

Kako su suvremene zajednice tih sojeva razdvojene za 200 i više generacija od svojih predaka te kako ih mnogobrojne svjetske institucije uzgajaju, u svim tim suvremenim podsojevima je kroz stoljetni vremenski period došlo do značajnog (kumulativnog) genetskog odstupanja u odnosu na ishodišni soj od kojeg svi potječu.

Uzimajući u obzir nastalo genetsko odstupanje, moguće je da se fenotipska vidljiva obilježja u populaciji današnjih sojeva razlikuju od onih koja su zabilježena u ishodišnim populacijama, pred stotinjak godina.



**Figura 2:** Razvoj podsoja

Podsoj se razvije nakon 20 uzastopnih visoko srođenih (brat x sestra) parenja (engl. inbreeding). Iako ova dva laboratorija (iz gornjeg primjera) nisu pojedinačno provela 20 uzastopnih ciklusa parenja u visokom srodstvu, Laboratorij A i B održavaju sojeve koji su razdvojeni sa 20 rasplodnih generacija. Dodavanje laboratorijskih kodova na imena sojeva generalni je pokazatelj da je između dva soja došlo do genetskog odstupanja.

### Poznate genetske razlike između podsojeva koje se manifestiraju i kao fenotipske razlike

Podsojevi visokosrođenih miševa se osim u genotipu ponekad razlikuju i po fenotipskim obilježjima.

Spontane mutacije uvijek ne uzrokuju vidljive promjene u fenotipu; one se mogu fiksirati u homozigotnoj populaciji miševa bez vidljivih manifestacija i promjena na fenotipu kroz duži niz godina te kao takve neprimjetno proći ispod radara istraživača koji gospodare mišjom kolonijom koristeći miševu u znanstvenim istraživanjima; tek su vidljive fenotipske promjene očigledni dokaz da je došlo do genetskog odstupanja.

Često je u bazičnim istraživanjima na pr. fenotipski učinak izražaja mutacije gena predmet znanstvenog istraživanja; u svim ostalim slučajevima (primjenjena istraživanja),

neočekivani eksperimentalni rezultati ne bi smjeli biti tek povod da se pokus kvalificira kao “neuspješan” već bi trebali pobuditi sumnju da su upravo slučajne genetske mutacije krivci za razvoj neočekivanog i neželjenog fenotipa i rezultata.

Na primjer, roditeljski visoko srođeni soj C3H poslužio je Jackson Laboratory (JL dalje u tekstu) istraživačima za uspostavu dva podsoja koji se naizgled nisu razlikovali duži niz godina. Dr. Walter Heston uzgojio je soj 1930. godine (sada poznat kao C3H/HeJ). 1952. godine, Heston je predao neke miševu iz svog uzgoja JL istraživaču, Dr. Henry Outzen-u (taj soj je sada poznat kao C3H/HeOuJ). Krajem 1960-tih, utvrđeno je da je Hestonov soj otporan na izazov lipopolisaharidom (LPS), dok je Outzen-ov soj ostao osjetljiv na izazov LPS-om. Kasnije je mutacija dovedena u vezu sa

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 <sup>tm1Unc</sup> /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 <sup>scid</sup> /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	

**Tabela 2: Genetske sekvence i fenotipske značajke su specifične za podsoj**

Samo su „J“ mišji podsojevi u potpunosti sekvencirani a rezultati sekvenciranja pohranjeni su u Ensembl bazu podataka (gdje Y znači da). Mnogi podsojevi imaju zabilježeni polimorfizam jednog nukleotida a genotipska osnova C57BL/6J podsoja služi kao referentna (kontrola). Pored SNP (polimorfizam jednog nukleotida) informacije, tisuće za podsoj specifičnih fenotipskih karakteristika neovisno se kvantificiralo i rezultati pohranjeni u MPD (baza mišjih fenotipova) bazi podataka dostupni su za analizu. Velik broj JL sojeva se distribuira posredstvom Charles Rivera (CR) u Europi i Japanu i ti sojevi su zaštićeni Jackson Laboratory (JL) patentom koji garantira provođenje programa genetske stabilnosti (GSP engl. Genetic Stability Program).

genom Tlr4 koji je odgovoran za prepoznavanje patogena i aktivaciju urođenog imunskog sustava. (Poltorak et al., 1998a; Watson et al., 1978). Dok substitucija baze C u A na nukleotidu 2342 u genu Tlr4 nije naposljetku identificirana, mutacija se fiksirala u Heston-ovom podsoju, vjerojatno u periodu između 1958 i 1965 (Poltorak et al., 1998b). Da nekim slučajem Heston-ov C3H podsoj nikad nije bio tretiran LPS-om, vrlo vjerojatno se Tlr4 mutacija ne bi identificirala te bi zaključci iz povijesnih istraživanja iz područja bazične imunologije na ovim sojevima bili osporeni.

#### **Podsojevi sadrže specifične genomske sljedove (sekvence)**

Postojanje genetskog odstupanja osim slučajnim otkrićem može se sa sigurnošću identificirati i potvrditi postupkom sekvenciranja genoma novonastalog mišjeg podsoja i njegovom usporedbom sa referentnim (ishodišnim) genomom. C57BL/6J ženka je prva poslužila za kompletno sekvenciranje mišjeg genoma u sklopu "Mouse Genome Sequencing Consortium" (hrv. konzorcij za sekvenciranje mišjeg genoma).

Do danas je kompletno sekvencirano 15 glavnih visoko srođenih mišjih sojeva i svi su pripadnici „J“ podsojeva, što je službeni ILAR kod za „Jackson Laboratory“ (JL dalje u tekstu) sojeve (Adams et al., 2015, [www.ensembl.org/Mus\\_musculus/Info/Strains](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Info/Strains)) (Tabela 2)

Dodatnih 20 + visoko srođenih sojeva se sekvenciralo čitajući kratke redosljede kako bi se identificiralo polimorfizam jednog nukleotida (SNP engl. Single Nucleotide Polymorphism), indele i relativne strukturne varijacije u odnosu na referentnu C57BL/6J genetsku osnovu (Frazer et al., [www.sanger.ac.uk/science/data/mouse-genomes-project](http://www.sanger.ac.uk/science/data/mouse-genomes-project)).

Furthermore, known SNP data for specific substrains can be found and compared in the "Mouse Phenome Database" (MPD hrv. baza mišjih fenotipova).

Dodatno, poznate SNP (polimorfizam jednog nukleotida) podatke za pojedine podsojeve može se pronaći i uspoređivati u prije spomenutoj MPD bazi što je unificirana kolekcija genotipskih i fenotipskih karakteristika najčešće korištenih mišjih sojeva (<http://phenome.jax.org>).

#### **Genotipska osnova mišjih sojeva utječe na znanstvene zaključke**

Kako je ranije opisano na primjeru genetskog odstupanja dokazanom za C3H mišji soj, podsojevi mogu razviti spontane mutacije koje imaju potencijala utjecati na rezultate i zaključke istraživanja.

Ako se eksperimente na životinjama ne provodi u skladu sa dobrim istraživačkim praksama, kao na primjer primjenom podsojeva odgovarajućih genotipova, rezultati mogu ozbiljno ugroziti eksperimentalnu reproducibilnost.

Bez obzira na to da li su spontane mutacije nastale u uzgojnoj nastambi proizvođača ili u pojedinačnim uzgojnim nastambama krajnjih korisnika, kako znanstveni istraživač koji provodi *in vivo* istraživanja može znati koji je podsoj najbolji za ostvarenje ciljeva njegovih istraživanja?

Na žalost, nema jednostavnog odgovora na to pitanje.

Najbolji način da se utvrdi da li varijabla genotip ima utjecaja na ciljeve istraživanja jest da se istovremeno provedu identični pokusi na različitim podsojevima i usporede krajnji rezultati.

Kako je to u praksi nemoguće sprovesti, najbolji način da se utvrdi utjecaj genotipa na rezultate istraživanja jest da se o tome educira putem publikacija drugih istraživača i da se nastavi dopunjavati specifična znanja o tome koristeći se u istraživanjima identičnim, strogo genetski definiranim podsojevima.

#### **C57BL/6 podsojevi**

Između svih podsojeva visoko srođenih mišjih sojeva postoje razlike.

C57BL/6 soj je najčešće korišten u *in vivo* istraživanjima i kao takav najčešće citiran u publikacijama, u preko 37000 publikacija u PubMed-u (Tabela 3).

Ovaj rad će se fokusirati samo na publikacije koje opisuju razlike između članova C57BL/6 obitelji podsojeva. Trenutačno postoji preko 16000 publikacija u sklopu kojih su istraživanja provedena na originalnom C57BL/6J podsoju.

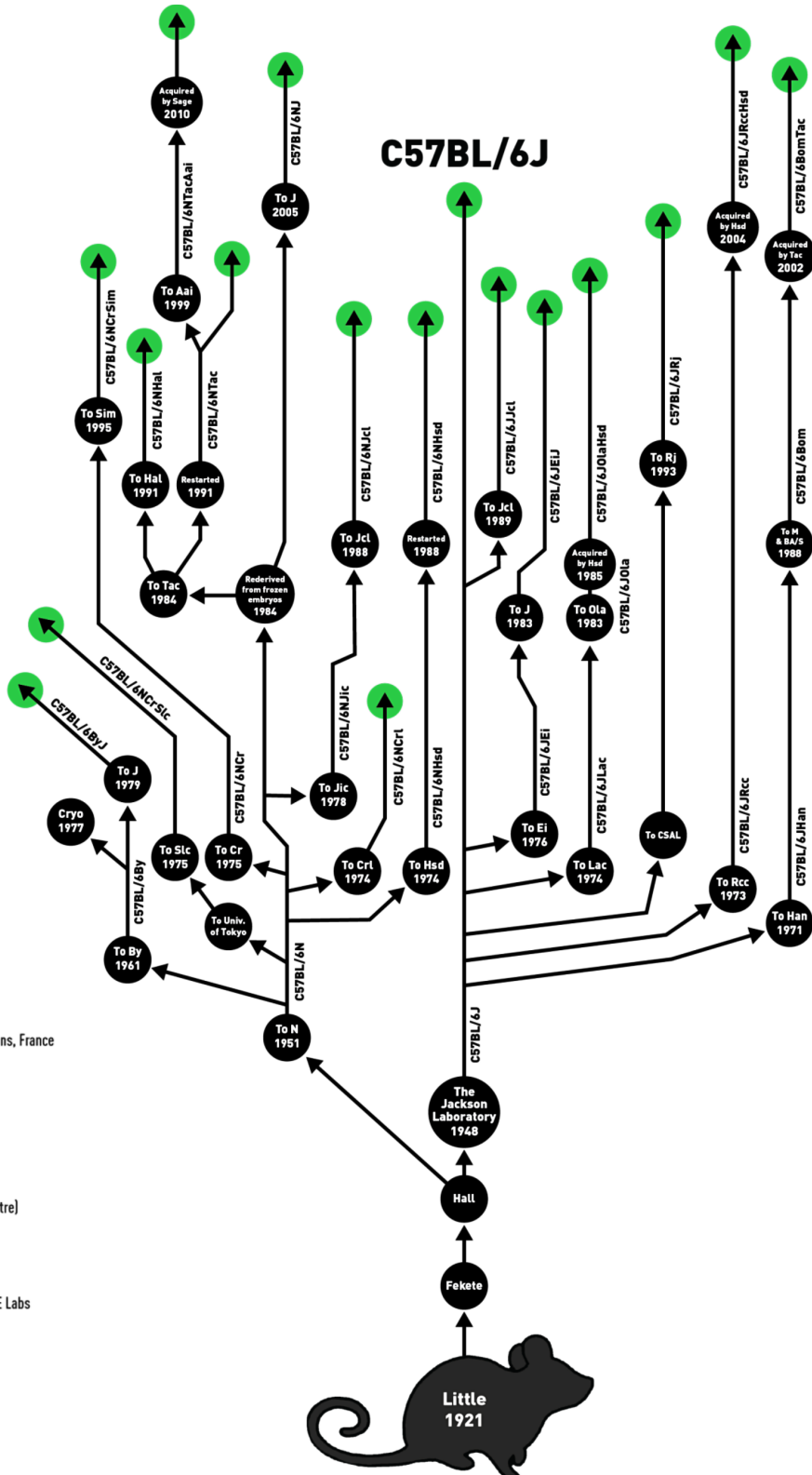
Manji broj publikacija postoji u sklopu kojih su istraživanja provedena na podsojevima proizišlim iz originalnog C57BL/6J soja.

**Figura 3: Povijest razvoja C57BL/6 podsojeva**

Clarence Cook Little, osnivač “the Jackson Laboratory” 1921. godine uspostavio je prvu stabilnu koloniju mišjeg C57BL/6 soja.

U međuvremenu, soj je distribuiran stotinama instituta i tisućama laboratorija krajnjih korisnika diljem svijeta.

Zahvaljujući spontanim mutacijama koje su dovele do genetskog odstupanja, svaki C57BL/6 podsoj je usrodstvu sa ostalim ali istovremeno svaki podsoj posjeduje jedinstvene poznate i nepoznate razlike u sekvencama vlastitog genoma.



- Aai** Ace Animals, Inc.
- Bom** M&B A/S
- By** Donald W. Bailey
- Cr** NCI, DCTD Animal Production Program
- Crt** Charles River Laboratories
- CSAL** Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Orleans, France
- Han** Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover
- Hal** Hilltop Animals Lab, Inc.
- Hsd** Harlan Sprague Dawley, Inc, acquired by Envigo, 2015
- J** The Jackson Laboratory
- Jic** Central Institute for Experimental Animals
- Jcl** CLEA Japan, Inc.
- Lac** Laboratory Animal Centre (MRC Carshalton Lab Animal Centre)
- N** National Institutes of Health
- Ola** Olac, Ltd.(Bicester, Oxfordshire, UK)
- Rj** Centre D'Élevage R. Janvier
- Sage** Sigma Aldrich, Sigma Advanced Genetic Engineering - SAGE Labs
- Sim** Simonsen Laboratories, Inc.
- Slc** Japan SLC, Inc.
- Tac** Taconic Farms, Inc.



Otprilike, 1200 publikacija opisuje istraživanja provedena na podsojevima originalnog C57BL/6N soja.

U nadolazećim godinama, očekuje se da će primjena C57BL/6N podsojeva značajno narasti jer će svih 20000 gena mišjeg genoma biti ciljano u C57BL/6N embrionalnim matičnim stanicama u sklopu projekta „International Knockout Mouse Consortium (IKMC)“ (hrv. međunarodni konzorcij “knockout (KO)” miševa) koji se temelji na tehnologiji ciljane mutacije ([www.mousephenotype.org](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/6NCrI	71
C57BL/6NJ	11
C57BL/6NHsd	41
C57BL/6NTac	78

**Tabela 3: Zastupljenost podsojeva C57BL/6 u znanstvenim publikacijama**

U vrijeme publiciranja ovog rada, C57BL/6J i C57BL/6N su bili termini korišteni za pretraživanje PubMed baze podataka.

Izvorni (originalni) JL C57BL/6J podsoj poslan je 1951. godine u američki državni zdravstveni institut (National Institute of Health, NIH).

Tako nastali C57BL/6N podsoj je kasnije distribuiran u nekoliko instituta, 1974. u CR laboratorije (današnji soj C57BL/6NCrI), u Harlan (danas Envigo) iste godine i ponovno 1988. (današnji soj C57BL/6NHsd) te u Taconic 1991. godine (današnji soj C57BL/6NTac).

2005. godine N podsoj se vratio u JL i danas je poznat kao C57BL/6NJ podsoj.

Trenutačno, najmanje 100 rasplodnih generacija razdvaja C57BL/6J od C57BL/6N podsojeva (Figura 3).

Nekoliko publikacija demonstrira nasljedne fenotipske razlike između J i N podsojeva koje su nastale kao posljedica kumulativnog genetskog odstupanja.

Miševi su važni životinjski modeli za proučavanje uloge gena koji su sekvencionirani ali čija funkcija nije utvrđena pa se tako, ovisno o specifičnosti znanstvenog pitanja, neki podsojevi više preferiraju i češće koriste u istraživačkoj praksi od ostalih (Bryant, 2011). Neki klasični i suvremeniji primjeri su navedeni, kako slijedi:

- Ekspresija mutiranog Nnt gena u C57BL/6J miševa pokreće glukozom potaknute procese sekrecije inzulina, za razliku od C57BL/6N podsoja u kojih takvi procesi izostaju (Freeman et al., 2006).
- C57BL/6J miševi pokazuju sklonost prema alkoholu i redovito ga konzumiraju dočim to ne vrijedi za C57BL/6NCrI soj miševa (Mulligan et al., 2008). Studijama mapiranja genskog lokusa i kvantificiranja utjecaja gena na fenotipske osobine ova dva podsoja moguće je osigurati bolje razumijevanje uloge ovih gena u razvoju miševe te ljudske ovisnosti na alkohol.
- C57BL/6N podsojevi posjeduju alele Crbrd8 odgovorne za razvoj retinalne degeneracije dok C57BL/6J podsoj posjeduje divlji tip alela (Mattapallil et al., 2012)
- C57BL/6J0laHsd miševi su homozigotni za mutaciju koja prouzrokuje spontano brisanje gena odgovornih za upravljanje sinteze proteina alfa sinuklein i multimerin-1 (Specht and Schoepfer, 2001, 2004). Nakupljanje alfa sinukleina u centralnom živčanom sustavu nalaz je tipičan za Parkinsonovu bolest: mutacija prisutna u C57BL/6J0laHsd podsoju izgleda ne utječe na prionima potaknutu sinaptotoksičnost (Asuni et al., 2010) ali generalno utječe na degeneraciju motoričkih neurona (Pelkonen and Yavich, 2011; Pena-Oliver et al., 2012).
- C57BL/6J0laHsd miševi osim toga imaju smanjenu gustoću kostiju u usporedbi sa C57BL/6J i C57BL/6JRccHsd podsojevima (Liron et al., 2017).
- C57BL/6NHsd miševi nose Dock2 mutaciju koja utječe na procese signaliziranja B-stanica i imunološku toleranciju što nije odlika većine C57BL/6 podsojeva (Mahajan et al., 2016)

U slijedećem primjeru, rezultati desetogodišnjih znanstvenih istraživanja jednog laboratorija dovedeni su u pitanje jer su se pogrešno temeljili na dva genetski značajno različita C57BL/6 soja (<https://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>). U objavljenim originalnim studijama autori su koristili nedefinirani C57BL/6 podsoj i njegovu genetsku podlogu za kreiranje Siae „Knock Out“ miša (Cariappa et al., 2009).

Siae gen, stajalo je u njihovoj izvornoj publikaciji iz 2009., sudionik je procesa razvoja B-stanica i signaliziranja.

Miševi nositelji Siae mutacije su potom spareni sa specifičnim JL C57BL/6J podsojem kako bi se na potonji soj prebacila Siae mutacija kroz najmanje 20 generacija parenja u visokom srodstvu.

Usljedilo je neugodno iznenađenje kada se sa pokusima na miševima C57BL/6J osnove nije uspjelo ponoviti prijašnje rezultate (Mahajan et al., 2016).

Nakon više godina provođenja dodatnih analiza na nekoliko komercijalno dostupnih C57BL/6 podsojeva utvrđeno je da je u C57BL/6NHsd miševa došlo do pojave i fiksiranja spontane mutacije Dock2 koja je potvrđena kao stvarni uzrok promjena u funkcijama B-stanica.

Ovaj primjer trebao bi poslužiti kao pouka da je u *in vivo* istraživanjima poželjno detaljno praćenje i razumjevanje genetskog porijekla miševa koji se koriste.

Zbog postojanja genetskog odstupanja i razlika u genotipu, visoko srođeni miševi se ne bi smjeli naizmjenično koristiti. Korisno je znati kod provođenja ciljanih *in vivo* istraživanja da utjecaj spontanih mutacija sa posljedičnim genetskim odstupanjem i promjenom fenotipa soja može ovisiti te biti potaknuto nekolicinom eksperimentalnih čimbenika.

Tako je utvrđeno da je Nnt mutacija u C57BL/6J soju u *in vitro* uvjetima zaslužna za smanjenje inzulinske sekrecije dočim taj efekt izostaje *in vivo*, u C57BL/6J miševa, nositelja Nnt mutacije (Freeman et al., 2006).

U drugoj studiji nisu utvrđene značajne razlike u sekreciji inzulina *in vitro* ili *in vivo* u C57BL/6J i C57BL/6NTac podsojeva (Wong et al., 2010).

Nadalje, status Nnt mutacije te njena uloga u razvoju hranom izazvane pretilosti kao i u procesima inzulinskog

odaziva nije jasan i možda ovisi o sadržaju masti u prehrani (Nicholson et al., 2010).

U skladu s time, dva J podsoja (J, JWehi) i četiri N podsoja (NTac, NHsd, NCrI, NJ) na prehrani formulom siromašnoj mastima razvila su slične profile inzulinske sekrecije nakon izazova glukozom.

Međutim, kada je C57BL/6NJ podsoj primao hranu bogatu mastima, na izazov glukozom demonstrirao je reducirani inzulinski odaziv koji se nije mogao objasniti razlikama u statusu Nnt gena, tjelesne težine, udjela tjelesnih masti, razlikama u prehrani ili statusu beta stanica gušterače (Hull et al., 2017).

Postoje još neke razlike među C57BL/6 podsojevima koje su obrađene u publikacijama.

Bryant i suradnici saželi su u svom radu iz 2008 razlike u ponašanju među podsojevima a koje se tiču anksioznosti, boli i reakcije na amfetamine.

Šire gledano, razlike među podsojevima C57BL/6J i C57BL/6Ntac uspoređene su u iscrpnim unificiranim istraživanjima fenotipova koji su uključivali 413 parametara (EMPreSS) a istraživanja su provedena u 4 neovisna centra “European Mouse Diseases Clinic, EUMODIC” (hrv. europski konzorcij klinika za mišje bolesti) (Simon et al., 2013).

U sva četiri centra, rezultati dobiveni na J i Ntac miševima razlikovali su se u nekoliko istraženih područja, uljučivši i reakciju na podražaj, lokomotornu aktivnost, jačinu hvata, kardiovaskularne karakteristike, metaboličke parametre i kliničku kemiju.

Uzimajući sve u obzir, genetska osnova je tek jedna komponenta eksperimentalnog dizajna koja može utjecati na reproducibilnost i koju treba imati na umu kada se generalizira sa zaključcima o biološkim procesima. Zabrinjava činjenica da u preko 37000 publiciranih radova koji u PubMed bazi opisuju istraživanja na “C57BL/6” soju većina autora ne navodi korišteni podsoj.

### **Prakse gospodarenja mišjom kolonijom koje ograničavaju genetski pomak**

Sve su uzgojne kolonije podložne mutacijama i posljedičnom genetskom odstupanju. Ipak, poznate su strategije gospodarenja mišjom kolonijom koje ograničavaju



genetsko odstupanje pa tako i nepoželjne posljedice po eksperimentalnu reproducibilnost. Navedene strategije podrazumijevaju upotrebu pravilne nomenklature, promišljene prakse parenja i krioprezervaciju mišjih embrija. U nastavku slijede neke od najboljih praksi koje valja primijeniti kod gospodarenja mišjom kolonijom.

#### **Nomenklatura i pravilno izvještavanje**

Pravilno izvještavanje nomenklature mišjeg soja nužno je kako bi se osigurao nedvojbeni identitet soja na kojem se provode istraživanja.

- **U svakodnevnim rutinskim poslovima gospodarenja kolonijom, preporuča se koristiti unapred računalno tiskane kavezne kartice u različitim bojama sa navodom pravilne nomenklature soja i njegovog porijekla (podatci uzgajivača) kao i osiguranje sljedivosti istih podataka njihovim zapisom u laboratorijske dnevnik.** Prethodno računalno tiskanje kaveznih kartica smanjuje mogućnost greški kod ručnog unosa podataka u kartice te poboljšava usklađenost nomenklature relevantne za kvalitetno provođenje *in vivo* istraživanja. Primjena različitih boja kaveznih kartica za različite sojeve naročito je korisna u prostorima u kojima se istovremeno drži više različitih mišjih sojeva sličnog izgleda i slične nomenklature.
- **Preporučuje se primjena pravilne nomenklature i prilikom odjelnih prezentacija u ležernoj, „neformalnoj“ komunikaciji.** Neformalna komunikacija postaje „formalna“ kada se podatke konačno obradi za potrebe poster prezentacija, govornih prezentacija, publikacija i prijava projekata za financijsku potporu.
- **U publikacijama i prijavama projekata za financijsku potporu, preporuča se primjena kompletne i pravilne nomenklature te porijeklo podsoja kod prvog navoda mišjeg soja u tekstu.** Definirati koja kratica nomenklature soja će se koristiti kasnije u tekstu i u podacima. U poglavlju koje opisuje metodologiju, navesti kompletu nomenklaturu i porijeklo korištenih podsojeva. Identificirati porijeklo soja, ime laboratorija, instituta i/ili dobavljača te u tom slučaju evidentirati kataloški broj soja. Izvijestiti broj rasplodnih generacija i

pri tom korištene sheme parenja (vidi niže). Za dodatne preporuke, konzultirati se sa ARRIVE preporukama ([www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines](http://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines)).

#### **Parenje u visokom srodstvu, rodoslovlje i broj rasplodnih generacija**

Parenje u visokom srodstvu dopušta bržu identifikaciju devijantnih fenotipova u mišjoj koloniji.

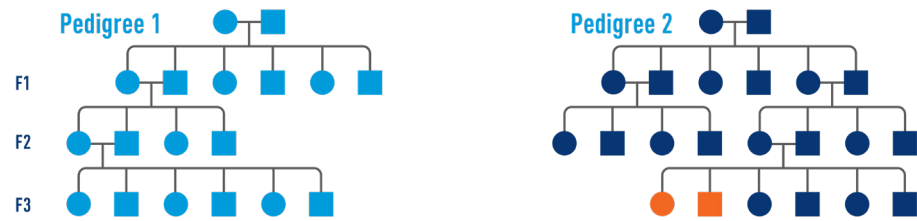
Evidencija o rodoslovlju omogućava da se nepoželjnom mutacijom potencijalno afektirani i potvrđeno afektirani visoko srođeni miševi na vrijeme uklone iz kolonije (Figura 4).

Broj rasplodnih generacija omogućava brzu identifikaciju potencijalne opasnosti od razvoja genetskog odstupanja u koloniji.

- **Parenje u visokom srodstvu** (engl. inbreeding) – pariti samo braću i sestre.
  - **Rodoslovlje** – Bilježiti podatke rasplodne ženke i mužjaka koji se koriste u svakom postupku parenja.
  - Preporuča se uspostava i vođenje evidencije dva i više rodoslovlja unutar kolonije te pri tom nikad ne križati rasplodne životinje jednog rodoslovlja sa životinjama drugog rodoslovlja.
- N = broj rasplodnih generacija sa ciljem prebacivanja poznate mutacije odnosno fenotipa na željeni soj (engl. backcrossing)  
 F = parenje u visokom srodstvu, brat x sestra  
 p = krioprezervacija  
 + = razdvaja informacije o rasplodnim generacijama životinja  
 ? = nepoznati brojevi rasplodnih generacija

Na primjer, “N6F12+F8” odnosi se na cikluse parenja soja koji se križao 6 puta sa ciljem prebacivanja poznate mutacije, u visokom srodstvu pario se 12 puta a potom se prebacio u drugi laboratorij gdje se pario u visokom srodstvu još 8 puta.

Uzimajući u obzir da se novi podsoj kao posljedica genetskog odstupanja javlja nakon 20 uzastopnih parenja u visokom srodstvu, bilo bi poželjno osvježiti genotipsku osnovu kolonije iz gornjeg primjera



**Figura 4: Održavanje kolonije poznatog rodoslovlja**

Pariti samo sestru x brata (krug x kvadrat), u paru (mužjak x ženka) ili haremski (jedan mužjak x dvije ženke), vodeći evidenciju za 2 ili više rodoslovlja po koloniji (svjetlo plava vs. tamno plava), nikada ne mješajući rasplodne životinje jednog rodoslovlja sa drugim.

Ako se nepoželjni fenotipovi (narančasto) pojave unutar kolonije jednog rodoslovlja, afektirani pojedinci se lakše identificiraju i uklone iz kolonije.

Neafektirane životinje (Rodoslovlje 1, svjetlo plavo) mogu se onda podijeliti u dva nova rodoslovlja, bez gubljenja vremena na uspostavu nove kolonije.

#### **Prikupljanje podataka i osiguranje kvalitete u koloniji**

Osim što treba paziti na sheme parenja u praksi, sojeve valja redovito promatrati kako bi se uočile bilo kakve promjene u fenotipu kolonije.

Kada se radi o praćenju dokaza genetskog odstupanja, promjene u fenotipu mogu se pratiti kroz vidljive razlike ili izmjerene razlike: na primjer, razlike u izgledu, u ponašanju, raspolodnim rezultatima ili razlike u eksperimentalnim očitanjima.

Voditelj uzgojne nastambe i istraživači su obučeni i u poziciji da prvi identificiraju nastale fenotipske promjene, i da, shodno tome, poduzmu mjere sprečavanja genetskog odstupanja.

Za neke suvremene sojeve, usporedba sa karakteristikama genoma njihovih predaka može pomoći u sprečavanju daljnjeg genetskog odstupanja.

„Mouse Phenome Database“ (hrv. baza mišjih fenotipova) je baza koja sadrži informacije o karakteristikama sojeva i može se pretraživati koristeći ime soja ili fenotip a sadrži i sve protokole prikupljanja podataka (<http://phenome.jax.org>) (Tabela 2).

Ako se unutar kolonije fenotip promijenio, genetsko odstupanje mogući je krivac za nastalu promjenu i kao takav zaslužuje dužnu pažnju.

Pitanja koja pri tom treba uzeti u obzir:

- Koliko miševa je afektirano i može li se promjena u fenotipu retrogradno slijediti do određenog kaveza ili kolonije poznatog rodoslovlja?
- Koliko godina i kroz koji broj rasplodnih generacija je kolonija prisutna u dotičnoj uzgojnoj nastambi?
- Kada je bio posljedni postupak osvježavanja (obnove) kolonije (vidi slijedeće poglavlje) i koje je bilo porijeklo miševa koji su se pri tom koristili?

Bez pažljivo vođenih bilježaka i referentnih podataka o uspostavi i održavanju kolonije, nemoguće je utvrditi kada je došlo do promjene fenotipa.

#### **Postupci osvježavanja genetske osnove kolonije**

Nakon uspostave kolonije s potomstvom dobivenim uzastopnim visoko srodnim (engl. inbreeding) parenjem kroz 5-10 rasplodnih generacija, mišje kolonije bi trebalo osvježiti, kako bi se spriječilo akumuliranje genetskog odstupanja u koloniji. Metode osvježavanja genetskog osnova kolonije mogu uključivati slijedeće postupke:

- **Prebacivanje željenog fenotipa na određeni soj miševa (engl. backcrossing)**

„Genetically Engineered Mutant Mouse (GEMM)“ (hrv. miševi mutanti dobiveni transgencičnom tehnologijom) sojevi su genetski modificirani miševa koji se mogu

križati sa odgovarajućim visokosrođenim ili hibridnim sojem dostupnim kod renomiranih komercijalnih uzgajivača koji u svojoj uzgojnoj praksi primjenjuju metode ograničavanja pojave genetskog odstupanja. Križanje sa svrhom prebacivanja željenog fenotipa odnosno poznate mutacije (engl. backcrossing) na ciljani soj treba provesti koristeći muške i ženske rasplodne životinje kako bi se osiguralo da se oba spolna kromosoma osvježe. Ako se soj (heterozigotni ili homozigotni) križa do statusa divljeg tipa, tada visokosrođeni mišji soj kojeg isporučiti komercijalni proizvođač kolonije miševa u divljem tipu služi da se osvježi genetska osnova kolonije miševa krajnjeg korisnika. Kod evidentiranja rasplodne generacije, svako križanje ili osvježivanje označi se sa dodatnim „N“ (vidi prijašnje poglavlje).

- **Nabava novih rasplodnih (roditeljskih) parova**  
 Kolonija visokosrođenih miševa kod krajnjeg korisnika se može obnoviti nabavom i uvođenjem novog rasplodnog para miševa direktno od komercijalnog uzgajivača ili iz pouzdanog repozitorija koji u uzgojnoj praksi provode mjere osiguranja genetske kvalitete životinja odnosno mjere sprečavanja genetskog odstupanja.
- **Obnova kolonije biološkim materijalima iz kriorepozitorija**  
 Genetsko odstupanje može se pouzdano spriječiti samo prestankom parenja životinja. Krioprezervacija sperme ili embrija mišjih sojeva jedinstvenog genotipa te onih koji se rijetko koriste u istraživanjima pouzdana je mjera sprečavanja genetskog odstupanja i mjera je prevencije gubitka vrijednog soja transgeničnih miševa kao i mjera smanjenja troškova održavanja kolonije. Krioskladišteni biološki materijal služi da se obnovi kolonija miševa koja je doživjela greške u rasplodnoj praksi, genetsko odstupanje ili je pak izumrla zbog pojave zarazne bolesti ili prirodne katastrofe.

### Potvrda genetske osnove (genotipa) kolonije

- **Provesti analitički pregled i probir (skeniranje) genoma sa ciljem da se procijeni rizik od kontaminacije.**  
 Skeniranje genoma ili SNP (polimorfizam jednog

nukleotida) niza pomaže razlikovanju dva podsoja u bliskom srodstvu, kao što su to C57BL/6J i C57BL/6N.

- **Sekvencirati genom.** Sekvenciranje SNP niza (polimorfizam jednog nukleotida) neće identifikirati genetsko odstupanje u koloniji. Jedini pouzdani način da se utvrdi genetsko odstupanje unutar soja jest provesti potpuni analitički pregled i probir genoma te njegovu usporedbu sa referentnim t.j. ishodišnim genomom njihovih predaka.

### Napredne metode limitiranja genetskog odstupanja

Koliki je rizik da laboratorij (krajnji korisnik) koji je utvrdio genetsko odstupanje u svojoj aktivnoj rasplodnoj koloniji nabavkom rasplodnog para iz repozitorija uzgajivača u svoju rasplodnu koloniju uvede nepoželjnu genetsku kontaminaciju, nastalu kod uzgajivača?

Mišji repozitoriji i uzgajivači, u pravilu, održavaju puno veće kolonije u kojima rjeđe dolazi do genetskog odstupanja (Figura 1A).

Dodatno, brojni repozitoriji i uzgajivači profesionalno primjenjuju gore spomenute strategije gospodarenja kolonijom, kao što su primjena potpune nomenklature, parenje u visokom srodstvu, krioprezervaciju ali i druge, naprednije metode.

Da bi se procijenio stupanj genetskog odstupanja u velikim rasplodnim populacijama JL, analitički se pregledalo visoko srođene C57BL/6J miševe razdvojene sa 69 rasplodnih generacija i 19 godina neprekidnog parenja.

Između ove dvije populacije, identificirano je 669 jedinstvenih SNP (polimorfizam jednog nukleotida). Od njih, sedam je promijenilo slijed amino kiselina ili mjesto izrezivanja RNK (ribonukleinske kiseline).

Prema procjenama i analizama, svako 10 generacija pojavi se potentna mutacija (7 SNPs/69 rasplodnih generacija) sposobna mijenjati funkciju proteina, pri tom ne računajući veće promjene kao što su delecije, inverzije, duplikacije koje imaju štetne fenotipske posljedice.

Ako uzmemo u obzir da u prosjeku obuka dodiplomskog ili poslijediplomskog studenta u laboratoriju traje 5 a potom njegova karijera voditelja *in vivo* studija 20 i više godina,

u mišjoj zajednici na kojoj je svo to vrijeme provodio istraživanja vrlo vjerojatno je nastupilo značajnije genetsko odstupanje.

JL dulji niz godina distribuira miševe u sve zemlje svijeta i krajnjim korisnicima garantira sojeve miševa sa stabilnim i reproducibilnim genomom a što je izazov koji od JL uzgajivača zahtjeva provođenje ekstremnih mjera sa svrhom ograničavanja genetskog odstupanja.

JL sojevi su zaštićeni od akumuliranja genetskog odstupanja zahvaljujući primjeni kombinacije slijedećih praksi.

Svi sojevi koj nose „J“ kod održavaju se kroz jedan i/ili oba programa osmišljena da ograniče i detektiraju genetsko odstupanje a to su program genetske stabilnosti (GSP) i program genetske kontrole kvalitete.

Sojevi označeni „J“ kodom uključuju sve sojeve koji su uzgojeni i distribuirani u JL diljem SAD kao i one koji su uzgojeni i distribuirani iz CR uzgojnih nastambi diljem Europe i Japana.

Da bi se osigurala kontinuirana kvaliteta na svim uzgojnim lokacijama, prakse gospodarenja kolonijama redovito revidira i iznova odobrava JL.

To podrazumijeva i primjenu identičnih krioskladištenih bioloških materijala koji se redovito uvode u postojeće žive kolonije (GSP, slijedeće poglavlje) ili se koriste u svrhu provedbe redovite obnove rasplodne kolonije. Zajedno, ove aktivnosti efikasno preveniraju genetsko odstupanje podsojeva.

**Program genetske stabilnosti (GSP) za najčešće korištene visoko srodne (engl. inbred) „J“ sojeve**  
 Najčešće korišteni visoko srodni „J“ sojevi održavaju se primjenom jedinstvenih strategija koje preveniraju akumulaciju genetskog odstupanja unutar mišje rasplodne kolonije.

Američki ured za patente i robne marke izdao je 2009 i 2012 JL-u patente za GSP program (<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/find-and-order-jax-mice/why-jax-mice/genetic-quality-control-program>).

Sojevi uzgojeni po principima GSP-a krioskladište se kao dvostanični embriji koji se iznova uvode (mikorinjiciranje embrija u jajovod – embriotransfer) u matičnu rasplodnu populaciju kako bi se u njoj izbjegla akumulacija genetskog odstupanja.

Bez ovakve prakse, matična rasplodna kolonija održavala bi se isključivo parenjem u visokom srodstvu, između braće i sestara.

Prije primjene patentiranih programa osiguranja kvalitete, redovita obnova matične rasplodne kolonije provodila se dva do četiri puta godišnje odabirom optimalnog brat-sestra rasplodnog para za uspostavu transgeničnog potomstva poznatog genetskog statusa (engl. founder colony).

Sa ovakvim pristupom, današnja matična rasplodna kolonija bi se genetski razlikovala od svojih predaka, zahvaljujući nastalom genetskom odstupanju.

GSP praksa nalaže da se zamjena rasploda provodi pomoću zaliha krioskladištenih embrija visokosrođenih sojeva koji svi vuku porijeklo do ishodišne kolonije predaka.

Zaliha zamrznutih embrija se koristi za obnovu rasplodne kolonije svako pet (5) generacija.

Periodično, obnova rasplodne kolonije uvođenjem zamrznutih embrija (embriotransfer) smanjuje broj rasplodnih generacija nakon kojih se provodi nova obnova rasplodne kolonije.

Prema tome, „J“ sojevi kojima se gospodari prema GSP principima, zaštićeni su od genetskog odstupanja bez obzira na lokaciju uzgojne nastambe u kojoj se nalaze i bez obzira na „starost“ to jest broj rasplodnih generacija mišje kolonije (Tabela 3).

#### **Program kontrole genetske kvalitete**

Osim primjene GSP principa u rasplodnoj praksi, „J“ sojevi se još održavaju i po principima kontrole genetske kvalitete (GQC) (<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/find-and-order-jax-mice/why-jax-mice/genetic-quality-control-program>).

Ovaj program integrira visoki stupanj odgovornosti kod provedbe brojnih principa koji se rutinski provode i u uzgojnim nastambama brojnih drugih krajnjih korisnika.

Profesionalno osoblje koje gospodari rasplodnom kolonijom obučeno je da uspješno identificira fenotipske varijante koje se očituju razlikama u boji krzna, za specifični soj netipičnoj veličini tijela, težini, skeletnoj strukturi, promjenama u ponašanju i reproduktivnim performansama, povećanoj incidenciji tumorskih oboljenja i smanjenu životnog vijeka.

Svaki miš u kojem se utvrdio odmak od očekivanih, za soj specifičnih karakteristika, postaje predmet dodatnih analiza porijekla rodoslovlja i po potrebi se uklanja iz rasplodne kolonije.

Poželjno je željeno rodoslovlje mišjih kolonija održavati tako da se njima gospodari na lokacijama koje su odvojene od brojčano nadmoćnih rasplodnih i distribucijskih kolonija.

Visokosrođeni sojevi se redovito analitički pregledaju i probiru ciljajući genetske anomalije ili dokaze genetske kontaminacije koristeći SNP (polimorfizam jednog nukleotida) panel analiza, kako su u publikaciji objavili Petkov et al., 2004.

### **JAX™ miševi uzgojeni u Charles River (CR u tekstu) uzgojnim nastambama diljem Europe i Japana**

JL i CR posjeduju ugovor o suradnji kojim se osigurava redovita opskrba regionalnih uzgajivača diljem Europe,

Japana, Koreje i Tajvana JAX™ miševima iz Amerike kao i istraživača koji provode biomedicinska istraživanja u istim regijama. Slijedeći stroge uzgojne protokole te protokole kontrole kvalitete, europski i japanski CR uzgajivači proizvode JAX™ sojeve miševa koji su mikrobiološkom i genetskom kvalitetom ekvivalentni sojevima koji se uzgajaju u JL uzgojnim nastambama diljem SAD.

Za sve dodatne informacije molim pogledati link [www.criver.com/jaxmice](http://www.criver.com/jaxmice).

### **Zaključak**

Genetsko odstupanje je neizbježna posljedica aktivnog rasploda mišje kolonije i pojava je koja može negativno utjecati na zaključke i reproducibilnost znanstvenog istraživanja koje se provodi na životinjama.

Iako se genetsko odstupanje ne može u cijelosti eliminirati iz uzgoja, principi gospodarenja kolonijom miševa mogu se uspješno implementirati u individualnim uzgojnim nastambama krajnjih korisnika kao i u velikim mišjim repozitorijima te kod komercijalnih uzgajivača, čime se garantira genetska stabilnost proizvedenih mišjih kolonija.

Reproducibilnost i znanstvena otkrića ovise o pažljivom izvještavanju potpune nomenklature korištenih mišjih sojeva kao i uzgojnih principa koji su doveli do uspostave kolonije određenog mišjeg podsoja.

### Literatura:

- 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<sup>OlaHsd</sup> 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., Kallou 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 sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains. *Nature* *448*, 1050–1053.
- Freeman, H.C., Huggill, 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-<sup>OlaHsd</sup> 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., Reifsnyder, 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.