

GENETSKA STANDARDIZACIJA

- Uvod-zgodovina genetske standardizacije
- Pomen z vidika 3R – pravilni izbor modela
- Tipi-vrste poskusnih živali glede na genetsko sestavo
- Izvor in posledice genetske variabilnosti
- Genetski nadzor (monitoring)
- Povzetek



Prof. dr. Simon Horvat

NOVA – ODLIČNA REFERENCA

FELASA report: *Laboratory Animals* 2020 135-148

Working Party Report

**Genetic quality assurance and genetic monitoring of laboratory mice and rats:
FELASA Working Group Report**

Fernando Benavides¹ , Thomas Rülicke² , Jan-Bas Prins^{3,4}
James Bussell⁵, Ferdinando Scavizzi⁶, Paolo Cinelli⁷,
Yann Herault^{8,9} and Dirk Wedekind¹⁰



Laboratory
Animals
Limited

Laboratory Animals
2020, Vol. 54(2) 135–148

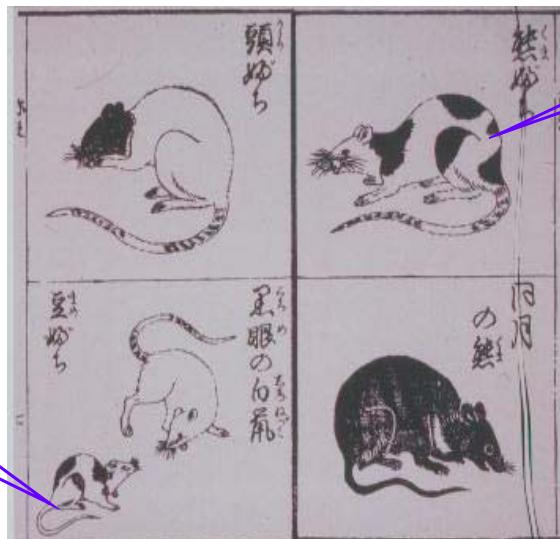
... podrobnosti v *Supplement* (92 strani)

PRVE OBJAVE – UPORABA MIŠI V RAZISKAVAH ~ 1664



POSKUS NA MIŠIH Z ZRAČNO ČRPALKO – VPLIV atmosferskega pritiska na živo bitje ipd
→ Večinoma na divjih miših, ne-standardizirano.

Spontane Mutacije neznani avtor, Japonska 1787



“NEURADNI” ZAČETEK GENETSKIH RAZISKAV Z MIŠMI ~ 1860

**-DELNO „GENETSKO STANDARDIZIRAL!“
(RAZVIL LINIJE, KI SO BILE FIKSIRANE ZA BARVO DLAKE)**

Avstrijski škof Anton Ernst Schaffgotsch prepove Mendlu delo z mišmi zaradi (*):

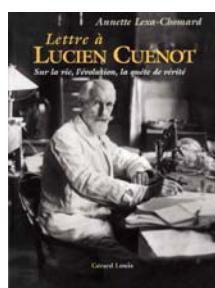
“ni primerno, da menih deli sobo z bitji,
~ ki so „spolno aktivne“



* Paigen K: One hundred years of mouse genetics: an intellectual history. I.The classical period (1902-1980). Genetics 2003, 163:1-7

“URADNI ZAČETEK – genetika miši” - 1902

- 1900 Correns, De Vries, in Tschermak
- Neodvisno potrdijo Mendlove zakone – vsi pri višjih rastlinah



- 1902
- **Lucien Cuenot** (Francija)
- Mendlovi zakoni veljajo tudi pri miših (dedovanje barve dlake)
- *Cue'not, L., 1902 Notes et revues, Arch. Zool. Exp. Gen., xxvii*
- 1905 L. Cuenot: prva letalna mutacija AY (aguti yellow)

ŽE UPORABA MUTIRANIH
– DELNO INBRIDIRANIH
GENETSKO
STANDARDIZIRANIH MIŠI

PRVI "KOMERCIALNI" REJCI MIŠI
Abbie Lathrop (ZDA) ~ 1900-
prve začetki standardizacije




Redila "Fancy" mice za prodajo v začetku kot družne živali kasneje večino za raziskovalne inštitute

Zbrala in vzrejala nekaj pomembnih mutantov

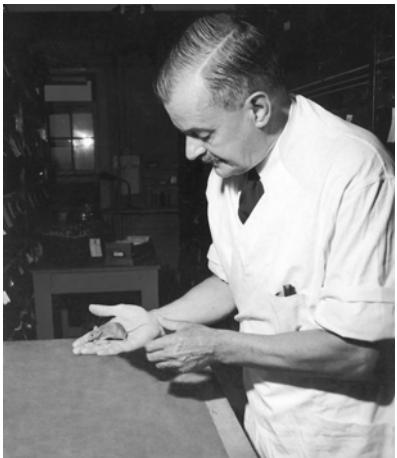
- creamy buff*
- rare ruby eye yellow*
- white English sable*
- waltzing mouse*
- silver fawn mice*

-1921 je Clarence Little razvil inbridirano C57BL/6 -starše (miš številka 57) kupil pri gospe Lathrop

-naj bi vsaj 6 današnjih inbridiranih linij izvirolo iz njene zbirke

- redila do 11 000 miši na njeni "farmi"
- njeni zapiski in vzrejni protokoli zelo koristili raziskovalcem
- kot so-avtor objavila več člankov

PRVA INBRIDIRANA LINIJA MIŠI –“DBA“
Clarence LITTLE (ZDA) ~ 1910-



~ 1910 DBA
(Dilute, Brown, Agouti)



-1921 je Clarence Little razvil inbridirano C57BL/6 -starše kupil pri gospe Lathrop

Ustanovil The Jackson Laboratory 1929
Cancer genetics, transplantation (pomen homogenosti genetskega ozadja)



Prvi genetski markerji – fenotipske mutacije (barva dlake ipd)
 → stabilnost dedovanja barve ~ genetska stabilnost



aguti



albino



činčila



Aguti-rumena



spotted



rjava

POMEN GENETSKE STANDARDIZACIJE Z VIDIKA NAČEL 3R

Genetska variabilnost povečuje biološko variabilnost

- Pomen IZBORA vrste in tipa poskusnih
- Pomen poznavanja porekla
- pravilni izbor ŽIVALSKEGA MODELJA in KONTROLE-uporabimo manjše število živali, → (načelo »reduce«)
- pravilni izbor ŽIVALSKEGA MODELJA- uporaba *izboljšanih manj agresivnih postopkov* -→ (načelo „refine“)

IZBIRA POSKUSNIH ŽIVALI GLEDE NA ZNANSTVENO VPRAŠANJE

- Izbor **med speciesi** (?miši, podgane, kunci, hrčki, drugo?..)

Npr.,
CISTIČNA
FIBROZA,

?

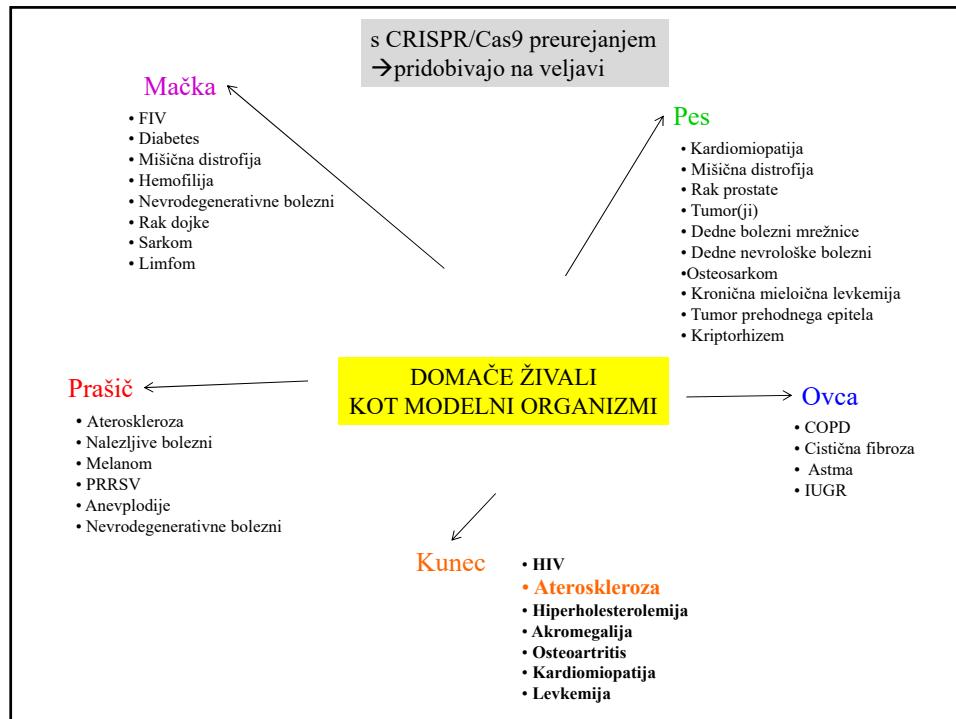


IZBIRA POSKUSNIH ŽIVALI GLEDE NA ZNANSTVENO VPRAŠANJE

Npr., CISTIČNA FIBROZA,

Disease	Human	Pig	Ferret	Rabbit	Rat	Mouse
Spontaneous Lung Infections	✓	✓ ⁹	✓ ^{8,10}	?	X	X ^{2,15,39}
Impaired Growth	✓	✓ ⁷	✓ ^{8,10}	✓ ⁴	✓ ³	✓ ^{2,15,39}
Intestinal	✓	✓ ^{7,35}	✓ ^{8,11,35}	✓ ⁴	✓ ^{3,35}	✓ ^{2,15,39}
Exocrine Pancreatic	✓	✓ ^{29-30,35}	✓ ^{11,35}	?	X	X ^{2,15,39}
Endocrine Pancreas	✓	✓ ³²	✓ ³¹	?	?	X ^{2,15,39}
Hepatic	✓	✓ ^{35,40}	✓ ^{11,35}	?	?	X ^{2,15,39}
Gallbladder	✓	✓ ^{35,40}	✓ ^{11,35}	?	NA	X ^{2,15,39}

Rosen_Engelhardt J CYST FIBR. 2018 Animal models for cystic fibrosis



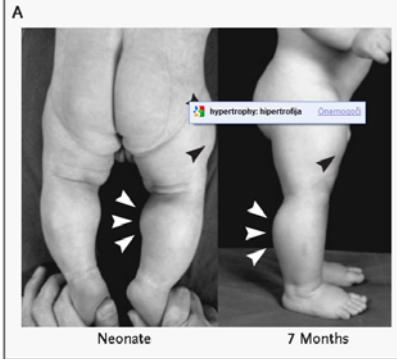
IZBOR POSKUSNIH ŽIVALI DOMAČE ŽIVALI

**MODELI IZNIČENIH GENOV – SPONTANE „NARAVNE“ MUTACIJE
-NISO GSO; OBSTAJAJO PRI RAZLIČNIH VRSTAH**

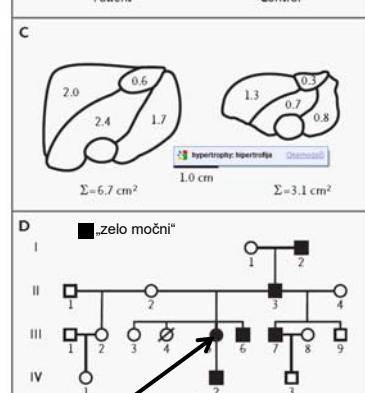
<u>Domače živali</u>	Baza podatkov OMIA https://omia.org/home/ <small>npr: KLJUČNE BESEDE – DWARFISM, MUSCULAR...</small>
<u>Človek</u>	Baza podatkov OMIM https://www.omim.org/
<u>Psi</u>	http://www.vet.cam.ac.uk/idid/

**Mutacije v genu *MIOSTATIN*
vodijo v dvojno omiščenost pri človeku**

Schuelke, M et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child
NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE 2004



A
Neonate 7 Months



2.0	0.6
2.4	1.7
$\Sigma = 6.7 \text{ cm}^2$	

1.3	0.7	0.8
$\Sigma = 3.1 \text{ cm}^2$		

? KATERI ŽIVALSKI MODEL

Mama = Profesionalna športnica
– heterozigot za *Mstn* nično mutacijo

Prof. dr. Simon Horvat

**RAZLIČNI MODELI za dvojno omiščenost
MED VRSTAMI**



(a)



(b)



(c)

Parma ovc TEXEL



(d)

Parma psov WHIPPET

+/-

-/-

Prof. dr. Simon Horvat

Figure 1. Double muscling phenotype resulting from inactivating mutations in the *MSTN* gene. (a) *Mstn*^{-/-} mouse (left) compared with a wild-type littermate (right). Reproduced, with permission, from Ref. [24]. (b) Belgian Blue bull. Reproduced, with permission, from Ref. [8]. (c) Texel sheep (photograph kindly provided by Michel Georges). (d) 'Bully' whippet homozygous for a *MSTN* mutation (bottom) and a whippet heterozygous for the same mutation (top). Reproduced, with permission, from Ref. [1].

IZBIRA POSKUSNIH ŽIVALI GLEDE NA ZNANSTVENO VPRAŠANJE

- Izbira optimalne linije **znotraj vrste**

Modeli, ki razvijejo aterosklerozo v 3 mesecih na HF komercialni krmi



Npr. LDLreceptor knockout
ApoE knockout

Linija FLI – sicer selezionirana na Debelost in razvije metabolni sindrom Vendar pa ne tudi ateroskleroze



Npr. večina ostalih linij miši

IZBOR MIŠJEGA MODELA ZA DIABETES TIPA 2

-glede na znanstveno vprašanje

-katero obliko bolezni pri človeku simuliramo

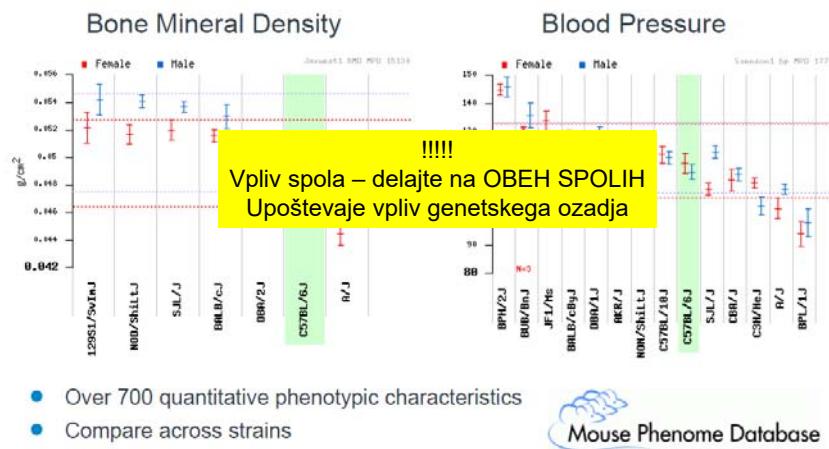
Mouse Models May Recapitulate Human Characteristics

	HUMAN	B6.Cg-Lep ^{+/+} (Strain 632)	BKS.Cg-Dock7 ^{+/+} +/+ Lep ^{+/+} /J (Strain 642)	C57BL/6J DIO (Strain 380050)	NON/Shi/LtJ (Strain 2423)	KK.Cg-A/J (Strain 2468)	NONcNZO10/LtJ (Strain 4456)	TALLYHO/JngJ (Strain 5314)	MSNASH/PcoJ (Strain 30888)
Genetics/ Degree of Obesity	Polygenic/ Moderate	Monogenic/ Severe	Monogenic/ Severe	Polygenic/ Moderate	Polygenic/ Moderate	Monogenic/ Moderate	Polygenic/ Moderate	Polygenic/ Moderate	Polygenic/ Moderate
Genetics/ Degree of Diabetes	Polygenic/ Moderate ¹	Polygenic/ Severe ^{2, 3}	Polygenic/ Severe ²	Polygenic/ Moderate ¹	Polygenic/ Moderate ^{2, 3}	Polygenic/ Severe ¹	Polygenic/ Severe ¹	Polygenic/ Severe ¹	Polygenic/ Moderate (del- dependent)
Insulin Resistance	Moderate to Severe	Severe	Severe	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate to Severe
Ilet Atrophy	Variable	No	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes (late)	Not determined
Human Disease Model		Phase I & II	Phase I, II & III	Pre-diabetic state	Pre-diabetic & Phase I	Phase I, II & III	Phase I, II & III	Phase I, II & III	Phase I, II, III (?)
Diabetic complica- tions	+ Impaired wound healing + Variable neuropathy, nephropathy, liver steatosis	+ Impaired wound healing + Neuropathy + Severe liver steatosis	+ Impaired wound healing + Severe liver steatosis + Neuropathy	+ Mid neuropathy	+ Mid nephropathy + Severe liver steatosis	+ Nephropathy + Moderate liver steatosis	+ Mid nephropathy + Moderate liver steatosis	+ Moderate steatosis	+Develops metabolic syndrome / NASH on a Western diet

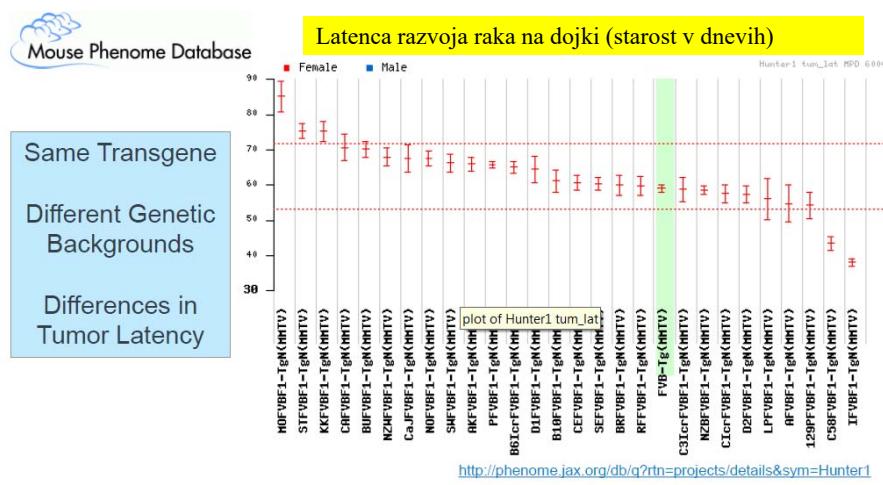
Vir: JAX mice webinar

IZBIRA optimalnega modela FENOTIPSKE BAZE_LITERATURA

<http://phenome.jax.org/>



IZBIRA glede na VPLIV GENETSKEGA OZADJA (posebej pri transgenih)



<https://www.jax.org/news-and-insights/2006/june/the-importance-of-genetic-background-in-mouse-based-biomedical-research>

TIPI – VRSTE POSKUSNIH ŽIVALI GLEDE NA GENETSKO SESTAVO

TIPI – VRSTE POSKUSNIH ŽIVALI GLEDE NA GENETSKO SESTAVO

- **1.) Inbridirane linije:**
 - iz enega izhodnega para neinbridirane vrste
 - Po najmanj 20 generacijah parjenja med brati in sestrami
 - Še vedno do 2% ostanka heterozigotnosti
 - Šele po 36-tih generacijah parjenje brat-sestra dosežemo ~ popolno izogenost
 - Cilj IZOGENOSTI pri inbridiranih linijah
 - zmanjšati na najmanjšo možno raven, genetsko variabilnost znotraj inbridirane linije – vsaka žival je „tehniška“ in ne „biološka“ ponovitev
 - **Fiksirati alele** v celotnem genomu (jih narediti homozigotne) in s tem fiksirati določene **lastnosti**.
 - Zagotoviti **histokompatibilnost** (sprejemanje transplantacij od druge živali iste linije)

Simecek P, Forejt J, Williams RW, et al. High-resolution maps of mouse reference populations. *G3*, 2017; 7: 3427–3434.

TIPI – VRSTE POSKUSNIH ŽIVALI GLEDE NA GENETSKO SESTAVO

- **Inbridirane PODLINIJE:**

- Če pričnete s svojo vzrejo med F20-F40
- če kupite inbridirano linijo od referenčnega centra in jo sami vzrejate več kot 2 leti (? Star vir), 20 generacij (FELASA 2020)
- če z genetskimi _ fenotipskimi testi ugotovimo novo genetsko variabilnost znotraj linije
- Če razvijete svojo novo linijo (npr: seleksijsko, transgeno ipd)

TERMINOLOGIJA

Glavni posodobljen vir:
<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml>

- [1. Introduction](#)
 - [1.1 Mice](#)
 - [1.2 Rats](#)
- [2. Laboratory codes](#)
- [3. Inbred Strains and Hybrids](#)
 - [3.1 Definition](#)
 - [3.2 Nomenclature of Inbred Strains](#)
 - [3.3 Indication of Inbreeding](#)
 - [3.4 Substrains](#)
 - [3.5 Hybrids](#)
- [4. Strains Made from Multiple Inbred Strains](#)
 - [4.1 Recombinant Inbred Strains](#)
 - [4.2 Collaborative Cross Strains](#)
 - [4.3 Mixed Inbred Strains](#)
 - [4.4 Recombinant Congenic Strains](#)
 - [4.5 Advanced Intercross Lines](#)
- [5. Coisogenic, Congenic, and Segregating Inbred Strains](#)
 - [5.1 Coisogenic Strains](#)
 - [5.2 Congenic Strains](#)
 - [5.3 Chromosome Substitution or Consomic Strains](#)
 - [5.3.1 Consomic Strains](#)
 - [5.4 Segregating Inbred Strains](#)
 - [5.5 Conplastic Strains](#)
- [6. Outbreds and Closed Colonies](#)
 - [6.1 Outbreds](#)
 - [6.2 Closed Colonies](#)
- [7. ES cell lines and iPS cell lines](#)
- [8. References](#)

Perše, M. in Rozman, D. (2006)
 Značilnosti in pravila poimenovanja
 inbridiranih linij miši. *Veterinarske novice*,
 2006, letn. 32, št. 1/2, str. 23-29.

TERMINOLOGIJA – Linije - podlinije

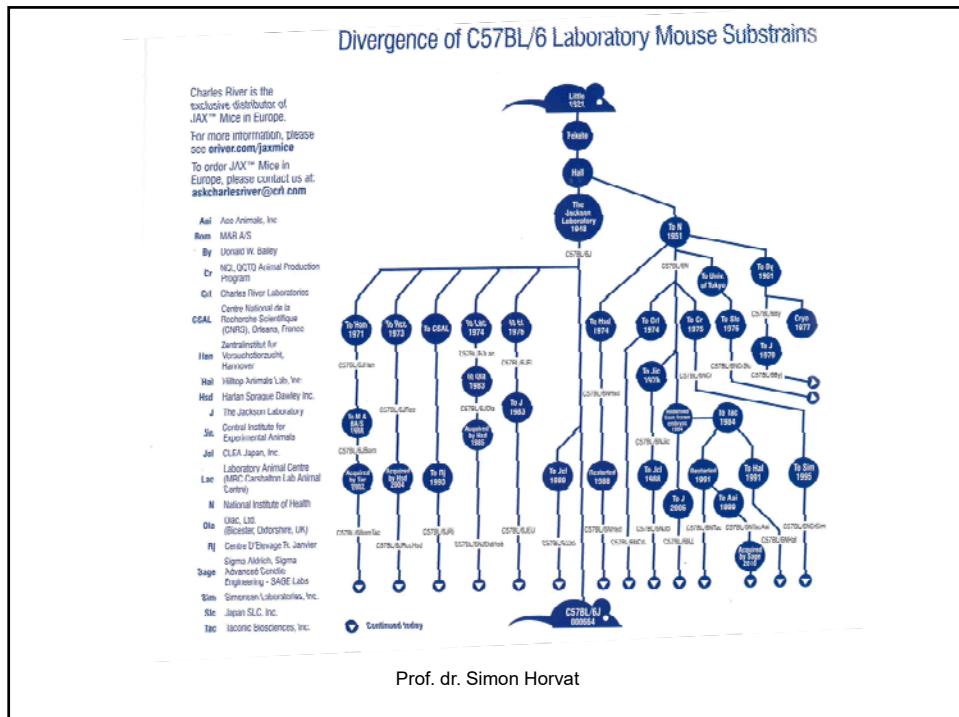
<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml>

Okrajšava	Linija - Podlinija
129	129 strains (may include subtype, e.g., 129S6 for strain 129S6/SvEvTac)
A	A strains, except for Heston substrains
A/He	A/He (Heston substrains)
AK	AKR strains
B	C57BL
B6J	C57BL/6J substrains
B6N	C57BL/6N substrains
B10	C57BL/10 strains
BR	C57BR/CD
C	BALB/c strains
CBy	BALB/cBy (Bailey substrains)
CWt	BALB/cWt (Whitten substrains)
C3	C3H strains
CBA	CBA strains, except Carter substrains

PUBLIKACIJE – NUJNO PODROBNO NAVAJANJE LINIJE – PODLINIJE

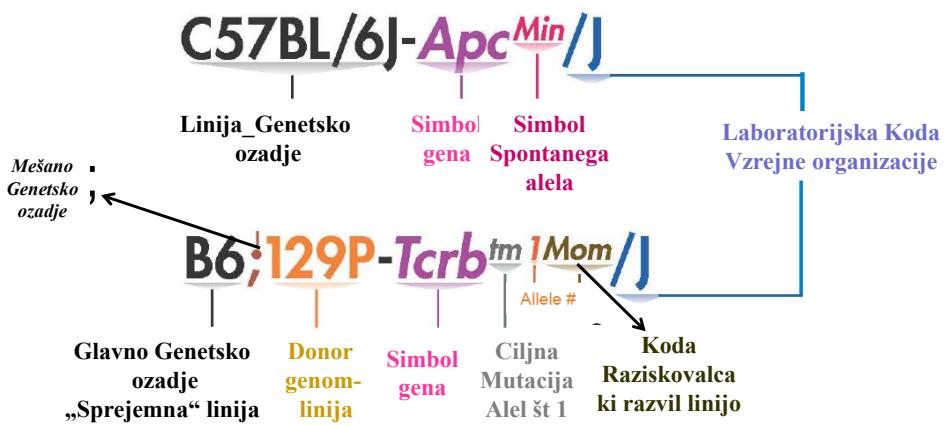
KATERO LINIJO
C57BL STE UPORABILI?

- [C57BL/6J](#)
- [C57BL/10J](#)
- [C57BL/6NJ](#)
- [C57BL/6ByJ](#)
- [C57BL/6NCrl](#)
- [C57BL/6NTac](#)
- [C57BL/10ScNJ](#)
- [C57BL/10ScSnJ](#)
- [C57BLKs/J](#)
- [C57BL/10SnJ](#)
- [C57BL/6BomTac](#)
- [C57BL/6JOlaHsd](#)
- [C57BL/6NHsd](#)
- [C57BL/6NNIH](#)



TERMINOLOGIJA – Spontane mutacije in gensko spremenjene linije (npr. „knockout“)

Spontaneous and Targeted Mutations (tm) = KNOCKOUT



Dodaten VIR: Webinar <https://www.jax.org/education-and-learning/webinars>

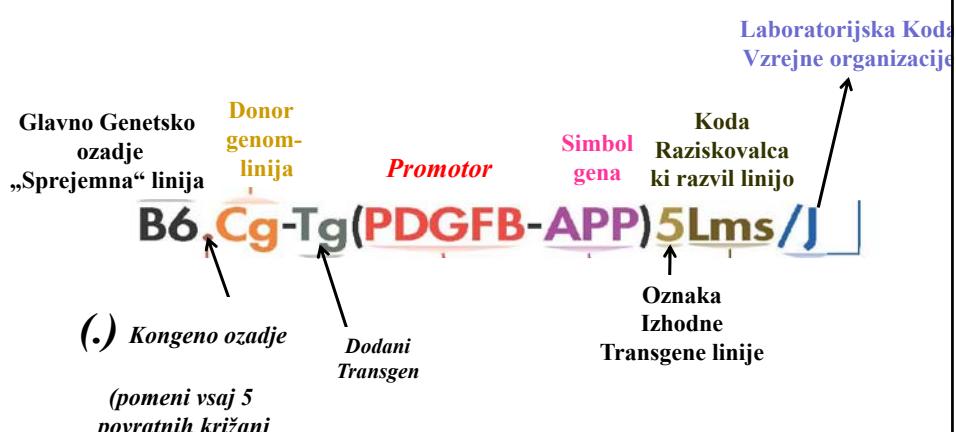
INBRIDIRANA (knockout) PODLINIJA

- Kodo laboratorijskih odobrenih Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) (<http://dels.nas.edu/ilar>).
- Primer "naše" transgenske linije odobrene s strani ILAR:
 - B6.129SV-Cyp51^{tm1Bfro} (pogojni alel loxP)
 - B6.129SV-Cyp51^{tm1.1Bfro} (nični alel)



<https://www.jax.org/jax-mice-and-services>

DELOVNI PRIMER – transgena linija (dodan gen)

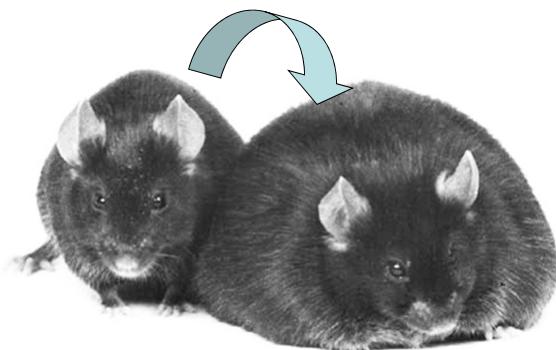


VIR: <http://emeeting.jax.org/p81loqjkogt/>

INBRIDIRANE – POSEBNE VRSTE LINIJ POSKUSNIH ŽIVALI

1. KO-IZOGENE

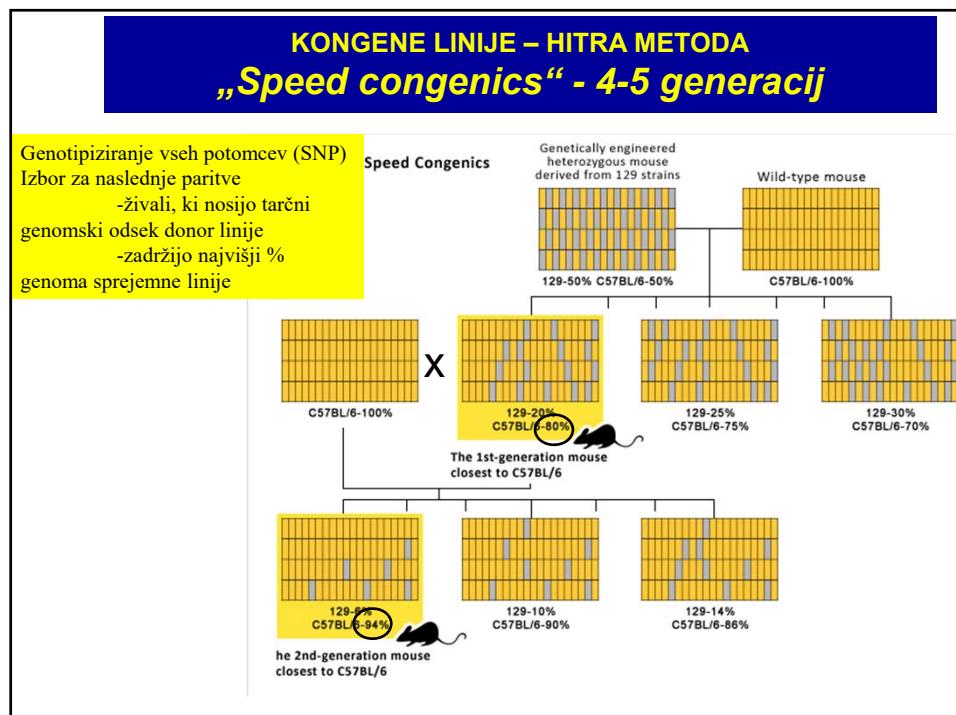
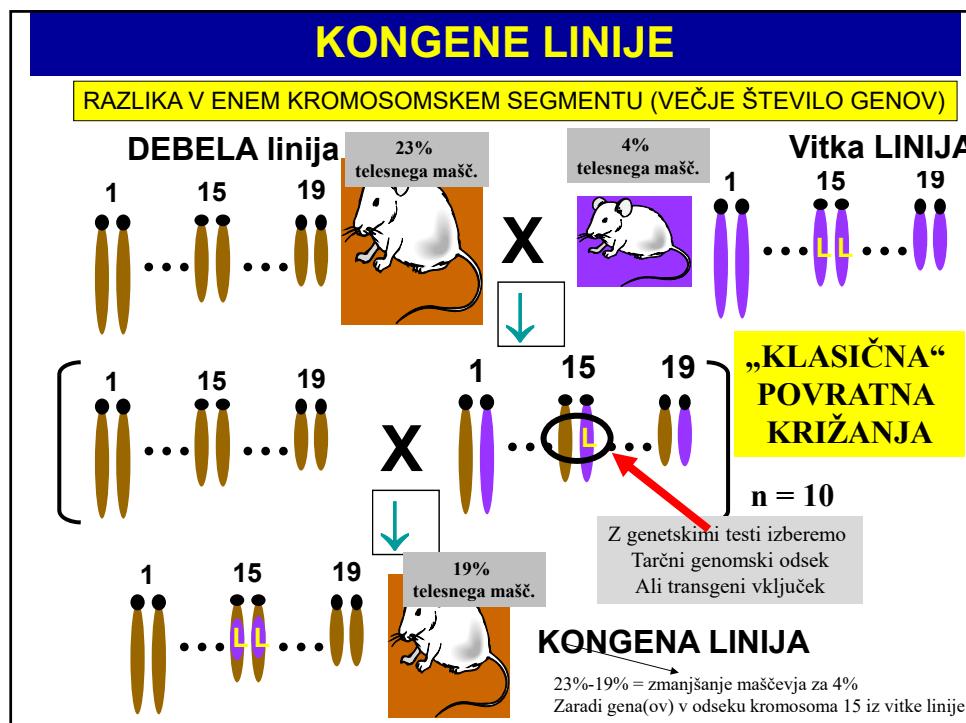
SPONTANA MUTACIJA (gen LEPTIN)

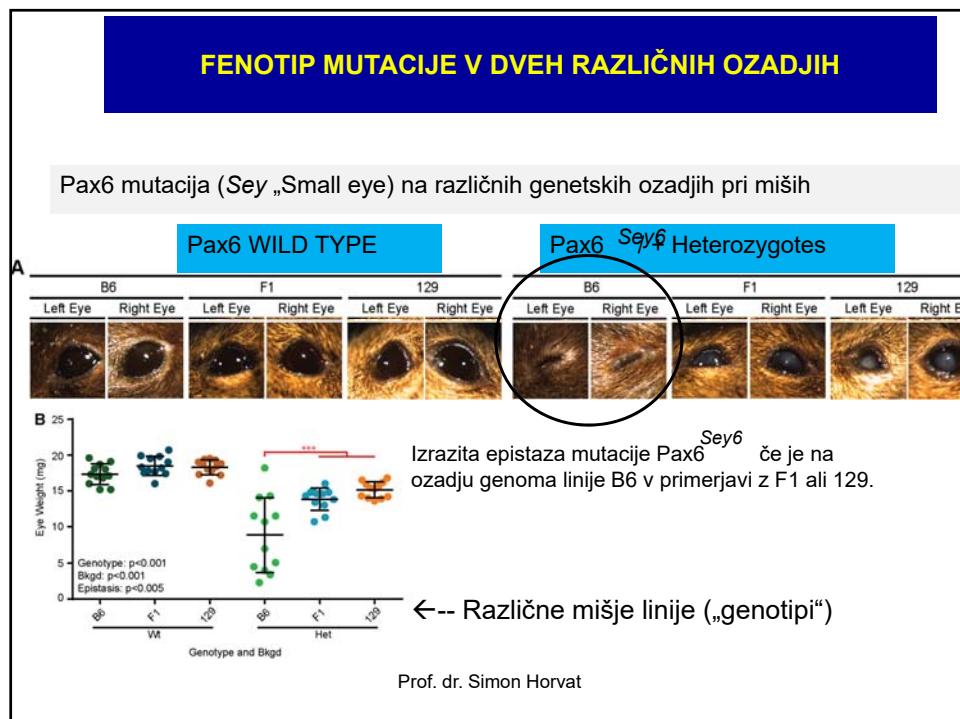
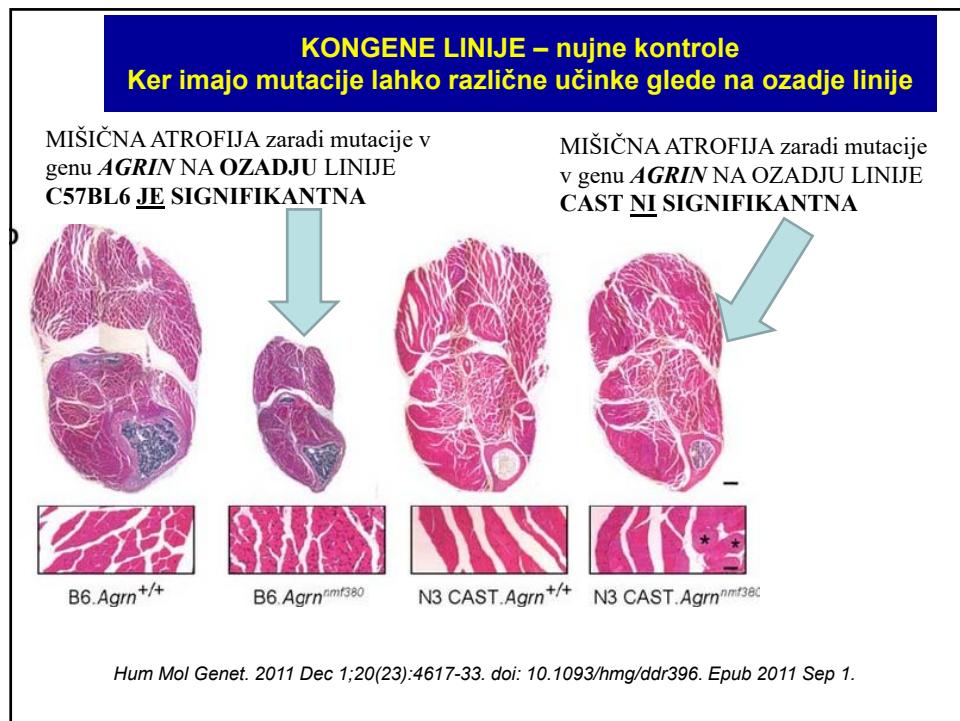


KO-IZOGENE LINIJE

RAZLIKA LE V ENI MUTACIJI (LAHKO 1 NUKLEOTID RAZLIKE)







KAJ STORITI če kupite / dobite

C57BL/6;129P2-Apoa1 tm1Unc/J

IZ IMENA STE UGOTOVILI :(glejte prejšnje diase ali
<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml>

- Gre za tarčno mutacijo številka 1 (tm1) gena Apoa1 (narejena je bila genska sprememba, navadno knock-out, knock-in..)
- mutacija je na mešanem ozadju podlinij C57BL/6 in 129P2
- ker je med simboloma linij PODPIČJE in ne PIKA, **linija še ni kongena**
- Sprejemna linija je C57BL/6, ker je napisana na prvem mestu
- mutacijo so razvili na University of North Carolina, USA (Unc)
- podlinijo vzreja The Jackson Laboratory (J)

KAJ STORITI

- razviti kongeno linijo z povratnimi križanji na linijo C57BL/6J – prej pridobiti informacije, če so že izvajali povratna križanja
- po 10tih generacijah povratnega križanja, ali ~ 5 generacij speed „congenics“ je linija kongena in je tedaj šele prava kontrola linija C57BL/6J

TIPI – VRSTE POSKUSNIH ŽIVALI GLEDE NA GENETSKO SESTAVO

2.) NE- INBRIDIRANE

so genetsko raznolike (heterogene) populacije, ki se vzrejajo z naključnim parjenjem ali drugimi sistemi parjeni, ki preprečujejo križanja v ožjem sorodstvu.

Primeri ne-inbridiranih vrst poskusnih živali, ki se pogosto uporabljajo so:

- pri miših (NMRI, OF, CD-1, Swiss-webster, CF-1, CFW)
- pri podgannah (Sprague-Dawley (SD), Wistar (WI) and Long-Evans (LE).)
- ne-inbridirane so praviloma tudi populacije psov, mačk, kuncev, morskih prašičkov, kokoši in drugih domačih živali

1. F1 hibridi
2. Prave naključno parjene populacije (PASME)

TIPI – VRSTE POSKUSNIH ŽIVALI GLEDE NA GENETSKO SESTAVO

2.) NE- INBRIDIRANE

Prednosti pred inbridiranimi

- robustne, plodne, odlične nadomestne matere
- za določene lastnosti manj variabilne od inbridiranih
 - > zaradi tega in zaradi dejstva, da so genetsko heterogene podobno kot človeška populacija, pogosto v uporabi za toksikološke in farmakološke teste

Slabosti – kritike

- ker so genetsko heterogene je problem standardizacije in s tem ponovljivosti poskusov
- “standardizira“ se v glavnem na fenotipske lastnosti kot so telesna masa, plodnost, barva dlake ipd.
- V ZADNJEM ČASU OSTRE KRITIKE ZA UPORABO V POSKUSIH POSEBEJ V TOKSIKOLOGIJI IN RAZVOJU ZDRAVIL!**

*Festing MF. Inbred strains should replace outbred stocks in toxicology, safety testing, and drug development.
Toxicol Pathol 2010; 38: 681–690.*

NE-INBRIDIRANE LINIJE - kot ~pasme

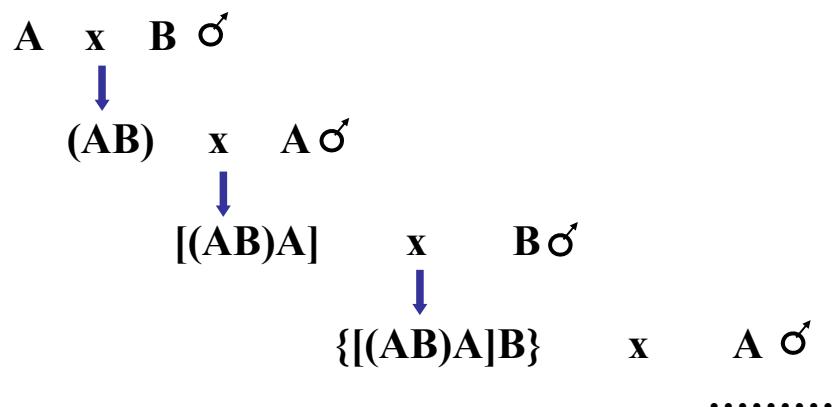
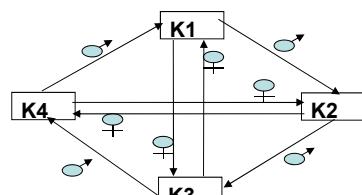
-parjenje nesorodnih živali znotraj pasme

-imajo značilnosti pasme



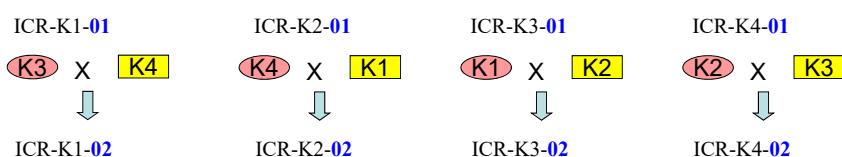
ČE SVOJO VZREJO → KUPITI “VELIKO” ZAČETNO POPULACIJO
ZAHTEVATI GENETSKO RAZNOLIKO!

SISTEMI KRIŽANJ ZA VZDRŽEVANJE GENETSKE RAZNOLIKOSTI

Rotacijsko križanje –
2 pod-populacijiRotacijsko križanje –
4 populacije

PREDNOST
 -visoka, konstantna stopnja heterozigotnosti
 -PREDNOST: za poskuse je OK „katerikoli“ potomec pod-populacij

Razdelitev na pod-populacije linije ICR K1, K2, K3, K4



Drug način: parjenje do največ bratranec X sestrična

IZVOR IN POSLEDICE

GENETSKE VARIABILNOSTI

LOČIMO

- 1.) GENETSKA KONTAMINACIJA
- 2.) GENSKI tok (genetic drift)

1.) GENETSKA KONTAMINACIJA

-napake pri paritvah

Posebej paziti, ko se blizu vzrejajo linije s podobno barvo
dlake ali podobnim fenotipom nasploh

albino (Tyr^c / Tyr^c)

agouti (A/A),

non-agouti (a/a)



2.) GENSKI tok (genetic drift)

Genski tok je posledica SPONTANIH, večinoma NEVTRALNIH mutacij, ki lahko izginejo iz populacij (linij) ali se naključno obdržijo.

Problem za standardizacijo!
-TEŽKO odkriti na podlagi fenotipa
ali rutinskega genetskega monitoringa

VIDNI GENSKI tok

C57BL/6J-*A^w*-J/J
([000051](#))



B6(Cg)-*Tyr*^{c-2}J/J
([000058](#))

C57BL/6J
([000664](#))



C57BL/6J-*Lyst*^{bg}-J/J
([000629](#))



C57BL/6J-*Kit*^{W-v}/J
([000049](#))

Dolgo časa „NEVIDNI GENSKI tok

C3H/HeJ
([000659](#))

+LPS

Endotoxin resistant

Tlr4^{Lps-d} (1958-1965)



C3H/HeOuJ
([000635](#))

+LPS

Endotoxin sensitive

Tlr4 wild-type

1952

2.) kako „močan“ je GENSKI tok

Glede na frekvenco novih spontanih mutacij pri sesalcih:

$\sim 10^{-5}$ do 10^{-8} spontanih mutacij / lokus / gameto / generacijo

$\rightarrow 0,5\text{-}3 \times 10^{-8}$ / bp / generacijo

\rightarrow 1 mutacija v proteinskih genih na $\sim 1\text{-}2$ generaciji

Z sekvenciranjem celotnega genoma genski tok dokazan pri številnih podlinijah miši in podgan

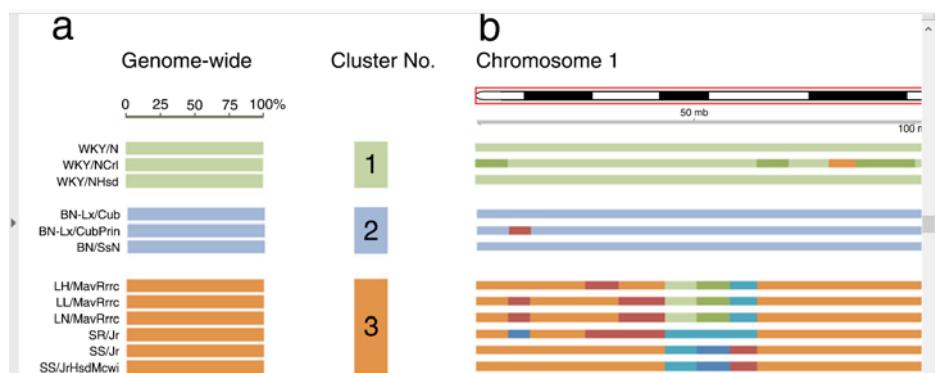
-Mekada K, Hirose M, Murakami A, et al. Development of SNP markers for C57BL/6N-derived

mouse inbred strains. *Exp Anim* 2015; 64: 91–100

-Hermsen R, de Ligt J, Spee W, et al. Genomic landscape of **rat** strain and substrain variation.

BMC Genomics 2015; 16: 357.

Genomske (funkcijske?) razlike med podlinijami podgan



-Hermsen R, de Ligt J, Spee W, et al. Genomic landscape of **rat** strain and substrain variation. *BMC Genomics* 2015; 16: 357.

Različni fenotipi pri C57BL/6 podlinijah zaradi genskega toka.....

Further phenotypical characterisation of two substrains of C57BL/6J inbred mice differing by a spontaneous single-gene mutation

François Solyer^{a,*}, Charlotte C.M. N...
^a Department of Psychoneuropharmacology
^b Génétique, Neurogénétique et Comportement
 Châtenay, Cedex 2, France

Contents lists available at ScienceDirect
 Behavioural Brain Research
 Journal homepage: www.elsevier.com/locate/behbr

=Original=

Genetic Differences among C57BL/6 Substrains

Kazuyuki MIKADA,
 Naomichi NAKATA,
 N...

The C57BL/6J Mouse Strain Background Modifies
 the Effect of a Mutation in *Bcl2l2*

Stefanie J. Navarro, Tuyen Trinh, Charlotte A. Lucas, Andrea J. Ross,
 and Grant R. MacGregor¹

Department of Developmental and Cell Biology, School of Biological Sciences, and
 Mitochondrial Medicine and Genetics, University of California Irvine, Irvine, Calif.

Open Access **Ready available online** **PLUS one**
**Not All Mice Are Equal: Welfare Implications of
 Behavioural Habituation Profiles in Four 129 Mouse
 Substrains**

Hilary Boles^{1,2,3}, Amber R. Salmons^{1,2}, Marilka van Sprundel¹, Saskia S. Arndt^{1,2}, Frauke Oehl^{1,2}

¹Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Science in Science and Society, Division of Animal Welfare and Laboratory Animal Sciences, University of Utrecht, The Netherlands

**Spontaneous deletion of epilepsy gene
 orthologs in a mutant mouse with a low
 electroconvulsive threshold**

Yan Yang¹, Barbara J. Mayor¹, James F. Otto², Timothy P. O'Brien³, Verity A. Letts¹,

H. Steve White² and Wayne N. Frankel^{1,4}

¹The Jackson Laboratory, 600 Main Street, Bar Harbor, ME 04609, USA and ²Pharmaceutical Drug Development Program, Department of Pharmacology and Toxicology, University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA

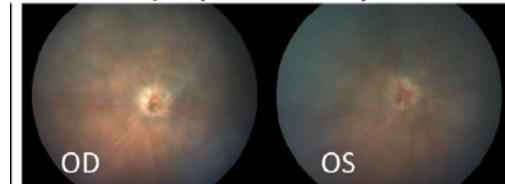
Različni fenotipi pri C57BL/6 podlinijah zaradi genskega toka.....

D: C57BL/6N (Taconic)



C57BL/6N imajo
 Mutacijo v genu
Crbl1rd8
 → očesne lezije

E: C57BL/6J (Jackson Labs)



C57BL/6J
 So Divji tip

Mattapallil et al 2012 INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE 2012 The Rd8 Mutation of the *Crbl1* Gene Present in Vendor Lines of C57BL/6N Mice and Embryonic Stem Cells, and Confounds Ocular Induced Mutant Phenotypes

NADZOR GENETSKE INTEGRITETE GENETSKI MONITORING

NADZOR GENETSKE INTEGRITETE POSKUSNIH ŽIVALI

- OPAZOVANJE - fenotipi
- OZNAČEVANJE
- RODOVNIKI – SISTEMI PARJENJ
- GENETSKI (DNA) TESTI

PERŠE, Martina, HORVAT, Simon, ROZMAN, Damjana. Genetski nadzor inbridiranih linij = Genetic monitoring of inbred strains. Acta agric. Slov.. 2007, letn. 90, št. 2, str. 69-83.

OPAZOVANJE – BARVA DLAKE

<http://www.allaboutmice.co.uk/types-varieties-2/>

- Npr. pri miših so pogosti aleli
- *Agouti* gen:
 - alel "A" (agouti – divji tip, črna dlaka, z vmesnimi pasovi rjave dlake)
 - alel "a", ne-agouti (črn)
 - alel "Aw" – "bel trebuh"
- *Tirozinaza* gen:
 - Alel "Tyr-c (albino)
 - alel "Tyrc-ch" (činčila);
- Rjav (Brown) gen:
 - alel (*Tyrb1b*); rjav
- Gen D (dilute):
 - Alel (*Myo5ad*)
- Gen za barvo P:
 - alel (p) – "the pink-eyed dilution locus (p);



OPAZOVANJE – BARVA DLAKE

- NE ZANAŠAJTE SE NA BARVO DLAKE!!!!!!!!!
- NE ZANAŠAJTE SE NA PODOBNOST IMEN LINIJ

PRIMER : C57BL/6 : C57BL/10

-M. Simon S. Brown et al. *Genome Biology* 2013, 14:R82
A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains

-Timmermans S; Van Montagu M; Libert C. 2017. Complete overview of protein-inactivating sequence variations in 36 sequenced mouse inbred strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(34):9158-9163PubMed: 28784771MGI: J:244295

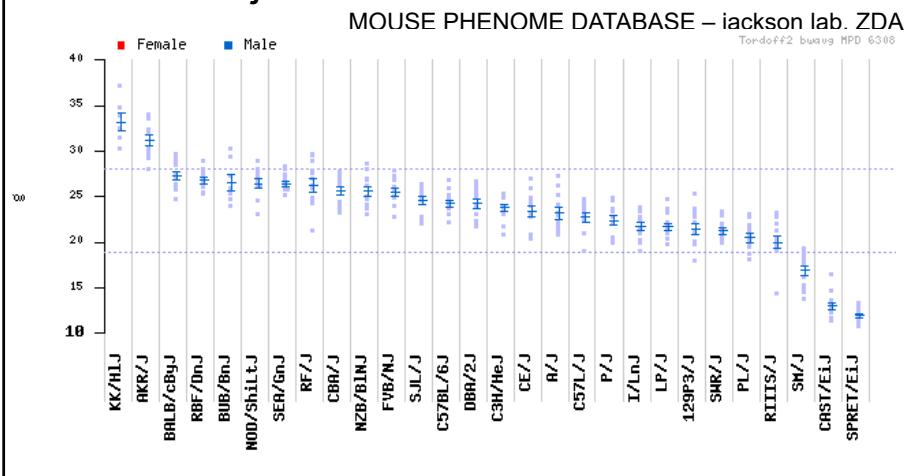
-Doran AG; Wong K; Flint J; Adams DJ; Hunter KW; Keane TM. 2016. Deep genome sequencing and variation analysis of 13 inbred mouse strains defines candidate phenotypic alleles, private variation and homozygous truncating mutations. *Genome Biol* 17(1):167PubMed: 27480531MGI: J:262923

The inbred C57BL/6 mouse strain was established at the Jackson Laboratory from the parental strain C57BL at F24 in 1948. In 1951, at F32, it was then passed on to the National Institutes of Health (NIH), leading to the C57BL/6N line.

-Med njima odkrili najmanj 34 SNPs in 2 indels v kodogenih regijah in 15 strukturnih variant -dokazali tudi razlike v določenih fizioloških, biokemičnih in vedenjskih sistemih

FENOTIPSKE ZNAČILNOSTI

- Velikost gnezda, telesna teža, obnašanje....



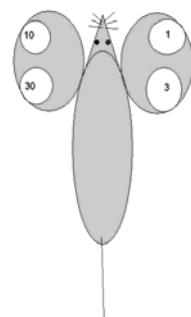
OZNAČEVANJE ŽIVALI – GENETSKI NADZOR

1 luknjica				2 luknjici, isto uho		2 luknjici, različno uho			
1	3	10	30	4	40	11	13	31	33
3 luknjice						4 luknjice		Drugo	
14	41	31	33	43		44		Brez	

ČE JE OZNAČEVANJE
PREPUŠČENO NAKLJUČUJU
SO POGOSTO IZBRANE ISTE
(ZAČETNE (LAŽJE) OZNAKE

(desničar – 1 ali 3 ali 4)
(levičar – 10 ali 30, ali 40)

VELIKO KLETK
Z ENAKIMI OZNAKAMI



NAKLJUČNO OZNAČEVANJE BOLJŠI GENETSKI NADZOR

POMEMBNO SPLOH ZA POSKUSE,
vsaka kletka ima svojo kombinacijo

kletka	miska_1	miska_2	miska_3	miska_4
1	1	10	14	44
2	3	40	11	33
3	30	31	14	41
4	3	4	13	14
5	1	30	40	13
6	40	11	13	14
7	11	41	34	44
8	10	31	34	43
9	11	33	41	44
10	3	31	14	44
11	30	4	31	43
12	4	13	33	41
13	1	3	33	41
14	30	4	13	44
15	4	11	14	34
16	10	33	14	43
17	3	30	43	44
18	40	11	14	43
19	3	40	41	34
20	1	40	31	41

OZNAČEVANJE ŽIVALI – GENETSKI NADZOR

Identifikacijski Mikročipi

[Bio Medic Data Systems, Inc.](#)

255 West Spring Valley Avenue, Maywood, New Jersey 07607

[Kent Scientific Corporation](#)

1116 Litchfield Street, Torrington, CT 06790

[LUTRONIC North America](#)

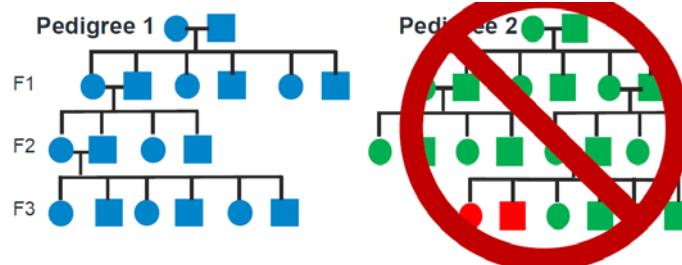
2285 St Laurent Unit A1, Ottawa, ON K1G 4Z4 Canada



-permanentno označevanje
-vsaka živali svoja številka

RODOVNIKI

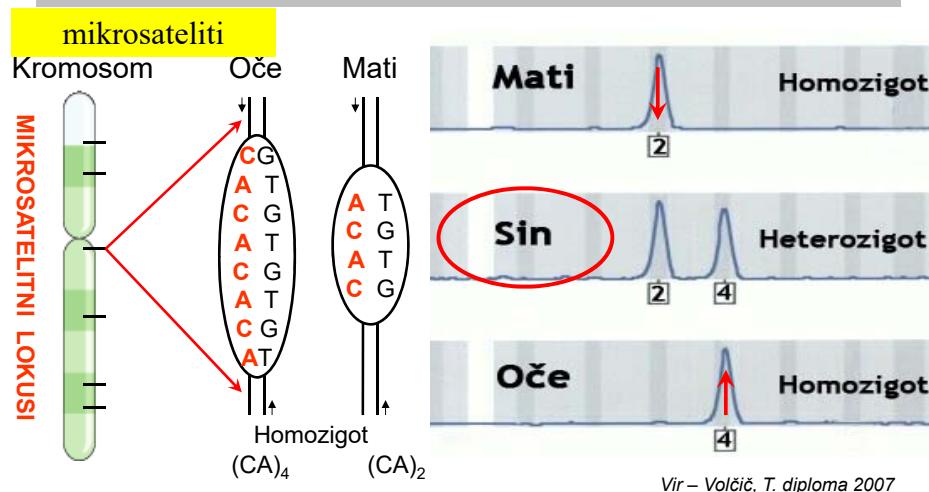
Inbridirane – sistem brat-sestra vsako generacijo 1 par



Pri tem sistemu „nove“ mutacije ali kontaminacije postanejo prej „fiksirane“ in vidne
Izločimo potomce-rodovnik, ki ne ustreza po fenotipu ipd.

GENETSKI MONITORING

izvajate sami



Vir – Volčič, T. diploma 2007

Benavides et al – Mouse microsatellite genetic monitoring Lab Anim 2001; 35: 157–162.

Mashimo et al T, Voigt B, Tsurumi T, et al. Rat microsatellite genetic monitoring BMC Genet 2006; 7: 19

ISKANJE POLIMORFNIH MIKROSATELITOV



<http://www.informatics.jax.org/marker>

<http://shigen.nig.ac.jp/mouse/mmdbj/about.jsp>

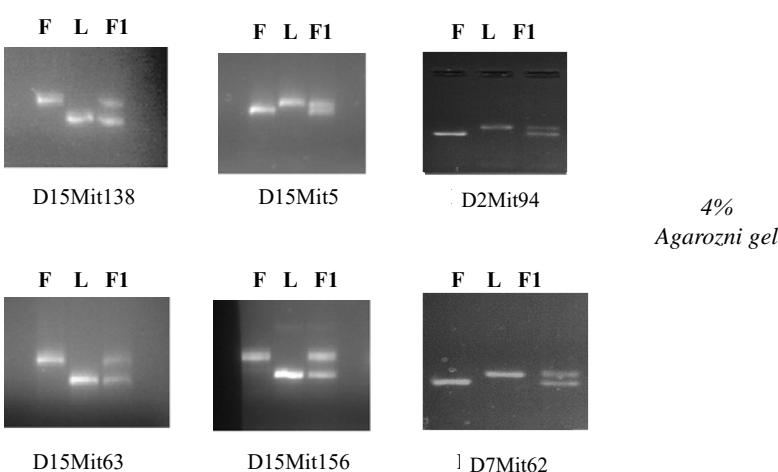


Locus Name	Chr.	B6	CAST	difference
D1Mit17	1	166	184	18
D1Mit73	1	171	186	15
D1Mit59	1	138	160	22
D1Mit59	1	138	160	22
D1Mit17	1	166	184	18
D1Mit184	1	103	100	3
D1Mit381	1	122	142	20
D1Mit73	1	171	186	15



<http://rgd.mcw.edu/>

MIKROSATELITI – standardna agarozna elektroforeza



4%
Agarozni gel

KOLIKO MARKERJEV IZBRATI?

Preglednica 1: Princip izbire števila genetskih označevalcev za izvajanje genetskega monitoringa: primer spodaj prikazuje, da s 6 polimorfnimi ne-vezanimi genetskimi označevalci lahko z 98,5% verjetnostjo ugotovimo, če sta pregledani inbridirani liniji genetsko »čisti« ali »kontaminirani«.

¹ Genetski označevalec	Alel Inbridirane Linije št. 1	Alel Inbridirane Linije št. 2	Kumulativna verjetnost, da lahko odkrijemo genetsko kontaminacijo
A	A1	A2	(1- (0,5) ¹) 50%
B	B2	B1	(1- (0,5) ²) 75%
C	C1	C2	(1- (0,5) ³) 87%
D	D1	D2	(1- (0,5) ⁴) 93%
E	E2	E1	(1- (0,5) ⁵) 97%
F	F2	F1	(1- (0,5) ⁶) 98,5%

1 genetski označevalci so ne-vezani (ležijo na različnih kromosomih)

Sicer je priporočilo FELASA – 40 markerjev

Novejše metode genetskega monitoringa

V januarju 2009 tako The Jackson Laboratory

SNP mikromreža "Mouse Diversity Genotyping Array"

600,000 lokusov SNP

900,000 sond za določanje variabilnosti števila kopij določenih genomskeih odsekov

APLIKACIJE-

-genetski monitoring

-raziskave (kompleksne lastnosti-QTL)

-št. Kopij (raklji)

Vse pogosteje sekvenciranje celotnega genoma

<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/find-and-order-jax-mice/why-jax-mice/genetic-quality-control-program>

Petkov_Wiles; Genomics. 2004 May;83(5):902-11.

Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse.

Fahay_Perez. Mamm Genome. 2013 Apr; 24(3-4): 89–94.

The case for genetic monitoring of mice and rats used in biomedical research

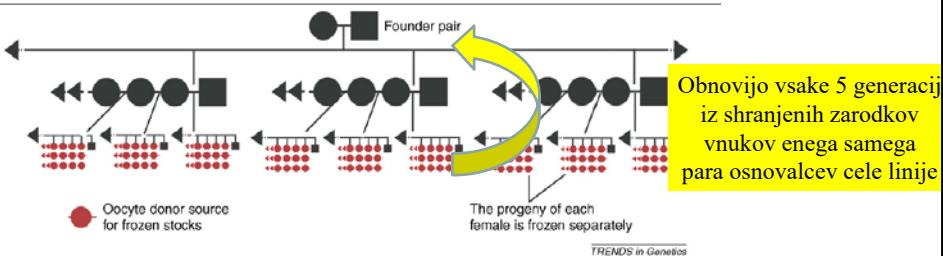
Cui SF1, Zhou Q, Qu X Altern Lab Anim. 2012 Jul;40(3):155-63.

SNP genotyping for the genetic monitoring of laboratory mice by using a microarray-based method with dualcolour fluorescence hybridisation.

Zagotavljanje genetske stabilnosti primer – The Jackson laboratory

INBRIDIRANE LINIJE

Poleg, klasičnih metod (barva dlake, obnašanje, plodnost, fenotipi)



Genetski monitoring izhodnega para – preprečevanje genskega toka

Taft RA, Davisson M and Wiles MV. Know thy mouse. *Trends Genet* 2006; 22: 649–653

Zagotavljanje genetske stabilnosti

NE-INBRIDIRANE LINIJE

Poleg, klasičnih metod (barva dlake, obnašanje, plodnost, fenotipi)

- FREKVENCE GENETSKIH OZNAČEVALCEV V VELIKI POPULACIJI
- PRIMERJAVA Z ZGODOVINSKIMI PODATKI FENOTIPOV
- PREPREČEVANJE INBRIDINGA
- OHRANJANJE GENETSKE HETEROGENOSTI
- OSVEŽEVANJE Z ZAMRZNjenimi STAREJŠIMI GENERACIJAMI

Iskanje SNP „katerihkoli“ živalskih vrst)

ENSEMBL

<http://www.ensembl.org>

PODROBEN PRIMER
NA KONCU
PREDSTAVITVE

dbSNP

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>



GENETSKI MONITORING *komercialni zunanji izvajalci*

<https://www.criver.com/products-services/research-models-services/animal-health-surveillance/genetic-testing-services/mouse-rat-genotyping?region=3696>

<https://www.jax.org/research-and-faculty/resources/scientific-research-services/get-and-reproductive-sci-and-tgs/transgenic-genotyping-services>

<https://genomics.neogen.com/en/mouse-universal-genotyping-array>

<https://www.transnetyx.com/monitoring>

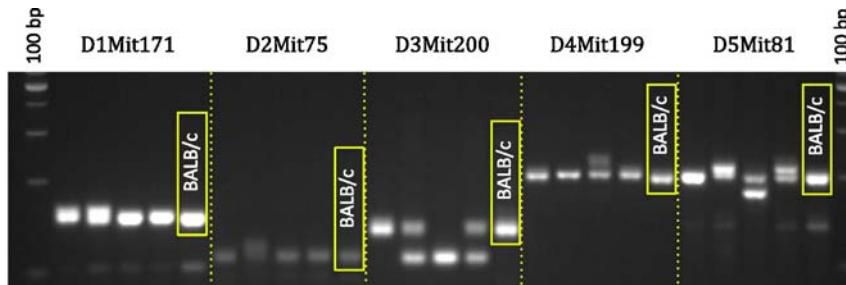
<https://www.taconic.com/colony-management/genotyping-and-genetic-analysis/#snp>

(„DISCLAIMER“ – nimamo izkušenj s temi podjetji, vrstni red je arbitraрен)

KDAJ IZVAJATI GENETSKI MONITORING

- **Ko prejmete – uvozite živalski model**
 - (zahtevajte opravljen genetski test ali protokol za test od pošiljatelja)
- **Redno vsaj paritve –starše;**
- Ko vzdržujete linije s povratnimi križanji ali izvajate poskuse na F1, F2 križancih..
- **Ko preverjate % genetskega ozadja (gensko sprememnjeni modeli)**
- Ko oddajate živali, tkiva (*zaželeno*)
- Pred poskusni (celice, tkiva) – če nepričakovani rezultati – po poskusu (*zaželeno*)

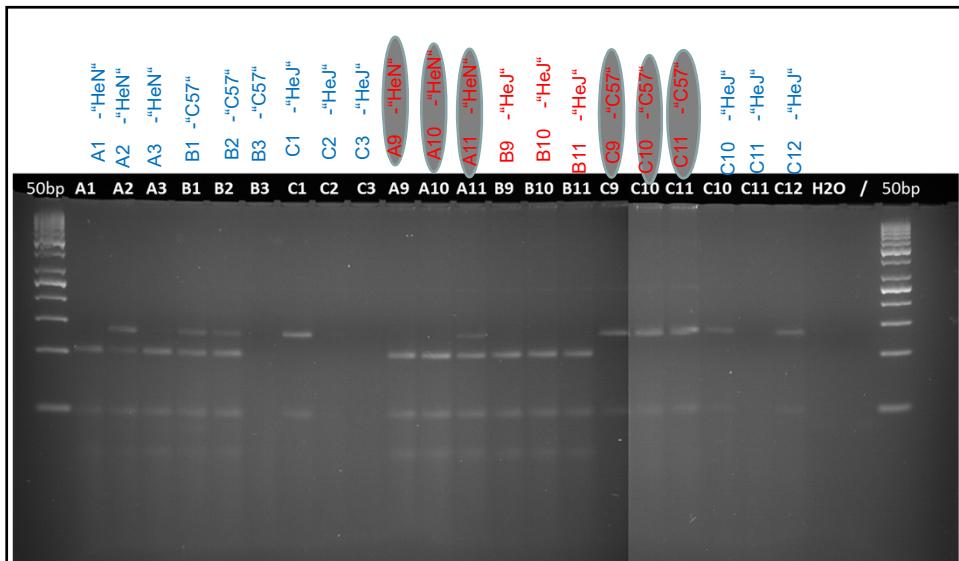
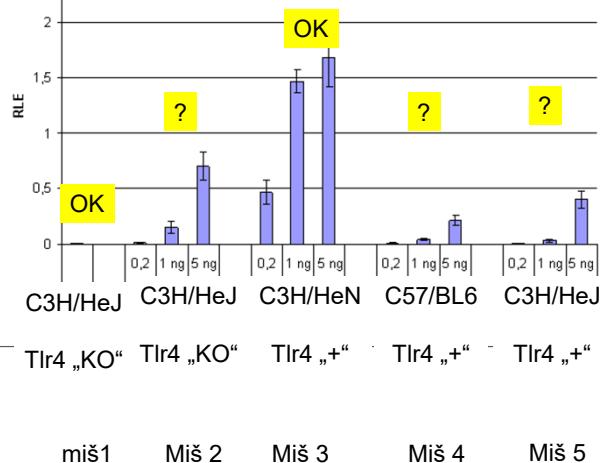
GENETSKI MONITORING PRI NAKUPU LINIJE ALI PRI VZREJI



DETEKCIJA GENETSKE KONTAMINACIJE LINIJE BALB/c

NAPAKE SE DOGAJAJO - PRIMER

aktivacija Tlr4 celic makrofagov iz kostnega mozga – ponovitev sumljivi vzorcev



Napaka ni bila pri prevzemu miši
Ampak v laboratoriju (narobe obrnjena plošča)

POMEN GENETSKEGA MONITORINGA (IZVORA)
TUDI V POSKUSIH

Pomembno shraniti nekaj
„materiala“ z DNA (ušesni
vzorec, lizati) za ponovno
preverjanje

ŠE VEDNO NEZADOSTNO UPOŠTEVANJE TERMINOLOGIJE PRI PUBLIKACIJAH

Total 27,519 PubMed publications using C57BL/6 mice

Substrain	# of Citations*
C57BL/6J	11,830
C57BL/6N	1,119
C57BL/6JOlaHsd	38
C57BL/6Jlco	21
C57BL/6JBom	11

VEČINA PUBLIKACIJ
NAVAJA SAMO LINIJO
BREZ NAVEDBE
PODLINIJE

(ŠE ENKRAT – POMEN TERMINOLOGIJE → Navajanje GENETSKEGA OZADJA → – različni rezultati

The *Prkdc^{scid}* mutation. In the **NOD background**, the *Prkdc^{scid}* mutation is associated with **low natural killer (NK) cell activity**, no complement activity, impaired macrophage development and impaired antigen presenting cell functions; in the **BALB/c background**, it is associated with **high NK cell activity**, high complement activity, normal macrophage development and normal antigen-presenting cell functions (Custer *et al.* 1985; Shultz *et al.* 1995).

IL10-deficiency. In the **B6 background**, IL10-deficiency only slightly increases susceptibility to inflammatory bowel disease (IBD); in the **129/SvEv, BALB/c, and C3H/HeJBir backgrounds**, it greatly increases IBD susceptibility (Beckwith *et al.* 2005).

Več drugih primerov na povezavi

<https://www.jax.org/news-and-insights/2006/june/the-importance-of-genetic-background-in-mouse-based-biomedical-research>

SPODBUDNO

Vse več dobrih primerov v literaturi, npr

MATERIALS AND METHODS

Mice

C3H/HeJBirZtm (C3-*wt*), C57BL/6JZtm (B6-*wt*), C3Bir.129P2-*Il10^{tm1Cgn}*/JZtm (C3-*Il10^{-/-}*), and B6.129P2-*Il10^{tm1Cgn}*/JZtm (B6-*Il10^{-/-}*) were obtained from the Central Animal Facility (Hannover Medical School, Hannover, Germany). B6 (*Cg*)-*Tyr^{c-2}*/J *Ifnb1^{tm1.1Lien}* mice were obtained from the Helmholtz Centre for Infection Research (Braunschweig, Germany). B6.129-*Stat1^{tm1Dlv}* mice were kindly provided by David E. Levy (New York) through Matthias Müller (Vienna). Routine microbio-

Norovirus Triggered Microbiota-driven Mucosal Inflammation in Interleukin 10-deficient Mice
By: Basic, Marijana; Keubler, Lydia M.; Buettner, Manuela; et al.
INFLAMMATORY BOWEL DISEASES Volume: 20 Issue: 3 Pages: 431-443 Published: MAR 2014

ŠE (preveč) SLABIH PRIMEROV

Animal Studies

? DOBAVITELJ
? GENETSKO
OZADJE
TERMINOLOGIJA

All animal studies were approved by the local investigational review board (AF 16/20090) in an accredited establishment at the Institute Pasteur de Lille (no. B59-108) according to governmental guidelines no. 86/609/CEE. Age- and sex-matched *Nod2*-deficient (*Nod2^{-/-}*), interleukin 10-deficient (*Il10^{-/-}*) and control Balb/c mice (without

: Yadav, .. Int IBD Genetics Consortium
GASTROENTEROLOGY Volume: 153 Issue: 2 Pages: 550-565
Published: AUG 2017

IMPACT FACTOR : 20,77

IZZIVI GENETSKA STANDARDIZACIJA

Genom

Mikrobiom

že ~ OK

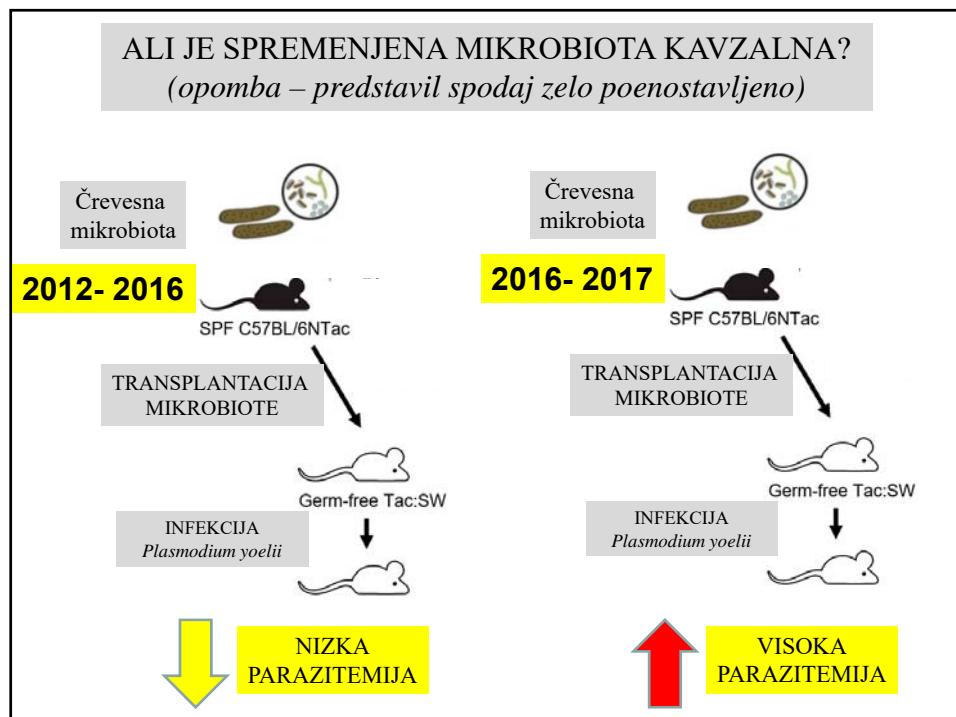
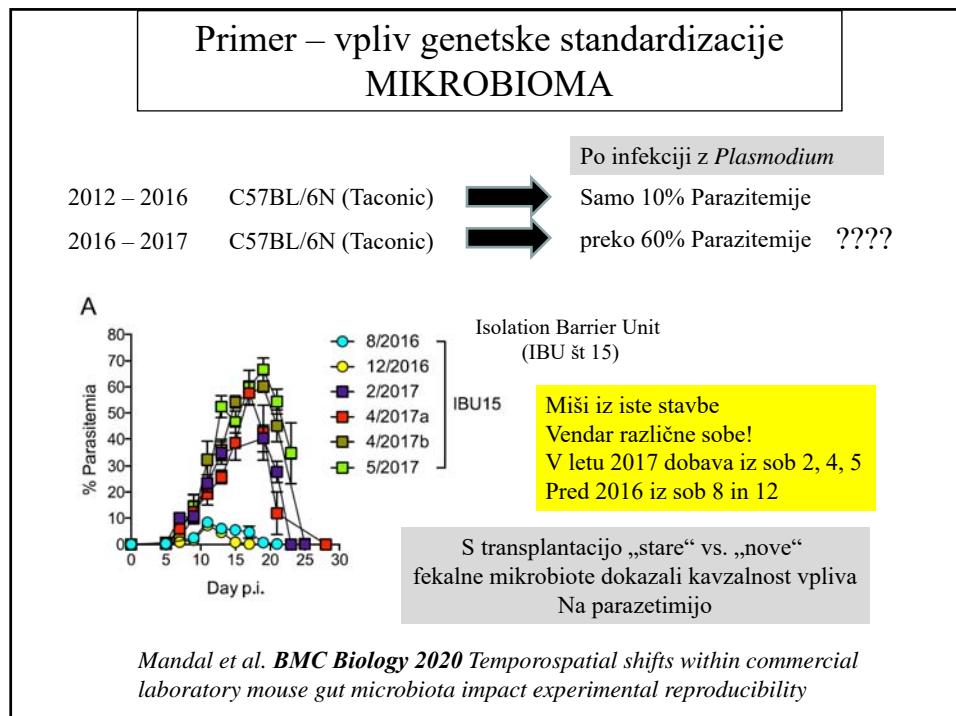
?

Primer – vpliv genetske standardizacije MIKROBIOMA

- 1.) Že leta 1990 objava – razlike v mikrobioti enake linije med različnimi prodajalci (*Hirayama s sod. Exp Anim.* 1990;39(2):263–7.)
 - 2.) Mandal s sod. (ref. Spodaj) nakupovali več let vedno isto inbridirano linijo od istega priznanega vzrejnega Centra (Taconic)
 - V zadnjih letih opazili povečano občutljivost na eksperimentalno infekcijo z malarijo
 - Imeli zmrzljeno blato za leta nazaj – z genetsko analizo mikrobioma pokazali na signifikanten premik v sestavi mikrobioma
 - S transplantacijami „stare“ in „nove“ mikrobiote v sterilne miši dokazali kavzalni vpliv spremembe mikrobiote na njihov fenotip

Villarino Schmidt PNAS 2016 2016;113(8):2235–40.

Mandal et al. BMC Biology 2020 Temporospatial shifts within commercial laboratory mouse gut microbiota impact experimental reproducibility



Primer – vpliv genetske standardizacije MIKROBIOMA

- Razlike v mikrobiomu iste linije so bile značilno **različne med sobami in različnimi deli stavbe** vzrejnega Centra
- Izzivi za prihodnost - genetska standardizacija mikrobioma?
 - PRODAJALCI:
 - ? Genetski monitoring mikrobioma in poročilo pri vsaki pošiljki
 - RAZISKOVALCI
 - ? Pri objavah poročati točno iz katere „sobe“ / objekta je bila kupljena linija in kdaj
 - ? Pri objavah poročati ne samo „genetiki“ uporabljenih linij ampak tudi o sestavi mikrobioma

Mandal et al. BMC Biology 2020 Temporospatial shifts within commercial laboratory mouse gut microbiota impact experimental reproducibility

SKLEPI

- Izbor optimalnega modela in KONTROLE
- Nakup pri uveljavljenem prodajalcu, ki izvaja genetski monitoring – ponoven nakup pri istem
- Ni priporočljivo vzrejati komercialnih linij kot svoje podlinije – če že, zamenjati po največ 10 generacij
- Genetski monitoring – (*moja*) priporočila
 - Vzrejne (prodajalec) – celovit (mikrosateliti, SNP čipi)
 - Uporabniške – vsaj delen (mikrosateliti)
 - *Raziskovalci - Vsaj za pomembne poskuse – shraniti vsaj malo biološkega materiala (tkiva, lizati, DNA, RNA..) za morebitni kasnejši genetski monitoring*

SKLEPI

- Lastne linije
 - krioprezervacija „doma“ (zarodki, sperma)
 - donacija_servis – repozitoriji (JAX, EMMA, MMRRC, IMSR)
 - → možnost rederivacije in osveževanja – preprečevanja genskega toka → genetska stabilnost linij
- PUBLIKACIJE
 - Terminologija!; Metode- podrobno (Supplement!)
 - Diskusija – omejitve in pasti modela
- ? V bodoče (*moja želja*) – genetski monitoring predpisan podobno kot je mikrobiološki monitoring
 - (celovit za vzrejne (komercialne); „delen“ za uporabniške

GENETSKA STANDARDIZACIJA!!!

ZA REZULTATE, POSKUSE:

- 3R
- PONOVLJIVOST, RELEVANTNOST
- SPLOŠNOST, TRAJNOST
- ETIČNO OPRAVICLJIVOST



DODATNO – za DOMA...

primera iskanja SNP označevalcev
v genomski bazi ENSEMBL in
SNPdb

ENSEMBL – mouse genetic variation

Primer – iskanje mišjega modela za mutacijo v genu *Tlr4*

Iščite Mouse genome“ za gen *Tlr4*
Kliknite *Genetic variation / Variant Image*

kliknite

ENSEMBL – mouse genetic variation

Primer – iskanje mišjega modela za mutacijo v genu *Tlr4*

Iščite Mouse genome“ za gen *Tlr4*
Kliknite **Genetic variation / Variant Image**

Pregled, kje v genu, kjer so pri miših odkriti polimorfizmi

Pregled, v katerih proteinskih domenah se nahajajo polimorfizmi

ENSEMBL – mouse genetic variation

Primer – iskanje mišjega modela za mutacijo v genu *Tlr4*

Iščite Mouse genome“ za gen *Tlr4*
Kliknite **Genetic variation / Variant Table**

kliknite ➤

Variant ID	Chr: bp	Alleles	Class	Source	Evidence	Clin. Sig.	Conseq. Type
rs233931073	4:66822605	G/A	SNP	dbSNP	-	-	upstream gene variant
rs259009708	4:66822618	C/T	SNP	dbSNP	-	-	upstream gene variant
rs223534144	4:66822619	G/A	SNP	dbSNP	●	-	upstream gene variant
rs13489035	4:66822683	T/C	SNP	dbSNP	● ●	-	upstream gene variant
rs261369059	4:66822719	G/T	SNP	dbSNP	-	-	upstream gene variant
rs13498448	4:66822761	T/C	SNP	dbSNP	● ●	-	upstream gene variant

ENSEMBL – mouse genetic variation

Primer – iskanje mišjega modela za mutacijo v genu *Tlr4*

Iščite Mouse genome“ za gen *Tlr4*
Kliknite **Genetic variation / Variant Table / Show in Transcript**

Codons	Alternating codons	Another codons																																			
Exons	An exon	Another exon																																			
Variants	3 prime UTR	5 prime UTR	Frameshift	Inframe deletion	Missense	Stop gained	Synonymous																														
Other	UTR																																				
Markup	loaded																																				
• Variants are filtered by consequence type																																					
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tbody> <tr> <td style="text-align: left; padding: 5px;">361 CCTGATGACATTCTTCAACCAGAACATAGATCTGAGCTTCACCCGTTGAGATC</td> <td style="text-align: right; padding: 5px;">420</td> </tr> <tr> <td style="text-align: left; padding: 5px;">142 CCTGATGACATTCTTCAACCAGAACATAGATCTGAGCTTCACCCGTTGAGATC</td> <td style="text-align: right; padding: 5px;">201</td> </tr> <tr> <td style="text-align: left; padding: 5px;">48 -P--D--D--I--F--S--S--T--K--N--I--D--L--S--F--N--P--L--K--I-</td> <td style="text-align: right; padding: 5px;">67</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center; padding: 10px;"> </td> </tr> <tr> <td style="text-align: left; padding: 5px;">421 TTAAAGGTTAGCTCTCCAATTTCGAACTTCTGGATTATCCAGGGAG</td> <td style="text-align: right; padding: 5px;">480</td> </tr> <tr> <td style="text-align: left; padding: 5px;">202 TTAAAAAGCTATACTCTCCAATTTCGAACTTCTGGATTATCCAGGGAG</td> <td style="text-align: right; padding: 5px;">261</td> </tr> <tr> <td style="text-align: left; padding: 5px;">68 -L--K--S--Y--S--F--S--N--E--L--Q--W--L--D--L--S--R--E-</td> <td style="text-align: right; padding: 5px;">87</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center; padding: 10px;"> </td> </tr> <tr> <td style="text-align: left; padding: 5px;">481 ATGAACACTGATCCAATCCCTGGGCACATGCTCTACTRAGCCAGATCCTTAGT</td> <td style="text-align: right; padding: 5px;">540</td> </tr> <tr> <td style="text-align: left; padding: 5px;">262 ATGAACTGATCCAATCTCGAGGCACATGCTCTACTAAGCCACATCTTAAGT</td> <td style="text-align: right; padding: 5px;">321</td> </tr> <tr> <td style="text-align: left; padding: 5px;">88 -M--N--T--E--S--K--S--S--E--A--H--A--L--A--L--S--H--I--L--S-</td> <td style="text-align: right; padding: 5px;">107</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center; padding: 10px;"> </td> </tr> <tr> <td style="text-align: left; padding: 5px;">541 CCATGCCAACCTCGAGGGAGCTCAGAGTTAAACTGGGGAGCCTTCTTACCGAGG</td> <td style="text-align: right; padding: 5px;">600</td> </tr> <tr> <td style="text-align: left; padding: 5px;">322 CCATGCCAACCTCGAGGGAGCTCAGAGTTAACTGGGGAGCCTTCTTACCGAGG</td> <td style="text-align: right; padding: 5px;">381</td> </tr> <tr> <td style="text-align: left; padding: 5px;">108 -P--C--Q--P--R--R--K--L--R--V--K--L--G--S--L--S--Y--Q--R-</td> <td style="text-align: right; padding: 5px;">127</td> </tr> </tbody> </table>								361 CCTGATGACATTCTTCAACCAGAACATAGATCTGAGCTTCACCCGTTGAGATC	420	142 CCTGATGACATTCTTCAACCAGAACATAGATCTGAGCTTCACCCGTTGAGATC	201	48 -P--D--D--I--F--S--S--T--K--N--I--D--L--S--F--N--P--L--K--I-	67			421 TTAAAGGTTAGCTCTCCAATTTCGAACTTCTGGATTATCCAGGGAG	480	202 TTAAAAAGCTATACTCTCCAATTTCGAACTTCTGGATTATCCAGGGAG	261	68 -L--K--S--Y--S--F--S--N--E--L--Q--W--L--D--L--S--R--E-	87			481 ATGAACACTGATCCAATCCCTGGGCACATGCTCTACTRAGCCAGATCCTTAGT	540	262 ATGAACTGATCCAATCTCGAGGCACATGCTCTACTAAGCCACATCTTAAGT	321	88 -M--N--T--E--S--K--S--S--E--A--H--A--L--A--L--S--H--I--L--S-	107			541 CCATGCCAACCTCGAGGGAGCTCAGAGTTAAACTGGGGAGCCTTCTTACCGAGG	600	322 CCATGCCAACCTCGAGGGAGCTCAGAGTTAACTGGGGAGCCTTCTTACCGAGG	381	108 -P--C--Q--P--R--R--K--L--R--V--K--L--G--S--L--S--Y--Q--R-	127
361 CCTGATGACATTCTTCAACCAGAACATAGATCTGAGCTTCACCCGTTGAGATC	420																																				
142 CCTGATGACATTCTTCAACCAGAACATAGATCTGAGCTTCACCCGTTGAGATC	201																																				
48 -P--D--D--I--F--S--S--T--K--N--I--D--L--S--F--N--P--L--K--I-	67																																				
421 TTAAAGGTTAGCTCTCCAATTTCGAACTTCTGGATTATCCAGGGAG	480																																				
202 TTAAAAAGCTATACTCTCCAATTTCGAACTTCTGGATTATCCAGGGAG	261																																				
68 -L--K--S--Y--S--F--S--N--E--L--Q--W--L--D--L--S--R--E-	87																																				
481 ATGAACACTGATCCAATCCCTGGGCACATGCTCTACTRAGCCAGATCCTTAGT	540																																				
262 ATGAACTGATCCAATCTCGAGGCACATGCTCTACTAAGCCACATCTTAAGT	321																																				
88 -M--N--T--E--S--K--S--S--E--A--H--A--L--A--L--S--H--I--L--S-	107																																				
541 CCATGCCAACCTCGAGGGAGCTCAGAGTTAAACTGGGGAGCCTTCTTACCGAGG	600																																				
322 CCATGCCAACCTCGAGGGAGCTCAGAGTTAACTGGGGAGCCTTCTTACCGAGG	381																																				
108 -P--C--Q--P--R--R--K--L--R--V--K--L--G--S--L--S--Y--Q--R-	127																																				

ENSEMBL – mouse genetic variation

Primer – iskanje mišjega modela za mutacijo v genu *Tlr4*

Iščite Mouse genome“ za gen *Tlr4*
Kliknite **Genetic variation / Variant Table / Consequences / Stop gained**

Npr. zanima nas, če pri miši obstaja v tem genu mutacija, ki generira STOP kodon in skrajša protein

Phenotypes		Genetic Variation		Variant table		Variant image		Structural variants		Gene expression		Pathway		Regulation		Literature references		Supplementary evidence		ID History		Gene history	
Configure this page		Custom tracks		Export data		Share this page		Bookmark this page															
This table shows known variants for this gene. Use the 'Consequence Type' filter to view a subset of these.																							
Filter		SIFT: All		Consequences: All		Filter Other Columns		Consequences		Turn All Off		PTV		PTV & Missense		Only Exonic		Turn All On					
Variant ID		Chr		Consequence		PTV = Protein Truncating Variant		PTV = Protein Truncating Variant		PTV = Protein Truncating Variant													
rs223931073		4-668		transcript ablation		inframe deletion		mature mRNA variant		protein altering variant		5 prime UTR variant		3 prime UTR variant		non coding transcript exon variant		intron variant					
rs25		4-668		splice acceptor variant		protein altering variant		splice donor variant		missense variant		splice region variant		incomplete terminal codon variant		intron variant		intron variant					
rs225534144		4-668		stop gained		stop lost		start retained variant		stop retained variant		synonymous variant		stop retained variant		upstream gene variant		non coding transcript variant					
rs13486035		4-668		frameshift variant		splice site variant		start retained variant		stop retained variant		stop gained		stop gained		downstream gene variant		downstream gene variant					
rs261369059		4-668		inframe insertion		inframe insertion		intron variant		intron variant		intron variant		intron variant		intron variant		intron variant					
rs13498446		4-66822761		T/C		SNP		dbSNP		-		-		-		-		-					
variant		variant		variant		variant		variant		variant		variant		variant		variant		variant					
rs13498446		4-66822761		T/C		SNP		dbSNP		-		-		-		-		-					
variant		variant		variant		variant		variant		variant		variant		variant		variant		variant					
rs13498446		4-66822761		T/C		SNP		dbSNP		-		-		-		-		-					
variant		variant		variant		variant		variant		variant		variant		variant		variant		variant					

ENSEMBL – mouse genetic variation

Primer – iskanje mišjega modela za mutacijo v genu *Tlr4*

Iščite Mouse genome“ za gen *Tlr4*
Kliknite **Genetic variation / Variant Table/ Consequences/ Stop gained**

Npr. zanima nas, če pri miši obstaja v tem genu mutacija, ki generira STOP kodon in skrajša protein

Consequence Type	Description	Count
PTV	Protein Truncating Variant	1
PTV & Missense		0
Only Exonic		0
Turn All On		0
Inframe deletion	(1)	1
inframe insertion	(1)	1
splice acceptor variant	(1)	1
splice donor variant	(1)	1
stop gained	(1)	1
stop lost	(1)	1
start lost	(1)	1
transcript amplification	(1)	1
inframe insertion	(1)	1
intron deletion	(1)	1
protein altering variant	(1)	1
missense variant	(1)	1
splice region variant	(1)	1
incomplete terminal codon variant	(1)	1
start retained variant	(1)	1
synonymous variant	(1)	1
stop retained variant	(1)	1
upstream gene variant	(1)	1
downstream gene variant	(1)	1
mature mRNA variant	(1)	1
5 prime UTR variant	(1)	1
3 prime UTR variant	(1)	1
non coding transcript exon variant	(1)	1
intron variant	(1)	1
UTR transcript variant	(1)	1
non coding transcript variant	(1)	1

ENSEMBL – mouse genetic variation

Primer – iskanje mišjega modela za mutacijo v genu *Tlr4*

Iščite Mouse genome“ za gen *Tlr4*
Kliknite **Genetic variation / Variant Table/ Consequences/ Stop gained**

Nadaljnji prikaz posledic te mutacije

Genes and regulation

Gene and Transcript consequences

Gene	Transcript (strand)	Allele	Consequence Type	Position in transcript	Position in CDS	Position in protein	AA	Codons	Detailed
ENSMUSG0000003900	ENSMUST00000107365 (+)	T (T) biotype: protein_coding	stop gained	547 (out of 1866)	328 (out of 465)	110 (out of 154)	Q/*	CAA/TAA	Show

No overlap with Ensembl Regulatory features
No overlap with Ensembl Motif features

Ensembl release 95 - January 2019 © EMBL-EBI
Permanent link - View in archive site

ENSEMBL – mouse genetic variation

Primer – iskanje mišjega modela za mutacijo v genu *Tlr4*

Iščite Mouse genome“ za gen *Tlr4*

Kliknite *Genetic variation / Variant Table/ Consequences/ Stop gained/Population genetics/Show genotypes*

Katere mišje linije imajo to STOP kodon mutacijo?

rs48664781 SNP

Most severe consequence: stop gained | See all predicted consequences

Alleles: C/T | Highest population MAF: 0.17

Location: Chromosome 4:66924436 (forward strand) | VCF: 4 66924436 .rs48664781 C T

Evidence status: This variant has 3 HGVS names - Show Variants (including SNPs and indels) imported from dbSNP (release 150)

Original source: About this variant: This variant overlaps [rs48664781](#) and has 21 sample genotypes.

Explore this variant

Population genetics

Phenotype data

Genomic context, Genes and regulation, Flanking sequence, Sample genotypes, Linkage disequilibrium, Phylogenetic context, Citations, 3D Protein model

ENSEMBL – mouse genetic variation

Primer – iskanje mišjega modela za mutacijo v genu *Tlr4*

Iščite Mouse genome“ za gen *Tlr4*

Kliknite *Genetic variation / Variant Table/ Consequences/ Stop gained/Population genetics/Show genotypes*

Katere mišje linije imajo to STOP kodon mutacijo?

Show	All ▾ entries	Sample (Male/Female/Unknown)	Genotype (forward strand)	Population(s)
Limija CAST/EiJ	CAST/EiJ	MGP-129P2/OlaHsd (U)	C/C	Mouse Genomes Project
Liniji PWK/Ph SPRET/EU	PWK/Ph SPRET/EU	MGP-129S1/Svmlj (U)	C/C	Mouse Genomes Project
		MGP-129S5SeVbird (U)	C/C	Mouse Genomes Project
		MGP.A/J (U)	C/C	Mouse Genomes Project
		MGP.AKR/J (U)	C/C	Mouse Genomes Project
		MGP.BALB/cJ (U)	C/C	Mouse Genomes Project
		MGP.C3HHeJ (U)	C/C	Mouse Genomes Project
		MGP.C57BL/6NJ (U)	C/C	Mouse Genomes Project
		MGP.CAST/EJ (U)	T/T	Mouse Genomes Project
		MGP.CBA/J (U)	C/C	Mouse Genomes Project
		MGP.DBA/2J (U)	C/C	Mouse Genomes Project
		MGP.FVB/NJ (U)	C/C	Mouse Genomes Project
		MGP.Lpu (U)	C/C	Mouse Genomes Project
		MGP.NOD/ShlU (U)	C/C	Mouse Genomes Project
		MGP.NZO/HU (U)	C/C	Mouse Genomes Project
		MGP.PWKPhJ (U)	T/T	Mouse Genomes Project
		MGP.SPRET/EU (U)	T/T	Mouse Genomes Project
		MGP.WSB/EU (U)	C/C	Mouse Genomes Project

Iskanje SNP za laboratorijske miši

http://www.informatics.jax.org/strains_SNPs.shtml

The screenshot shows the MGI-Mouse Strains, SNPs page. At the top, there's a navigation bar with links like Home, Genes, Phenotypes, Human Disease, Expression, Recombinases, Function, Strains / SNPs, Homology, Pathways, Tumors, and Contact Us. Below the navigation bar, there's a section titled "Strains, SNPs & Polymorphisms" with a brief description. On the left, there's a "Access Data" section with a "SNP Query" link, which is highlighted with a large black arrow pointing upwards. On the right, there's a "FAQs" section and a small image of several mice. At the bottom, there's a "Strains and Strain Comparisons" section with a "Select All" and "Clear All" button, and a list of strain names.

Prof. dr. Simon Horvat

Iskanje SNP za laboratorijske miši

http://www.informatics.jax.org/strains_SNPs.shtml

This screenshot is similar to the one above, but it shows a search query for the gene "Foxp3". The "Gene Symbol/Name" field contains "Foxp3". There are three radio buttons below the search field: "within the gene(s)", "include 2 kb upstream and downstream of the gene(s)", and "include 10 kb upstream and downstream of the gene(s)". A note says "For the gene(s) specified above return all SNPs:". Below this, there are two sections: "Associated Genes" and "Strains and Strain Comparisons". In the "Associated Genes" section, the "Foxp3" gene is listed. In the "Strains and Strain Comparisons" section, several mouse strains are listed, with some being circled in red. A large black arrow points upwards from the "Associated Genes" section towards the "Strains and Strain Comparisons" section.

Prof. dr. Simon Horvat

Iskanje SNP za laboratorijske miši

Export: SNPs to Text File					
SNP ID (dbSNP Build 142)	Map Position (GRCm38)	Gene & Category	Variation Type	Allele Summary (all strains)	129S1/SvImJ
rs33353969 MGI dbSNP MGU SNP Detail	ChrX:7591412	Ccdc22 Intron Fxp3 mRNA-UTR Gm3595 within coordinates of	SNP	C/T	C
rs33353972 MGI dbSNP MGU SNP Detail	ChrX:7594426	Ccdc22 Intron Fxp3 mRNA-UTR Gm3595 within coordinates of	SNP	C/T	C
rs33354915 MGI dbSNP MGU SNP Detail	ChrX:7595084	Ccdc22 Intron Fxp3 mRNA-UTR Gm3595 within coordinates of	SNP	C/T	C
rs33354918 MGI dbSNP MGU SNP Detail	ChrX:7595261	Ccdc22 Intron Fxp3 Locus-Region downstream Gm3595 within coordinates of	SNP	A/G	A
rs33354921 MGI dbSNP MGU SNP Detail	ChrX:7596106	Ccdc22 Intron Fxp3 863 bp downstream Gm3595 within coordinates of	SNP	A/G	A
rs33356834 MGI dbSNP MGU SNP Detail	ChrX:7596738	Ccdc22 Coding-NonSynonymous Fxp3 1495 bp downstream Gm3595 within coordinates of	SNP	A/G	A
rs33355836 MGI dbSNP MGU SNP Detail	ChrX:7597171	Ccdc22 Intron Fxp3 1929 bp downstream Gm3595 within coordinates of	SNP	C/T	T

rs33353969 SNP Details

ID: rs33353969 dbSNP

Variation Type: SNP
Alleles: C/T

Created in dbSNP Build: 125
Last Updated in dbSNP Build: 137

Additional Resources: [MIP](#) | [Mouse Genome Browser](#) | [Ensembl SNPView](#) | [UCSC Brower](#) | [NCBI MapViewer](#)

Location: ChrX:7593412 (GRCm38)

SNP Orientation to the Genome: forward

SNP Reference Flanking Sequence:

```
cctttagctt gatgggggtg
CCAATCCAG CCTAAGCCCT AGTTCACCC TAGCCCCAG ATGACATTTC CAGTCAGAAA
GCCCTCACAA CGAGCTATAC ATATCTCT TGGCCACTCG CAGCAGAGAA GATGACAGAC
ACCATCTTA TATTTACTCA ACCAAAACCC TAAACATGA AGAGCTGCC TTGGTACATT
V GTGAACTTC AAAGTTAGTC ATGCAAGTAC ACATGATGTC AGTCTACTG ACTCACACCC
CAAAGACTC ACCCAACACA TCTGAAACCA CGGGCACTAT CACACATAGG TGATATAACA
GACCCCTACA CAGCAACACGC ACTGGAACCT TCACAAATTAC ATCCCCCAA ACCACACAGG
CATACGTAT CATAACGAGC
```

Y = C/T

Note: Sequence in lower case indicates low-complexity or repetitive sequence

BLAST SNP flanking sequence against the mouse Genome
send flank to NCBI BLAST ▾ [Go](#)

Prof. dr. Simon Horvat