

Fachinformation

**aus dem Ausschuss für Genetik und
Labortierzucht**

Kongene Stämme durch Rückkreuzung und beschleunigte Rückkreuzung ("speed congenics")

Stand Mai 2021

**Autoren: Jutta Davidson,
Dirk Wedekind, Kurt Reifenberg,
Reinhart Kluge, Bernhard Aigner**

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	3
2.	Konventionelle Zucht kongener Stämme	4
3.	„Speed“-kongene Stämme.....	7
3.1	Markerauswahl.....	9
3.2	Markerdichte	9
3.3	Geschlechtschromosomen	9
3.4	Anzahl der zu testenden Tiere pro Generation	10
3.5	Anzahl der Rückkreuzungsgenerationen.....	12
4.	Praktische Probleme bei der Herstellung „Speed“-kongener Stämme.....	12
4.1	Marker sind nicht informativ für die ausgewählten Stämme	12
4.2	Die informativen Marker sind nicht gleichmäßig im Genom verteilt.....	12
4.3	Niedrige Reproduktionsleistung der Tiere.....	12
4.4	Beispiele aus der Praxis.....	13
5.	Zusammenfassung	13
6.	Internetadressen für polymorphe genetische Marker	14
6.1	Maus.....	14
6.2	Ratte	14
7.	Literatur	15

1. Einleitung

Koisogene Organismen sind genetisch einander sehr ähnlich und unterscheiden sich nur in einem kleinen Teil des Genoms voneinander, in der Regel nur durch eine einzige Genvariante, einem Allel. Sie eignen sich zur Untersuchung dieses Allels auf dem entsprechenden genetischen Hintergrund. Die Wirkung eines Gens hängt nicht nur von seiner Variante – dem Allel – ab, sondern auch von vielen anderen Genen des Organismus und deren Allelen. Die Gene, die auf die Ausprägung anderer Gene Einfluss nehmen können, werden auch als modifizierende Gene ("*modifier genes*") bezeichnet (Doetschman 2009). Ihre Identität und Anzahl im genetischen Hintergrund sind oft unbekannt und variieren im Einzelfall beträchtlich. So beeinflussen potenziell z.B. viele tausend Genomloci die menschliche Körpergröße (Kaiser 2020).

Die Untersuchung eines spezifischen Allels auf unterschiedlichen genetischen Hintergründen ist durch die Erstellung von kongenen Stämmen möglich, die auf dem interessierenden Genomlocus dasselbe Allel tragen, sich jedoch im genetischen Hintergrund unterscheiden. Der tierexperimentellen Forschung stehen eine Vielzahl von Inzuchtstämmen der Labornager zur Verfügung, deren genetischer Hintergrund standardisiert und definiert ist, um die Wirkung eines interessierenden Allels in unterschiedlichen Genomen analysieren zu können. Zwei klassische Inzuchtstämmen von Labormäusen der Spezies *Mus musculus* unterscheiden sich dabei funktionell in mehr als 1.000 der ca. 20.000 proteinkodierenden Gene (= ca. 5 - 10 %; Keane et al. 2011, Vanden Berghe et al. 2015). Für weitere funktionell wirksame Genomloci wie z.B. Loci, die nicht-kodierende, regulatorisch wirkende RNAs kodieren, oder regulatorisch wirkende Elemente (z.B. Promotoren, *Enhancer*, *Silencer*, etc.) ist der funktionelle Unterschied zwischen zwei Inzuchtstämmen bisher unbekannt. Damit kann bei diesen Elementen der funktionelle Unterschied zwischen zwei Inzuchtstämmen auch in einer anderen anteiligen Größenordnung als bei proteinkodierenden Genen liegen

Daneben werden auch spezifische Allele oder transgene Loci durch Zucht von zwei oder mehr Ausgangslinien in einem neuen Mausmodell kombiniert (z.B. bei Verwendung zweiteiliger transgener Systeme wie dem *Cre/loxP*-System). Hier kann es notwendig sein, durch Zuchtmethoden den genetischen Hintergrund der Ausgangslinien zu vereinheitlichen bzw. den genetischen Hintergrund der neu entstehenden Linie zu standardisieren.

Die ersten kongenen Stämme bei Labormäusen wurden um 1920 von Snell entwickelt, um Abstoßungsreaktionen bei Tumortransplantationen besser verstehen zu können (Silver 1995). Kongene Inzuchtstämmen der Ratten entstanden hauptsächlich in den 1970er und 1980er Jahren in Prag, Cambridge, Hannover und Göttingen, um die Funktion und Struktur der Transplantationsantigene (MHC) zu erforschen (Hedrich 2000).

Die Entwicklung eines kongenen Inzuchtstammes durch konventionelle Zucht dauert in der klassischen Form mit oftmaliger Rückkreuzung des interessierenden Allels in einen neuen genetischen Hintergrund mehrere Jahre. Die Entwicklung dieser Modelle kann mit Hilfe molekulargenetischer Methoden beschleunigt und optimiert werden ("*speed*"-kongene Stämme). Diese beiden Zuchtmethoden und das Genom der dabei erzeugten Tiere werden nachfolgend erläutert.

Alternativ dazu können mit gentechnischen Methoden Organismen erstellt werden, die dieselben genetischen Zieleigenschaften besitzen wie kongene Stämme (dasselbe

interessierende Allel auf unterschiedlichem genetischen Hintergrund). Mit Hilfe von sequenz-spezifischen Nukleasen wie vor allem CRISPR-Cas9 kann prinzipiell mit vertretbarem Zeit- und Arbeitsaufwand ein spezifisches Allel in gleicher Weise in mehr als einen Organismus eingefügt werden, d.h. mindestens zwei neu erstellte Individuen tragen an derselben Stelle im Genom die identische DNA-Sequenz des neuen Allels. Werden in einem solchen Projekt zwei verschiedene Inzuchtstämme erfolgreich verwendet (soweit die Tiere dann lebensfähig und fertil sind), sind der Ausgangsstamm und der neu entstehende Stamm für jeden einzelnen Inzuchtstamm koinzogene Stämme zueinander, und die beiden neu erstellten Stämme besitzen zueinander dieselben genetischen Zieleigenschaften wie kongene Stämme (d.h. identische DNA-Sequenz des neuen Allels an der identischen Stelle des Genoms, bei unterschiedlichem genetischen Hintergrund), ohne eine langwierige konventionelle Zucht durchführen zu müssen. Im Vergleich zur Erstellung von kongenen Stämmen durch Zuchtmethoden besteht der Nachteil in einem zu Beginn hohen, aber vertretbaren Arbeitsaufwand. Die beiden Hauptvorteile sind jedoch eine enorme Zeitersparnis und das Fehlen von genetischen Kontaminationen (siehe 2.). Durch die Verwendung der gentechnischen Werkzeuge möglicherweise ausgelöste unerwünschte, ungekoppelte Mutationen ("off-target effects") können durch die Rückzucht des interessierenden Allels auf den verwendeten genetischen Hintergrund aus der Population entfernt werden.

2. Konventionelle Zucht kongener Stämme

Die Erstellung eines kongenen Stamms erfolgt durch die Rückkreuzung eines interessierenden Allels vom Donorstamm auf den Rezipientenstamm (Abb. 1). Prinzipiell können auch mehrere interessierende Allele gleichzeitig zurückgekreuzt werden. Als Rezipientenstamm wird in der Regel ein Inzuchtstamm verwendet. Stammbäume der Inzuchtstämme sind für Maus (Beck et al. 2000, Petkov et al. 2004) und Ratte (Canzian 1997, STAR Consortium 2008) publiziert. Die Rückkreuzungsgenerationen werden mit F1, N2, N3, etc. benannt. In jeder Generation erfolgt eine Selektion auf das Vorhandensein des interessierenden Allels, das üblicherweise mittels einer PCR-Reaktion auf genetischer Ebene nachgewiesen wird, so dass auch bei rezessiven Allelen keine Notwendigkeit zum Einschalten von Zwischenkreuzungen zwischen die Rückkreuzungsschritte besteht.

Bei der konventionellen Zucht kongener Stämme werden 10 Rückkreuzungen (F1, N2 – N10) des Donorstamms auf den Rezipientenstamm durchgeführt. Bei einer Generationsdauer der Maus von 10 - 14 Wochen beträgt der Zeitaufwand für die Zucht eines konventionellen kongenen Stamms 2 - 3 Jahre und kann somit die weitere Forschung mit diesen Tieren stark verzögern.

Durch den Einsatz reproduktionstechnischer Maßnahmen wie hormonelle Ovulationsauslösung (Superovulation) junger Tiere bzw. Verwendung von Spermiovorläuferzellen kann der Zeitaufwand zur Erstellung eines kongenen Stamms verkürzt werden (Behringer 1998, Ogonuki et al. 2009, Landa et al. 2010, Behringer et al. 2014). Ein kongener Stamm kann entweder durch Anpaarung homozygoter Merkmalsträgertiere weitergeführt werden oder durch Anpaarung heterozygoter bzw. hemizygoter Merkmalsträgertiere mit Wildtyptieren (Silver 1995).

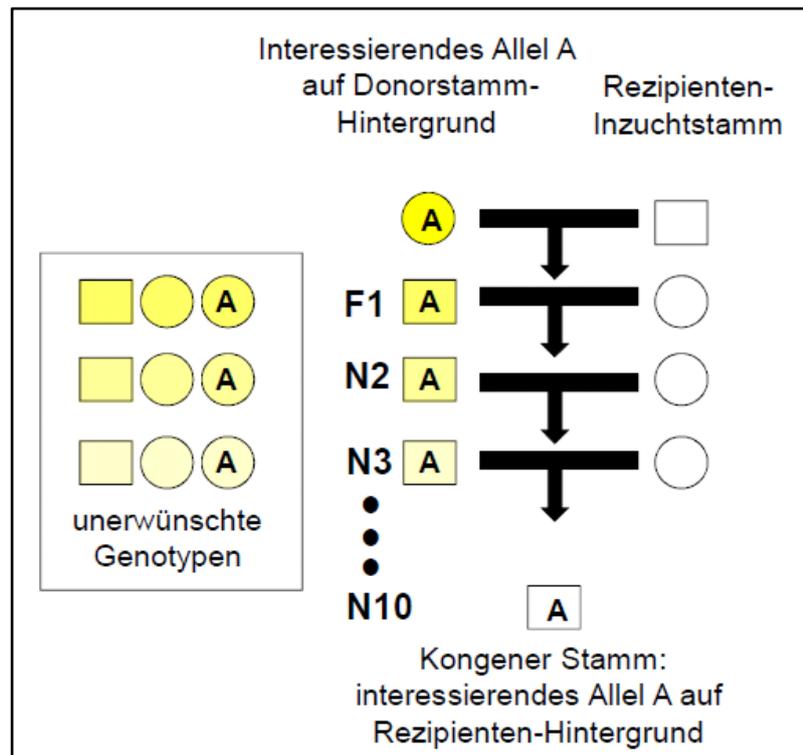


Abb. 1. Schema zur Zucht eines kongenen Stamms durch Rückkreuzung eines interessierenden Allels „A“ vom Donorstamm auf den Rezipientenstamm. Männliche Tiere sind durch Quadrate, weibliche durch Kreise charakterisiert. Initial wird ein weibliches Trägartier des interessierenden Allels „A“ mit einem Männchen des Rezipienten-Inzuchtstamms angepaart. Alle männlichen Nachkommen dieser Kreuzung tragen das Y-Chromosom des Rezipientenstamms. In allen folgenden Generationen werden männliche Trägartiere des Allels „A“ selektiert und mit Weibchen des Rezipientenstamms gepaart. So wird in der N2-Generation das X-Chromosom sowie die mitochondriale DNA des Rezipientenstamms im Genom des kongenen Stamms verankert.

Während des Rückkreuzungsprozesses werden die Donorstammanteile sukzessive durch Rezipientenstammanteile verdrängt. Bei der Kalkulation der Kontamination eines kongenen Stamms durch Donorstammanteile wird zwischen dem Genomanteil, der mit dem selektierten Genort chromosomal gekoppelt ist, und dem ohne Kopplung unterschieden (Abb. 2). Beim Genomanteil ohne Kopplung zum selektierten Genort nimmt die Kontamination durch Donorstammanteile bei jeder Rückkreuzungsgeneration „n“ theoretisch um 50 % ab. Der Anteil unerwünschter Donorstammallele am diploiden Genom des kongenen Stamms (Anteil von Donorstammallelen an der Gesamtallelanzahl) kann mit der Formel $0,5^n$ berechnet werden. Für $n = 10$ ergibt sich dafür ein Wert von 0,001 (= 0,1 %). Die Kontamination eines kongenen Stamms durch Donorstammanteile kann auch auf das haploide Genom bezogen werden und bezeichnet dann den Anteil heterozygoter (1 Donorstammallel sowie 1 Rezipientenstammallel) ungekoppelter Loci am Genom des kongenen Stamms. Diese Kontamination wird mit der Formel $0,5^{n-1}$ berechnet; für $n = 10$ ergibt sich dafür ein Wert von 0,002 (= 0,2 %). Damit wären durchschnittlich 40 der ca. 20.000 proteinkodierenden Säugergene betroffen. Bei einem funktionellen Unterschied zwischen Donorstamm und Rezipientenstamm in ca. 5 - 10 % dieser Loci (Vanden Berghe et al. 2015) tragen somit einzelne Stellen der genetischen Kontamination im Genom des kongenen Rezipientenstammes nicht das richtige funktionelle Allel des Zielstamms. Für die weiteren funktionell wirksamen Genomloci wie z.B. Loci, die nicht-kodierende, regulatorisch wirkende RNAs kodieren, oder regulatorisch wirkende Elemente (z.B. Promotoren, Enhancer, Silencer, etc.) ist die anteilige Größenordnung des funktionellen

Unterschiedes zwischen zwei Inzuchtstämmen bisher unbekannt. Bei der weiteren Zucht des kongenen Stamms durch Inzucht werden bei der Hälfte der heterozygoten Loci Rezipientenstammallele fixiert. In der Praxis kann die Kontamination der nicht gekoppelten Loci eines kongenen Stamms durch unbeabsichtigte und/oder verfahrenstechnisch immanente Selektion bei der Zucht (z.B. bei Lebensfähigkeit bzw. Fertilität der Merkmalsträger nur in Zusammenhang mit Allelen des Donorstamms, die im Rezipientenstamm nicht vorhanden sind) größer sein als rechnerisch vorhergesagt (Berry und Cutler Linder 2007). Der Wert kann durch zusätzliche Rückkreuzungsgenerationen weiter reduziert werden (Abb. 2). Um eine Beeinflussung des Phänotyps kongener Stämme durch nicht gekoppelte Donorstammanteile auszuschließen, wurde angeraten, für das ausgewählte interessierende Allel mehrere unabhängige kongene Stämme mit demselben Rezipientenstamm zu erzeugen (Armstrong et al. 2006).

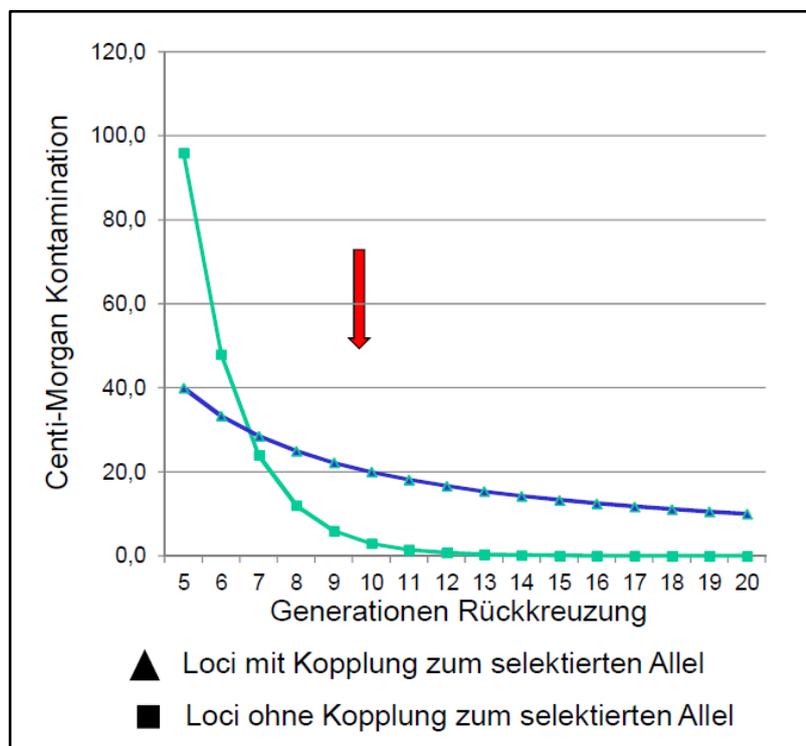


Abb. 2. Kontamination eines kongenen Stamms durch Donorstammanteile. Dargestellt ist die Kontamination in Centi-Morgan (cM) durch gekoppelte (Dreiecke) sowie ungekoppelte (Quadrate) Donorstammanteile von Generation N5 bis N20. In der N10-Generation (roter Pfeil) beträgt die Kontamination durch gekoppelte Donorstammanteile 20 cM, dies entspricht etwa 1,3 % des haploiden Genoms. Die Kontamination durch ungekoppelte Donorstammanteile beträgt in der Generation N10 etwa 0,2 % des haploiden Genoms, entsprechend etwa 3 cM. Die Abbildung zeigt deutlich, dass die Kontamination eines kongenen Stamms in erster Linie durch die gekoppelten Donorstammanteile verursacht wird. Die Abbildung wurde freundlicherweise von der Universität Mainz zur Verfügung gestellt. [Centi-Morgan ist die genetische Maßeinheit für die Rekombinationsfrequenz zwischen zwei Loci. Ein Abstand von 1 cM liegt zwischen zwei Loci vor, wenn in 100 Meiosen 1 Crossing-over-Ereignis stattfindet. 1 cM entspricht bei Maus und Ratte etwa 2 Mega-Basenpaaren (Mb). Das haploide Genom von Maus und Ratte ist ca. 3.000 Mb lang.]

Die Nomenklatur kongener Stämme umfasst die Bezeichnungen des Rezipientenstammes und des Donorstamms sowie das selektierte Allel. Die aktuellen Nomenklaturempfehlungen

können im Internet eingesehen werden¹. Die genetische Drift von Inzuchtstämmen durch die spontane Mutationsrate kann mit Hilfe der Kryokonservierung von Embryonen kontrolliert werden (Taft et al. 2006, Uchimura et al. 2015).

Für kongene Stämme, die aus Substämmen des Inzuchtstammes 129 (früher i.d.R. als genetischer Hintergrund von embryonalen Stammzellen zur Erstellung von homologen Rekombinanten verwendet) als Donorstamm und C57BL/6J oder C57BL/6NJ als Rezipientenstamm gezüchtet wurden, steht ein Internetprogramm zur Suche nach potenziellen funktionellen Veränderungen im Bereich der gekoppelten genetischen Kontamination bzw. weiterer interessierender Genomloci zur Verfügung (<http://me-pamufind-it.org>; Vanden Berghe et al. 2015).

In der Praxis der biomedizinischen Forschung ist zu beobachten, dass auch Ergebnisse von kongenen Stämmen publiziert werden, die mit weniger als 10 Rückkreuzungsgenerationen und ohne zusätzliche genetische Untersuchungen etabliert wurden. Wie oben dargestellt, ist in diesen Fällen von umfangreicheren genetischen Kontaminationen auszugehen.

3. „Speed“-kongene Stämme

Geschwindigkeit und Effizienz der Herstellung eines kongenen Stammes können durch die Verwendung eines Marker-assistierte Selektionsprotokolls (MASP, „*marker assisted selection protocol*“) deutlich gesteigert werden. Hierbei beschränkt sich die Selektion geeigneter Zuchttiere nicht nur auf das Vorhandensein des interessierenden Allels, sondern es erfolgt eine zusätzliche Selektion zur Maximierung von Rezipientenstammanteilen.

Die zur Selektion der optimalen Zuchttiere notwendige Charakterisierung der Nachkommen basiert auf der genomweiten Analyse genetischer Marker, die Polymorphismen zwischen den für die Zucht des kongenen Stamms verwendeten Ausgangstämmen aufweisen. Hierzu werden Mikrosatelliten (STR, „*short tandem repeats*“, oft „MIT-Marker“) oder SNPs („*single nucleotide polymorphisms*“) verwendet. Mikrosatelliten bestehen aus der direkt aufeinanderfolgenden Wiederholung von Grundmotiven aus zwei, drei oder vier Nukleotiden und bilden Allele unterschiedlicher Länge aus, die nach Amplifikation mittels PCR als Fragmentlängenpolymorphismen (SSLP, „*simple sequence length polymorphisms*“) identifiziert werden können. SNPs sind Polymorphismen einer einzelnen Base an einem definierten Genomlocus, die mit Hilfe mehrerer Methoden wie RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) oder Sequenzierung der entsprechenden PCR-Produkte oder allelspezifischer PCR identifiziert werden können. Im Unterschied zu Mikrosatelliten sind SNPs in der Regel dimorph, d.h. es existieren für einen spezifischen SNP nur zwei Allele. Sie eignen sich gut für den Einsatz in automatisierten Hochdurchsatzuntersuchungen (z.B. Yang et al. 2009, Morgan et al. 2016).

Das Genom von Tieren der F1-Generation (= F1-Hybride bei Verwendung von Inzuchtstämmen für Donor- und Rezipientenstamm) besteht jeweils zur Hälfte aus Anteilen von Donor- und Rezipientenstamm. In der Regel wird unabhängig sowohl vom Grad der Homozygotie in Donor- und Rezipientenstamm als auch vom Grad der genetischen

¹ <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/index.shtml>; siehe dort „Guidelines for nomenclature of mouse and rat strains“

Übereinstimmung zwischen Donor- und Rezipientenstamm mit der Selektion in der N2-Generation begonnen.

Ein MASP wird häufig allein dazu eingesetzt, den Rezipientenstammanteil an den Loci ohne Kopplung zum selektierten Allel zu maximieren. Für diese Rezipientenstammanteile kann in der Praxis ein Wert von ca. 99,9 % bereits nach 5 - 7 Rückkreuzungsgenerationen erreicht werden (Tab. 1). Der größte Zuchtfortschritt wird dabei in den ersten Rückkreuzungsgenerationen erzielt. Der Zeitaufwand zur Erzeugung eines kongenen Stammes durch beschleunigte Rückkreuzung beträgt bei der Maus damit i.d.R. ca. 1,5 Jahre (Markel et al. 1997, Wakeland et al. 1997, Weil et al. 1997, Visscher 1999, Wong 2002, Armstrong et al. 2006). Der Einsatz reproduktionstechnischer Maßnahmen kann den Zeitaufwand noch weiter verkürzen (z.B. Ogonuki et al. 2009).

Rückkreuzungsgeneration	Rezipientenstammanteil (%)	
	ohne MASP	mit MASP
N1 (=F1)	50,0	50,0
N2	75,0	80,8
N3	87,5	94,0
N4	93,8	99,0
N5	96,9	99,9
N6	98,4	
N7	99,2	
N8	99,6	
N9	99,8	
N10	99,9	

Tab. 1. Einfluss eines Marker-assistierten Selektionsprotokolls (MASP) auf den Anteil des Rezipientenstamms am diploiden Genom eines kongenen Stammes, der keine Kopplung zum selektierten Allel aufweist. Die Werte ohne MASP entsprechen den theoretischen Durchschnittswerten in der Population und können mit der Formel $1 - 0,5^n$ berechnet werden. Die Werte mit MASP wurden für die Untersuchung von 20 Merkmalsträgertieren pro Generation errechnet und experimentell verifiziert (Markel et al. 1997).

Ein MASP kann und sollte auch dazu genutzt werden, um die erhebliche Kontamination der chromosomalen Anteile zu minimieren, die mit dem selektierten Allel gekoppelt sind (Abb. 2). Ohne Verwendung eines MASP für diese Genomanteile kann die Länge (in cM) des mit dem selektierten Allel gekoppelten Donorgenomintervalls auch in diesem Fall ab der Rückkreuzungsgeneration N5 mit der Formel $200 / n$ geschätzt werden. Um das gekoppelte Donorgenom erheblich zu vermindern, ist die Untersuchung einer großen Tierzahl mit den entsprechenden genetischen Markern notwendig. Diese Untersuchung kann in die beschleunigte Rückkreuzung integriert werden oder im Anschluss an die Erstellung des kongenen Stammes erfolgen. Für kongene Stämme mit einer Donorstammkontamination von 20 cM um das selektierte Allel wurde geschätzt, dass die gekoppelte Donorstammkontamination in zwei weiteren Zuchtschritten auf 5 cM verringert werden kann, wenn in jeder Generation 50 Merkmalsträger in den Selektionsprozess zur Minimierung der Donorstammkontamination einer Seite des kongenen Intervalls eingesetzt werden (Silver 1995).

Zur Durchführung der beschleunigten Rückkreuzung sind neben einem geeigneten Protokoll zur Testung auf das zu übertragende Allel im Hinblick auf die Kosten-Nutzen-Abwägung vor allem die Markerauswahl, die Markerdichte, die Differenzierung zwischen Heterosomen (Geschlechtschromosomen) und Autosomen, die Anzahl der für die Selektion erforderlichen Tiere sowie die Anzahl an Rückkreuzungsgenerationen zu berücksichtigen.

3.1 Markerauswahl

Die polymorphen Marker werden so gewählt, dass sie das gesamte Genom abgesehen von den Geschlechtschromosomen (siehe 3.3) gleichmäßig abdecken. Zur Identifizierung der Crossing-over-Ereignisse während der Meiose sind pro Chromosom mehrere polymorphe Marker zu untersuchen, zu deren Auswahl für Maus und Ratte mehrere Datenbanken zur Verfügung stehen (siehe 6.) und Markersets für eine Vielzahl von Inzuchtstämmen publiziert sind (Maus: z.B. Schalkwyk et al. 1999, Witmer et al. 2003, Szatkiewicz et al. 2008, Cox et al. 2009; Ratte: z.B. Bryda und Riley 2008, STAR Consortium 2008). Daneben bieten kommerzielle Dienstleister Tests mit etablierten Markersets als auch die individuelle Zusammenstellung und Testung von Markersets an.

3.2 Markerdichte

In Bezug auf die Markerdichte gilt ein Abstand von weniger als 20 cM als empfehlenswert. Bei einer Gesamtgenomgröße der Maus von mehr als 1.500 cM entspricht das einem Markerset von mindestens 80 gleichmäßig über das Genom verteilten Loci. Eine Computersimulation hat aufgezeigt, dass bei Markerabständen von 10 cM und 25 cM die Wahrscheinlichkeit des Auftretens doppelter Crossing-over-Ereignisse und damit von Kontaminationen durch Donorstamm-DNA vergleichbar gering ist (Wakeland et al. 1997). Allerdings beschrieb eine andere Arbeitsgruppe eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen unerkannter Donorstammgenomanteile und rät zu einer Markerdichte von 10 cM (Armstrong et al. 2006).

Während der Rückkreuzung werden sukzessiv Genomanteile des Rezipientenstamms fixiert. Die fixierten Anteile brauchen in den Folgegenerationen prinzipiell nicht mehr mit Markern getestet werden. Daher kann von Generation zu Generation entschieden werden, ob die Markeranzahl reduziert wird und damit Kosten eingespart werden oder ob eventuell zusätzlich weitere Marker untersucht werden (z.B. zur Reduktion der gekoppelten Donorstammkontamination). Am Ende des Rückkreuzungsprojekts ist eine genomweite genotypische Endkontrolle des erstellten „Speed“-kongenen Stammes empfehlenswert

3.3 Geschlechtschromosomen

Sofern sich das interessierende Allel auf einem Autosom befindet, werden die Geschlechtschromosomen des Rezipientenstamms bei Verwendung des in Abb. 1 gezeigten Zuchtschemas in der F1- und N2-Generation fixiert. Die Verwendung spezifischer Marker für Geschlechtschromosomen ist in diesem Fall nicht erforderlich.

Liegt das interessierende Allel auf dem Y-Chromosom, müssen auch in der ersten Kreuzungsgeneration männliche Merkmalsträgertiere verwendet werden. Das X-Chromosom des Rezipientenstamms wird bereits in der F1-Generation fixiert. Somit ist die Verwendung spezifischer Marker für Geschlechtschromosomen auch in diesem Fall nicht erforderlich. Eine Besonderheit der Lage des interessierenden Allels auf dem Y-Chromosom ist, dass die Selektion auf das Allel vollständig entfallen kann, da in allen Generationen alle männlichen

Nachkommen Trägertiere des interessierenden Allels sind. Das Y-Chromosom des kongenen Stammes besteht vollständig aus Donorstammgenom.

Liegt das interessierende Allel auf dem X-Chromosom, ist anzuraten, dass in allen Rückkreuzungsgenerationen weibliche Trägertiere des interessierenden Allels verwendet werden. Nur so ist gewährleistet, dass das X-Chromosom in jeder Generation die Möglichkeit zur Rekombination hat und so die Größe des auf den kongenen Stamm übertragenen gekoppelten Donorstammanteils möglichst stark reduziert werden kann. Hier empfiehlt sich die Verwendung spezifischer Marker für das X-Chromosom.

3.4 Anzahl der zu testenden Tiere pro Generation

Da der Genomanteil des Rezipientenstamms unter den Nachkommen eine Streuung aufzeigt, die einer Normalverteilung um den theoretischen Durchschnittswert entspricht, steigt mit der Anzahl der getesteten Tiere die Wahrscheinlichkeit, ein Individuum mit relativ hohem Genomanteil des Rezipientenstamms zu finden. Üblicherweise werden pro Generation ca. 10 - 20 Merkmalsträger mittels MASP untersucht und es werden diejenigen 2 - 4 Tiere zur weiteren Rückkreuzung ausgewählt, die den höchsten Anteil an Rezipientenstamm-DNA zeigen (Abb. 3). Die Untersuchung von Tierzahlen von mehr als 30 - 50 bringt keine nennenswerten Vorteile (Markel et al. 1997). In der Regel werden männliche Merkmalsträger verwendet, um durch Anpaarung an mehrere weibliche Tiere des Rezipientenstamms eine hohe Anzahl an Nachkommen erzeugen zu können (Abb. 1). Auswahl und Verpaarung von mehr als einem Merkmalsträger dienen der Vorbeugung potenzieller Fertilitätsprobleme.

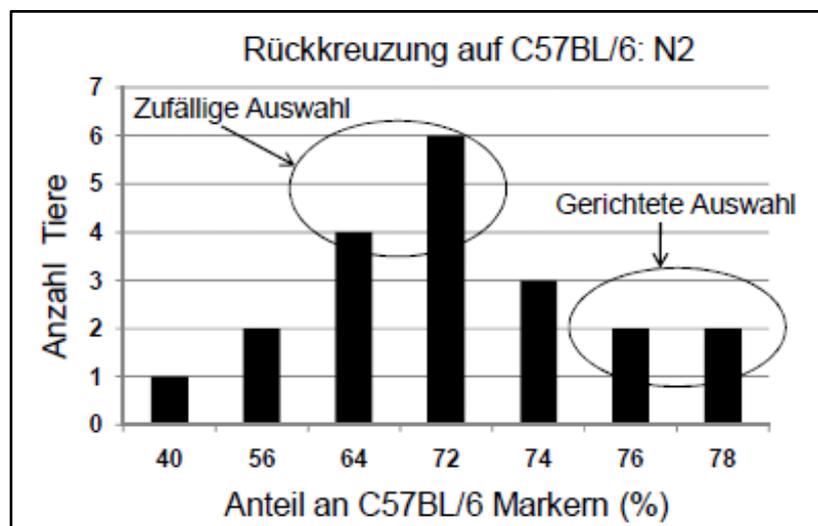


Abb. 3. Beispiel einer Rückkreuzung auf den C57BL/6-Inzuchtstamm, Rückkreuzungsgeneration N2. Es wurden insgesamt 20 N2-Tiere mittels Marker-assistiertem Selektionsprotokoll (MASP) untersucht. Dargestellt ist die Anzahl an Tieren nach ihren verschiedenen Rezipientenstammanteilen. Der Rezipientenstammanteil wurde auf das diploide Genom der Tiere bezogen und errechnet sich theoretisch mit der Formel $1 - 0,5^n$ (n = Rückkreuzungsgeneration). Für die N2-Generation beträgt der theoretische Wert 75 %. Die Abbildung zeigt, dass der Rezipientenstammanteil einer Normalverteilung um den theoretischen Durchschnittswert folgt. Bei zufälliger Auswahl der Zuchttiere für die nächste Rückkreuzungsgeneration ist die Wahrscheinlichkeit am größten, ein Individuum mit durchschnittlichem Genomanteil des Rezipientenstamms auszuwählen. Durch gerichtete Auswahl mittels MASP können gezielt diejenigen Tiere selektiert werden, die die höchsten Rezipientenstammanteile aufweisen

Zur Auswahl der optimalen Tiere für die Zucht der nächsten Rückkreuzungsgeneration kann die größte Anzahl an vollständigen Rezipientenstammchromosomen oder der höchste Gesamtanteil an Rezipientenstammgenom berücksichtigt werden. Simulationsmodelle zeigen für beide Fälle einen ähnlichen Erfolgsfortschritt der Rückkreuzung (Weil et al. 1997). Tab. 2 zeigt eine nach dem letztgenannten Kriterium durchgeführte Selektion. Daneben sind ggf. gekoppelte Loci des kongenen Intervalls und/oder projektspezifische, nicht gekoppelte Loci zu beurteilen.

Marker-Bezeichnung	Chromosomale Position (cM)	N2-1	N2-2	N2-3	N2-4	N2-5	N2-6	N2-7	N2-8	N2-9	N2-10
Chr1-1	10	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0	1,0	0,5
Chr1-2	21	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	0,5
Chr1-3	37	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5
Chr1-4	47	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
Chr1-5	54	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
Chr1-6	67	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
Chr1-7	94	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
Chr1-8	106	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0
Chr1-1	15	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	0,5
Chr1-2	34	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	0,5
Chr1-3	47	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Chr1-4	52	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	0,5	1,0
Chr1-5	58	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0
C57BL/6 Anteil (%)		71,6	82,7	70,9	77,3	75,0	87,4	77,3	71,8	84,1	79,8
Mittelwert der C57BL/6 Anteile (%)		76,9									

Tab. 2. Ausschnitt (nur für die Chromosomen 1 und 19) der Auswertung eines Marker-assistierten Selektionsprotokolls (MASP). Die Rückkreuzung erfolgte auf den Inzuchtstamm C57BL/6. Dargestellt sind die MASP-Ergebnisse von 10 getesteten Tieren (N2-1 bis N2-10) der Rückkreuzungsgeneration N2 für 8 Marker auf Chromosom 1 (Chr1-1 bis Chr1-8, grau unterlegt) und 5 Marker auf Chromosom 19 (Chr19-1 bis Chr19-5, blau unterlegt). Die Werte der Chromosomen 2 bis 18 (Doppelpfeil) sind nicht dargestellt. Für jedes Tier und jeden Marker wird der Rezipientenstammanteil des diploiden Genoms angegeben. Ein gewünschter homozygoter Genotyp (2× Rezipientenstammallel) wird durch die Zahl 1,0 und ein heterozygoter Genotyp (Donorstammallel + Rezipientenstammallel) durch die Zahl 0,5 dargestellt. Der experimentell ermittelte Durchschnittswert des Rezipientenstammanteils am diploiden Genom liegt im vorliegenden Beispiel bei 76,9 % (rot unterlegt, theoretisch erwartet: 75 %). Individuum Nr. N2-9 zeigt den höchsten Anteil und liegt mit 84,1 % (gelb unterlegt) deutlich über dem Mittelwert.

3.5 Anzahl der Rückkreuzungsgenerationen

Ein „Speed“-kongener Stamm kann innerhalb von 5 - 6 Generationen mit einer Kontaminationsrate der nicht gekoppelten Genorte erzeugt werden, die der von konventionellen kongenen Stämmen entspricht (Tab. 1). Dies stellt eine erhebliche Zeitersparnis dar. Für solche „Speed“-kongenen Stämme gehen Simulationsuntersuchungen der Arbeitsgruppe von Armstrong et al. (2006) jedoch von einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen unerkannter, nicht gekoppelter Donorstammgenomanteile aus. Deshalb empfiehlt diese Gruppe, bei „Speed“-kongenen Stämmen nach der Verwendung eines MASP noch 1 - 2 weitere Rückkreuzungsanpaarungen auf den Rezipientenstamm anzufügen. Sofern die gekoppelten Donorstammanteile nicht in das MASP mit einbezogen wurden, besitzen die Nachkommen früher Rückkreuzungsgenerationen „Speed“-kongener Tiere noch erhebliche Donorstammgenomanteile um das selektierte Allel. Der Anteil liegt in der N5-Nachkommengeneration bei ca. 40 cM.

4. Praktische Probleme bei der Herstellung „Speed“-kongener Stämme

4.1 Marker sind nicht informativ für die ausgewählten Stämme

Im Internet stehen Datenbanken zur Verfügung, die Informationen über polymorphe Marker von Inzuchtstämmen anbieten (siehe 6.). Jedoch werden von Experimentatoren auch laborspezifische Substämmen oder nicht gelistete Inzuchtstämmen verwendet. Dadurch sind oft nicht alle ausgewählten Marker informativ für die eigenen Untersuchungen. Abhilfe schafft der Test der Marker in den Ausgangsstämmen und der entsprechenden N1 (= F1) Generation.

4.2 Die informativen Marker sind nicht gleichmäßig im Genom verteilt

Bei der Auswahl der Marker ist darauf zu achten, dass sie gleichmäßig über das Genom verteilt sind und der durchschnittliche Abstand zwischen den Markern auf dem Chromosom etwa 10 - 25 cM (siehe 3.2) beträgt. Insbesondere bei der Verwendung von Mikrosatelliten finden sich dafür in den Datenbanken nicht immer geeignete Marker.

Hier kann es hilfreich sein, informative Mikrosatelliten und SNPs für die Genotypisierung zu kombinieren. Alternativ ist mit Hilfe von Datenbanken im sequenzierten Genom von Maus oder Ratte nach Mikrosatelliten und SNPs zu suchen, für die noch keine Primer existieren, und die gegebenenfalls detektierten Marker für die gewählten Stämme selbst zu testen.

4.3 Niedrige Reproduktionsleistung der Tiere

Die Entwicklung eines „Speed“-kongenen Stammes unter Einsatz von MASP macht nur Sinn, wenn ausreichend viele Nachkommen für die Genotypisierung und für eine erfolgreiche Zucht zur Verfügung stehen. Dafür müssen genug Zuchtpaare angesetzt werden und es muss die Reproduktionsleistung der Kreuzungspartner ausreichend sein, um genügend Nachkommen zu generieren.

Oftmals wirken sich der genetische Hintergrund, eine Mutation, Umweltfaktoren oder der Hygienestatus negativ auf die Reproduktionsleistung aus. Diese Faktoren können das Paarungsverhalten, die Wurfgröße und das Aufzuchtverhalten beeinträchtigen. Einen ersten

Anhaltspunkt für die zu erwartende Reproduktionsleistung bietet der Kolonie-Index² der Ausgangsstämme. Ein weiteres Hindernis bei der Entwicklung kongener Stämme kann eine Verschiebung der Genotypen oder eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses in den Rückkreuzungspopulationen darstellen.

4.4 Beispiele aus der Praxis

Beispiele für praktische Probleme:

- Das mutierte Gen *Dpp4^m* sollte vom Inzuchtstamm F344-*Dpp4^m* in die Inzuchtstämme DA und LEW.Cg-*RT1^{av1}* eingekreuzt werden. Für beide Stammkombinationen (F344-*Dpp4^m* vs. DA und F344-*Dpp4^m* vs. LEW.Cg-*RT1^{av1}*) standen ausreichend genetische Marker zur Verfügung, um den genetischen Hintergrund der jeweiligen Rückkreuzungsgenerationen zu überprüfen. Während der kongene Stamm DA.F344-*Dpp4^m* in der Generation N6 einen homogenen genetischen Hintergrund aufwies, war die Reproduktionsleistung der Kreuzung (F344-*Dpp4^m* × LEW.Cg-*RT1^{av1}*) × LEW.Cg-*RT1^{av1}* so gering, dass die Generation N3 nicht erreicht wurde. Daher wurde alternativ der kongene Inzuchtstamm DA.F344-*Dpp4^m* als Donorstamm eingesetzt, um die *Dpp4* Mutante in den Stamm LEW.Cg-*RT1^{av1}* einzukreuzen. In der Generation N6 hatte der Stamm LEW.Cg (F344)-*RT1^{av1}* *Dpp4^m* einen homogenen genetischen Hintergrund.
- Der Versuch, das Transgen Il-18bp des Mausinzuchtstammes B6-Tg(Il-18bp) in den Stamm MRL-FasLpr einzukreuzen, scheiterte nach der Generation N6, weil mit zunehmender Rückkreuzungsgeneration die Mütter ihre Würfe vollständig auffraßen.
- Für die Entwicklung des kongenen Inzuchtstammes MRL.Cg-Fas_{lpr} Il-18^{tm1Aki}/Ztm konnten 56 informative Mikrosatellitenmarker ermittelt werden. In jeder Generation wurden ca. 40 Nachkommen generiert, von denen die Hälfte heterozygot für das modifizierte Interleukin-18-Allel auf Chromosom 9 waren. Die Männchen mit dem größten Anteil des Rezipientengenoms wurden für weitere Verpaarungen verwendet. Erst in der 13. Rückkreuzungspopulation wurden keine heterozygoten Genorte mehr im genetischen Hintergrund des kongenen Stammes ermittelt. Ein anschließender Test unter Einsatz von 27 SNPs zeigte bei zwei Tieren jedoch immer noch einen heterozygoten Genort auf Chromosom 7.

5. Zusammenfassung

Zur konventionellen Generierung eines kongenen Stammes wird ein interessierendes Allel i.d.R. für 10 Generationen von einem Donorstamm-Hintergrund auf einen Rezipientenstamm-Hintergrund zurückgekreuzt. Dabei erfolgt eine Selektion ausschließlich auf das Vorhandensein des interessierenden Allels. Bei „Speed“-kongenen Stämmen wird darüber hinaus in jeder Generation ab N2 ein Marker-assistiertes Selektionsprotokoll (MASP) zur Maximierung der Rezipientenstammanteile verwendet. Zur Erstellung von „Speed“-kongenen Tieren wird im Hinblick auf die Kosten-Nutzen-Abwägung üblicherweise ein genomweites Markersset mit einem mittleren Abstand der benachbarten Marker von 10 - 20 cM verwendet (1 cM entspricht bei Maus und Ratte etwa 2 Mega-Basenpaaren (Mb)) und pro Generation werden 10 - 20 männliche Merkmalsträger untersucht. Damit können nach 5 – 6

² Der Kolonie-Index bezeichnet die mittlere Anzahl an Nachkommen pro weiblichem Tier und Zeiteinheit.

Kreuzungsgenerationen „Speed“-kongene Stämme generiert werden, deren Anteil an Donorstammgenom ohne Kopplung zum interessierenden Allel dem konventioneller kongener Stämme entspricht. Bei nachgewiesener Fixierung einzelner Genomanteile des Rezipientenstammes können in den nächsten Rückkreuzungsgenerationen zusätzliche Marker verwendet werden. Dringend anzuraten ist die Verwendung von weiteren Markern zur Reduktion des Donorstammgenoms, das das selektierte Allel flankiert. Zur Reduzierung des Restrisikos, dass nach der Erstellung eines „Speed“-kongenen Stamms mit Hilfe des verwendeten Markersets noch unerkannte Donorstammgenomanteile vorhanden sind, ist in Erwägung zu ziehen, noch 1 - 2 zusätzliche Rückkreuzungsanpaarungen auf den Rezipientenstamm durchzuführen. Darüber hinaus führt eine weitere kontinuierliche Rückkreuzung des kongenen Stamms auf den Rezipientenstamm potenziell durch die zusätzliche Verringerung der gekoppelten genetischen Kontamination zu weiteren Veränderungen des genetischen Hintergrundes. Ergebnisse von Untersuchungen verschiedener Rückkreuzungsgenerationen dieses kongenen Stammes sind damit nicht direkt zu vergleichen. Daneben stellt die Zucht und anschließende phänotypische Untersuchung mehrerer unabhängiger kongener Stämme für ein ausgewähltes Allel in demselben Rezipienten-Inzuchtstamm eine mögliche Lösung für das Problem von unerkannten ungekoppelten Donorstammgenomanteilen im kongenen Stamm dar. Als Alternative zu den beschriebenen Zuchtverfahren können mit gentechnischen Methoden Organismen erstellt werden, die dieselben genetischen Zieleigenschaften besitzen wie kongene Stämme (siehe 1.).

6. Internetadressen für polymorphe genetische Marker

Eine Zusammenstellung der Internetadressen für polymorphe genetische Marker findet sich auch in Benavides et al. (2020), siehe dort „Supplementary material“.

6.1 Maus

Ensembl Genome Browser (<https://www.ensembl.org/index.html>)

The Jackson Laboratory (<https://www.jax.org/research-and-faculty/resources>); u.a.

- Mouse Genome Informatics Database (<http://www.informatics.jax.org>); u.a. Mikrosatelliten mit Primersequenzen und Fragmentgrößen (<http://www.informatics.jax.org/marker>)
- Mouse Phenome Database; siehe dort „Genotypes“ (<https://phenome.jax.org/genotypes>)
- Multiple Genome Viewer (<http://www.informatics.jax.org/mgv/>)
- SNP Database (<http://www.informatics.jax.org/snp>)

Mouse Microsatellite Data Base of Japan: SHIGEN (<http://shigen.nig.ac.jp/mouse/mmdbj/>)

Wellcome Sanger Institute: Mouse Genomes Project

(<https://www.sanger.ac.uk/science/data/mouse-genomes-project>)

6.2 Ratte

Ensembl Genome Browser (<https://www.ensembl.org/index.html>)

RGD - Rat Genome Database (<http://rgd.mcw.edu>)

7. Literatur

- Armstrong NJ, Brodnicki TC, Speed TP. 2006. Mind the gap: analysis of marker-assisted breeding strategies for inbred mouse strains. *Mamm Genome* 17:273-287.
- Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MFW, Fisher EMC. 2000. Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet* 24:23-25.
- Behringer R. 1998. Supersonic congenics? *Nat Genet* 18:108.
- Behringer R, Gertsenstein M, Vintersten Nagy K, Nagy A. 2014. *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Benavides F, Rüllicke T, Prins J-B, Bussell J, Scavizzi F, Cinelli P, Herault Y, Wedekind D. 2020. Genetic quality assurance and genetic monitoring of laboratory mice and rats: FELASA Working Group Report. *Lab Anim* 54:135–148.
- Berry ML, Cutler Linder C. 2007. Breeding systems: considerations, genetic fundamentals, genetic background, and strain types. *In: Fox JG, Barthold SW, Davisson MT, Newcomer CE, Quimby FW, Smith AL (eds). The mouse in biomedical research - v.1. History, wild mice, and genetics*. Academic Press, Burlington, MA, p. 53-78.
- Bryda EC, Riley LK. 2008. Multiplex microsatellite marker panels for genetic monitoring of common rat strains. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 47:37–41.
- Canzian F. 1997. Phylogenetics of the laboratory rat *Rattus norvegicus*. *Genome Res* 7:262-267.
- Cox A, Ackert-Bicknell CL, Dumont BL, Ding Y, Bell JT, Brockmann GA, Wergedal JE, Bult C, Paigen B, Flint J, Tsaih SW, Churchill GA, Broman KW. 2009. A new standard genetic map for the laboratory mouse. *Genetics* 182:1335-1344.
- Doetschman T. 2009. Influence of genetic background on genetically engineered mouse phenotypes. *Methods Mol Biol* 530:423–433.
- Hedrich HJ. 2000. History, strains and models. *In: Krinke GJ (ed). The laboratory rat*. Elsevier, London, p 3-16.
- Kaiser J. 2020. Growth spurt for height genetics. *Science* 370:645.
- Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, White MA, Wong K, Yalcin B, Heger A, Agam A, Slater G, Goodson M, Furlotte NA, Eskin E, Nellaker C, Whitley H, Cleak J, Janowitz D, Hernandez-Pliengo P, Edwards A, Belgard TG, Oliver PL, McIntyre RE, Bhomra A, Nicod J, Gan X, Yuan W, van der Weyden L, Steward CA, Bala S, Stalker J, Mott R, Durbin R, Jackson IJ, Czechanski A, Guerra-Assunção JA, Donahue LR, Reinholdt LG, Payseur BA, Ponting CP, Birney E, Flint J, Adams DJ. 2011. Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature* 477:289-294.
- Kenneth NS, Younger JM, Hughes ED, Marcotte D, Barker PA, Saunders TL, Duckett CS. 2012. An inactivating caspase 11 passenger mutation originating from the 129 murine strain in mice targeted for c-IAP1. *Biochem J* 443:355–359.
- Landa V, Zidek V, Pravenec M. 2010. Generation of rat "supersonic" congenic/conplastic strains using superovulation and embryo transfer. *Methods Mol Biol* 597:267-275.
- Lusis AJ, Yu J, Wang SS. 2007. The problem of passenger genes in transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2100-2103.
- Markel P, Shu P, Ebeling C, Carlson GA, Nagle DL, Smutko JS, Moore KJ. 1997. Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nat Genet* 17:280-284.

- Morgan AP, Fu C-P, Kao C-Y, Welsh CE, Didion JP, Yadgary L, Hyacinth L, Ferris MT, Bell TA, Miller DR, Giusti-Rodriguez P, Nonneman RJ, Cook KD, Whitmire JK, Gralinski LE, Keller M, Attie AD, Churchill GA, Petkov P, Sullivan PF, Brennan JR, McMillan L, Pardo-Manuel de Villena F. 2016. The mouse universal genotyping array: from substrains to subspecies. *G3 (Bethesda)* 6:263-279.
- Ogonuki N, Inoue K, Hirose M, Miura I, Mochida K, Sato T, Mise N, Mekada K, Yoshiki A, Abe K, Kurihara H, Wakana S, Ogura A. 2009. A high-speed congenic strategy using first-wave male germ cells. *PLoS ONE* 4:e4943.
- Petkov PP, Ding Y, Cassell MA, Zhang W, Wagner G, Sargent EE, Asquith S, Crew V, Johnson KA, Robinson P, Scott VE, Wiles MV. 2004. An efficient SNP system for mouse genome scanning and elucidating strain relationships. *Genome Res* 14:1806-1811.
- Schalkwyk LC, Jung M, Daser A, Weiher M, Walter J, Himmelbauer H, Lehrach H. 1999. Panel of microsatellite markers for whole-genome scans and radiation hybrid mapping and a mouse family tree. *Genome Res* 9:878-887.
- Silver LM. 1995. *Mouse genetics: concepts and applications*. Oxford University Press, New York, NY. <http://www.informatics.jax.org>; siehe dort "More resources"
- STAR Consortium. 2008. SNP and haplotype mapping for genetic analysis in the rat. *Nat Genet* 40:560-566.
- Szatkiewicz JP, Beane GL, Ding Y, Hutchins L, Pardo-Manuel de Villena F, Churchill GA. 2008. An imputed genotype resource for the laboratory mouse. *Mamm Genome* 19:199-208.
- Taft RA, Davisson M, Wiles MV. 2006. Know thy mouse. *Trends Genet* 22:649-53.
- Uchimura A, Higuchi M, Minakuchi Y, Ohno M, Toyoda A, Fujiyama A, Miura I, Wakana S, Nishino J, Yagi T. 2015. Germline mutation rates and the long-term phenotypic effects of mutation accumulation in wild-type laboratory mice and mutator mice. *Genome Res* 25:1125-1134.
- Vanden Berghe T, Hulpiau P, Martens L, Vandenbroucke RE, Van Wonterghem E, Perry SW, Bruggeman I, Divert T, Choi SM, Vuylsteke M, Shestopalov VI, Libert C, Vandenabeele P. 2015. Passenger mutations confound interpretation of all genetically modified congenic mice. *Immunity* 43:200-209.
- Visscher PM. 1999. Speed congenics: accelerated genome recovery using genetic markers. *Genet Res* 74:81-85.
- Wakeland E, Morel L, Achey K, Yui M, Longmate J. 1997. Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking). *Immunol Today* 18:472-477.
- Weil MM, Brown BW, Serachitopol DM. 1997. Genotype selection to rapidly breed congenic strains. *Genetics* 146:1061-1069.
- Witmer PD, Doheny KF, Adams MK, Boehm CD, Dizon JS, Goldstein JL, Templeton TM, Wheaton AM, Dong PN, Pugh EW, Nussbaum RL, Hunter K, Kelmenson JA, Rowe LB, Brownstein MJ. 2003. The development of a highly informative mouse simple sequence length polymorphism (SSLP) marker set and construction of a mouse family tree using parsimony analysis. *Genome Res* 13:485-491.
- Wong GT. 2002. Speed congenics: applications for transgenic and knock-out mouse strains. *Neuropeptides* 36:230-236.
- Yang H, Ding Y, Hutchins LN, Szatkiewicz J, Bell TA, Paigen BJ, Graber JH, Pardo-Manuel de Villena F, Churchill GA. 2009. A customized and versatile high-density genotyping array for the mouse. *Nat Methods* 6:663-666.

Haftungsausschluss

Die Benutzung der Veröffentlichungen (Fachinformationen, Stellungnahmen, Hefte, Empfehlungen, u. ä.) der GV-SOLAS und die Umsetzung der darin enthaltenen Informationen erfolgt ausdrücklich auf eigenes Risiko. Die GV-SOLAS und auch die Autoren können für etwaige Unfälle und Schäden jeder Art, die sich durch die Nutzung der Veröffentlichung ergeben (z.B. aufgrund fehlender Sicherheitshinweise), aus keinem Rechtsgrund eine Haftung übernehmen. Haftungsansprüche gegen die GV-SOLAS und die Autoren für Schäden materieller oder ideeller Art, die durch die Nutzung oder Nichtnutzung der Informationen bzw. durch die Nutzung fehlerhafter und/oder unvollständiger Informationen verursacht wurden, sind grundsätzlich ausgeschlossen. Rechts- und Schadenersatzansprüche sind daher ausgeschlossen. Das Werk inklusive aller Inhalte wurde unter größter Sorgfalt erarbeitet. Die GV-SOLAS und die Autoren übernehmen jedoch keine Gewähr und keine Haftung für die Aktualität, Korrektheit, Vollständigkeit und Qualität der bereitgestellten Informationen, ebenso nicht für Druckfehler. Es kann keine juristische Verantwortung sowie Haftung in irgendeiner Form für fehlerhafte Angaben und daraus entstandene Folgen von der GV-SOLAS und den Autoren übernommen werden. Für die Inhalte von den in diesen Veröffentlichungen abgedruckten Internetseiten sind ausschließlich die Betreiber der jeweiligen Internetseiten verantwortlich. Die GV-SOLAS und die Autoren haben keinen Einfluss auf Gestaltung und Inhalte fremder Internetseiten und distanzieren sich daher von allen fremden Inhalten. V.i.S.d.P. der Vorstand der GV-SOLAS.