



**HELMHOLTZ
ZENTRUM FÜR
INFEKTIONSFORSCHUNG**

**This is a pre- or post-print of an article published in
Leist, S., Kollmus, H., Pilzner, C., Schughart, K.
Collaborative Cross: An innovative mouse population as
genetic model for humans [Collaborative Cross: Eine
innovative Mauspopulation als genetisches Modell für den
Menschen]
(2013) BioSpektrum, 19 (5), pp. 502-504.**

Themenstichwort: Komplexe Genetik

Collaborative Cross – eine innovative Mauspopulation als genetisches Modell für den Menschen

Sarah Leist, Heike Kollmus, Carolin Pilzner, Klaus Schughart

Abteilung Infektionsgenetik, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH, Braunschweig

The Collaborative Cross (CC) is a genetic reference population of recombinant inbred lines of mice. It is derived from eight genetically diverse founder strains, including inbred laboratory and wild-derived strains. The genome of the CC lines contains a mixture of genomic regions from all founder strains. The CC will represent an extremely valuable future resource to study complex genetics of disease related phenotypes in the mouse model.

Eine Vielzahl der großen Volkskrankheiten wie Krebs, Diabetes und neurodegenerative Erkrankungen entsteht durch das komplexe Zusammenspiel von vielen genetischen Einflüssen. Im Menschen ist es sehr schwer die genetischen Faktoren zu untersuchen, da deren Ausprägung von nicht kontrollierbaren Umweltfaktoren maskiert wird. Zudem ist es aus selbstverständlichen ethischen Gründen nicht möglich, Experimente am Menschen durchzuführen. Die biomedizinische Forschung verwendet deshalb die Maus als Modellsystem.

Erfolge und Limitationen der klassischen Vorwärts-Genetik

Die Vorwärts-Genetik ist der beste Ansatz, um die verschiedenen Gene eines komplexen Erbgangs zu identifizieren: Ausgehend vom Phänotyp wird der Einfluss von Genvarianten auf das Erscheinungsbild untersucht. Ein wichtiges Werkzeug der Vorwärts-Genetik sind Familien von Maus-Inzuchtstämmen, den sogenannten genetischen Referenz-Populationen (GRP=*genetic reference population*), bei denen natürlich vorkommende Genvarianten studiert werden können. Diese Studien ähneln genomweiten Assoziationsstudien (*GWAS=genome wide association study*) beim Menschen. Besteht eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Phänotyp und einem bestimmten Abschnitt des Genoms, spricht man von einem QTL (*quantitative trait locus*) (Abb. 1). So konnten in der Vergangenheit viele Gene in QTLs bei der Maus identifiziert werden, die ebenfalls bei humanen Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielen [1]. Solche Untersuchungen wurden in der Vergangenheit mit klassischen Laborstämmen der Maus durchgeführt. Da diese Stämme jedoch ursprünglich aus Liebhaberzuchten hervorgegangen sind, repräsentieren sie nur einen Teil der vorhandenen genetischen Vielfalt der Mausspezies.

Collaborative Cross – Design und Vorteile

Um GRPs mit größerer genetischer Vielfalt zu generieren, entwickelte eine Gruppe von Wissenschaftlern im Jahr 2002 das Konzept des Collaborative Cross (CC) [2]. Das CC vereint die genetischen Eigenschaften von klassischen Inzuchtstämmen mit denen von natürlich vorkommenden Mauspopulationen.

Für das CC wurden acht parentale Mausstämmen ausgewählt, die nach Verpaarung in einem ausgeklügelten Kreuzungsschema schließlich zu einer Population von ca. 700 Mauslinien führen (Abb. 2). Die Auswahl der parental Stämme wurde in der Forschungsgemeinschaft der Mausgenetiker lange diskutiert und erfolgte auf Grund spezifischer Kriterien. Von den klassischen Laborstämmen wurden fünf ausgewählt: C57BL/6J und A/J, zwei der frühesten Inzuchtstämmen, 129S1/SvImJ, der häufig zur Herstellung von Knock-out Mäusen verwendet wurde, sowie NOD/ShiLtJ und NZO/HILtJ,

als Krankheitsmodelle für Diabetes und Fettleibigkeit. Des Weiteren wurden in das CC-Zuchtschema Inzuchtstämme von Wildmäusen aufgenommen: CAST/EiJ (*Mus musculus castaneus*), PWK/PhJ (*M. m. musculus*) und WSB/EiJ (*M. m. domesticus*). Diese wohl durchdachte Selektion konnte die genetische Vielfalt der Population signifikant erhöhen und deckt 90% der vorhandenen genetischen Variabilität der Spezies *Mus musculus* ab [3].

Es wurde ein strenges Zuchtschema ausgearbeitet, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der parental Genomabschnitte in den CC-Linien zu gewährleisten. Im ersten Schritt wurden die Elternstämme untereinander gekreuzt. Die resultierende G1 Generation wurde untereinander verpaart und führte zur G2 Generation. Das Genom weist zu diesem Zeitpunkt eine Mischung aller acht Elternstämme auf. Die Nachkommen der G2 Generation wurden dann mittels Bruder-Schwester-Verpaarung über mindestens 20 Generationen ingezüchtet. Hierdurch entstehen die CC-Inzuchtlinien mit einer jeweils individuellen Mischung der parental Genomabschnitte im homozygoten Status [4] (Abb. 2). Eine einmalige Kartierung bekannter Genvarianten reicht aus, um den Genotyp für jede Linie und aller ihrer Nachkommen zu bestimmen. Das CC, als Kollektion vieler CC-Linien, kann ähnlich wie die menschliche Population untersucht werden. Es bietet eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber den bisherigen GRPs: eine höhere genetische und phänotypische Variabilität (durch die Aufnahme von Inzuchtstämmen aus Wildfängen), eine höhere statistische Signifikanz (durch eine größere Zahl an Linien) und eine exzellente Kartierungsauflösung (durch die Akkumulation vieler Rekombinationen).

Die Zucht des Collaborative Cross wurde auf Grund des immensen Aufwandes auf drei Standorte weltweit verteilt. In den USA wurde zunächst im Oak Ridge National Laboratory, später an der Universität von North Carolina gezüchtet. Ein zweiter Standort startete im International Livestock Research Institute, Kenia, und wird jetzt in Israel an der Universität von Tel Aviv fortgeführt. In Australien findet die Zucht an der Universität von Westaustralien statt. Fertige CC-Linien werden aus Israel und Australien an die Universität von North Carolina verlagert. Dort finden eine abschließende Genotypisierung und derzeit auch der Vertrieb der Linien statt. Um die CC-Linien für die wissenschaftliche Community schnellst möglichst zugänglich zu machen wird eine zweistufige Verteilungsstrategie verfolgt: Die erste Stufe beinhaltet zwölf CC-Linien, die sofort lieferbar sind. Die zweite Stufe beinhaltet 36 weitere CC-Linien. Der Export der ersten CC-Linien von North Carolina nach Europa erfolgte an das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig. Hier werden zurzeit neun Linien gezüchtet und auf ihre Reaktion im Verlauf einer Influenzainfektion untersucht. Detaillierte Informationen zu den CC-Linien können auf der Homepage der Universität von North Carolina eingesehen werden (www.csbio.unc.edu/CCstatus/). Diese umfassen Sequenzierdaten, die genomische Architektur, Zuchteffizienz, Tipps zur Handhabung und weitere wichtige Informationen.

Erste Ergebnisse mit dem Collaborative Cross

Bereits während ihrer Züchtung wurden die entstehenden CC-Linien (pre-CC-Linien) intensiv für unterschiedlichste Forschungsprojekte genutzt. Hierbei konnten wichtige Erkenntnisse über bestimmte Erbgänge erhalten werden, welche die große wissenschaftliche Bedeutung des CC bereits jetzt untermauern.

Mäuse des parental Stammes WSB/EiJ haben einen charakteristischen weißen Fleck auf der Stirn. Von 111 untersuchten pre-CC-Linien trugen sechs ebenfalls dieses Merkmal. Nachfolgende Analysen identifizierten eine vergleichsweise kleine chromosomale Region auf Chromosom 10 von nur 8,5 Mb, die 52 Genen enthält und die in allen sechs pre-CC-Linien vorkommt. Eines der Gene, die in dieser

Region lokalisiert sind, ist der Kit-Ligand (*Kitl*). Es ist mit abnormaler Fellfarbe assoziiert und stellt daher ein exzellentes Kandidatengen für das Auftreten des weißen Flecks dar (Abb.3) [5]. Weiterhin konnten Kandidaten-Gene für die Anfälligkeit gegenüber *Aspergillus fumigatus* und Influenza A identifiziert sowie die genetischen Grundlagen von verschiedenen hämatologischen Parametern bestimmt werden [6]. Diese Analysen demonstrieren eindrucksvoll, dass die phänotypische Varianz der CC-Linien viel höher ist als die der derzeit vorhandenen GRPs. Die QTL-Intervalle sind sehr klein, sodass die ursächlichen Genvarianten für einen Phänotyp schnell gefunden werden können.

Eine verheißungsvolle Zukunft

Eine weitere Eigenschaft macht das Collaborative Cross zum wohl wichtigsten Werkzeug der Zukunft im Feld der komplexen Genetik: Ein und dieselbe Mauspopulation wird weltweit untersucht werden. Die unterschiedlichsten Fragestellungen werden mit verschiedenartigsten Methoden bearbeitet. Diese Ergebnisse können weltweit gesammelt, verglichen und kombiniert werden. Jede Arbeitsgruppe kann Daten von anderen Gruppen in die eigene Auswertung mit einfließen lassen und von Erfahrungen anderer profitieren [7]. Natürlich kann man von einem experimentellen Mausmodell nicht erwarten, dass es alle komplexen genetischen Erkrankungen des Menschen aufklären wird. Jedoch scheint sich bereits jetzt abzuzeichnen, dass das CC ein Meilenstein für die Aufklärung der biologischen Mechanismen darstellen wird, die menschlichen Erkrankungen zugrunde liegen. Somit wird das CC wesentliche Beiträge in der Translation von wissenschaftlichen Erkenntnissen in die klinische Anwendung liefern.

Literatur

1. Schughart K, Libert C, SYSGENET consortium et al. (2013) Controlling complexity: the clinical relevance of mouse complex genetics. *Eur J Hum Genet* doi: 10.1038/ejhg.2013.79
2. Threadgill DW, Hunter KW, Williams RW (2002) Genetic dissection of complex and quantitative traits: from fantasy to reality via a community effort. *Mamm Genome* 13:175-8
3. Roberts A, Pardo-Manuel de Villena F, Wang W et al. (2007) The polymorphism architecture of mouse genetic resources elucidated using genome-wide resequencing data: implications for QTL discovery and systems genetics. *Mamm Genome* 18:473-81
4. Collaborative Cross Consortium (2012) The genome architecture of the Collaborative Cross mouse genetic reference population. *Genetics* 190:389-401
5. Aylor DL, Valdar W, Foulds-Mathes W et al. (2011) Genetic analysis of complex traits in the emerging Collaborative Cross. *Genome Res.* 21:1213-22
6. Threadgill DW, Churchill GA (2012) Ten years of the collaborative cross. *G3 (Bethesda)* 2:153-156
7. Threadgill D W (2006) Meeting report for the 4th annual Complex Trait Consortium meeting: from QTLs to systems genetics. *Mamm Genome* 17:2-4
8. Nedelko T, Kollmus H, Klawonn F et al. (2012) Distinct gene loci control the host response to influenza H1N1 virus infection in a time dependent manner *BMC Genomics* doi:10.1186/1471-2164-13-411

Korrespondenzadresse:

MSc Sarah Leist
Abteilung Infektionsgenetik

Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH
Inhoffenstr. 7
D-38124 Braunschweig
Tel.: + 49 531 6181 1117
Fax: + 49 531 6181 1199
Sarah.Leist@helmholtz-hzi.de
www.helmholtz-hzi.de

Beschreibung: Arbeitsgruppe/Bild

Sarah Leist, Carolin Pilzner, Heike Kollmus (v. l. n. r.) sind Mitglieder der Abteilung Infektionsgenetik am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, die von Klaus Schughart (Mitte) geleitet wird. Die Arbeitsgruppe untersucht die Wirts-Pathogen-Interaktionen nach Influenza A Infektionen in der Maus und führt zurzeit Studien mit der *Collaborative Cross*(CC)-Population durch.

Abbildungslegenden

Abb. 1: *Quantitative trait locus* (QTL)-Mapping nach Influenza-A-Infektion. Oben: mittlerer Todeszeitpunkt (MTZ) in Linien einer genetischen Referenz-Population (<http://www.genenetwork.org>). Unten: QTL-Mapping identifiziert eine signifikante Korrelation (rote Linie: $p=0,05$) des Phänotyps mit einer genomischen Region des Chromosoms 5 und eine nahezu signifikante Korrelationen auf Chromosom 19 [8]. Die graue Linie zeigt die Signifikanzgrenze für suggestive QTLs ($p = 0,37$)

Abb. 2: Zuchtschema der *Collaborative Cross*(CC)-Referenzpopulation. Die acht Elternstämme (A-H, Bild: Brynn Voy, University of Tennessee) werden untereinander nach einem definierten Zuchtschema gekreuzt und führen nach 20 Generationen zu den CC-Linien, deren Genom jeweils ein einmaliges Mosaik der genetischen Information ihrer Eltern darstellt. (<http://csbio.unc.edu/CCstatus>).

Abb. 3: Phänotypisierung mit pre-*Collaborative Cross*(CC)-Linien. Der weiße Stirnfleck stellt ein segregierendes, phänotypisches Merkmal der CC-Population dar (links CC003, rechts WSB/EiJ). *Quantitative trait locus*-Mapping identifiziert eine signifikante Korrelation dieses Phänotyps mit einer genomischen Region des Chromosoms 10, welche für das Kandidatengen *Kitl* von WSB/EiJ codiert [5].