

Jenseits der Artengrenzen: Mäusezucht in der Petrischale

Breaking species barriers by breeding mice in a dish

Chan, Frank

Friedrich-Miescher-Laboratorium für biologische Arbeitsgruppen in der Max-Planck-Gesellschaft, Tübingen

Korrespondierender Autor/in

E-Mail: frank.chan@tuebingen.mpg.de

Zusammenfassung

Die Ursachen für Unterschiede zwischen den Arten ist ein großes Rätsel in der Biologie. Da Hybride aus Kreuzungen zweier Arten in der Regel steril sind, war eine genetische Kartierung in der Genetik sehr schwierig. Die Forschungsgruppe hat jetzt die bahnbrechende Methode der *in vitro recombination* zum Einsatz gebracht, bei der der Genaustausch direkt im Zellsystem erzielt wird. Dadurch konnten die Unterschiede zwischen Mausarten genetisch kartiert werden. Durch die Überwindung kreuzungsimmanenter Artgrenzen liefert diese Methode nun umfassende Einblicke in die Grundlagen genetischer Variation.

Summary

How species differ from each other is a key question in biology. But genetic mapping between species has been challenging, because hybrid crosses are typically sterile. Combining latest stem cell and genomic techniques, the research group has pioneered *in vitro* recombination to circumvent breeding and directly cause gene exchanges in cells. In this way they have mapped differences between mouse species within weeks and created mouse embryos carrying hybrid mosaic genomes. By circumventing species barriers that prevent interbreeding this work sheds light on the genetic basis of trait variation.

Die genetische Grundlage von Artunterschieden

Schon seit dem Altertum fragt man sich, was am Ende die Unterschiede zwischen den vielen verschiedenen Arten bedingt. Heute können Biologen komplette Genome entschlüsseln, in Echtzeit Gene aufspüren, die sich selbst ein- und ausschalten, und sogar Gene von einer Art in eine andere Art einschleusen. Dennoch ist die Frage, welche Gen-Mutationen beispielsweise eine Hausmaus von ihren wilden Verwandten unterscheiden, immer noch schwer zu beantworten. Dies hängt auch damit zusammen, dass genetische Analysen, wie die von Mendel vor einem Jahrhundert durchgeführten Studien, umfassende Zuchtbemühungen zur Mischung der Genome erfordern. Bedauerlicherweise sind in der DNA-Sequenz des Genoms jeder Spezies viele genetische Barrieren kodiert, die eine Mischung durch Kreuzung verhindern. Diese Barrieren sind praktisch unsichtbar, ihr Code ist nicht entschlüsselt. Wenn wir durch Kreuzung von Individuen verschiedener Arten Hybride züchten, manifestieren sie sich jedoch als schwere Defekte.

In seinem Werk *Die Entstehung der Arten* hat Darwin dem Thema sterile Hybride, zu denen die Maultiere zählen, ein ganzes Kapitel gewidmet [1]. Hybride sind nicht nur deshalb interessant, weil sie aufgrund ihrer Sterilität zur Aufklärung, wie sich Arten bilden und erhalten, beitragen könnten; sie interessieren die Wissenschaftler auch, weil sie die Gene beider Eltern tragen und damit das gesamte Spektrum des Artenunterschiedes – vom Auffälligen bis zum Subtilen, sogar Trivialen – aufweisen. Selbst wenn die Hybridgenome zu Defekten führen, liefern uns diese Fehlbildungen wertvolle Hinweise auf eine genetische Unvereinbarkeit von Arten. Erfolgreiche Kreuzungen über die Artenschranke hinweg lassen viele spannende Entdeckungen erwarten. Mithilfe von modernen Stammzelltechniken und raffinierten genetischen Manipulationen haben die Forscher genau dies gemacht: Sie haben neuartige Kreuzungen zwischen verschiedenen Mausarten hergestellt, und zwar in einer Petrischale, ganz ohne Zucht von Tieren.

Mäusezucht in der Petrischale?

Statt die Artbarrieren mit Gewalt zu überwinden, entdeckten Frank Chan und seine Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter einen verborgenen Weg, der hinter diesen Barrieren liegt. Sie starteten mit einem Hybridgenom, bestehend aus der Labormaus, die im Wesentlichen aus der Hausmausart *Mus musculus* hervorgegangen ist, und deren Schwesterart, der algerischen Maus *Mus spretus*, die sich vor rund 1,5 Millionen Jahren aus der Hausmauslinie entwickelt hat [2, 3]. Statt komplette Mäuse zu züchten, gewannen die Forscher Stammzellen aus der frühen embryonalen Phase, in der das Kreuzungsprodukt aus nur wenigen Zellen besteht [2]. Diese Hybridstammzellen waren genau das, was sie brauchten, denn in diesen Zellen befindet sich das Potenzial, nahezu alle Zelllinien in der Maus zu rekonstruieren - eine als Pluripotenz bezeichnete Fähigkeit. Warum sind die Hybridstammzellen von so großer Bedeutung?

Bei der normalen Zellteilung, der Mitose, sorgen verschiedene genetische Mechanismen dafür, dass jede Tochterzelle eine exakte Kopie jedes mütterlichen und väterlichen Chromosoms erhält. Die hohe Zuverlässigkeit der mitotischen Zellteilung bedeutet, dass im Gegensatz zur Zucht, bei der alle Gene beliebig vermischt werden, alle Gene in genetischer Kopplung zusammengehalten werden. Dadurch lässt sich vermeiden, dass der Genetiker die Effekte eines kausalen Gens von seinem benachbarten *bystander*-Gen unterscheiden muss. Zur Herstellung neuartiger Genkombinationen in der Zellkultur durch Mitose nutzte das Tübinger Team den chemischen Inhibitor ML216, um einen grundlegenden Zellmechanismus zu sabotieren, der über ein Gen mit der Bezeichnung *Bloom-Syndrom (Blm)* gesteuert wird [4, 5, 6]. Normalerweise verhindert *Blm* den Genaustausch während der *Mitose*. Aber die Unterdrückung oder der Verlust der *Blm*-Funktion ermöglicht einen Genaustausch zwischen Chromosomkopien. Das gilt nicht nur für Hybridstammzellen, sondern auch für Patienten, die unter dem *Bloom-Syndrom* leiden – einer Krankheit, die später häufig Krebs verursacht [7]. Es gelang, *Blm* während der ersten Stammzellteilung vorsichtig und vorübergehend gerade so weit zu unterdrücken, dass Genaustausche, sogenannte Rekombinationen, zwischen den verschiedenen Kopien der Mausechromosomen beider Arten möglich waren. Bei präziser Durchführung erzeugt dieser Prozess eine genetische Rekombination, die das Ergebnis einer Züchtung von Tieren nachahmen kann. Da sich der gesamte Prozess in der Petrischale vollzieht, bezeichneten die Wissenschaftler die Technik als *in vitro recombination*. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie sich auch auf ansonsten sterile Hybridgenome anwenden lässt (**Abb. 1a**).

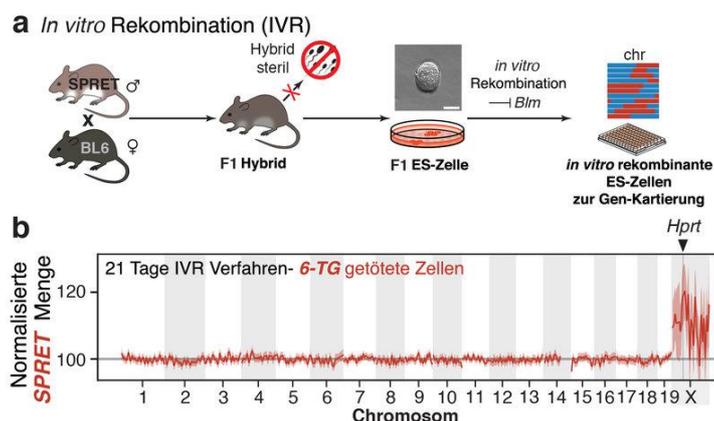


Abb. 1: Mäusezucht in der Petrischale. **(a)** Hybridstammzellen aus einer Kreuzung zwischen der Labormaus (BL6) und einer anderen Art, *Mus spretus* (SPRET), wurden für die Anwendung der *in vitro recombination* Methode mit dem Wirkstoff ML216 versetzt. Diese Substanz unterdrückt das *Bloom-Syndrom*-Gen und führt unter Zellkulturbedingungen während der Zellteilung zu DNA-Austauschen. Die rekombinierten Genome ähneln denen einer herkömmlichen Zucht, obwohl der gesamte Prozess in einer Petrischale stattfand. **(b)** Dank der Zellempfindlichkeit auf den Wirkstoff Tioguanin (6-TG) als Indikator für die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (*Hprt*)-Aktivität sequenzierten die Wissenschaftler die Genome derjenigen Zellen, die nach der 6-TG-Behandlung überlebten beziehungsweise starben und verglichen die Frequenzen der Gene für das gesamte Genom. Das stärkste Signal identifiziert *Hprt*, was bestätigt, dass die *in vitro recombination* dazu beitragen kann, binnen weniger Wochen Artunterschiede in Stammzellen zu identifizieren, ohne Tiere züchten zu müssen.

© Friedrich-Miescher-Laboratorium/Chan

Fast Forward-Genetik

Nachdem die Artenbarriere überwunden war, wollten die Forscher nachweisen, dass sie mithilfe der *in vitro recombination* die Unterschiede zwischen den Mausarten direkt vergleichen und kartieren können. Entscheidend dafür war, dass sie ein sogenanntes *Proof-of-Concept*-Experiment entwickeln konnten, um zu bestätigen, dass sie die bisher als unpassierbar geltende Artbarriere tatsächlich überwunden hatten. Dazu wurden zwei Elemente benötigt: erstens, als Positivkontrolle, ein bereits bekanntes Gen für eine Variation, in der sich beide Arten unterscheiden, und zweitens die Möglichkeit, Millionen von Zellen, von denen theoretisch jede ihre eigene Genkombination haben kann, schnell auf ihren Genotyp hin zu durchsuchen und dessen Phänotyp zu bestimmen.

Die Wahl fiel auf ein Stoffwechsellenzym mit der Bezeichnung Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (*Hprt*), dessen Gen auf dem Geschlechtschromosom X residiert, das in *Mus spretus* nachweislich eine rund 100-fach stärkere enzymatische Aktivität als in der Labormaus *Mus musculus* zeigt. Hilfreich und praktisch in diesen Versuchen ist die Tatsache, dass die Wissenschaftler die *Hprt*-Aktivität nach Behandlung der Hybridstammzellen mit dem Wirkstoff Tioguanin, einem Zytotoxikum, bestimmen: *Hprt* wandelt Tioguanin zügig in eine zelltötende Verbindung um. Mit anderen Worten: Nur rekombinante Stammzellen, deren *Hprt*-Aktivität niedrig ist, überleben eine hohe Tioguanin-Dosis und werden einer genetischen Untersuchung unterworfen.

Friedrich-Miescher-Laboratorium/Chan

Embryonen, zwei Wochen nach Fertilisation und erzeugt aus Standard- beziehungsweise Hybrid-Mosaik Zellen

Das Video zeigt Embryonen, zwei Wochen nach Fertilisation und erzeugt aus Standard- beziehungsweise Hybrid-Mosaik Zellen von *Mus spretus* und *Mus musculus*. Sie wurden nach Kontrastfärbung mittels *X-ray micro-computer tomography* (microCT) mit einer Auflösung von 9,4 µm gescannt. Die Kontrastfärbung erlaubt die Identifikation und das präzise Vermessen einzelner Organe. In den Hybrid-Mosaik Embryonen wurden deutliche Defekte sichtbar, was auf eine Zell-Zell Kommunikation oder aber eine Migration von einzelnen Zellen hindeutet. Weitere Erläuterungen im Text.

Zur einzelnen Messung und Klassifizierung von mehreren Millionen Zellen nutzte das Team die fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, *FACS*. Dabei bugsiert ein moderner Zellsortierer einen Zellstrom durch ein winziges Fenster hindurch. Während einer tausendstel Sekunde, die eine einzelne Zelle für die Passage durch das Fenster benötigte, wurde mit einer aufwändigen Installation aus Lasern, Spiegeln und Detektoren jede Zelle auf einen fluoreszierenden Farbstoff hin untersucht, der lebende von toten Zellen unterscheiden kann und dann elektrische Impulse abgibt, um die Zellen in geordnete Gruppen zu sortieren. Mit dem *FACS*-Verfahren konnte das Team die Zellgesundheit von Millionen Zellen in rasanter Geschwindigkeit messen und sie in wirkstoffresistente oder –anfällige Gruppen aufteilen.

Auf der Grundlage dieser beiden Methoden setzten die Forscher dann nachfolgend die neuesten DNA-Sequenzierungstechniken ein, um *M. spretus* und *M. musculus* Allelfrequenzen zwischen wirkstoffresistenten und –anfälligen Zellenpools zu vergleichen. Würde das Experiment wie erwartet funktionieren, müsste der anfällige Pool wesentlich mehr *M. spretus* Allele enthalten, weil die *M. spretus Hprt*-Kopie wesentlich aktiver in der Umwandlung von Tioguanin ist, was zum Zelltod führt. Tatsächlich zeigten die resultierenden Daten nur an einem einzigen Ort im Genom eine stärkere Ausrichtung auf *M. spretus*-Allele, der punktgenau und wie erwartet auf dem *Hprt*-Gen des Geschlechtschromosoms *X* liegt (Abb. 1b). Der Signalmangel an anderen Stellen im Genom weist umgekehrt darauf hin, dass die *in vitro recombination* die beiden Genome derart effizient umgesetzt hat, dass *Hprt* gegenüber dem Zufallsmix anderer Gene im Genom als Ort herausgegriffen werden konnte, der für die Tioguanin-Anfälligkeit verantwortlich ist. Noch eindrucksvoller war, dass diese Identifizierung ohne Verwendung lebender Mäuse erfolgen konnte und nur 21 Tage Zellkultivierungsbehandlung sowie weitere 5 Tage für ein repliziertes Experiment in Anspruch genommen hat. Wären vergleichbare Experimente mit Hilfe der traditionellen Zucht von Mäusen durchgeführt worden, hätte dies mindestens zwei Jahre und mehrere Zuchtgenerationen gedauert – eine teure, kostenintensive und angesichts der Kreuzungssterilität nahezu unmögliche Aufgabe.

Dieses *Proof-of-concept*-Experiment bestätigt, dass das *in vitro recombination*-Verfahren geeignet sein könnte, die Grundlagen der genetischen Variation zwischen Mauslinien in einem extrem schnellen *Fast-Forward*-Modus mit neuesten Stammzell- und Sequenzierungstechnologien zu kartieren - unter Umgehung der Artenbarriere.

Auf den Kopf gestellte Genetik – unmögliche Hybride werden erzeugt

Mit dem Überspringen des gesamten Entwicklungs- und Zuchtzyklus durch den Einsatz embryonaler Stammzellen hat das Tübinger Team die Genetik völlig umgekrempelt. Jetzt aber stand ihnen eine ziemlich ungewöhnliche Herausforderung bevor: Tatsächlich war der Weg bis zu den rekombinierten Genomen in Stammzellen erst der einfache Teil der Übung. Wäre es jetzt auch möglich, aus diesen Zellen wieder das gesamte Tier herzustellen, um gegebenenfalls die phänotypischen Auswirkungen zu ermitteln, die aus den hybriden Mischgenomen resultieren?

Dazu wandten sich die Forscher an Ronald Naumann vom Max-Planck-Institut für Zellbiologie und Genetik in Dresden, der eine komplizierte Mikroinjektions-Technik perfektioniert hat. Mit einer Laserbohrtechnik konnte er in einem einzigen Schritt ohne weitere Züchtung komplette Mäuse produzieren, die vollständig aus den mikroinjizierten embryonalen Stammzellen stammen. Dies ist ein entscheidendes Detail, da sich die Kreuzungssterilität bereits in der ersten Generation durchsetzt und das Team ohne diese Technik Hals über Kopf wieder zurück in die Artenbarriere gestürzt wäre. Das Ergebnis: Dank dieser Kooperation hat das Team erstmalig „unmögliche Hybrid“-Embryonen aus einer *in vitro recombination* zwischen divergenten Schwestermausarten gewonnen (**Abb. 2**).

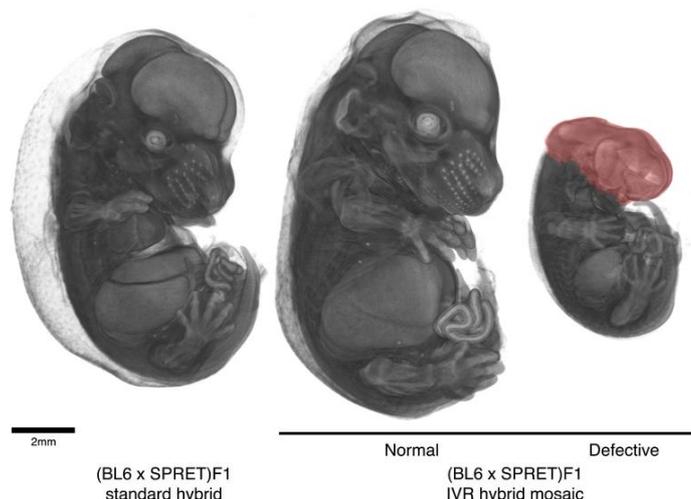


Abb. 2: Unmögliche Hybride. Links: Standard-Hybridmaus-Embryo der ersten Generation, rund 14 Tage alt und rekonstruiert über Röntgen-Mikro-Computertomographie. Mitte und rechts: Hybrid-Mosaikmaus-Embryonen aus Stammzellen nach *in vitro recombination*-Behandlung in ähnlichen Entwicklungsphasen. Diese Stammzellen tragen Genome, die Mosaik-Hybrid-Mischungen sind, die über eine normale Züchtung nicht erreicht werden können und bei denen es sich effektiv um unmögliche Hybride handelt. Diese Hybride unterscheiden sich voneinander und zeigen eine normale Entwicklung (Mitte) sowie Kopfentwicklungsschäden (rechts, die Rotschattierung markiert missgebildete Kopfstrukturen). Eine Untersuchung, wie fehlangepasste Genkombinationen diese Defekte verursachen können, könnte zur Aufklärung grundlegender Entwicklungs- und Zellprozesse sowie von Erkrankungen des Menschen beitragen.

© Friedrich-Miescher-Laboratorium/Chan

Auf den ersten Blick sahen die aus diesem umgekrempelten Ansatz resultierenden Embryonen bemerkenswert normal aus. Genauso wie die Maultier-Kreuzung aus einem Pferd und einem Esel schienen die Genome der Hybrid-Mosaik-Hausmaus und der *M. spretus* Maus gut zusammenzuarbeiten. Bei genauerer Untersuchung stellte sich jedoch heraus, dass ein erheblicher Anteil der Hybridembryonen Fehlbildungen im Schluss des Neuralrohrs aufwies. Bei einem der Embryos war der Defekt so schwerwiegend, dass der Kopf kaum zu erkennen war. Bei Kindern ist die *spina bifida* oder ihre seltene Form, *craniorachischisis* (Kopf-Wirbelspalt), ein Entwicklungsdefekt, der durch beeinträchtigte Zellbewegungen während der Entwicklung verursacht wird [8]. Bei diesen Embryonen haben wahrscheinlich die Hybridgenkombinationen Zellbewegungen oder -kommunikationen unterbrochen. Das ist zwar bedauerlich, aber Beispiele wie diese haben es uns ermöglicht, die Entwicklungs- und Zellprozesse zu verstehen, die die biologischen Grundlagen der Entstehung verschiedener Arten oder von Erkrankungen erhellen. Die Wissenschaftler haben zudem festgestellt, dass sich

die neuartige *in vitro recombination*-Technik ohne Weiteres auch auf induzierte pluripotente menschliche Stammzellen (iPSC) anwenden lässt, um Unterschiede innerhalb und zwischen Individuen in der Petrischale zu kartieren. Mögliche Anwendungen in der personalisierten Genomik wiederum wären die Identifizierung von Mutationen, denen Erkrankungsphänotypen zugrunde liegen, sowie auf spezielle Patienten zugeschnittene Behandlungen.

Fazit

Mit Hilfe von Stammzellen, neuesten Sequenzierungstechniken und transgenen Verfahren haben Chan und Kollegen den Zukunftsweg für eine völlig neue Art von genetischen Untersuchungen aufgezeigt. Mit neuartigen *in vitro recombination*-Methoden lassen sich Genunterschiede in Säugetieren wie Mäusen sicher, schnell und zuverlässig direkt kartieren. Diese Vorgehensweise macht zudem umfassende Zuchtschritte überflüssig, was dazu beiträgt, die große Anzahl von Versuchstieren zu reduzieren. Begrüßenswert wäre, wenn diese Technik bei Anwendung auf menschliche Zellen über das Potenzial verfügt, zu Verbesserungen für Medizin und Therapien beizutragen.

Literaturhinweise

[1] **Darwin, C.**

On the origin of species. Chapter VIII Hybridism

John Murray, London (1859)

[2] **Dejager, L.; Libert, C.; Montagutelli, X.**

Thirty years of *Mus spretus*: a promising future

Trends in Genetics 25, 234-241 (2009)

[3] **Hoche pied, T.; Schoonjans, L.; Staelens, J.; Kreemers, V.; Danloy, S.; Puimège, L.; Collen, D.; Van Roy, F.; Libert, C.**

Breaking the species barrier: derivation of germline-competent embryonic stem cells from *Mus spretus* x C57BL/6 hybrids

Stem Cells 22, 441-447 (2004)

[4] **Nguyen, G. H.; Dexheimer, T. S.; Rosenthal, A. S.; Chu, W. K.; Singh, D. K.; Mosedale, G.; Bachrati, C. Z.; Schultz, L.; Sakurai, M.; Savitsky, P.; Abu, M.; McHugh, P. J.; Bohr, V. A.; Harris, C. C.; Jadhav, A.; Gileadi, O.; Maloney, D. J.; Simeonov, A.; Hickson, I. D.**

A small molecule inhibitor of the *BLM* helicase modulates chromosome stability in human cells

Chemistry & Biology 20, 55-62 (2013)

[5] **Guo, G.; Wang, W.; Bradley, A.**

Mismatch repair genes identified using genetic screens in *Blm*-deficient embryonic stem cells

Nature 429, 891-895 (2004)

[6] **Yusa, K.; Horie, K.; Kondoh, G.; Kouno, M.; Maeda, Y.; Kinoshita, T.; Takeda, J.**

Genome-wide phenotype analysis in ES cells by regulated disruption of *Bloom's syndrome* gene

Nature 429, 896-899 (2004)

[7] **German, J.; Bloom, D.; Passarge, E.**

Bloom's syndrome XI. Progress report for 1983

Clinical Genetics 25, 166-174 (1984)

[8] **Greene, N.; Copp, A.**

Neural tube defects

Annual Review of Neuroscience 37, 221-242 (2014)