

Erbfehlersuche I – Verwendung von genomweiten genetischen Markern (SNP-Chips)

Hermann Schwarzenbacher

1. Einleitung

Die jüngsten Entwicklungen in der Rinderzucht haben uns wieder daran erinnert, dass der Umgang mit Erbfehlern fester Bestandteil der Tierzucht ist. Die modernen Methoden der Genomforschung erlauben es heute, Erbfehler schnell zu identifizieren und damit in der Selektion zu berücksichtigen. Mit der Anzahl der auf diese Weise identifizierten genetischen Varianten steigt jedoch auch die Herausforderung einer fachlich fundierten Berücksichtigung dieser Informationen im Zuchtprogramm. Die Fleckviehzucht in Österreich und Deutschland hat sich für eine transparente und offensive Vorgangsweise in dieser Thematik entschieden und damit die Weichen für die Zukunft richtig gestellt.

In diesem Artikel sollen aktuelle Methoden der Identifikation von Erbfehlern vorgestellt werden. Im Teil I wird auf die Nutzung genomweiter Markerinformation, den sogenannten SNP-Chips, eingegangen. Zum besseren Verständnis der nachfolgenden Ausführungen sollen zunächst jedoch einige wichtige Begriffe geklärt werden:

2. Begriffsklärungen: Snips & Chips

SNP (Single Nucleotide Polymorphism, "Snip")

Einzelne variable Position (z.B. A oder C) in der insgesamt rund 3 Mrd. Bausteine (*Nukleotide*) umfassenden DNA. Jeder dieser beiden möglichen Zustände wird auch als *Allel* bezeichnet. Da die gesamte DNA doppelt angelegt ist, sind bei einem SNP drei Genotypen möglich: reinerbig (*homozygot*) AA bzw. CC oder mischerbig (*heterozygot*) AC.

Chip Technologie

Verfahren mit dem SNP kostengünstig und sehr genau bestimmt (*genotypisiert*) werden können. Ein *Chip* umfasst meist 24 Tiere die jeweils an mehreren 1.000 SNP genotypisiert werden. Man teilt Chips nach SNP Anzahl in "low density", (bis 10.000 SNP), „standard density“ (10.000-100.000 SNP) und „high density“ (derzeit bis zu 780.000 SNP) ein.

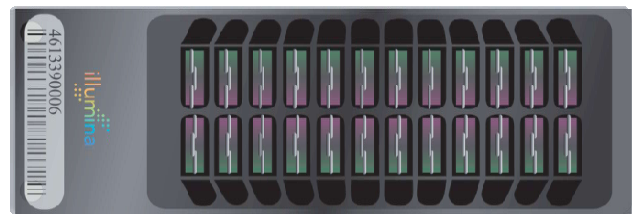


Abb. 1: SNP Chip für die Typisierung von 24 Tieren (www.illumina.com)

Haplotyp

Das gesamte Erbgut ist beim Rind in 30 Einheiten (*Chromosomen*) unterteilt. DNA-Bausteine am selben Chromosom, wurden vom Vater oder von der Mutter vererbt und werden auch meist gemeinsam an die Nachkommen weitergegeben. Die so vererbten DNA Abschnitte werden als *Haplotypen* bezeichnet.

Im Durchschnitt kommt es innerhalb eines Chromosoms pro Generation ein mal zu einem Vorgang der als Rekombination oder „*Crossing Over*“ bezeichnet wird. Dadurch werden DNA Abschnitte der Mutter mit jenen des Vaters innerhalb eines Chromosoms neu kombiniert und so an die Nachkommen vererbt.

Erbfehler und genetische Besonderheiten

Eine plötzlich auftretende Veränderung im Erbgut (*Mutation*) kann die Funktion eines Gens bzw. dessen Regulation stören. Oft reicht bei heterozygoten Trägern die Funktion eines

unveränderten Allels aus, um die Genfunktion aufrecht zu erhalten. Erst wenn beide Allele mutiert sind, kommt der Erbfehler zur Ausprägung (*rezessiver Erbgang*). Bei *Letalfaktoren* führt dies zum Tod des Tieres vor der Geschlechtsreife. Bei genetischen Besonderheiten ist das Tier zwar gesund, aber bestimmte Störungen (z.B. Unfruchtbarkeit) treten auf. Da selbst bei Allelfrequenzen von 10% nur jedes hundertste Tier reinerbig ist, bleiben solche Erbdefekte lange verdeckt und können sich daher unbemerkt in der Population verbreiten. Besonders schwierig zu finden sind Erbfehler mit *komplexem Erbgang*. Hier sind meist viele Genorte beteiligt, und oft spielen auch Umwelteinflüsse eine Rolle.

2. Ansätze der Suche nach Erbfehlern

Um einen Erbfehler effizient im Zuchtprogramm berücksichtigen zu können, müssen heterozygote Erbfehlerträger mit hoher Zuverlässigkeit erkannt werden. Daher ist es entscheidend, dass die betroffene Genomregion oder im Idealfall die verantwortliche Mutation, schnell identifiziert wird. Traditionell war das Auftauchen von Kälbern mit auffälligen Veränderungen der Ausgangspunkt dieser Erbfehlersuchen:

2.1 Phänotypen-getriebener Ansatz: Fallbeispiel Zwergwuchs (DW)

Die Analyse der väterlichen- und mütterlichen Abstammung dient zunächst der Suche nach Vorfahren über die Homozygotie an der vermuteten Mutation eingetreten sein könnte. Über genomweite SNP Daten kann das Erbgut dann nach Haplotypen abgesucht werden, die reinerbig, also in zwei identischen Kopien, vorliegen.

Anfang Mai 2013 hat ein Tierarzt in der ‚Rinderrunde‘, dem Internet Forum der ZAR, einen Hinweis gepostet, dass beim Stier *WILLE* eine Häufung von Zwergwuchskälbern zu beobachten wäre. In der Fleckviehzucht ist der Zwerg-

wuchs seit den 70er Jahren bekannt und wurde auf den Stier POLZER (Jg. 1959) zurückgeführt. Über zwergwüchsige Nachkommen erkannte Anlageträger wurden in den Folgejahren aus der Zucht genommen, bzw. wurden Züchter bei Vererbern aus dieser Linie, mit dem Hinweis ‚nicht auf POLZER einsetzen‘ gewarnt. Zwergwuchsfälle wurden in den folgenden Jahrzehnten zunehmend seltener beobachtet. Bei betroffenen Kälbern fallen neben den niedrigen Geburtsgewichten von 15-20 kg und dem deutlichen Zurückbleiben im weiteren Wachstum vor allem die Schädelform auf. Kennzeichnend sind hier eine auffallend gerade Nasenlinie, ein meist schmaler Kopf mit einer spitzen Dreiecksform und häufig, aber nicht immer, eine Unterkieferverkürzung (Abbildungen 1 und 2).

Zum Zeitpunkt des Hinweises in der Rinderunde waren in der Datenbank RDV zwei lebende Zwergwuchskälber von *WILLE* registriert. Insgesamt war die Häufung von rund 20 gemeldeten Zwergwuchsfällen bei über 20.000 Geburten relativ unauffällig. Die beiden Kälber wurden mit einem SNP-Chip typisiert und einer genauen tierärztlichen Untersuchung sowie der Sektion zugeführt.

In der statistischen Auswertung wurde nach Haplotypen gesucht, die bei beiden Zwergwuchsfällen reinerbig vorliegen, aber in der Fleckviehpopulation insgesamt sehr selten sind. Dieses Muster konnte nur in einer Genomregion auf dem 3. Rinderchromosom beobachtet werden. Die Frequenz des betreffenden Haplotyps liegt bei nur 0,7% bei 30.000 genotypisierten Fleckviehtieren. Durch die Initiative der Oberösterreichischen Besamungsstation konnten innerhalb kürzester Zeit 18 zusätzliche Fälle von Zwergwuchs genotypisiert werden, wodurch die Genauigkeit der Kartierung nochmals deutlich anstieg (Abbildung 3). Mitarbeiter der TU München konnten innerhalb weniger Wochen in diesem Abschnitt der DNA eine Mutation identifizieren die mit hoher Wahrscheinlichkeit verantwortlich für den Erbfehler ist (siehe Erbfehlersuche, Teil II).



Abb. 1-2: Typisches Erscheinungsbild des Zwergwuchses beim Fleckvieh (Fotos: Schwarzenbacher)

Am 24. Juni 2013, also nur sieben Wochen nach den ersten Hinweisen, wurden bereits Trägerlisten bei Besamungstieren im Internet veröffentlicht. Besonders entscheidend war diese Information bei der Ankaufentscheidung der vielen Söhne dieses Topvererbers. Jedes Tier, das in die genomische Zuchtwertschätzung eingeht, wird seither über einen Haplotypentest auf Zwergwuchs untersucht.

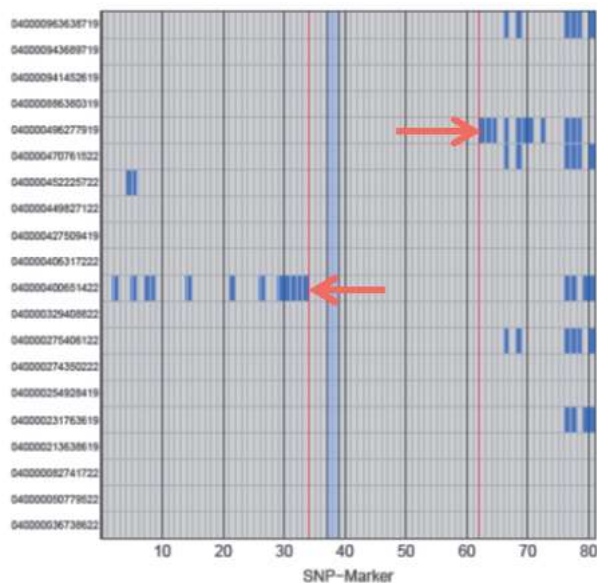


Abb. 3: Haplotypen von 20 Zwergwuchsfällen in der Genomregion in der die Zwergwuchsmutation liegt. Das Segment umfasst insgesamt 80 SNP Marker bzw. rund 6 Mio. Basenpaare (Mb). Hellblaue Zellen symbolisieren reinerbige SNP, dunkelblau sind heterozygote Marker dargestellt. Zwei Tiere erlauben es, das Segment auf rund 2 Mb einzuzugrenzen (rote Pfeile).

2.2 Genotypen-getriebener Ansatz: Fallbeispiel Braunvieh Haplotyp 2 (BH2)

Auch beim Braunvieh liegen inzwischen äußerst umfangreiche Genotypendaten vor. Dies eröffnet neue Möglichkeiten der Identifikation von Erbfehlern bzw. Genen mit starken Einzelwirkungen. Das Innovative an diesen Ansätzen ist, dass nicht mehr abgewartet werden muss, bis Erbfehler bei homozygoten Tieren in Erscheinung treten, sondern prospektiv und damit frühzeitig nach solchen Gendefekten gesucht werden kann.

Einer dieser Ansätze ist die Suche nach Haplotypen, die nur heterozygot, aber nicht homozygot vorkommen (VanRaden et al., 2011). Die zugrundeliegende Hypothese ist, dass homozygote Tiere aufgrund rezessiver Gendefekte nicht überlebensfähig sind. Der Abgang homozygoter Merkmalsträger kann während der Trächtigkeit, als embryonaler Frühtot, bei der Geburt oder in der Aufzuchtphase eintreten. Dies kann untersucht werden, indem Fruchtbarkeitsparameter (z.B. der Anteil erfolgreicher Besamungen), die Totgeburtenrate und die Kälbersterblichkeit bei Risikoanpaarungen analysiert und zu Populationswerten verglichen werden. Beispielsweise erwartet man bei Anpaarungen von heterozygoten Anlageträgern an Kühe deren Väter ebenfalls Träger des Gendefekts sind, dass im Durch-

schnitt jedes 8. Kalb aufgrund eines reinerbigen Letalgenstatus verendet. Mehr als 4.600 Braunviehgenotypen wurden herangezogen um genomweit nach Haplotypen mit fehlenden homozygoten Trägern zu suchen. Unter anderem wurde auf Chromosom 19 eine solche Region gefunden, die nicht im homozygoten Zustand vorliegt (Abbildung 4). Die Häufigkeit dieses als Braunvieh Haplotyp 2 (BH2) bezeichneten DNA-Abschnittes liegt bei rund 7% in der Braunviehpopulation.

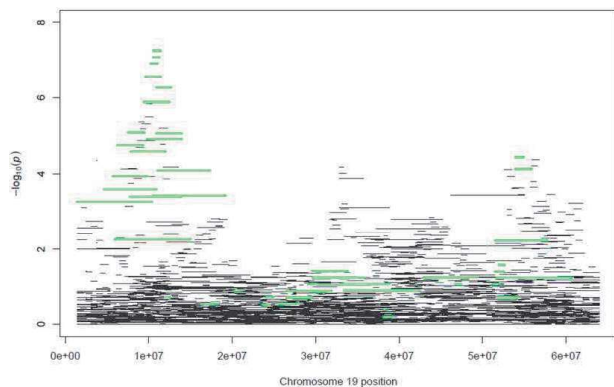


Abb. 4: Test auf die Abweichung der beobachteten Anzahl von Tieren mit homozygoten Haplotypen relativ zur erwarteten Anzahl auf Chromosom 19 (horizontale Achse: Position in Mb; vertikale Achse: Signifikanzniveau). Grün dargestellt sind Haplotypen, die bei keinem untersuchten Tier homozygot auftreten.

Um den Effekt dieses Haplotyps abzusichern, wurden alle Besamungstiere, die Träger für BH2 sind, markiert und Ausfallraten bei Risikoanpaarungen (Besamungstier und Kuhvater BH2 Träger) untersucht. Ausgewertet wurde sowohl der Anteil erfolgreicher Besamungen (Abbildung 5) als auch die Totgeburtenrate sowie die Abgänge während des ersten Lebensjahres (Abbildung 6). Während sich in der Risikogruppe beim Anteil erfolgreicher Besamungen bereits eine leichte Reduktion von 2,7% zeigt, wird eine um 4% höhere Sterblichkeit innerhalb der ersten 10 Lebenstage und eine um 4,6% höhere Sterblichkeit innerhalb des ersten Lebensjahres auffällig. Die durch BH2 verursachten Abgänge passieren also vor allem um den Zeitpunkt der Geburt. Zum Vergleich dazu ist bei Risikoanpaarungen mit Trägern der Spinalen Muskelatrophie (Krebs et al., 2007), die erhöhte Sterblichkeit

mit 2,3% bis zum 10. Tag und 6% innerhalb des ersten Jahres ähnlich hoch. Seit September 2013 werden international alle BH2 Träger veröffentlicht. Jedes Tier, das in die genomische ZWS eingeht, wird mittels Haplotypentest auf BH2 untersucht.

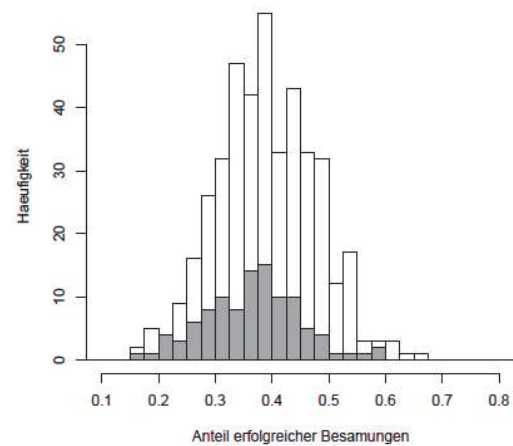


Abb. 5: Anteil erfolgreicher Besamungen bei Risikoanpaarungen (graue Balken: Vater und Muttersvater Träger von BH2) im Vergleich zu Anpaarungen mit normalem Risiko (farblose Linie: Vater frei, Muttersvater Träger von BH2).

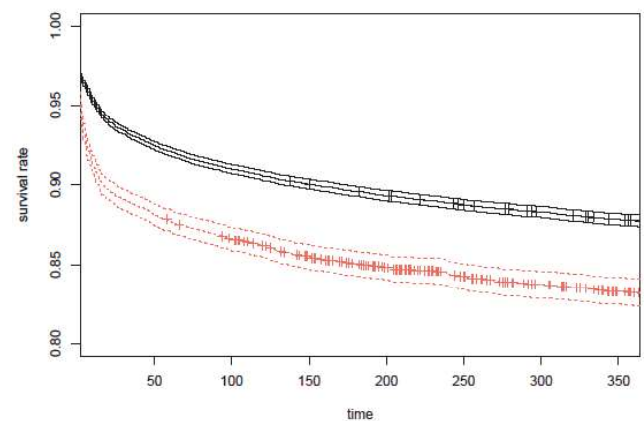


Abb. 6: Überlebensrate während des ersten Lebensjahres bei Risikoanpaarungen (rote Linie: Vater und Muttersvater Träger von BH2) im Vergleich zu Anpaarungen mit normalem Risiko (schwarze Balken: Vater frei, Muttersvater Träger von BH2). Die strichlierten Bereiche geben die 95%igen Vertrauensbereiche an.

Inzwischen konnten bei Kandidaten zur genomischen Zuchtwertschätzung vereinzelt auch reinerbige BH2 Träger beobachtet werden.

Darüber hinaus wurde in Zusammenarbeit mit der ARGE Braunvieh, der Braunvieh Schweiz, der TU München und Veterinärmedizinischen Universität in Wien und Zürich gezielt nach reinerbigen BH2 Kälbern gesucht um das, durch die Mutation verursachte Krankheitsge-

schehen, aufzuklären. Die bisher beobachteten Fälle zeigen unter anderem geringe Geburtsgewichte, hohe Krankheitsanfälligkeit und eine sehr hohe Sterblichkeit (Abbildungen 7 und 8).



Abb. 7-8: Homozygoter BH2-Träger mit einem gleich alten gesunden Vergleichstier (Foto: Birkenmaier).

3. Zusammenfassung

Durch die Verfügbarkeit von genomweiten SNP Daten können heute Erbfehler in vielen Fällen schnell aufgeklärt werden. Darüber können über genotypen-getriebene Ansätze Erbfehler bereits vor dem Auftauchen der ersten Missbildungen frühzeitig erkannt werden. Es ist sehr erfreulich, dass diese neuen Werkzeuge in der deutsch-österreichischen Rinderzucht konsequent genutzt werden.

4. Literatur

- Krebs S, Medugorac I, Röther S, Strässer K, Förster M. (2007): A missense mutation in the 3-ketodihydrosphingosine reductase FVT1 as candidate causal mutation for bovine spinal muscular atrophy. PNAS 104(16): 6746-51.
- VanRaden P, Olson KM, Null DJ, Hutchison JL. (2011): Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. J. Dairy Sci. 94: 6153-6161.

