

## **Artikel für den Förderungsdienst**

### ***Analyse der genetischen Variabilität der Lipizzanerrasse mittels molekular- und zytogenetischer Methoden***

<b>Projektnummer:</b>	<b>Forschungsprojekt Nr. L 1083/97</b>
<b>Projekttitle:</b>	<b>Analyse der genetischen Variabilität der Lipizzaner-Rasse mittels molekular- und zytogenetischer Methoden</b>
<b>Laufzeit:</b>	<b>01.10. 1997 bis 1. 10. 2000, 36 Monate</b>
<b>Forschungsstelle:</b>	Ludwig Boltzmann-Institut für immuno-, zyto- und molekulargenetische Forschung Veterinärplatz 1, A-1210 Wien
<b>Projektleiter:</b>	O. Univ. Prof. DI. DDr. habil. Dr. h.c. Gottfried Brem Tel. 0043-01-25077-5600
<b>Kooperationspartner:</b>	Prof. Burkhard Mayr Ao. Univ. Prof. Dr. Hans Sölkner Prof. Dr. Peter Dovc

#### **Einleitung und Problemstellung**

Vorrangiges Ziel des geförderten Projektes "Analyse der genetischen Variabilität der Lipizzanerrasse mittels molekular- und zytogenetischer Methoden" war es, einen Großteil der heute lebenden Lipizzanerpopulation genetisch zu charakterisieren. Aufgrund der besonderen Rolle des Kladrubers als Mitbegründer der Lipizzanerrasse (Gründerhengst Favory 1779) wurden zu Vergleichszwecken zusätzlich 50 Kladruber (Schimmel und Rappen) aus den Gestüten Kladruby bzw. Slatinany mit in die Untersuchung einbezogen. Insgesamt wurden 616 Pferde aus verschiedenen Staatsgestüten Blutproben entnommen (Tabelle 1). Die Blutproben dienten als Ausgangsmaterial für die Typisierung von variablen autosomalen DNA-Mikrosatelliten(MS)-Markern sowie für die Sequenzierung von definierten Mitochondrien(mt)-DNA-Abschnitten. Außerdem wurden aus den Blutproben Chromosomenpräparate hergestellt und zytogenetisch untersucht.

**Tabelle 1:** Untersuchte Lipizzaner- bzw. Kladrubergestüte und Anzahl gesammelter Blutproben

Gestüt [Land]	Hengste	Stuten	gesamt
Beclean [RO]	4	24	28
Djakovo [HR]	15	40	55
Fagaras (Simbata de Jos) [RO]	9	81	90
Lipica [SLO]	19	40	59
Monterotondo [I]	13	50	63
Piber [A]	72	81	153
Szilvásvárad [H]	8	68	76
Topol'cianky [SL]	5	37	42
Kladruby [CZ]	10	20	30
Slatinany (Kladruby) [CZ]	10	10	20
total	165	451	616

Die wichtigsten Ziele bzw. Fragen, die es zu untersuchen galt, waren folgende:

- Darstellung der genetischen Diversität des Lipizzaners mit Hilfe von DNA-MS- und mt-DNA-Markern
- Vergleich der genetischen Diversität des Lipizzaners mit der anderer Pferderassen
- Inwieweit kann über molekulargenetische Analysen der Inzuchtgrad eines Tieres abgeschätzt werden ?
- Ausmaß der genetischen Differenzierung der untersuchten Lipizzanerpopulationen (Gestüte)
- Einsatz und Validierung der DNA-MS- und mt-DNA-Analyse zur Überprüfung von Eltern-Nachkommen-Beziehungen bzw. ganzen Teilen von Stammbäumen (z.B. Stutenlinien)
- Überprüfung, ob der Chromosomenstatus innerhalb der Lipizzanerpopulation auffällige Aberrationen zeigt (PRINS-Telomeren- und Giemsa-Band-Technik)

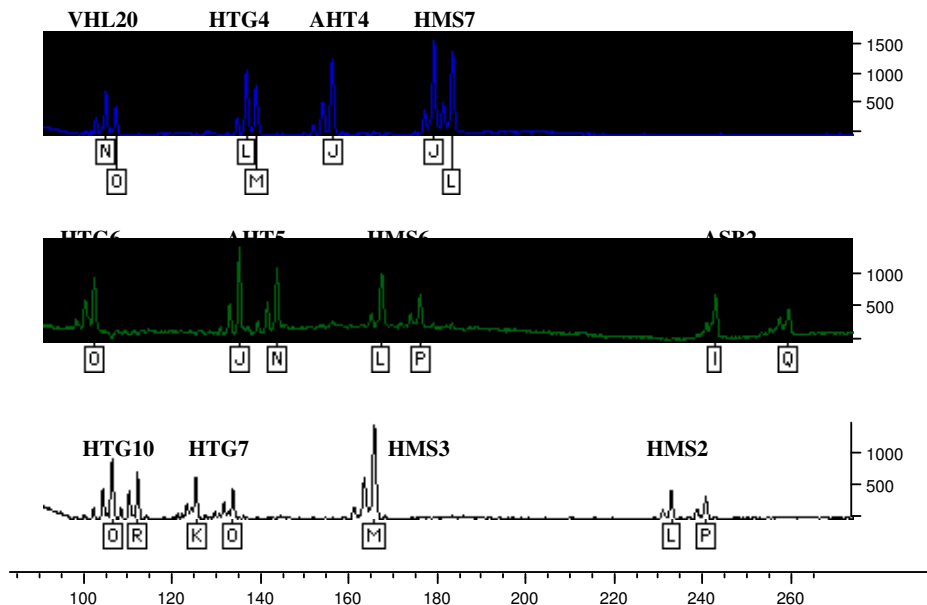
## **Ergebnisse & Diskussion**

### *Genetische Diversität des Lipizzaners*

Insgesamt wurden 22 pferdespezifische DNA-MS-Marker nach Amplifikation mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Primern und anschließender Auftrennung der Amplifikationsprodukte auf einem Kapillarelektrophoresegerät typisiert (Abbildung 1). Mit allen untersuchten MS-Markern wurden 153 verschiedene Allele identifiziert. Die mittlere Anzahl an Allelen, die für einen MS-Marker nachgewiesen werden konnte, betrug 6,95 (Maximum: 11; Minimum 3). Die mittlere Anzahl an Marker-Allelen unterschied sich zwischen den Gestüten signifikant (Abbildung 2A). Das Gestüt Piber zeigte im Vergleich zu Monterotondo und Kladrubern (Rappen) eine signifikant höhere Alleldiversität. Die höhere Diversität in Piber hängt jedoch vermutlich ursächlich mit den großen Unterschieden im Stichprobenumfang, der für die einzelnen Gestüte untersucht wurde, zusammen. Je größer die untersuchte Stichprobe ist, umso wahrscheinlicher ist es, daß auch Allele, die nur in

geringer Häufigkeit vorkommen, identifiziert werden und dann zur gesamten Alleldiversität beitragen.

**Abbildung 1:** Elektropherogramm eines Kapillarelektrophoreselaufes. Dargestellt sind Amplifikationsprodukte für 12 DNA-MS-Marker eines Lipizzaners. Allele sind mit einem Buchstabencode benannt. Über die Skala läßt sich die Länge der Allele in Basenpaaren ablesen.

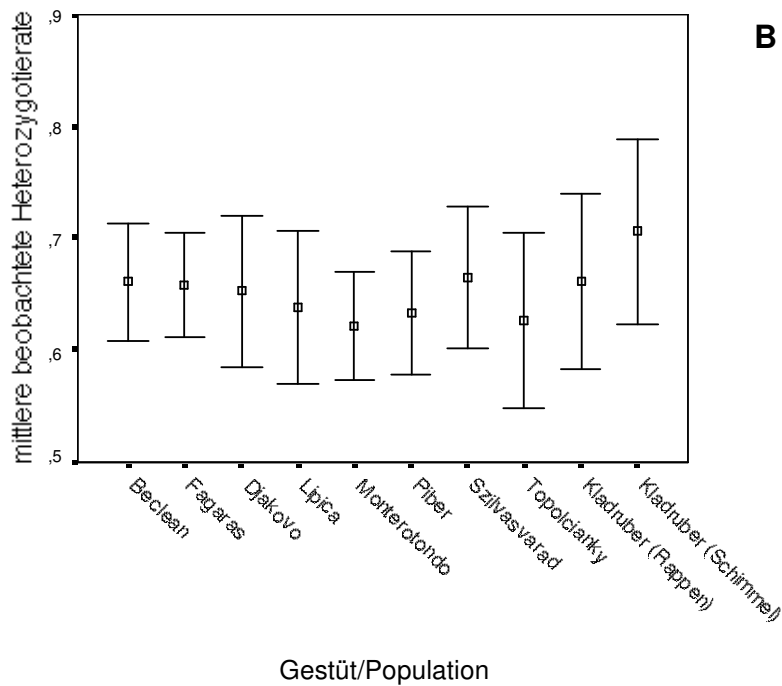
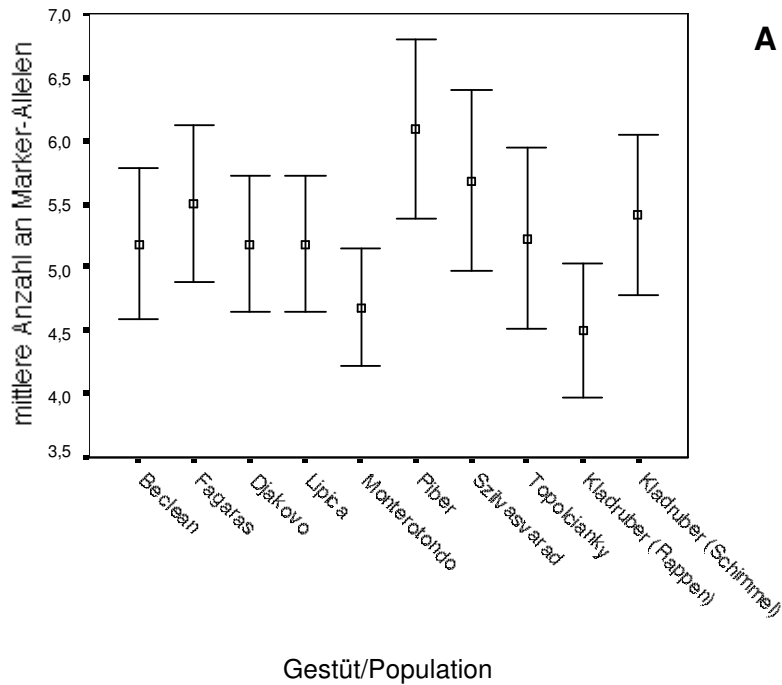


In der untersuchten Lipizzanerpopulation traten 19 Allele (12,4 %) mit einer Häufigkeit von weniger als 1 % auf. Das bedeutet, daß diese Allele nur bei sehr wenigen Lipizzanern (bei ein bis 10 Pferden) nachgewiesen werden konnten. Für seltene Allele besteht im Vergleich zu häufigeren Allelen eine größere Gefahr durch Einflußfaktoren wie z.B. genetische Drift oder Selektion aus der Population verloren zu gehen. Unter der Annahme, daß die Variabilität von DNA-MS ein Maß für die gesamte genetische Diversität der Population ist, würde der Verlust von seltenen MS-Allelen auch einen Verlust für die Vielfalt an züchterisch relevanten Genomabschnitten, nämlich den Genen, bedeuten, der vermieden werden sollte. Interessanterweise traten 37 % der "seltenen" Allele nur in den beiden rumänischen Gestüten Fagaras und Beclean auf. Eine Erklärung für das Auftreten solcher "rumänischer" Allele könnte der vermehrte Einsatz von Stuten aus der rumänischen Landeszucht zu Beginn des 20. Jahrhunderts sein. Wenn diese Allele tatsächlich authentische Lipizzanerallele und nicht das Resultat von Einkreuzungen anderer Rassen sind, dann stellen rumänische Lipizzaner möglicherweise eine wertvolle Reserve für den Genpool des Lipizzaners dar.

Die beobachtete Heterozygotierate der untersuchten MS-Marker variierte von 51 bis 82 % (gemittelt über Gestüte). Die mittlere Heterozygotie (Mittelwert über alle Marker und Gestüte), die ein Maß für die genetische Diversität der Population darstellt, betrug 67 %. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Heterozygotierate zwischen Gestüten festgestellt werden (Abbildung 2B). Obwohl der Lipizzaner eine vergleichsweise kleine Populationsgröße aufweist, ergibt der Vergleich der Alleldiversität bzw. der Heterozygotierate mit der anderer Pferderassen

(z.B. Englisches Vollblut, Trakehner, Haflinger oder Quarter Horse) keine Hinweise auf ausgeprägte Rassenunterschiede oder eine eingeschränkte genetische Diversität des Lipizzaners. Die molekulargenetischen Daten lassen nicht erkennen, daß Verwandtschaftspaarung (Inzucht) im großen Ausmaß stattfindet. Zytogenetische Untersuchungen ergaben ebenfalls keinen Hinweis auf auffällige Aberrationen, so daß sich die untersuchte Lipizzanerpopulation als "normale" Pferderasse darstellt.

**Abbildung 2:** A) Anzahl an nachgewiesenen Allelen und B) beobachtete Heterozygotierate (Mittelwert über 22 MS-Marker  $\pm$  95 % Konfidenzintervall) in Lipizzanergestüten bzw. Kladrubern. Kladruberpopulationen).

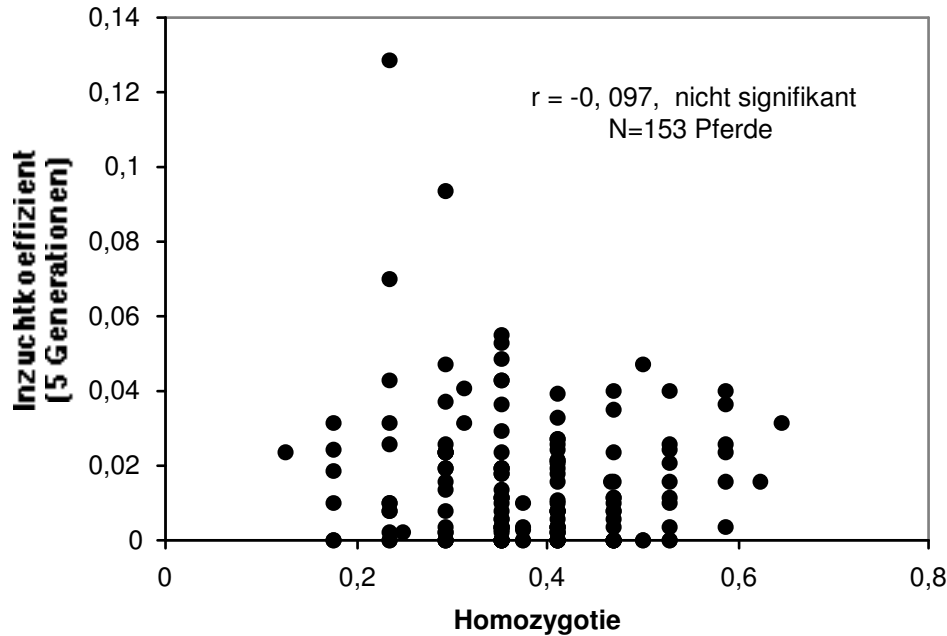


### *Inzuchtkoeffizient und Homozygotie*

Unter Verwendung der bekannten Pedigree-Informationen wurde überprüft, ob der aus dem Stammbaum berechnete individuelle Inzuchtkoeffizient mit der beobachteten Homozygotie (Anteil homozygoter Markerorte) eines Pferdes übereinstimmt. Theoretisch würde man erwarten, daß Inzuchtkoeffizient und Homozygotie eines Pferdes positiv miteinander korreliert sind, d.h. Tiere mit höherem Inzuchtkoeffizient sollten im Mittel auch einen höheren Homozygotiegrad zeigen als Pferde mit niedrigem Inzuchtkoeffizient. Am Beispiel der untersuchten Pferde aus dem Bundesgestüt Piber ist zu erkennen, daß keine signifikante positive Korrelation zwischen individueller Homozygotie und individuellem Inzuchtkoeffizient gezeigt werden konnte (Abbildung 3). Das gleiche Ergebnis - kein Zusammenhang zwischen Inzuchtgrad und Homozygotie - wurde erhalten, wenn alle untersuchten Tiere berücksichtigt wurden. Das bedeutet, daß zumindest mit einfachen statistischen Verfahren allein aufgrund von genetischen Untersuchungen keine Aussage darüber getroffen werden kann, welche Lipizzaner als "ingezüchtet", "weniger ingezüchtet" oder "nicht ingezüchtet" zu klassifizieren sind.

Es gibt mehrere Gründe, warum kein Zusammenhang zwischen Inzuchtgrad und Homozygotie gefunden wurde. Simulationsstudien (Baumung & Sölkner, Boku, Wien; siehe BMLF-Projekt 1137) ergaben, daß sehr viele MS-Marker untersucht werden müßten, damit die Homozygotie eines Tieres den wahren Autozygotiegrad (der mit dem Homozygotiegrad korreliert ist) widerspiegelt. Selbst wenn keine Beschränkung hinsichtlich der Untersuchungskosten für die Erhebung der Genotypen existieren würde und 100 Marker untersucht werden könnten, ist eine Aussage, ob ein Tier tatsächlich ingezüchtet ist momentan nur eingeschränkt möglich. Abstammungsüberprüfungen haben zudem ergeben, daß die Stammbaumdaten der untersuchten Lipizzaner zum Teil falsch sind (siehe unten). Verkehrte Abstammungen führen aber dazu, daß fehlerhafte Inzuchtkoeffizienten errechnet werden, die keine eindeutige Beziehung zur Homozygotie mehr zeigen.

**Abbildung 3:** Korrelation zwischen individueller Homozygotie (Anteil homozygoter MS-Loci; 18 MS-Marker berücksichtigt) und individuellem Inzuchtkoeffizienten am Beispiel von Lipizzanern aus Piber.



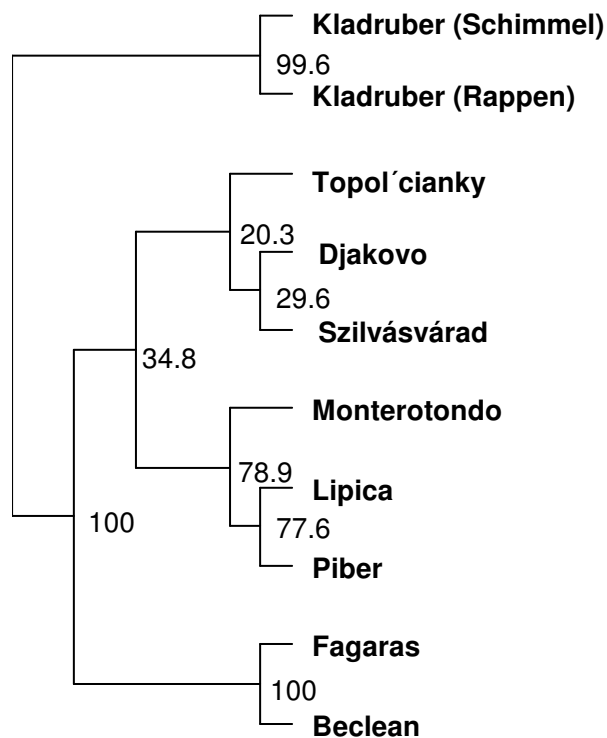
#### *Genetische Unterschiede zwischen Gestüten*

Die Allelfrequenzverteilungen der untersuchten DNA-MS-Marker wiesen zwischen Gestüten Unterschiede auf. Für einige Marker konnten sogenannte "private Allele", d.h. Allele, die nur in einem Gestüt auftraten, nachgewiesen werden. Da diese Allele äußerst selten waren – sie wurden jeweils nur bei einem Pferd nachgewiesen – muß man davon ausgehen, dass zufällige Mutationen für diese seltenen Varianten verantwortlich sind. Deutliche Unterschiede im Auftreten von MS-Allelen waren vor allem zwischen rumänischen Lipizzanern und Pferden anderer Lipizzanergestüte erkennbar. In die Untersuchung mit aufgenommenen Kladrubern unterschieden sich hinsichtlich der auftretenden Allele bzw. ihrer Allelfrequenzen von allen Lipizzanerpulationen. Trotz der historischen Beziehungen zwischen der Lipizzaner- und der Kladruberrasse, sind heute lebende Kladruber und Lipizzaner genetisch verschieden (siehe auch Abbildung 4). Die genetischen Unterschiede zwischen Lipizzanern und Kladrubern sind darauf zurückzuführen, daß für die Züchtung der Rasse auf unterschiedliche Genpools zurückgegriffen wurde und Kladruber und Lipizzaner weitgehend unabhängig voneinander gezüchtet wurden.

Obwohl es gewisse genetische Unterschiede zwischen Gestüten gibt, stellen die untersuchten Lipizzaner eine relativ homogene Population dar. Eine stärkere genetische Differenzierung zwischen Lipizzanerpulationen wäre überraschend gewesen, weil alle untersuchten Gestüte Beziehungen zur "Urpopulation" in Lipica aufweisen und eine Trennung der Lipizzaner in einzelne Gestüte erst vor relativ kurzer Zeit stattgefunden hat. Die Ausbildung von genetischen Unterschieden zwischen Populationen aufgrund von Mutation, Selektion und genetischer Drift ist

jedoch ein Vorgang, der vergleichsweise langsam voranschreitet. Zu dem ist es in der Zuchtgeschichte des Lipizzaners immer wieder zur Zusammenführung einzelner Populationen (Gestüte) bzw. zum Austausch von Zuchttieren zwischen Gestüten gekommen. Dieser "Genfluß" trägt dazu bei, daß genetische Unterschiede zwischen Populationen fortdauernd nivelliert werden. Am genetisch ähnlichsten sind sich die Gestüte Lipica, Monterotondo und Piber. Lediglich die rumänischen Lipizzaner setzen sich von den restlichen Lipizzanergestüten relativ deutlich ab (siehe Abbildung 4).

**Abbildung 4:** Rekonstruierter phylogentischer Baum für die untersuchten Lipizzanerp Populationen. Als genetisches Distanzmaß wurde der Anteil gemeinsamer Allele zwischen Individuen verschiedener Gestüte für alle untersuchten Loci berechnet. Die Zuverlässigkeit der Verzweigungen wird durch die Angabe der "Bootstrap-Werte" angezeigt. Hohe Bootstrap-Werte (Maximalwert = 100) weisen darauf hin, daß die Äste, welche von einem Verzweigungspunkt ausgehen, tatsächlich eine genetisch ähnliche Gruppe bilden. Niedrige Werte bedeuten, daß das Verzweigungsmuster unsicher ist.



#### *Nachweis von Fehlern im Lipizzanerstammbaum mit Hilfe von DNA-MS-Markern und mt-DNA*

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen, daß MS-Marker sehr gut für die Abstammungsüberprüfung beim Lipizzaner geeignet sind. Mit wenigen Einschränkungen sind alle 22 untersuchten Marker für einen DNA-Test nutzbar. Bereits mit einem Standardsatz von 12 Marken wird eine hohe Testsicherheit erreicht (Abbildung 1). Wenn beide Elterntiere für den Test zur Verfügung stehen und die Abstammung für ein Elternteil als gesichert angesehen werden kann, wird eine Fehl Abstammung vom Putativelternteil mit einer Sicherheit von 99,96 % entdeckt. Ist die Abstammung für beide Elternteile fraglich, liegt dieser Wert bei 98,76 %. Selbst wenn für



eine Vaterschaft z.B. zwei Brüder in Frage kommen, kann mit einer Sicherheit von etwa 96 % der Nichtvater von der Vaterschaft ausgeschlossen werden (Voraussetzung: mütterliche Abstammung ist sicher und Mutter steht für den Test zur Verfügung). In schwierigeren Fällen, z.B., wenn als Putativ-Väter zwei Brüder in Frage kommen und die Mutter für den Test nicht zur Verfügung steht, müssen allerdings zusätzliche Marker untersucht werden.

Aufgrund der vorhandenen Pedigree-Informationen konnte für 112 Lipizzaner die väterliche und für 141 Tiere die mütterliche Abstammung überprüft werden. Die Ergebnisse der Überprüfung sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

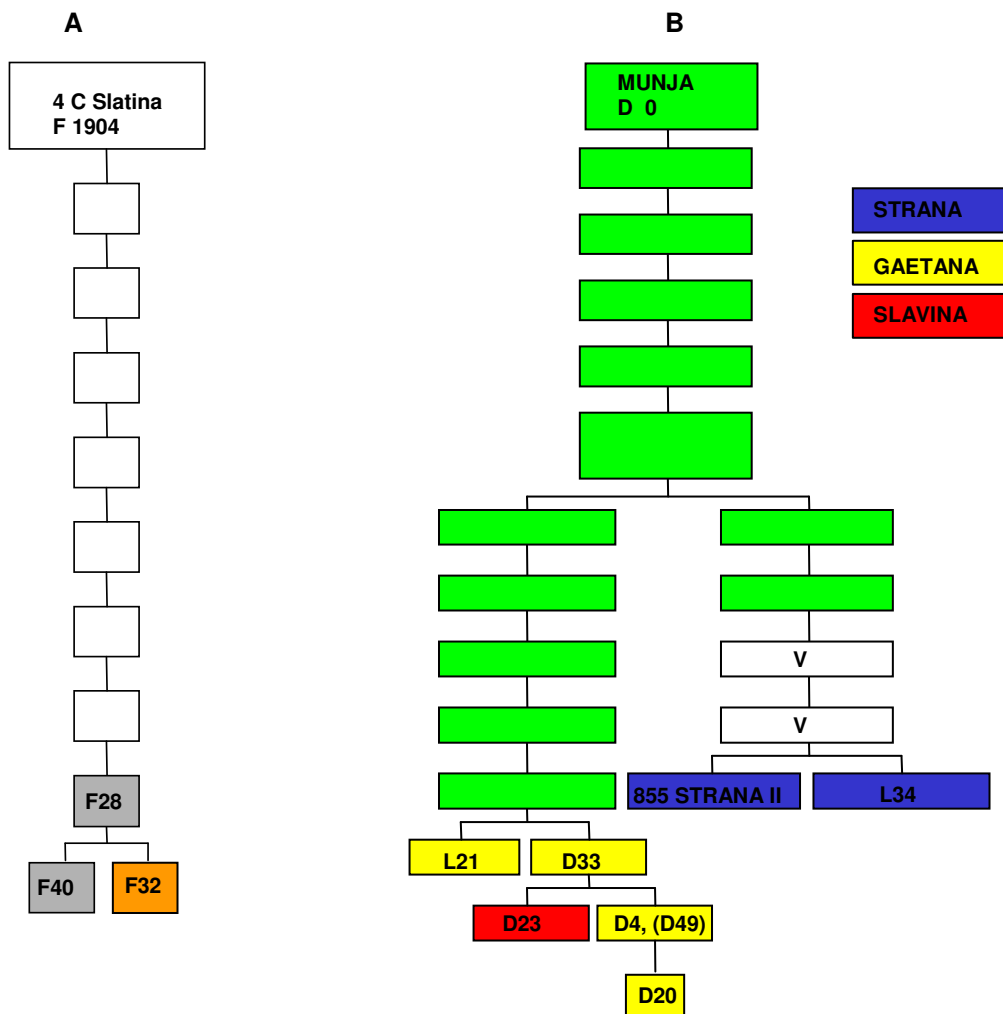
**Tabelle 2:** Häufigkeit von Fehl Abstammungen in Lipizzanergestüten

Gestüt [Land]	väterliche Fehl Abstammung (112 überprüft)	mütterliche Fehl Abstammung (141 überprüft)
Beclean [RO]	0	0
Djakovo [HR]	0	2
Fagaras (Simbata de Jos) [RO]	1	1
Lipica [SLO]	0	0
Monterotondo [I]	0	6
Piber [A]	0	0
Szilvásvárads [H]	1	1
Topol'cianky [SL]	0	1
total in %	1,8	7,8

Erstaunlicherweise war die mütterliche Abstammung weit häufiger falsch als die väterliche Abstammung (Tabelle 1). Auffällig war, daß im Gestüt Monterotondo 6 von 19 (32 %) überprüften Abstammungen nicht richtig waren. Schwierigkeiten bei der Zuordnung von Fohlen und Mutter werden wahrscheinlich durch das in Monterotondo praktizierte Haltungssystem (Weidehaltung in Kleinherden) begünstigt.

Ebenso wie die Vererbung von MS-Allelen Rückschlüsse über die Abstammung eines Tieres erlauben, so kann auch die Vererbung der mt-DNA für Abstammungsüberprüfungen genutzt werden. Mit Hilfe der mt-DNA lassen sich im Gegensatz zu autosomalen Markern (wie z.B. DNA-MS) Abstammungsfehler auch dann noch relativ einfach nachweisen, wenn nicht alle Vorfahren eines Nachkommens untersucht werden können. Im Gegensatz zu DNA-MS-Markern wird die mt-DNA jedoch immer von der Mutter an Nachkommen vererbt, die väterliche mt-DNA wird nicht an Nachkommen weitergegeben. Das bedeutet, daß alle Individuen eines Stammbaumes, die sich auf einen gemeinsamen mütterlichen Ursprung (z.B. Mutter-Nachkommen) zurückführen lassen, den gleichen mt-DNA-Typ besitzen müssen. Wenn Tiere aus einer mütterlichen Linie verschiedene mt-DNA-Typen aufweisen bedeutet dies, daß innerhalb der Linie eine Fehl Abstammung vorliegen muß.

**Abbildung 5:** Beispiele für den Nachweis von Stammbaumfehlern bei Lipizzanern über mt-DNA-Typen. A) Abstammungsfehler in direkter Nachkommenschaft. B) Mehrere Fehler in einer mütterlichen Linie. Gleichfarbige Felder entsprechen identischen mt-DNA-Typen. Direkte Abstammungsfehler (F28-F32 und D33-D23) wurden durch DNA-MS-Analysen bestätigt.



Bei insgesamt 56 im Datenmaterial enthaltenen mütterlichen Linien konnten in 16 Linien (28,5%) mindestens zwei verschiedene mt-DNAs nachgewiesen werden. In einigen Fällen traten sogar drei verschiedene mt-DNA-Typen auf, d.h. für eine ganze Reihe von mütterlichen Linien ist der dokumentierte Stammbaum offensichtlich nicht richtig. Abbildung 5 zeigt zwei der untersuchten Linien. In Abbildung 5A muß F28 als Mutter von F32 aufgrund der unterschiedlichen mt-DNA-Typen ausgeschlossen werden. Der Ausschluß von der Mutterschaft wurde durch MS-Analysen bestätigt. In Abbildung 5B ist der weiter verzweigte Stammbaum von Munja (Djakovo 1905) dargestellt. Auch hier konnte die mit mt-DNA nachgewiesene falsche Abstammung von D23 (als Mutter kommt D33 nicht in Frage) mit DNA-MS untermauert werden. Der Stammbaum von Munja ist ein Beispiel dafür, daß in einer Linie mehrfach Abstammungsfehler auftreten können. So zeigen die untersuchten Tiere des linken einen anderen mt-DNA-Typ als die Tiere des rechten Astes des Stammbaums.

Da sich der Stammbaum der Lipizzaner zumindest teilweise als fehlerhaft darstellt, sind alle Berechnungen, die auf Grundlage des Stammbaums basieren, wie zum Beispiel die Berechnung des Blut- oder Genanteils und des Inzuchtcoeffizienten, verfälscht. Selbst wenn mit sehr großem Aufwand weitere genetische Untersuchungen durchgeführt werden würden, ließe sich das genaue Ausmaß der Fehler kaum klären. Eine nachträgliche Korrektur des Stammbaums, vor allem bei älteren Generationen, würde außerordentlich arbeitsaufwendig sein und wahrscheinlich nicht alle Zweige des Pedigrees richtig rekonstruieren können.

Damit in Zukunft die Genauigkeit der Zuchtbucheintragungen verbessert werden kann, sollten in allen Gestüten Anstrengungen unternommen werden, die Fehl Abstammungsrate so weit wie möglich zu senken. Abstammungsüberprüfungen auf Basis der DNA-MS-Analyse wären hierzu absolut geeignet. Prinzipiell können die MS-Daten auch für Anpaarungsempfehlungen, wie sie in Piber durchgeführt werden, genutzt werden. Günstig wäre es sicherlich, wenn die MS-Analysen von einem Zentrallabor durchgeführt werden würden, das die notwendige Expertise (z.B. Teilnahme an internationalem Vergleichstests) aufweisen kann. Da für die MS-Analyse kein empfindliches Probenmaterial, wie z.B. Blut, benötigt wird, könnten Proben in Form von Schleimhautabstrichen oder Haarwurzeln zum Abstammungstest eingesandt werden. Die DNA, die aus diesem Probenmaterial isoliert wird, könnte darüber hinaus sehr gut eingelagert und auch für ergänzende genetische Untersuchungen genutzt werden. Besonderes Augenmerk sollte bei der Einführung eines DNA-Abstammungstests auch der ständigen Evaluierung des Testsystems gewidmet werden. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse wären auch für Abstammungstests bei anderen Rassen von internationalem Interesse.

Gerade im Hinblick auf eine weitere Erforschung von genetischen Merkmalen des Pferdes - dies könnte z.B. die Charakterisierung von bestimmten Leistungsgenen, Resistenzgenen oder auch Genen, die für die Ausprägung bestimmter Erbkrankheiten wichtig sind, sein - wäre eine leicht zugänglich und optimal gemanagte Pferderasse, wie sie der Lipizzaner darstellt, wertvolles Untersuchungsmaterial für die Wissenschaft.