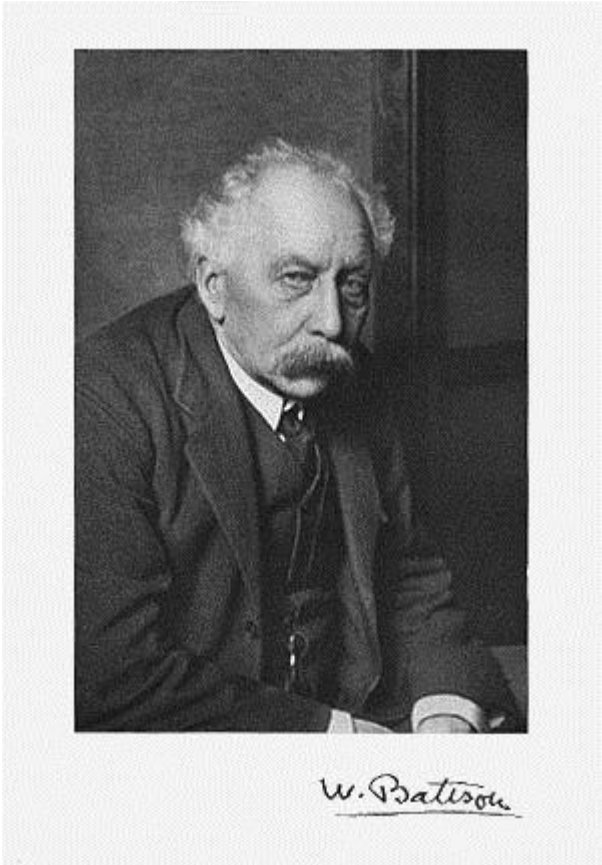


# Effektiver Einsatz neuer DNA- Sequenzierungsmethoden bei Erbfehlern

Cord Drögemüller  
Professur für Tiergenetik

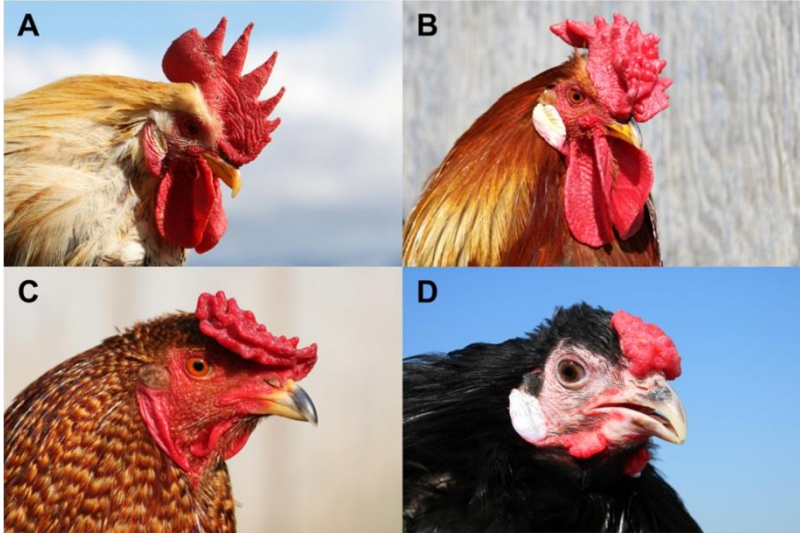
**Institut für Genetik**  
Vetsuisse-Fakultät  
**Universität Bern**

# 1902 – Genetik als neuer Begriff



**William Bateson**  
**Cambridge**  
(1861 Yorkshire – 1926 Merton)

Wikipedia



Imsland et al. (2012) PLOS Genetics 8: e1002775



Wiedemar et al. (2014) PLOS ONE 9: e93435

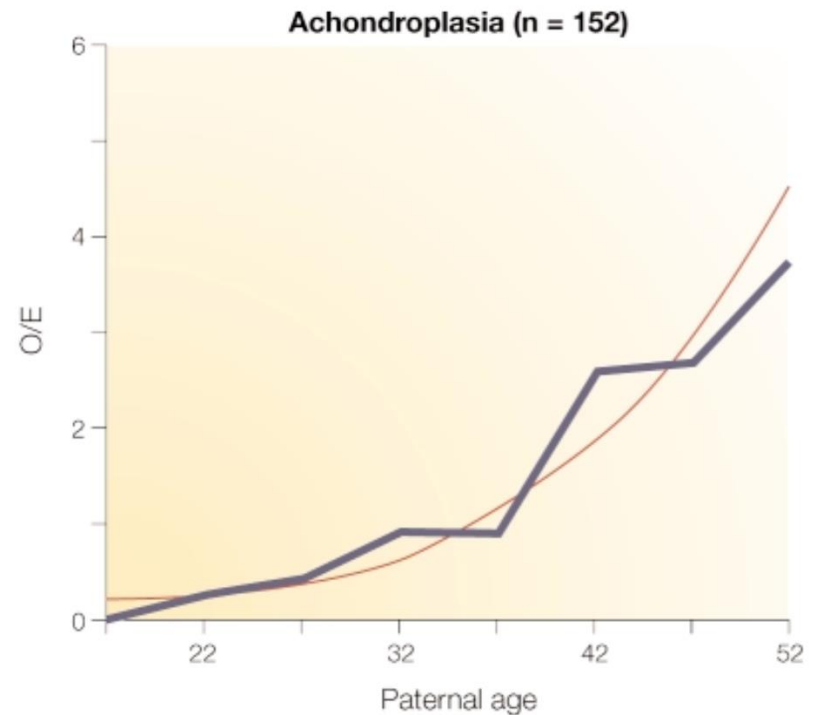
# 1912 – Mutationen stellten zunächst ein vages Konzept dar



**Wilhelm Weinberg**  
(1862 Stuttgart – 1937 Tübingen)

Stern C (1962) Genetics 47: 1-5

Bei Kindern mit Zwergwuchs (Achondroplasie), beobachtete **Weinberg** sporadische Fälle oftmals unter den letztgeborenen Kindern von (Gross-)Familien und vermutete einen genetischen Ursprung.

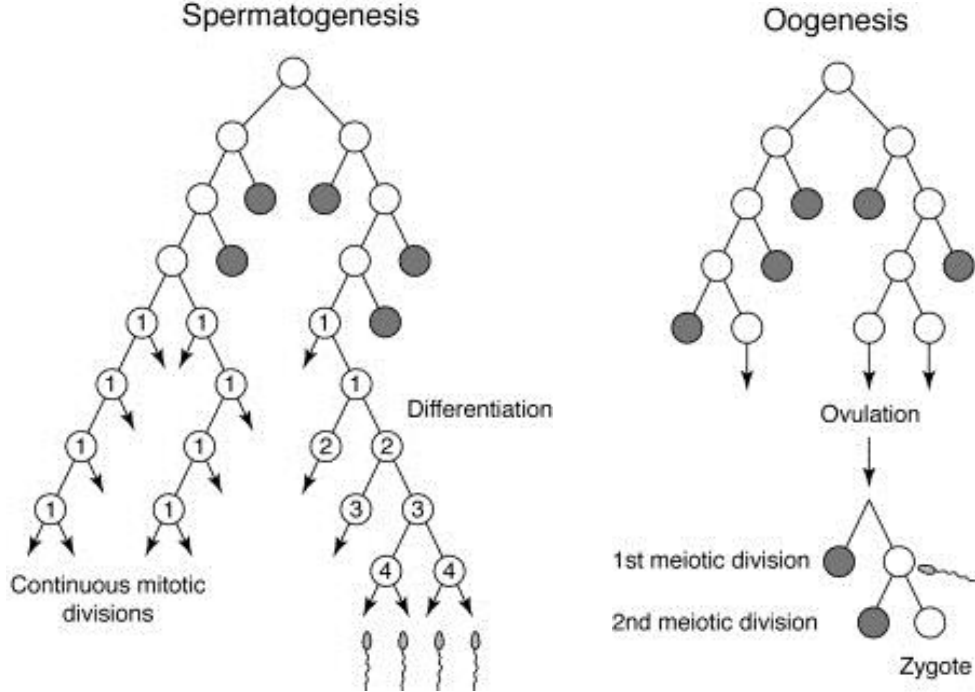


Crow JF (2000) Nature Genetics Review 1: 40-7

# 1955 – das Alter der Eltern bestimmt die Mutationsrate



## “Male mutation bias”



**Lionel Penrose**  
(1898 London – 1972 London)

Penrose LS (1955) Lancet 269: 312-3

Hurst LD & Ellegren (1998) Trends in Genetics 14: 446-52

# 2016: Erbfehler aufgrund natürlich auftretender DNA-Mutationen

Dominante Mutationen werden häufig unmittelbar bedeutend

**Problematisch:**

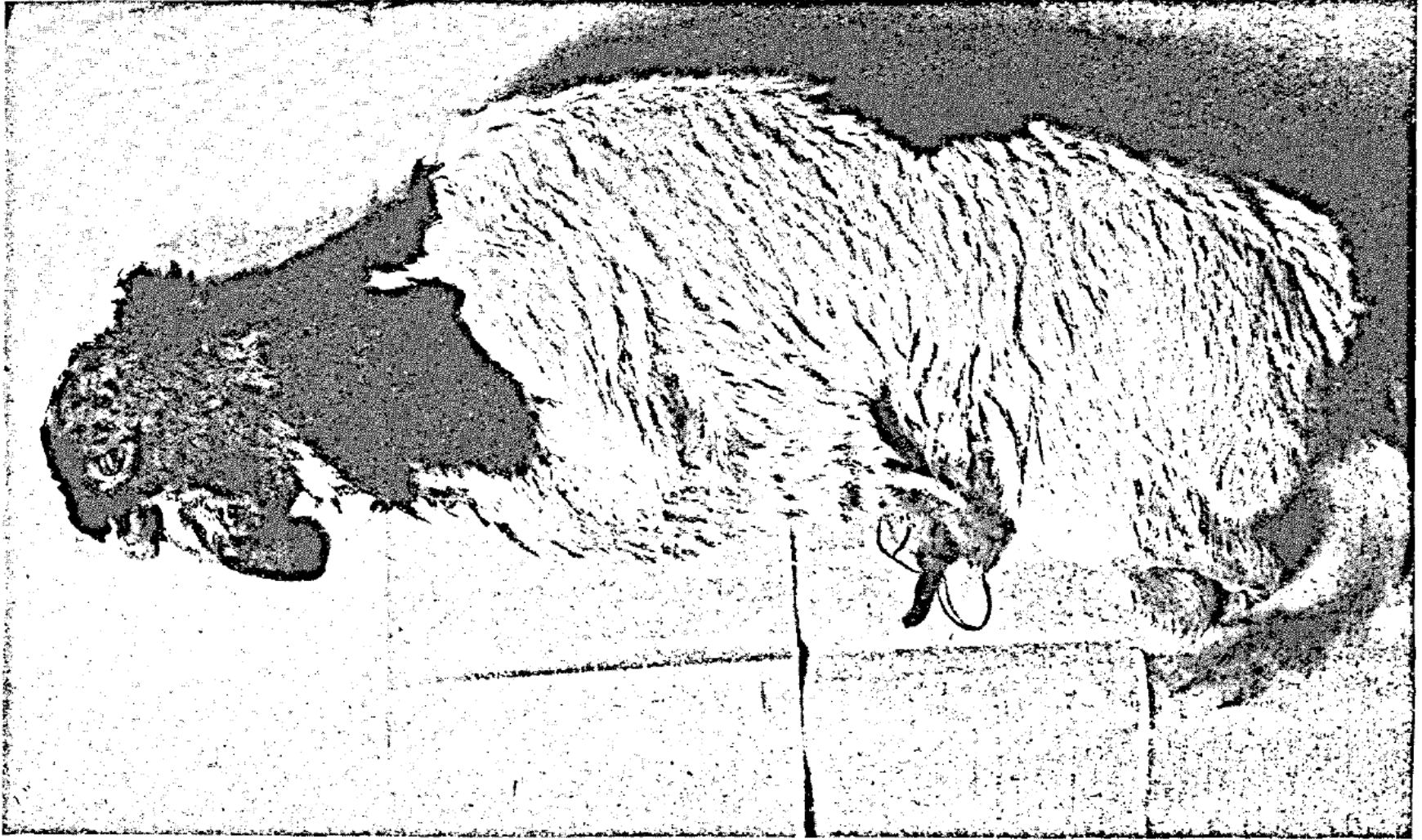
1. stark frequentierte KB-Vererber
2. Bullen ohne umfangreichen Prüfeinsatz (**genomische Selektion**)

Rezessive Mutationen brauchen mehrere Generationen bis zum Ausbruch

**Problematisch:**

1. stark frequentierte KB-Vererber
2. Inzucht, insbesondere bei geringer effektiver Populationsgrösse (**“kleine” Rassen**)
3. wenige Bullenväter
4. kurze Generationsintervalle beschleunigen einen Ausbruch (**genomische Selektion**)

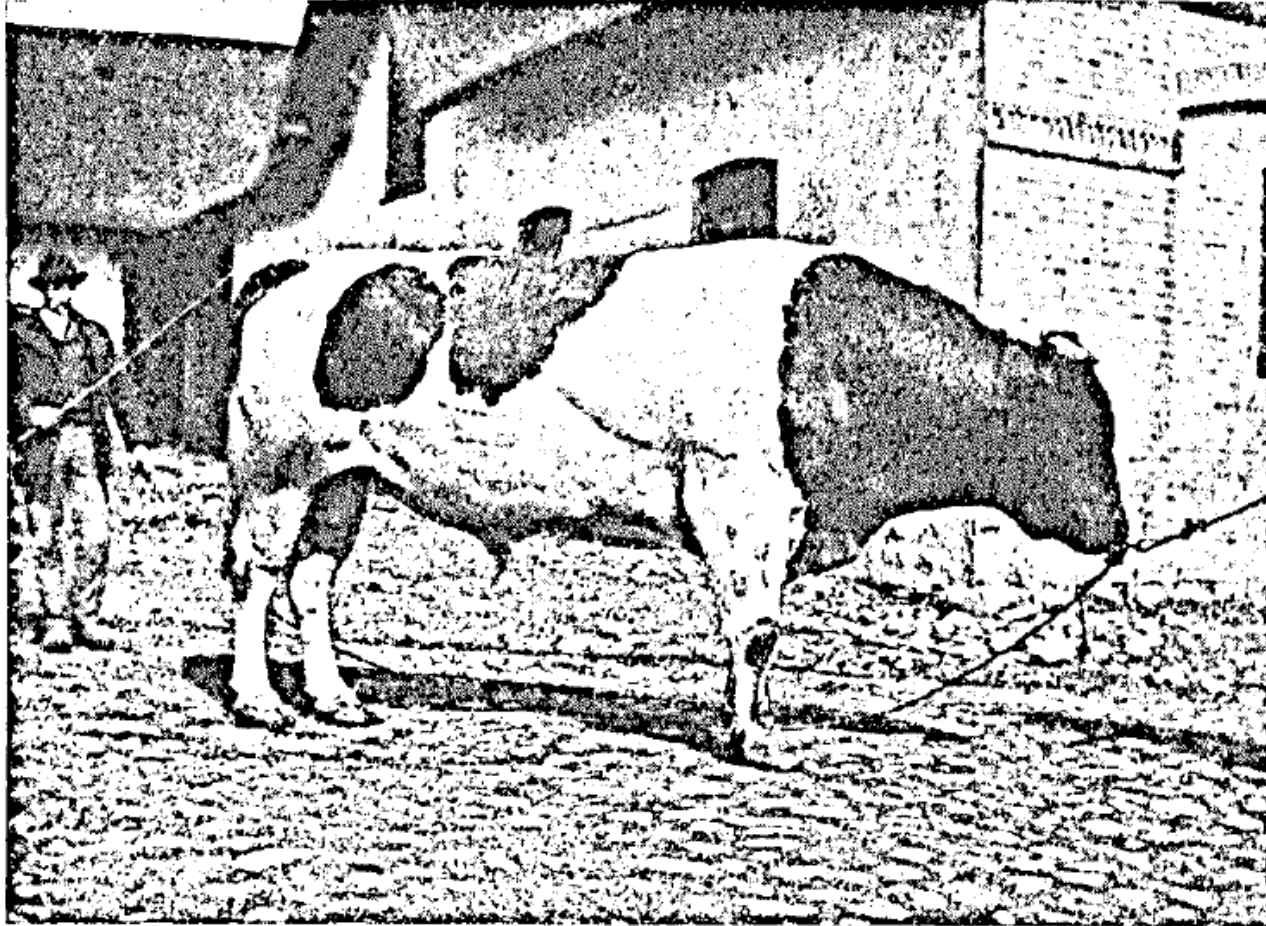
**1928: Rezessiver letaler “Faktor”  
verursacht einen Erbfehlerausbruch (Amputierte Kälber)**



Text-fig. 1. Abnormal calf, homozygous for the gene for *akroteriasis congenita*.

Wriedt C & Mohr OL (1928) Journal of Genetics 20: 187-215.

**1928: Rezessiver letaler “Faktor”  
verursacht einen Erbfehlerausbruch (amputierte Kälber)**



Text-fig. 3. The bull Gallus M. 77.

Wriedt C & Mohr OL (1928) Journal of Genetics 20: 187-215.

# Erbfehler erkannt – was tun?

**bis 1990:** zeit- und kostenintensive züchterische Gegenmassnahmen

1. Zuchtausschlussstrategien
2. Nachkommenprüfungen

**seit 1991:** DNA-basierte Testverfahren für monogene Defekte vereinzelt verfügbar

1. Material **zahlreicher betroffener Tiere** notwendig
2. Stand der **Genomanalyse** je nach Tierart **sehr limitiert**
3. Bei “verstandenen” Phänotypen waren (sind) Kandidatengene die erste Wahl



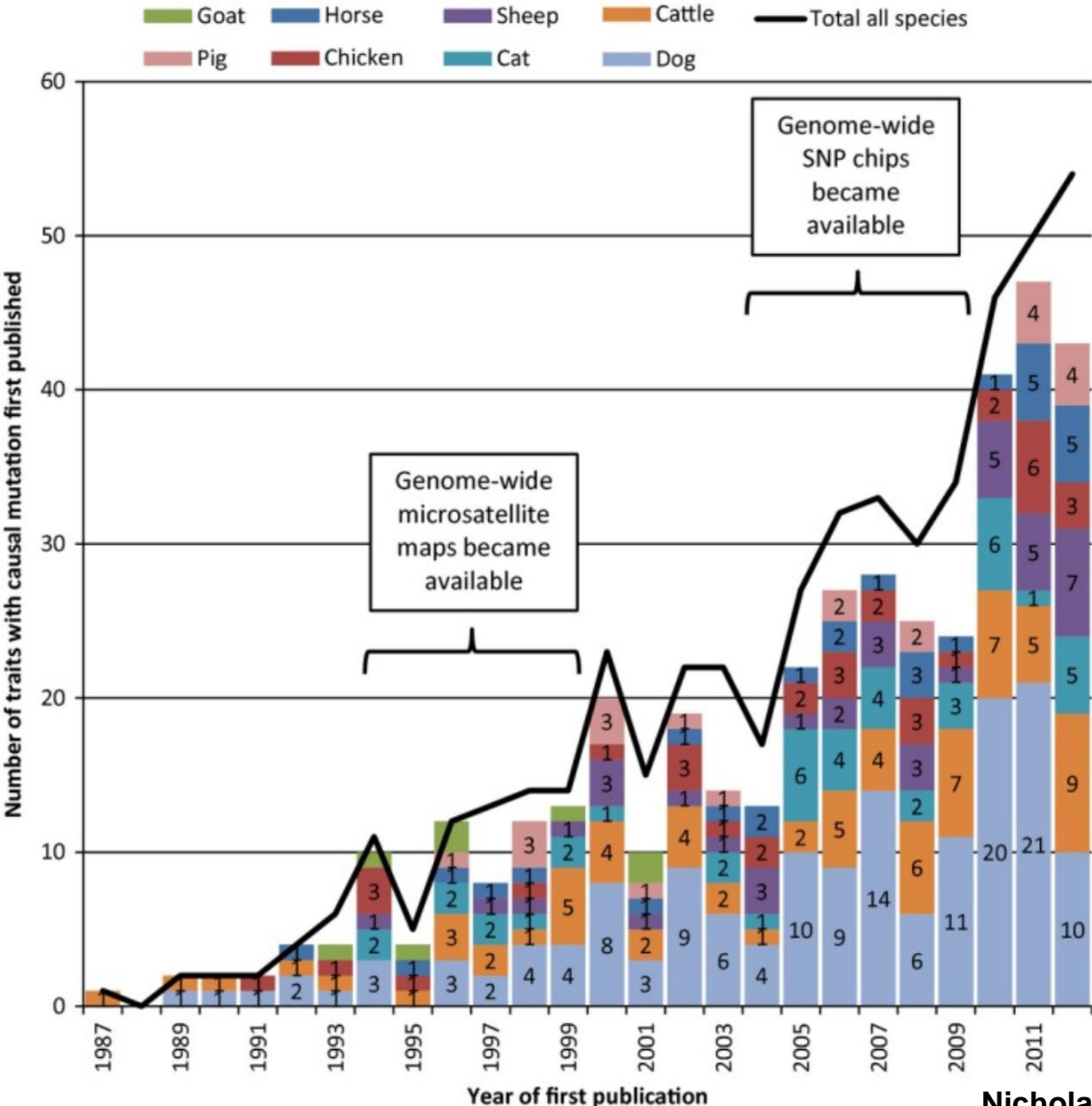
# wind of change – Gentests werden erstmals verfügbar

**Table 1. Monogenic Traits Mapped by Linkage Analysis in Livestock Species**

Species	Locus	Trait	Position	Gene	Reference
Pig	<i>MH</i>	Malignant hyperthermia	6	<i>CRC</i>	Fuji et al. 1991
	<i>I</i>	Dominant White coat color	8	<i>KIT</i>	Johansson et al. 1992; Johansson Moller et al. 1996
	<i>E</i>	Extension coat color locus	6	?	Mariani et al. 1996
	<i>Rn</i>	Muscle glycogen content	15	?	Milan et al. 1995, 1996; Mariani et al. 1996
	<i>ECK88a</i>	Intestinal receptor for <i>E. coli</i>	13	?	Guérin et al. 1993; Edfors-Lilja et al. 1995
	<i>b,acR</i>	K88ab,ac fimbriae			
	<i>ECF107</i>	Intestinal receptor for <i>E. coli</i> F107 fimbriae	6	?	Voegeli et al. 1994
	<i>R</i>				
Cattle	<i>CPS</i>	Campus tremor syndrome	7	?	I. Tammen and B. Harlizius, pers. comm.
	<i>PDME</i>	Weaver	4	?	Georges et al. 1993a
	<i>Polled</i>	Presence/Absence of horns	1	?	Georges et al. 1993b
	<i>Roan</i>	Roan coat color locus	5	?	Charlier et al. 1996a
	<i>MH</i>	Double muscling	2	?	Charlier et al. 1995
	<i>E</i>	Extension coat color locus	18	<i>MCTR</i>	Klungland et al. 1995
Sheep	<i>Sy</i>	Syndactyly	15	?	Charlier et al. 1996b
	<i>FecB</i>	Booroola fecundity gene	6	?	Montgomery et al. 1994
	<i>CLPG</i>	Callipyge muscular hypertrophy	18	?	Cockett et al. 1994, 1996
Goat	<i>Polled</i>	Presence/Absence of horns	1	?	Vaiman et al. 1996
Horse	<i>E</i>	Extension coat color locus	LGII	<i>MCTR</i>	Johansson et al. 1994; L. Marklund, M. Johansson Moller, K. Sandberg, and L. Andersson, pers. comm.
Poultry	<i>DW</i>	dominant white	LG22	?	Ruyter-Spira et al. 1996
	<i>SLD</i>	sex linked dwarfism	Z	<i>GHR</i>	Ning et al. 1994

# Erbfehler – was nun?

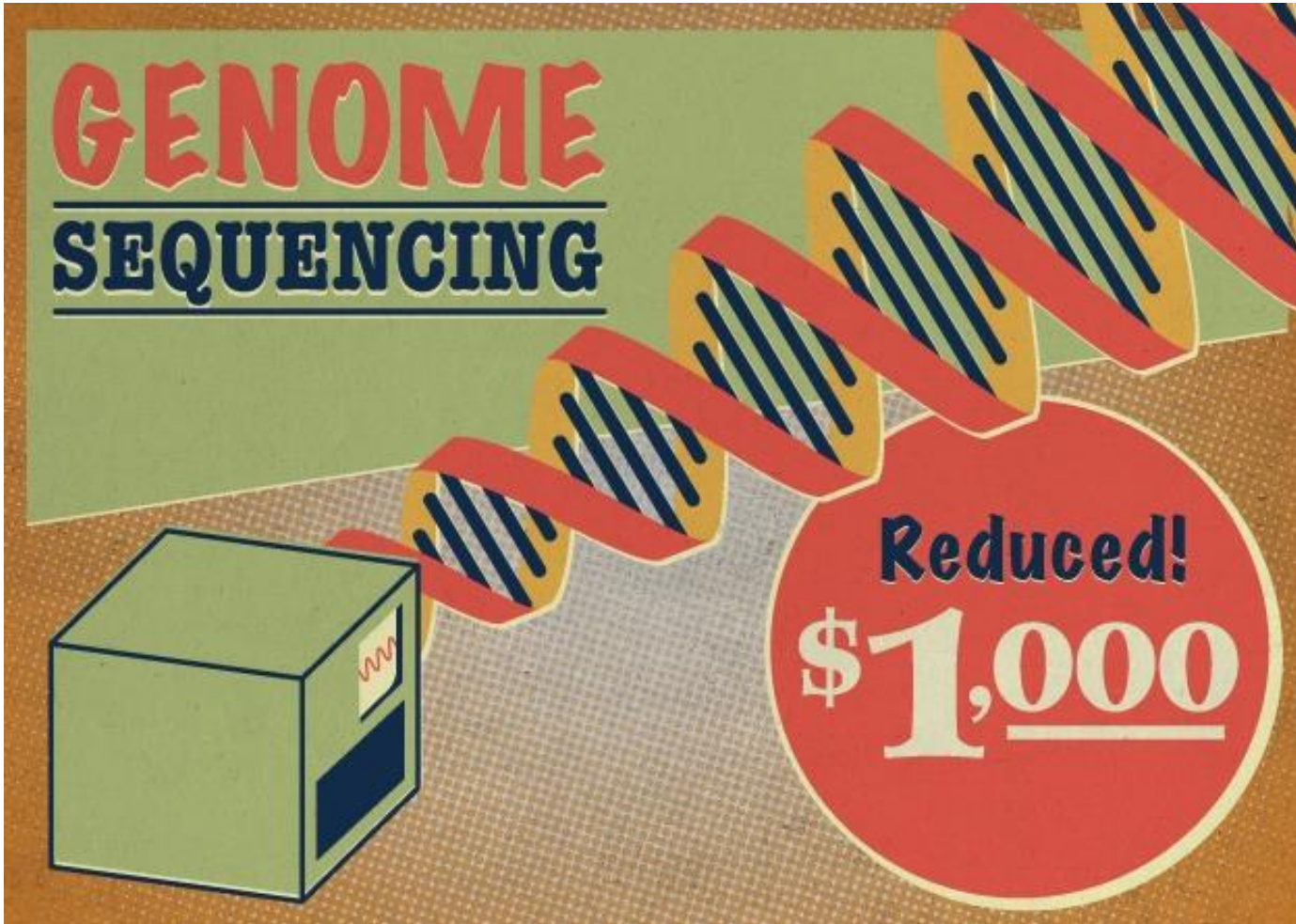
seit ca. 2005: Entschlüsselte Referenzgenome und SNP chips verfügbar



# Erbfehler – was jetzt?

seit ca. 2012: Einzelgenomsequenzierung dank *next-generation sequencing* verfügbar

1. Einzelne betroffene Tiere genügen um monogene Erbfehler aufzuklären
2. *short read technology* hat ihre Grenzen



# Im Zweifel genügt ein Tier...



Peters et al. *BMC Veterinary Research* (2015) 11:48  
DOI 10.1186/s12917-015-0366-0



**RESEARCH ARTICLE** **Open Access**

## DNA-based diagnosis of rare diseases in veterinary medicine: a 4.4 kb deletion of ITGB4 is associated with epidermolysis bullosa in Charolais cattle

Martin Peters<sup>1</sup>, Irene Reber<sup>2</sup>, Vidhya Jagannathan<sup>2</sup>, Barbara Raddatz<sup>3</sup>, Peter Wohlsein<sup>3</sup> and Cord Drögemüller<sup>2\*</sup>

Peters et al. *BMC Vet Res* (2015) 11: 48

# Selten ist manchmal gar nicht so selten...

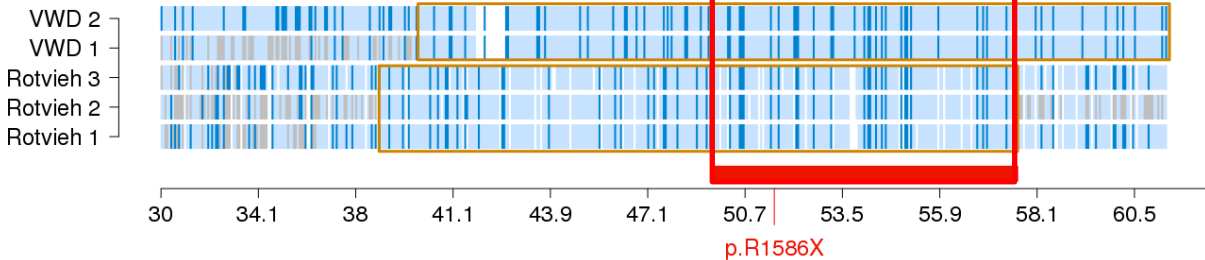
## *Dystrophic epidermolysis bullosa (DEB)* beim Roten Höhenvieh 2010: 3 Fälle mit Hautdefekt infolge *COL7A1* Mutation



Menoud et al.  
PLOS ONE (2012) 7: e38823



## Sehr ähnlicher DEB Phänotyp beim Vorderwälder 2015: 2 Fälle mit identischer Mutation



# Erbfehler– wie weiter?



*The 1000 bull genomes project aims to provide a large database of genetic variants for genomic prediction and genome wide association studies in all cattle breeds for the bovine research community.*

**«Jedes Rind trägt rund 100 rezessive Defektmutationen»**

## ARTICLES

nature  
genetics

### Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle

Hans D Daetwyler<sup>1-3</sup>, Aurélien Capitan<sup>4,5</sup>, Hubert Pausch<sup>6</sup>, Paul Stothard<sup>7</sup>, Rianne van Binsbergen<sup>8</sup>, Rasmus F Brøndum<sup>9</sup>, Xiaoping Liao<sup>7</sup>, Anis Djari<sup>10</sup>, Sabrina C Rodriguez<sup>4</sup>, Cécile Grohs<sup>4</sup>, Diane Esquerré<sup>11</sup>, Olivier Bouchez<sup>11</sup>, Marie-Noëlle Rossignol<sup>12</sup>, Christophe Klopp<sup>10</sup>, Dominique Rocha<sup>4</sup>, Sébastien Fritz<sup>5</sup>, André Eggen<sup>4</sup>, Phil J Bowman<sup>1,3</sup>, David Cooté<sup>1,3</sup>, Amanda J Chamberlain<sup>1,3</sup>, Charlotte Anderson<sup>1</sup>, Curt P VanTassel<sup>13</sup>, Ina Hulsegge<sup>8</sup>, Mike E Goddard<sup>1,3,14</sup>, Bernt Gulbrandsen<sup>9</sup>, Mogens S Lund<sup>9</sup>, Roel F Veerkamp<sup>8</sup>, Didier A Boichard<sup>4</sup>, Ruedi Fries<sup>6</sup> & Ben J Hayes<sup>1-3</sup>

The 1000 bull genomes project supports the goal of accelerating the rates of genetic gain in domestic cattle while at the same time considering animal health and welfare by providing the annotated sequence variants and genotypes of key ancestor bulls. In the first phase of the 1000 bull genomes project, we sequenced the whole genomes of 234 cattle to an average of 8.3-fold coverage. This sequencing includes data for 129 individuals from the global Holstein-Friesian population, 43 individuals from the Fleckvieh breed and 15 individuals from the Jersey breed. We identified a total of 28.3 million variants, with an average of 1.44 heterozygous sites per kilobase for each individual. We demonstrate the use of this database in identifying a recessive mutation underlying embryonic death and a dominant mutation underlying lethal chondrodysplasia. We also performed genome-wide association studies for milk production and curly coat, using imputed sequence variants, and identified variants associated with these traits in cattle.

Cattle were domesticated approximately 10,000 years ago to secure supplies of meat, milk and power. Recently, genomic selection has been adopted globally by cattle industries to accelerate genetic gains<sup>1</sup>. To meet projected global demands for milk and meat, rates of genetic gain must be further accelerated. At the same time, animal health and welfare must also be considered. Improved accuracy of genomic predictions<sup>2,3</sup> and rapid identification and

limited numbers of key ancestor bulls<sup>5</sup>. Once these ancestors are sequenced, descendants need only be genotyped with a dense SNP array to accurately infer their genome sequence<sup>3</sup> by tracing the large segments of chromosomes inherited from the ancestor bulls.

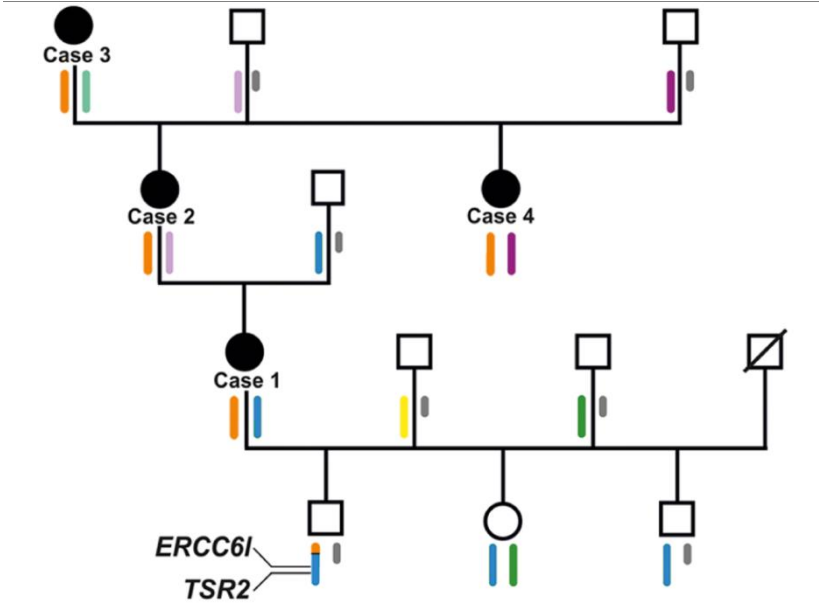
The aim of the 1000 bull genomes project is twofold: (i) to build a database of sequence variant genotypes of individuals, ideally key ancestors, from modern cattle breeds that enables sequence-based

© 2014 Nature America, Inc. All rights reserved.



Daetwyler et al. Nat Genetics (2014) 46: 858-65

# Aktuelles Beispiel: 2 aus 86 Tausend dank >1100 Genomsequenzen



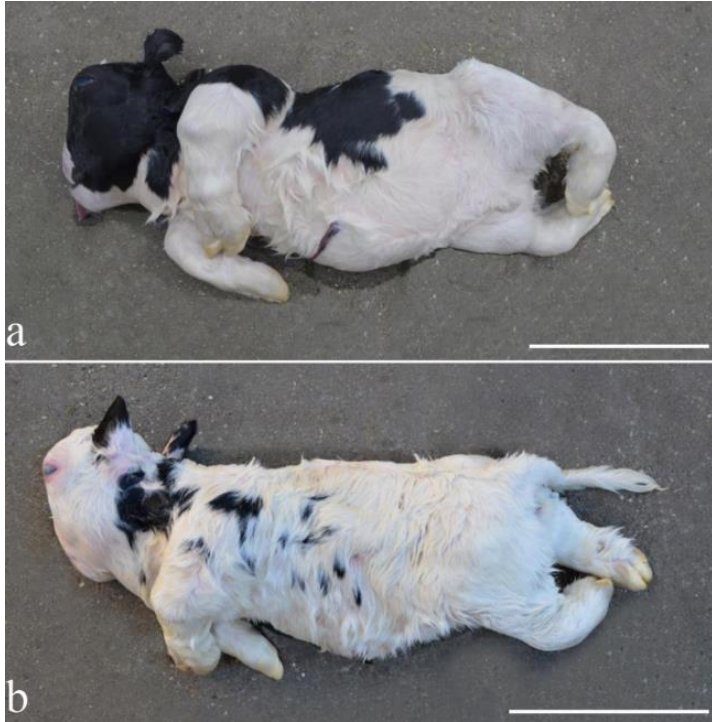
**Filtering step**

	Total number of variants <sup>a</sup>	Coding variants <sup>b</sup>
Variants in the whole genome	8,797,226	86,326
Variants in the critical intervals on BTA 7, 14, and X	361,134	1935
Variants in the critical intervals which were absent from 83 other cow genomes (local controls)	2593	21 <sup>c</sup>
Variants in the critical intervals which were absent from 1119 genomes of the 1000 bull genomes project (global controls)	29 <sup>c</sup>	2 <sup>d</sup>

**Erbfehler (**Mutationen**) treten immer wieder **neu** auf...**



# 2015: Holsteinbulle (DK) mit Bulldogkälbern

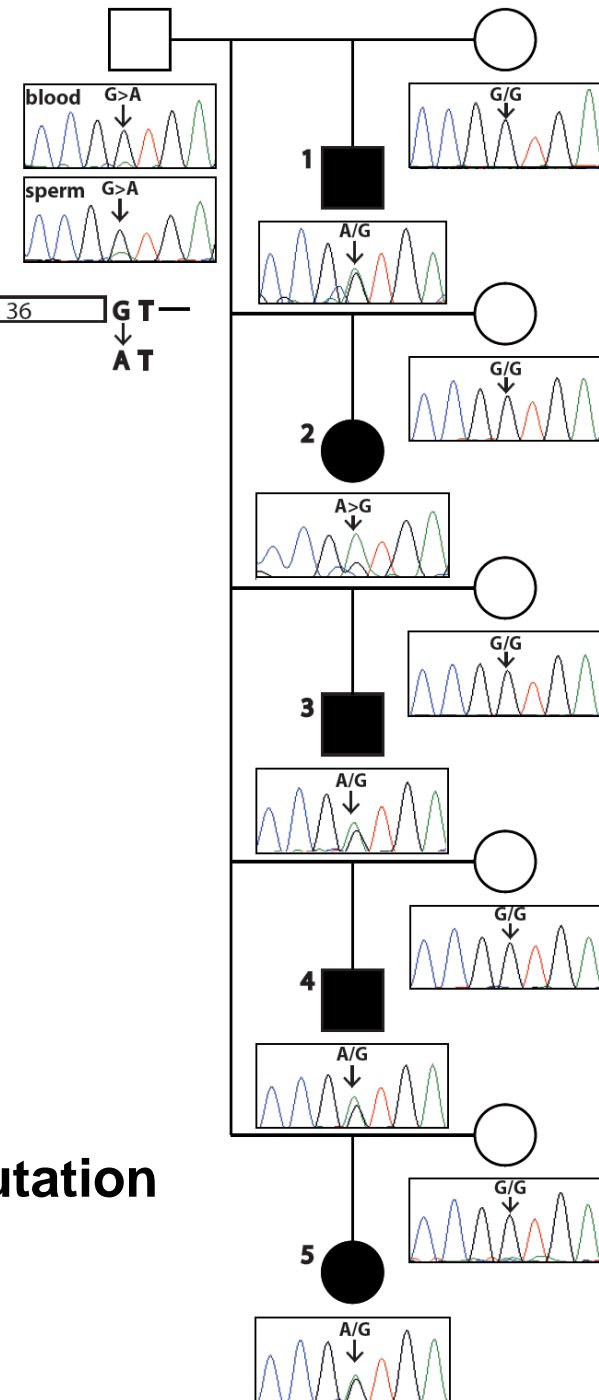
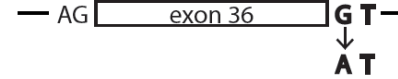


~12% betroffene Nachkommen (64 von 515)

Bulle ist ein **Keimbahnmosaik**  
für eine dominante Spontanmutation

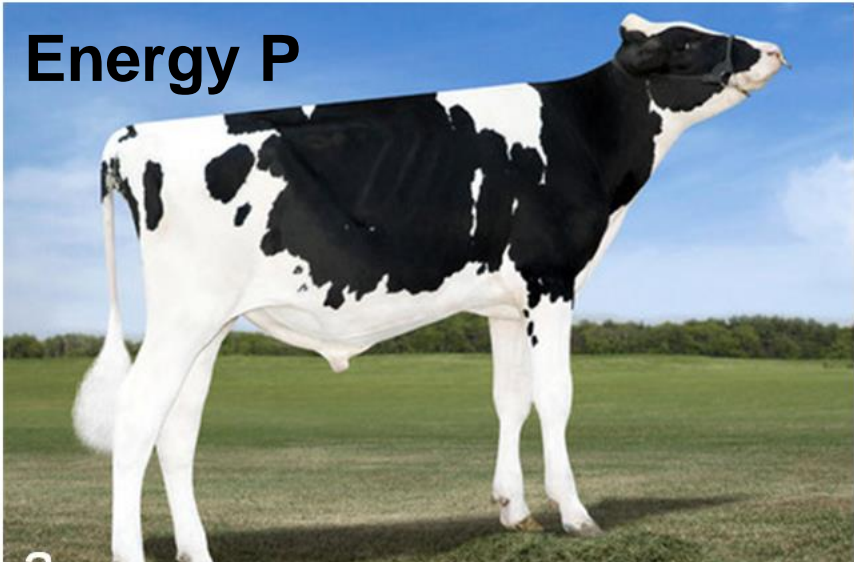
Agerholm et al. BMC Vet Res (2016) 12: in press

**COL2A1**



# 2016: Erbfehler sind (und bleiben) Thema

Energy P



**Dominante Keimbahnmutation verursacht Bulldogkälber**



© Hubert Pausch, TU München



Pressemitteilung, 06. April 2016

## Neue genetische Besonderheit bei Holsteins aufgedeckt

*Die deutschen und österreichischen Rinderzuchtorganisationen führen gemeinsam mit wissenschaftlichen Partnern ein systematisches Monitoring von genetischen Besonderheiten bei Holstein, Fleckvieh und Braunvieh durch. Dadurch konnte nun eine neue unerwünschte genetische Besonderheit in der Rasse Holstein aufgeklärt werden.*

Ein Bulle der MASTERRIND (Energy P) brachte vermehrt Nachkommen mit Missbildungen, die aufgrund ihres Erscheinungsbilds als „Bulldog“-Kälber bezeichnet wurden. Rund 25 % seiner Nachkommen waren davon betroffen. Die MASTERRIND hat den Bullen unmittelbar nach den ersten Meldungen über auffällige Kälber aus dem Programm genommen und bereits ausgeliefertes Spermia zurückgerufen. Dank dieser schnellen Reaktion konnte das Auftreten weiterer Kälber mit Missbildungen aus zusätzlichen Besamungen vermieden werden. Im Rahmen des systematischen Monitorings von genetischen Besonderheiten wurde die genetische Ursache der Missbildungen erforscht. Dazu untersuchte eine Arbeitsgruppe aus MASTERRIND, der Technischen Universität München und vit Verden betroffene und gesunde Nachkommen von Energy P. Als Ursache für die angeborenen Missbildungen konnten die Forscher eine spontane Mutation im Erbgut des Bullen ausmachen. Gibt der Bulle diese Mutation an seine Nachkommen weiter, weisen sie den klassischen „Bulldog“-Phänotyp auf und sind nicht lebensfähig. Nach derzeitigen Erkenntnissen kann mit den gesunden Nachkommen bedenkenlos weitergezüchtet werden.

Die meisten bislang aufgedeckten genetischen Besonderheiten (z.B. Cholesterin-Defizit oder Brachyspina) werden rezessiv vererbt. Im Gegensatz dazu folgt der „Bulldog“-Phänotyp einem dominanten Erbgang. Betroffene Kälber wurden ausschließlich unter den Nachkommen von Energy P beobachtet. Eine Verbreitung des Defektes in der Holstein Population kann daher ausgeschlossen werden.

Die Forschergruppe weist darauf hin, dass das Auftreten genetischer Besonderheiten keine neue Erscheinung ist. Vielmehr ist es mit Hilfe modernster Methoden der Genomanalyse nun möglich, bisher unentdeckte Besonderheiten wesentlich schneller aufzuklären. Spontane Mutationen, wie im vorliegenden Fall, treten im Genom aller Individuen auf. Da die meisten Mutationen keine nachweisbaren Auswirkungen haben, sind sie züchterisch nicht relevant. Bei spontanen Mutationen in

# 2016: Erbfehler müssen als solche erst einmal erkannt werden

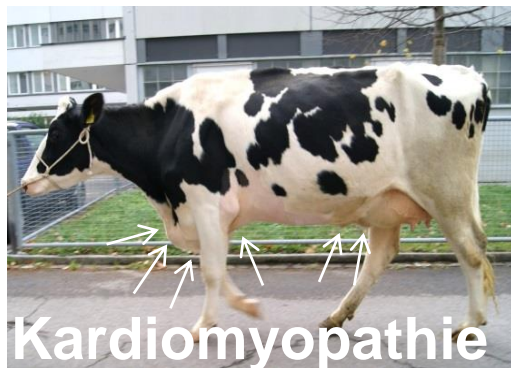
Erfassung und Meldung oftmals suboptimal

**insbesondere für “problematische” Phänotypen:**

Resorption/Aborte (embryonal/fetal)

milde/subtile Erkrankungen (schwierig als solche zu erkennen)

später im Leben auftretende Probleme



# 2016: Erbfehler müssen als solche erst einmal erkannt werden

Erfassung und Meldung oftmals suboptimal

**insbesondere für “problematische” Phänotypen:**

Resorption/Aborte (embryonal/fetal)

milde/subtile Erkrankungen (schwierig als solche zu erkennen)

später im Leben auftretende Probleme

Systematische Erfassung von “Besonderheiten” wünschenswert

**Beispiele:**

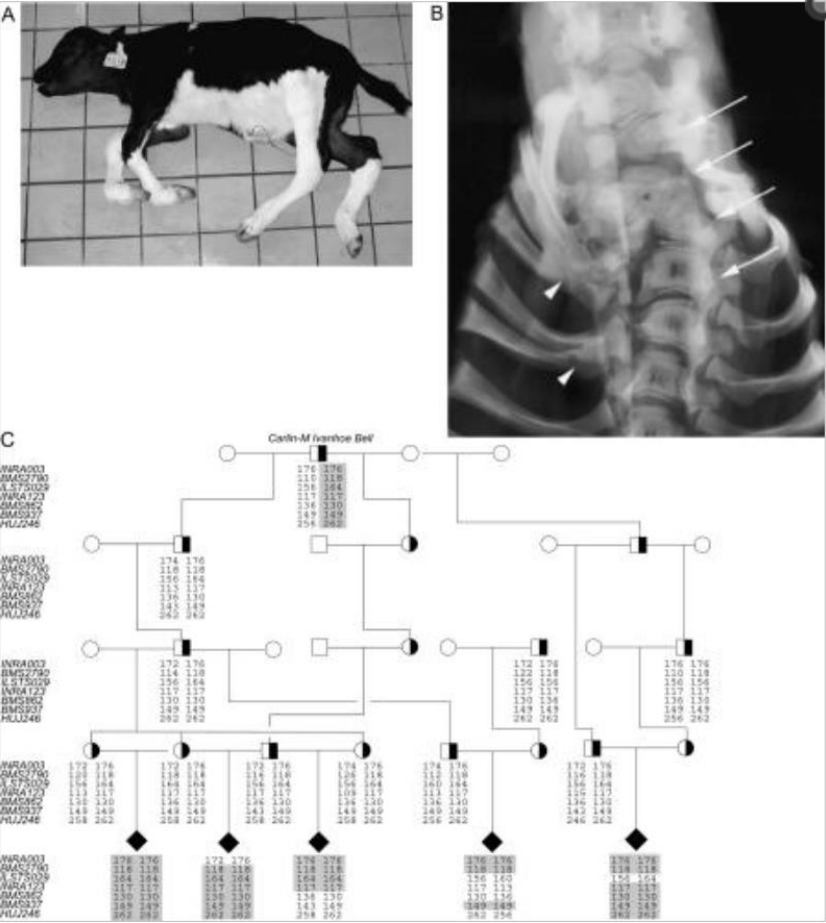
CH: *TierVerkehrsDatenbank + Projekt Netzwerk Rindergesundheit*

D: *Integrative Genomik in der Rinderzucht*

DK: *Danish Bovine Genetic Disease Programme*

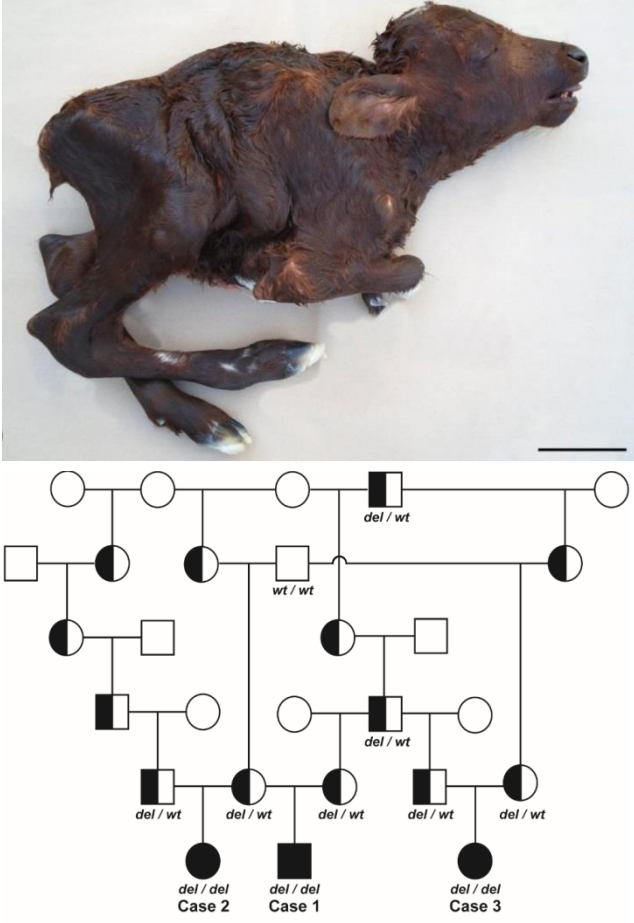
# Dänemark hat ein effizientes Monitoringsystem etabliert

## CVM bei Holsteins



Thomsen et al. Genome Res (2006) 16: 97-105

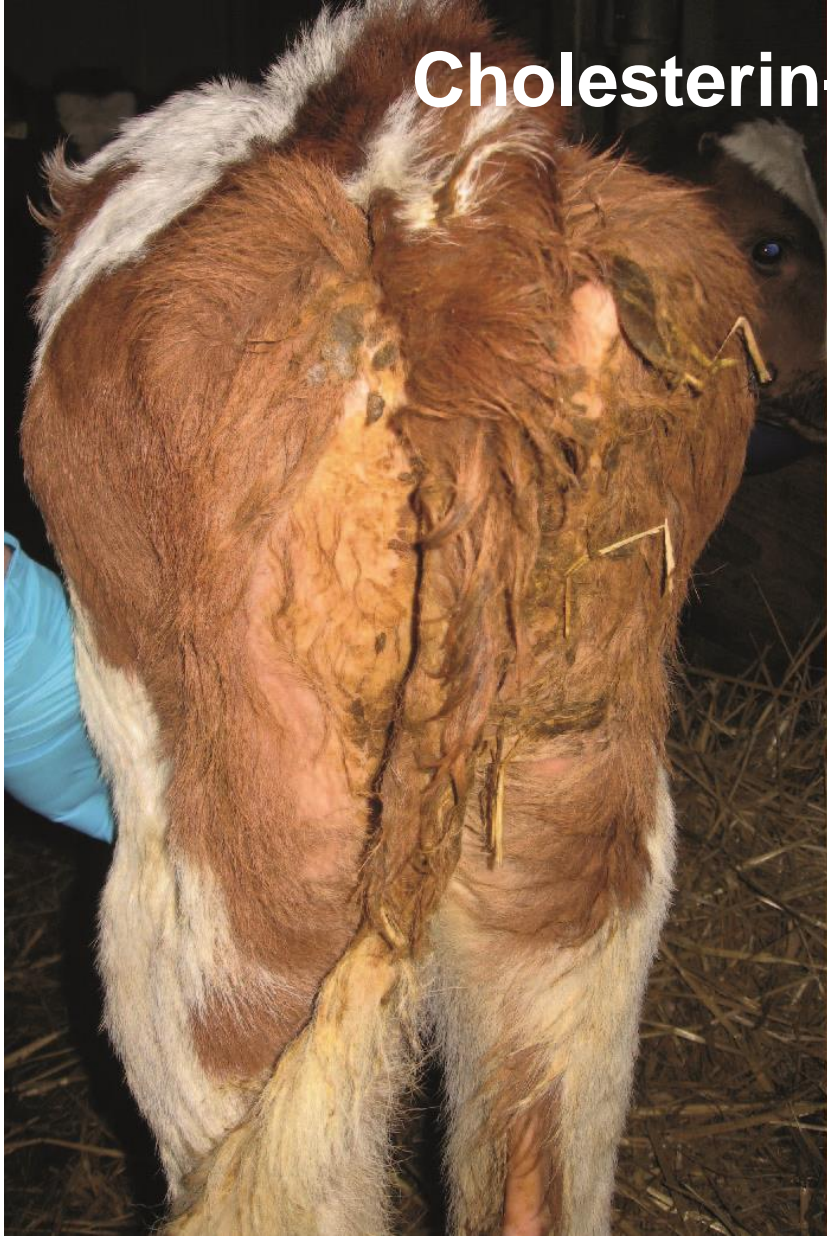
## AMC beim Roten Milchrind



Agerholm et al. BMC Genomics (2016) in press

# Jüngstes Beispiel: Ein neuer Erbfehler bei Holstein Rindern?

Cholesterin-Defizienz



Holstein

## **Gendefekt wird über Storm-Blut verbreitet**

---

seit Spätsommer 2015:

indirekter **Haplotypentest** auch in der Schweiz verfügbar

**Problem:** geringe Genauigkeit (ca. 80%)

da assoziierter **Haplotyp mit und ohne Mutation** vorkommt

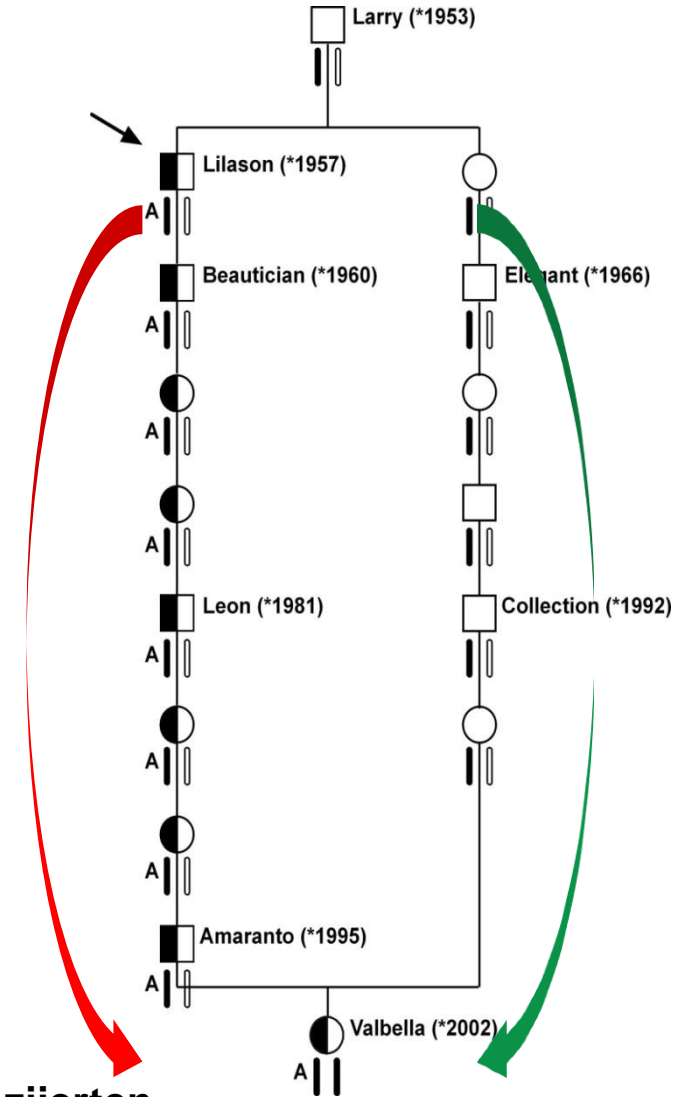


# Grenzen der indirekten Erbfehlerdiagnostik



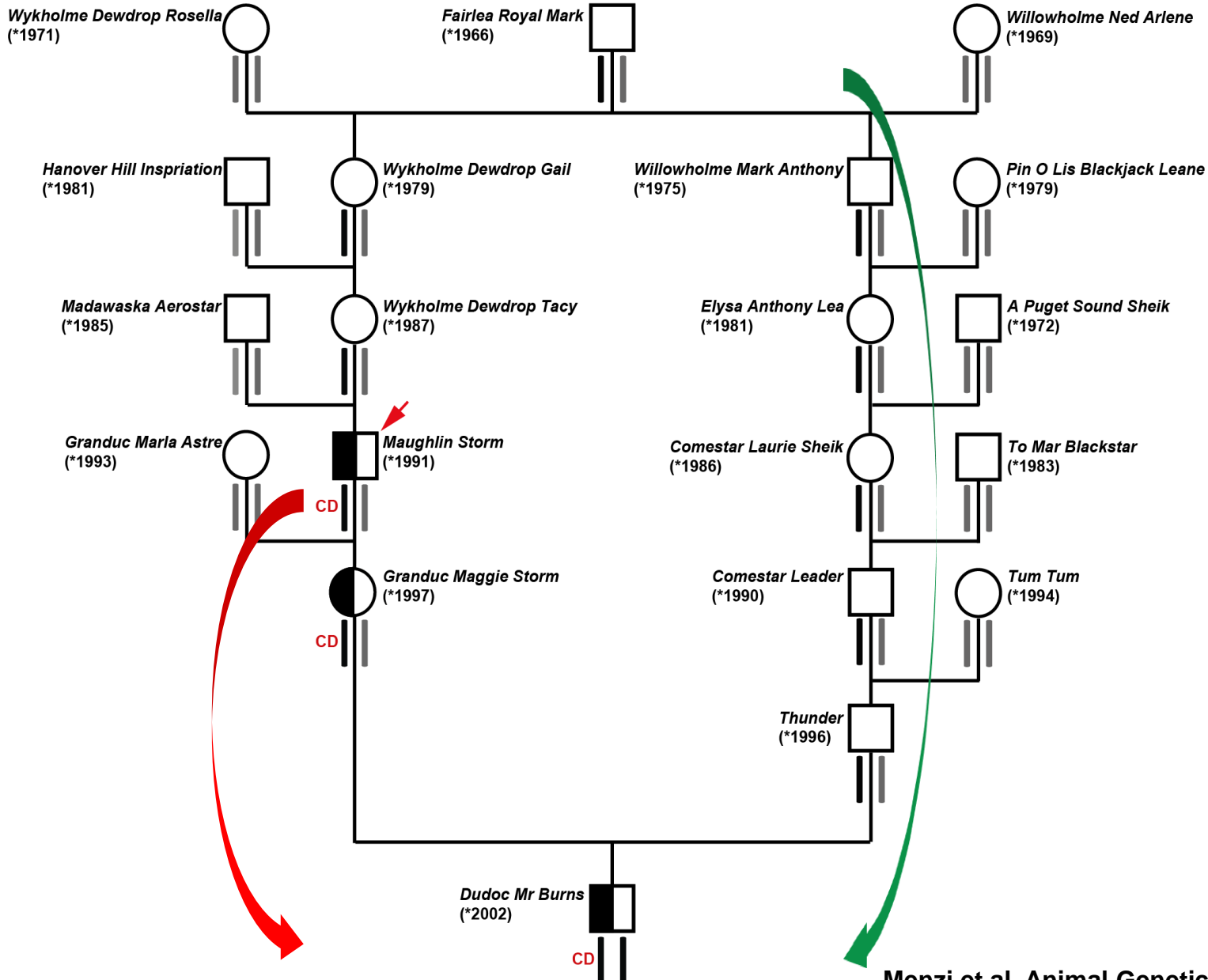
**Genotyp am Defektgenort **indirekt nicht genau bestimmbar****  
**z. B. Anlageträger ohne Meldung betroffener Nachkommen**

# Haplotypbasierte Erbfehlerdiagnostik ist oftmals ungenau



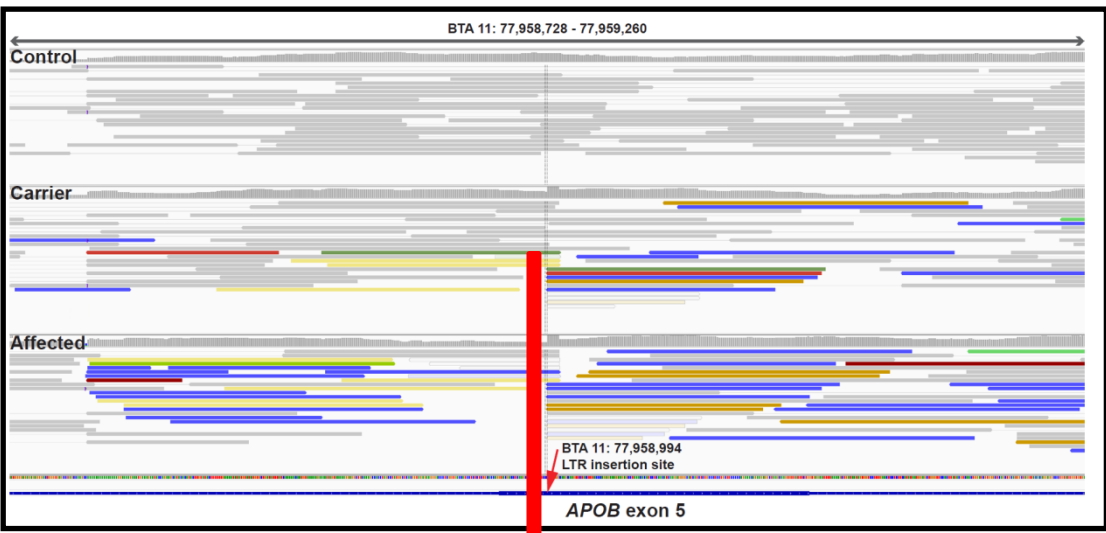
Durchbruch: ingezüchtete Kuh homozygot für den assoziierten Haplotyp, aber **heterozygot** für die kausale *SUOX* Mutation!

# Cholesterin-Defizienz: assoziierter Haplotyp mit und ohne Mutation

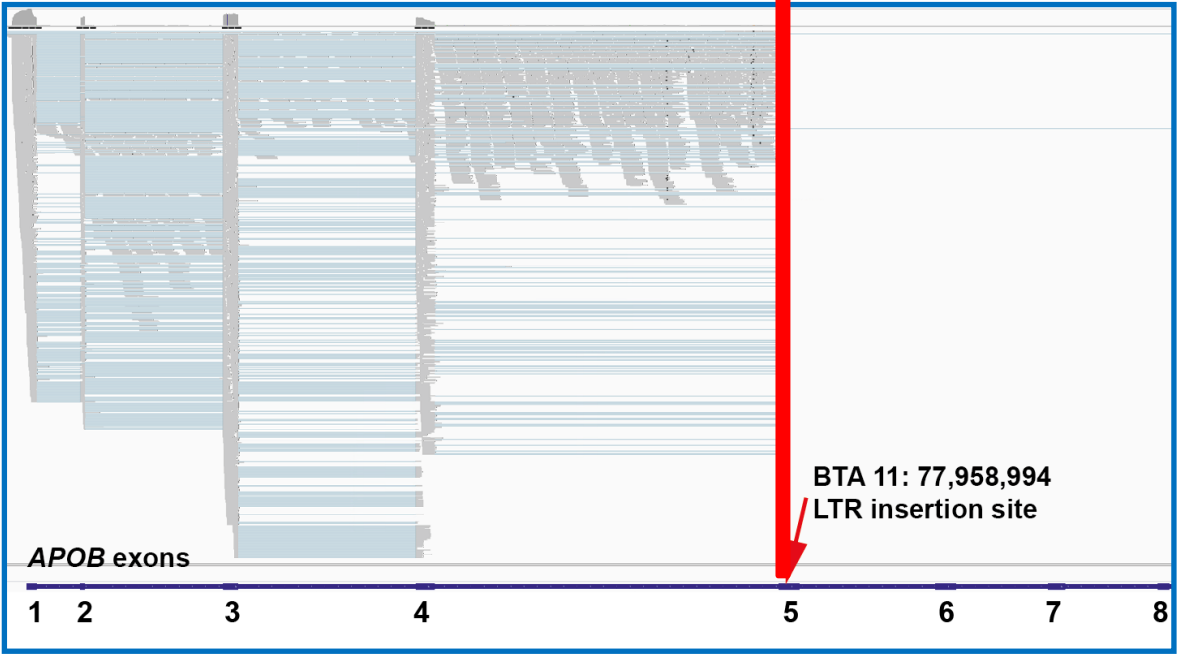


# Genomsequenzierung von 2 Tieren sowie eines Transkriptoms offenbarte die kausale Mutation für die Cholesterin-Defizienz

DNA



RNA

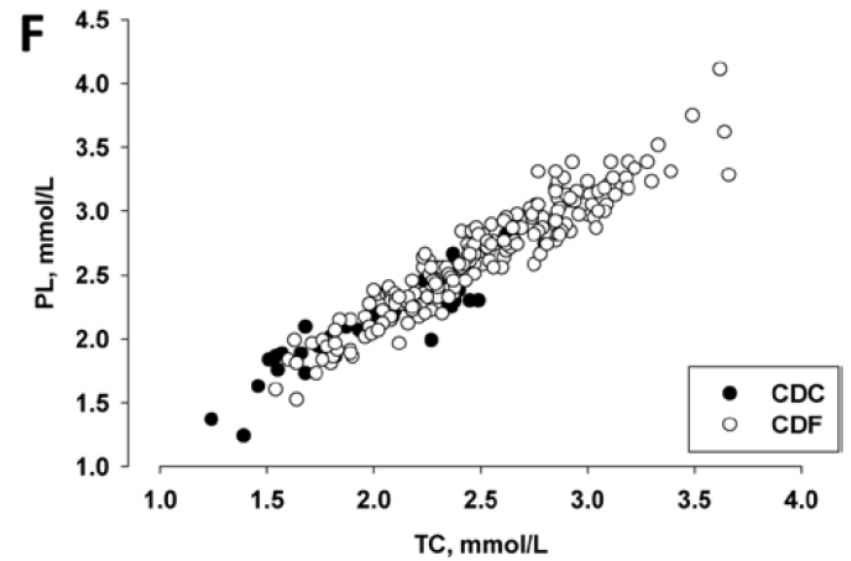
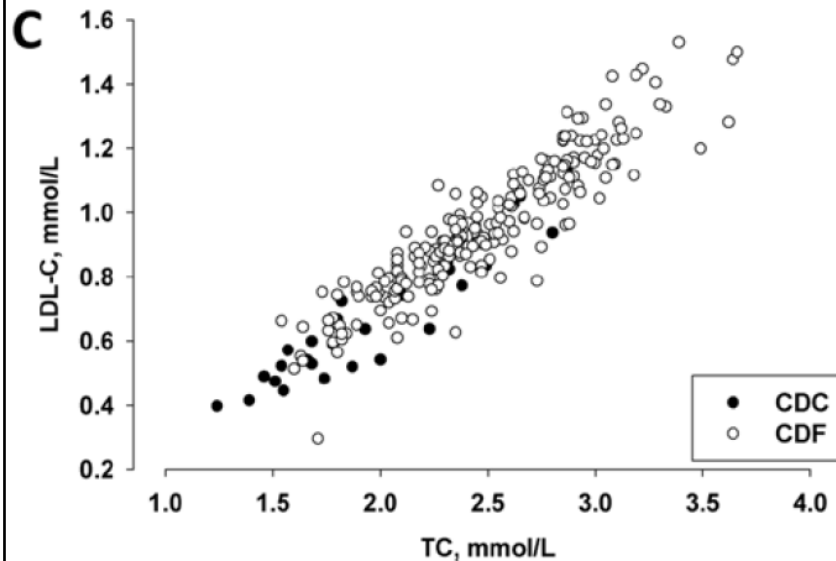


# Welche Effekte hat die identifizierte *APOB* Funktionsverlustmutation?

44 erkrankte Kälber (40 homozygot, 4 heterozygot) → unvollständig dominant??

## Rapid Communication: Cholesterol deficiency–associated *APOB* mutation impacts lipid metabolism in Holstein calves and breeding bulls<sup>1</sup>

J. J. Gross,<sup>\*2</sup> A.-C. Schwinn,<sup>\*2</sup> F. Schmitz-Hsu,<sup>†</sup> F. Menzi,<sup>‡</sup>  
C. Drögemüller,<sup>‡</sup> C. Albrecht,<sup>§</sup> and R. M. Bruckmaier<sup>\*3</sup>



# **Fazit: Genetische Besonderheiten und Erbfehler sind hochaktuell**

Molekulare Aufklärung mittels **Genomsequenzierung** besser möglich denn je

- 1) direkt mit betroffenen Tieren (**Phänotyp-basiert**)
- 2) indirekt **basierend auf SNP-Genotypen** (missing homozygosity)

Somit gilt: Es gibt immer mehr bekannte **rezessive** Defekte...

... und zusätzlich kommen vereinzelt **dominante Spontanmutationen** vor

## **Offene Fragen:**

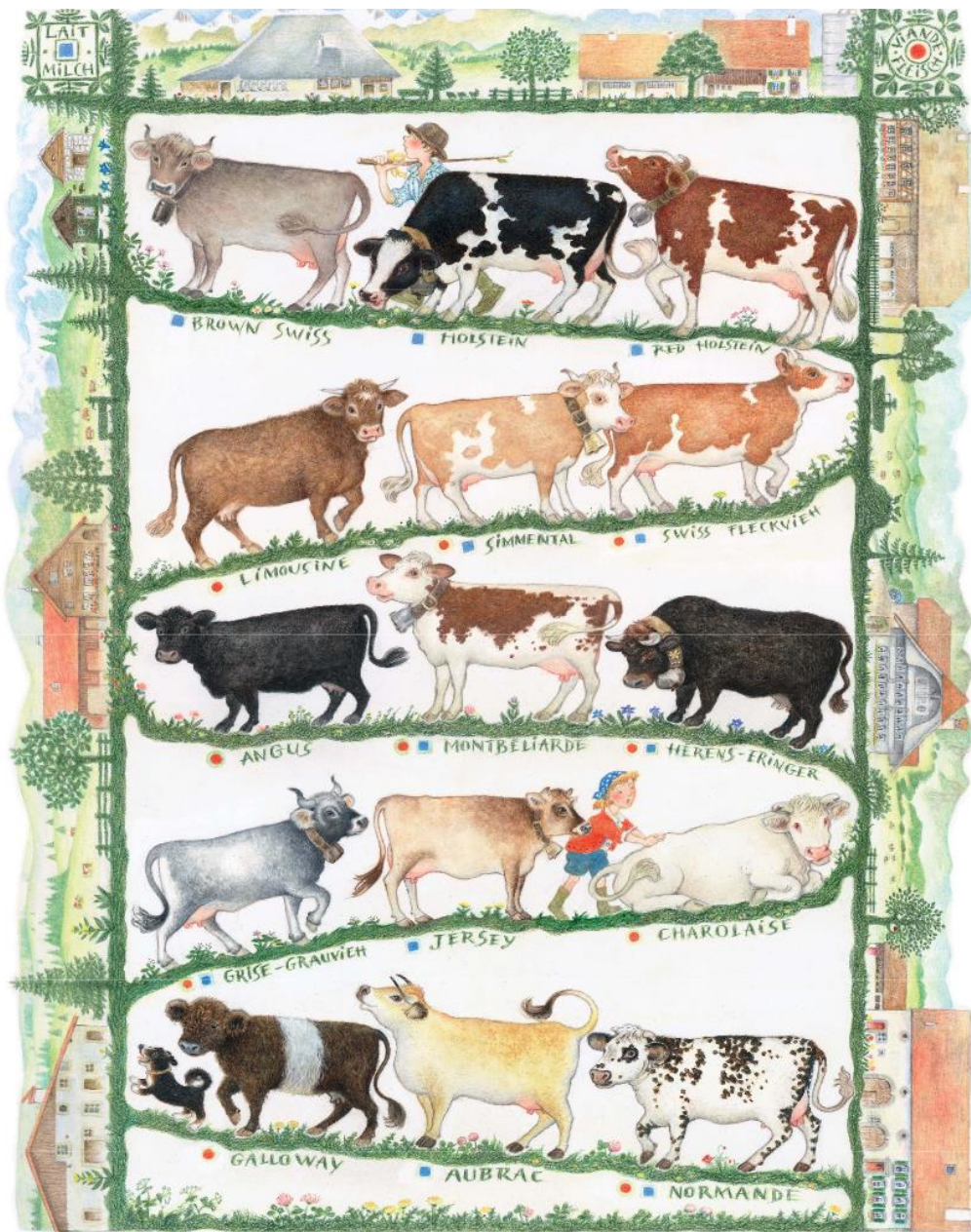
- 1) effizientes **Monitoring**
- 2) **Erbfehlermanagement** (Index)
- 3) **Genomsequenzierungen zukünftiger Zuchttiere**

**Besten Dank für die Unterstützung...**

**...an viele aufmerksame Züchter und Veterinäre, sowie ...**



Fragen?



PROCHES DE VOUS. LES PAYSANS SUISSES.  
GUT, GIBT'S DIE SCHWEIZER BAUERN.  
GRAZIE, CONTADINI SVIZZERI.