

Umstellung der Abstammungskontrolle beim Reitpferd

Seit über zwei Jahrzehnten wird die Abstammungsüberprüfung beim Pferd in Deutschland mittels molekulargenetischer Diagnostik im Labor durchgeführt. Bisher wurden zur Abstammungskontrolle beim Pferd sogenannte Mikrosatellitenmarker untersucht, die sich an verschiedenen Stellen des Pferdegensoms (Erbsubstanz oder DNA) finden. Üblicherweise werden beim Pferd als Ausgangsmaterial für DNA-Untersuchungen Haarproben genommen: Die Haarwurzeln enthalten Zellen mit einem Zellkern, in dem sich die Erbinformation befindet. International hat man sich 1997 auf ein Set von insgesamt 17 Mikrosatelliten zur Abstammungsüberprüfung bei Pferden geeinigt, darunter 12 Standardmarker und 5 Marker für erweiterte Untersuchungen. Die Internationale Gesellschaft für Tiergenetik (ISAG) hat bei der Abstimmung des Sets von verwendeten Mikrosatelliten eine koordinierende Rolle inne. In der Routine werden in Deutschland dementsprechend meist 12 Mikrosatellitenmarker untersucht, um zu überprüfen, ob ein Fohlen wirklich von der Stute und dem Hengst abstammt, die in den Papieren angegeben werden.

Ab dem 1. Januar 2021 erfolgt in der deutschen Reitpferdezucht schrittweise der Umstieg von Mikrosatellitenmarkern auf ein SNP-basiertes System. Was sind Mikrosatelliten, was bedeutet die Umstellung der Abstammungskontrolle für die Pferdezucht und was verbirgt sich hinter der Abkürzung SNP?

Was sind Mikrosatelliten?

Mikrosatelliten sind Stellen im Genom, an denen sich ein sehr kurzer Abschnitt, ein sogenanntes Motiv, vielfach wiederholt. Die Anzahl der Wiederholungen eines Motivs unterscheidet sich zwischen Tieren und kann beispielsweise zwischen 2 und 20 variieren. Bei der Abstammungskontrolle wird überprüft, ob die Varianten (d.h. die Anzahl der Motivwiederholungen) bei jedem der untersuchten Mikrosatellitenmarker, die beim Fohlen vorliegen, zu denen der Elterntiere passen. Wenn das Fohlen eine Variation aufweist, die es nicht von seinen Eltern geerbt haben kann, wird die Abstammung angezweifelt. Dieser Abgleich setzt voraus, dass für beide Elterntiere, d.h. Hengst und Stute, Informationen zu denselben Mikrosatellitenmarkern wie für das Fohlen vorliegen.

Wenn in der Praxis Haarproben an ein Labor zur Abstammungsüberprüfung übermittelt werden, werden die Ergebnisse danach dem Auftraggeber, z.B. dem betreuenden Pferdezuchtverband, direkt mitgeteilt und/oder elektronisch in die Pferdezuchtdatenbank übertragen, die für die meisten Verbände beim Dienstleister Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung w.V. (vit) angesiedelt ist. In der Datenbank kann die Information zu den Mikrosatelliten und zum Ergebnis der Abstammungsüberprüfung vom Verband dann jederzeit abgerufen werden.

Alternativ zu den Mikrosatelliten, kann die Abstammung auch anhand anderer genomischer Marker

überprüft werden: durch Einzelnukleotidpolymorphismen (im Englischen *Single Nucleotide Polymorphism*, kurz **SNP**).

Was sind SNPs?

Ein SNP bezeichnet eine einzelne Stelle in der DNA, an der sich Individuen voneinander unterscheiden. Während Mikrosatelliten in vielen Varianten auftreten können, kann jeder einzelne SNP üblicherweise nur in zwei verschiedenen Varianten vorliegen. Im Gegensatz zu Mikrosatelliten gibt es jedoch Millionen SNPs in der Erbsubstanz eines Pferdes. Ein Set von mehreren Dutzend bis wenigen hundert SNPs reicht aus, um einen individuellen, genetischen Fingerabdruck für ein Tier zu erstellen. Wie auch bei Mikrosatelliten wird eine SNP-Variante vom Vater und eine von der Mutter geerbt. Dadurch ist es möglich, über den Abgleich zwischen Nachkommen und Eltern zu überprüfen, ob die angegebenen Elterninformationen plausibel sind und so die Abstammungskontrolle durchzuführen.

Für die Routinediagnostik werden sogenannte SNP-Chips angeboten, mit deren Hilfe die Varianten von Zehntausenden oder auch Hunderttausenden SNPs in der Erbsubstanz eines Tieres parallel untersucht werden können. Wenn für ein Tier eine DNA-Probe vorhanden ist, kann mit Hilfe des SNP-Chips demnach ermittelt werden, welche Varianten ein Pferd für die untersuchten SNPs trägt. Die Labordiagnostik ist mittlerweile kostengünstiger geworden, und der Preis einer Typisierung von 17 Mikrosatelliten ist vergleichbar mit dem einer Typisierung von rund 80.000 SNPs.

Der Vorteil von SNPs besteht darin, dass sie in großer Anzahl vorhanden und flächendeckend über die Erbsubstanz verteilt sind. Dadurch lassen sich Informationen des SNP-Chips, neben der Abstammungsüberprüfung, für weitere züchterische Fragestellungen nutzen. Für die Schätzung genomischer Zuchtwerte und die genomische Selektion ist die Verwendung eines SNP-Chips beispielsweise eine grundlegende Voraussetzung. Im Rinderbereich kommt die genomische Selektion in der Milchviehzucht schon seit über 10 Jahren erfolgreich zur Anwendung. Auch spezielle, z.B. für die Ausprägung von Fellfarben oder auch Erbkrankheiten wichtige Einzelpositionen können über SNP-Chips untersucht werden.

Umstellung der Abstammungskontrolle

Die Vorteile der SNP-Analytik sprechen für sich. Jedoch müssen gewisse Dinge berücksichtigt werden, wenn es um einen Methodenwechsel bei einem Routineverfahren wie der Abstammungsüberprüfung geht. Zum 1. Januar 2021 stellen die ersten Zuchtverbände die Abstammungskontrolle beim Reitpferd von einem Mikrosatelliten-basierten Verfahren auf ein SNP-basiertes Verfahren um. Zu Beginn wird es eine Umstellungsphase geben, in der neu geborene Fohlen für SNPs typisiert werden, aber für die Elterntiere nur Informationen zu den Mikrosatelliten vorliegen. SNPs und Mikrosatelliten sind vollkommen unterschiedlich und lassen sich nicht miteinander vergleichen. Um zu umgehen, dass Elterntiere für SNPs nachtypisiert werden müssen, was sich in der Masse sehr kostenintensiv gestalten würde,

kann das Verfahren der sogenannten Imputation genutzt werden.

Was ist Imputation?

Imputation ist ein computergestütztes Rechenverfahren, bei dem ein Computerprogramm lernt, welche Mikrosatellitenvariante in Kombination mit welchen SNP-Varianten vorkommt. Basierend auf SNP-Daten bei einem Fohlen können dann seine Mikrosatellitenvarianten abgeleitet werden, die danach mit den Eltern abgeglichen werden. Nach einigen Jahren werden sowohl für die neue Elterngeneration als auch ihre Nachkommen SNP-Daten vorliegen, die für einen direkten Vergleich und damit für eine Abstammungskontrolle genutzt werden können.

Um das Verfahren der Imputation nutzen zu können, bedarf es einer sogenannten Lernstichprobe. Eine Lernstichprobe besteht aus Tieren, die sowohl für Mikrosatelliten als auch für SNPs typisiert wurden. Das Imputationsprogramm lernt anhand dieser Stichprobe, welche Mikrosatelliten-SNP-Kombinationen in einer Population von Pferden vorkommen können. Eine solche Lernstichprobe wurde in den vergangenen zwei Jahren von fünf Pferdezuchtverbänden gemeinschaftlich erstellt (Verband der Züchter des Oldenburger Pferdes e.V., Springpferdezuchtverband Oldenburg-International e.V., Westfälisches Pferdestammbuch e.V., Trakehner Verband e.V., Verband der Züchter des Holsteiner Pferdes e.V.). Bis zum Herbst 2020 umfasste die Lernstichprobe rund 2.000 Pferde, bis zum Jahresende 2020 werden es knapp 5.000 Pferde sein. Das Verfahren zur Imputation von Mikrosatelliten aus SNPs wurde unter Federführung des Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie (FBN) in Dummerstorf entwickelt und für die Routineimplementierung an das vit übergeben.

Das Verfahren der Imputation wurde ausführlich auf seine Genauigkeit getestet und weist sehr hohe Sicherheiten auf. Trotzdem kann es in seltenen Fällen (ca. 1 Prozent) dazu kommen, dass für einzelne Tiere eine falsche Mikrosatellitenvariante imputiert wird. Die Folge ist, dass eine Abstammung zu Unrecht angezweifelt wird. Ergibt der Abgleich der aus SNPs abgeleiteten Mikrosatelliten mit den elterlichen Mikrosatelliten das Ergebnis "bestritten", sollte daher zunächst im Labor eine Nachtypisierung des Fohlens für die 12 bisher eingesetzten Mikrosatelliten erfolgen. Im Gegensatz dazu ist es extrem unwahrscheinlich, dass einem Fohlen eine falsche Abstammung zugeschrieben wird – denn dafür müssten durch Fehler bei der Imputation für alle 12 Mikrosatelliten exakt die Varianten "getroffen" werden, die bei den fälschlicherweise angegebenen Eltern auftreten. Die Wahrscheinlichkeit dafür liegt bei etwa $0,1^{12}$ – ein Sechser im Lotto wäre wahrscheinlicher.

Die imputierten Mikrosatelliten werden in der Pferdezucht-Datenbank von vit hinterlegt werden und sind dort für die Pferdezuchtverbände abrufbar – analog zu Mikrosatelliten-Ergebnissen aus dem Labor, aber mit dem entsprechenden Herkunftsvermerk "vit".

Obwohl die SNP-Typisierung im Labor gut automatisiert ist, braucht sie im Vergleich zu einem Mikrosatellitenprofil aktuell noch ein wenig länger. Wenn Sie für ein Pferd sehr schnell eine Abstammungsüberprüfung benötigen, empfiehlt es sich daher, dafür noch das alte System der Mikrosatelliten zu nutzen. Wenn Sie trotzdem von den Vorteilen bekannter SNP-Genotypen profitieren möchten, können Sie gleichzeitig eine SNP-Genotypisierung und eine Mikrosatelliten-Analyse beim Labor in Auftrag geben. Außerdem ist das Imputationsverfahren noch nicht international mit der Mikrosatellitenbestimmung im Labor gleichgestellt. Sollten Sie ein offizielles Abstammungszertifikat (Abstammungsgutachten) benötigen, ist dafür weiterhin die klassische Mikrosatellitenuntersuchung im Labor notwendig, denn nur ein akkreditiertes Labor darf ein solches ausstellen. Es ist jedoch zu erwarten, dass in den kommenden Jahren weitere europäische Länder nach und nach auf eine SNP-basierte Abstammungskontrolle umsteigen werden und damit auch eine Anpassung des internationalen Standards erfolgen wird. Entsprechende Ringtests zur Vorbereitung werden aktuell unter dem Dach der ISAG analog zu den Mikrosatelliten durchgeführt.

Ändert sich die Abstammungskontrolle auch für Ponys, Kleinpferde und Spezialrassen?

Gegenwärtig ist das Imputationsverfahren nur auf Reitpferde ausgelegt. Da sich Pferderassen genetisch unterscheiden, ist eine zuverlässige Imputation von Mikrosatelliten bei Ponys, Kleinpferden und Spezialrassen (PKS) basierend auf genetischen Informationen von Warmblütern nicht zuverlässig. Für diese Rassen wird das Imputationsverfahren keine Option für die Übergangszeit darstellen. Für PKS-Rassen bietet sich eine fortgesetzte Nutzung der Mikrosatelliten an, beziehungsweise ein fortschreitender, länger anhaltender Prozess, in dem regelmäßig Tiere doppelt typisiert werden (SNP und Mikrosatelliten) bis genügend Informationen vorhanden sind, um einen direkten Vergleich (SNP) zwischen Eltern und Fohlen zu nutzen.

Kann die neue Abstammungskontrolle in jedem Labor durchgeführt werden?

Zum Auslesen von SNP-Daten ist für jedes SNP-Chip-Fabrikat ein spezielles Gerät notwendig, über das nicht jedes Labor verfügt. In Deutschland soll ab 2021 ein neu entwickelter SNP-Chip zum Einsatz kommen, für den Untersuchungslabore zunächst ihre Untersuchungsgenauigkeit nachweisen müssen. Und auch die Rollen von Labor und Datenverarbeitungsstelle ändern sich: Bisher haben Labore nach der Mikrosatellitenbestimmung oft nicht nur die Mikrosatelliten Daten als solche übermittelt, sondern auch selbst die Abstammungsüberprüfung, d.h. den Abgleich mit den Elterndaten, durchgeführt und das Ergebnis "unbestritten" oder "bestritten" als Abstammungsgutachten an den Pferdezuchtverband zurückgemeldet. Zukünftig werden die Labore die SNP-Typisierung vornehmen und die Daten an vit übermitteln, welches die weiteren Schritte übernimmt. So werden die SNP-Daten nicht nur in der eigens angelegten Genomdatenbank gespeichert,

sondern es erfolgt anschließend zunächst die Imputation der Mikrosatelliten und dann der Abgleich mit den elterlichen Mikrosatelliten, also die Plausibilitätsprüfung im Sinne der Abstammungskontrolle.

Welche Vorteile bringt der Umstieg auf ein SNP-basiertes Verfahren und was bedeutet das für die deutsche Pferdezucht?

Aus der Projektinitiative der fünf oben genannten Pferdezuchtverbände heraus, die auch die Entwicklung des Imputationsverfahrens ermöglichte, wurde ein neuer SNP-Chip entwickelt, über den mehr als 80.000 SNPs für jedes Pferd ausgelesen werden können. Einige dieser SNPs sind sogenannte diagnostische Marker, die sonst in Einzelgentests angewendet werden und entsprechend im Labor zu beauftragen sind. Damit lassen sich über den SNP-Chip gegen einen Aufpreis auch Informationen wie Fellfarben oder die Veranlagung für ausgewählte Krankheiten abrufen. Leider können nicht alle Gene, die ursächlich für genetisch bedingte Krankheiten oder Erbdefekte sind, über den Chip abgefragt werden, denn die zugrundeliegenden Gentests sind zum Teil patentrechtlich geschützt. Für solche Gentests können jedoch Sonderregelungen getroffen werden, was bei der SNP-Chip-Entwicklung für PSSM2 geschehen ist, so dass hierfür die verantwortlichen Gene gegen ein Entgelt freigeschaltet und ausgelesen werden können. Genetische Informationen von besonderem züchterischen Interesse werden somit durch die Umstellung einfacher, schneller und auch kostengünstiger verfügbar sein. Gegenwärtig laufen Arbeiten zur Entwicklung und Implementierung der genomischen Zuchtwertschätzung und Selektion beim Reitpferd in Deutschland. Durch die Umstellung der Abstammungskontrolle auf ein SNP-basiertes System können für alle Pferde mit SNP-Genotypdaten genomische Zuchtwerte ermittelt und ausgewiesen werden, sobald das Verfahren verfügbar wird. Und jedes Fohlen, das zur Abstammungskontrolle mittels SNP-Chip untersucht wurde, trägt zur Stärkung des genomischen Schätzsystems bei, sobald es später zur Beurteilung vorgestellt wird und Informationen zu züchterisch relevanten Merkmalen verfügbar werden. Außerdem lassen sich basierend auf SNP-Daten für Pferdepopulationen zusätzliche Parameter wie Verwandtschafts- und Inzuchtkoeffizienten berechnen.

Die flächendeckende SNP-Typisierung von Reitpferden auf diesem Niveau, d.h. mit einem 80.000er SNP-Chip, ist international einzigartig und eröffnet der deutschen Pferdezucht in ihrer Entwicklung neue Möglichkeiten. Das Umsatteln auf das moderne Verfahren der SNPs lässt Deutschland in dieser Hinsicht eine Vorreiterrolle einnehmen und setzt neue Maßstäbe.

- **Abläufe für den Züchter unverändert:**
 - Entnahme von Haarproben und Einsenden zur Laboranalyse in ausgewählte Vertragslabore**
 - nach Auslesen des SNP-Chips im Labor zunächst Nutzung eines Umrechnungsverfahrens (Imputation) zur Abstammungsüberprüfung**
 - Offizielle Abstammungsnachweise von akkreditierten Laboren weiterhin mittels Mikrosatelliten**
 - Abstammungskontrolle für PKS-Rassen vorerst unverändert mittels Mikrosatelliten**
 - SNP-Chip enthält diagnostische Marker: z. B: für Fellfarben oder verschiedene erbliche Krankheiten**
 - Speicherung der SNP-Daten in der Genomdatenbank bei vit (Verden) als Basis für zukünftige genomische Anwendungen**

- **Umstellung der molekulargenetischen Abstammungskontrolle beim Reitpferd ab dem 1. Januar 2021 (verbandsabhängig)**
- **Wechsel von Mikrosatelliten zu SNPs**