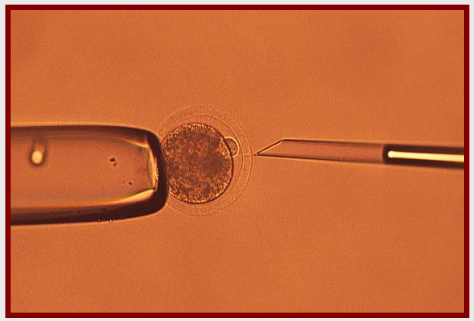
DAF-Tagung „Klimawandel und Extremwettereignisse: ein Problem für die Landwirtschaft? "
v.TI, Braunschweig, 7. und 8.11.2012

Tierische Erzeugung im Klimawandel: Auswirkungen und Anpassungen - aus der Sicht der Züchtung

- Tierproduktion und Klima-relevante Emissionen
- Genomanalyse bei Nutztieren/ Genomischer Zuchtwert
- Somatisches Klonen/Transgene Tiere
- Neue molekulare Methoden (ZFNs, Transposons)
- Schlußfolgerungen

Prof. Dr. Heiner Niemann

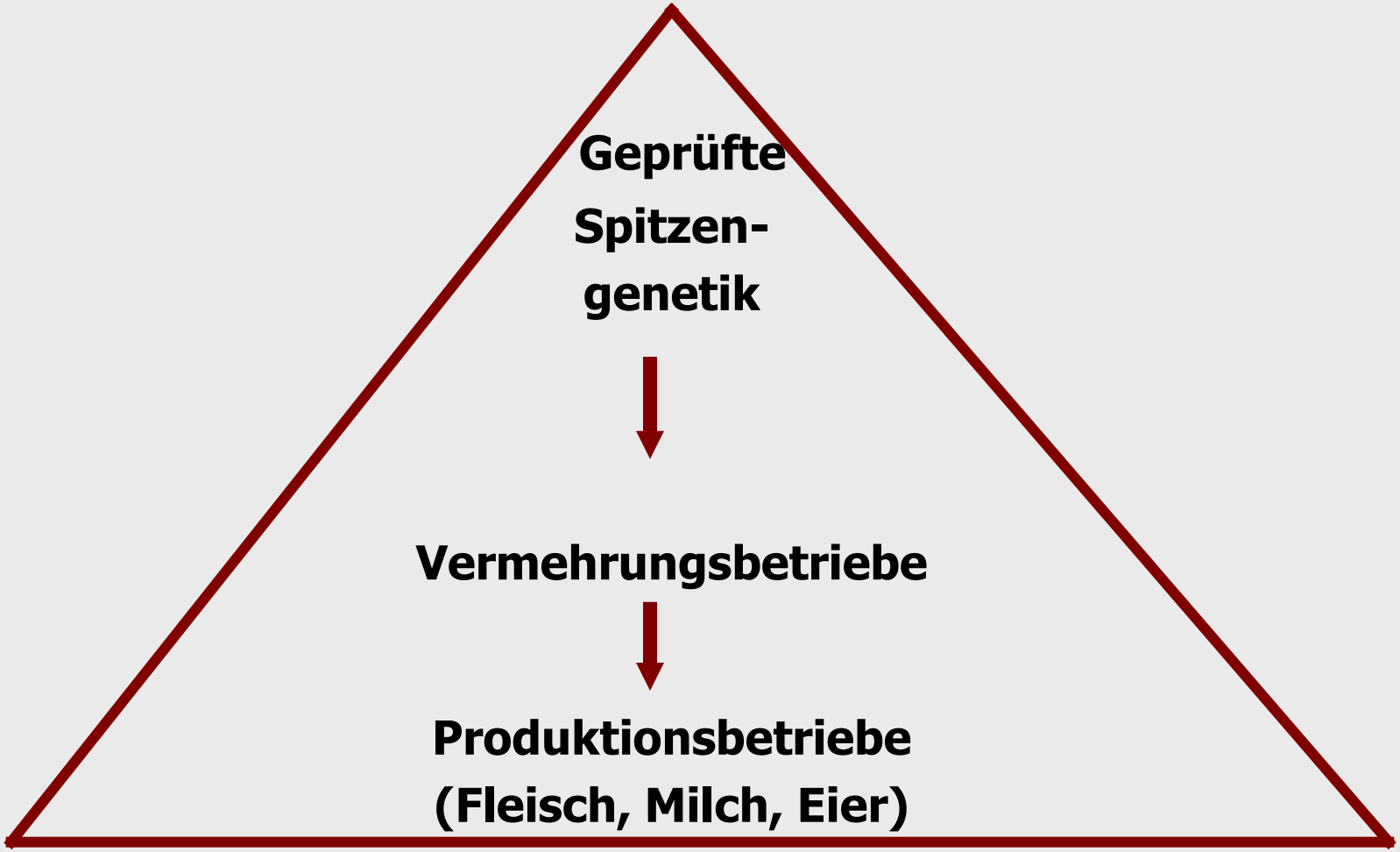
Institut für Nutztiergenetik
(Friedrich Loeffler Institut; FLI)
Mariensee, Neustadt, Germany



Entwicklung der Tierzucht

- Domestikation
- Vermehrung „nützlicher“ Populationen
- Auslese nach Exterieur
- Auslese nach spezieller Eignung
- Züchtung (Populationsgenetik, Statistik)
- Reproduktionstechnologien (KB, ET, etc)
- Molekulargenetik (Sequenzen, SNPs, etc)

Grundstruktur der modernen, globalisierten Tierzucht



Zuchtwertberechnung

- Der Zuchtfortschritt wird nach wie vor im Wesentlichen über die väterliche Seite erreicht.
- Die Zuchtwertberechnung geschieht über die Leistungen der Nachkommen (z.B. pro Testbulle 3-4000 Besamungen).
- Zur Zeit wird weltweit für die wichtigen Populationen auf den *genomischen Zuchtwert* umgestellt.
- Der Zuchtwert berücksichtigt mehrere Parameter
- Die Zuchtwerte sind global verfügbar.

Zusammenstellung eines Zuchtwerts am Beispiel der Milchrinderzucht

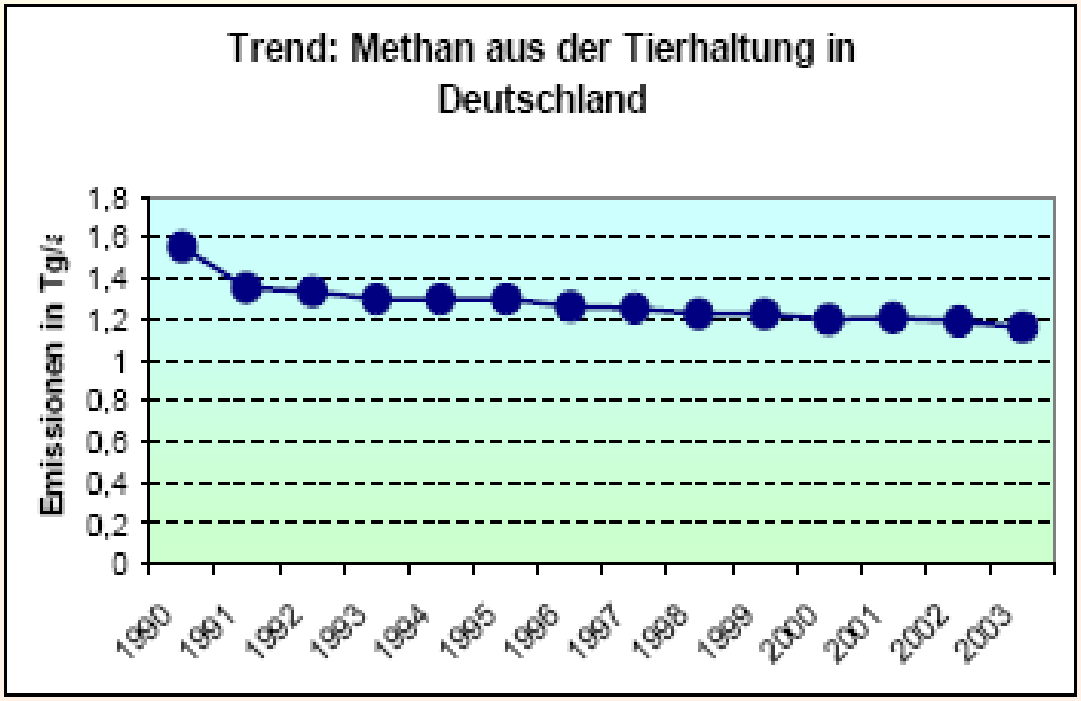
- Milchleistung (kg)
- Milchinhaltsstoffe (Eiweiß, Fett, Vitamine)
- Langlebigkeit/Robustheit
- Gesundheitsparameter
- Fruchtbarkeit
- Klauengesundheit
- u.a.

Die einzelnen Merkmale können prozentual unterschiedlich gewichtet werden.

Klima-relevante Emissionen durch landwirtschaftlich Nutztiere

- ~ein Drittel der globalen Klima-relevanten Emissionen entstammen der landwirtschaftlichen Produktion.
- Carbon-footprints (CO_{2eq}) zeigen die CO_2 Emissionen an.
- Carbon-footprints/Produkt: guter Indikator für die Futterverwertung.
- FAO: 1,3 kg CO_{2eq}/Milch (Nordamerika, Europa); 7,5 CO_{2eq}/Milch (Afrika)

Methan Emissionen aus der deutschen Tierhaltung



Quelle: UBA Treibhausgasinventar / in Gigatonnen

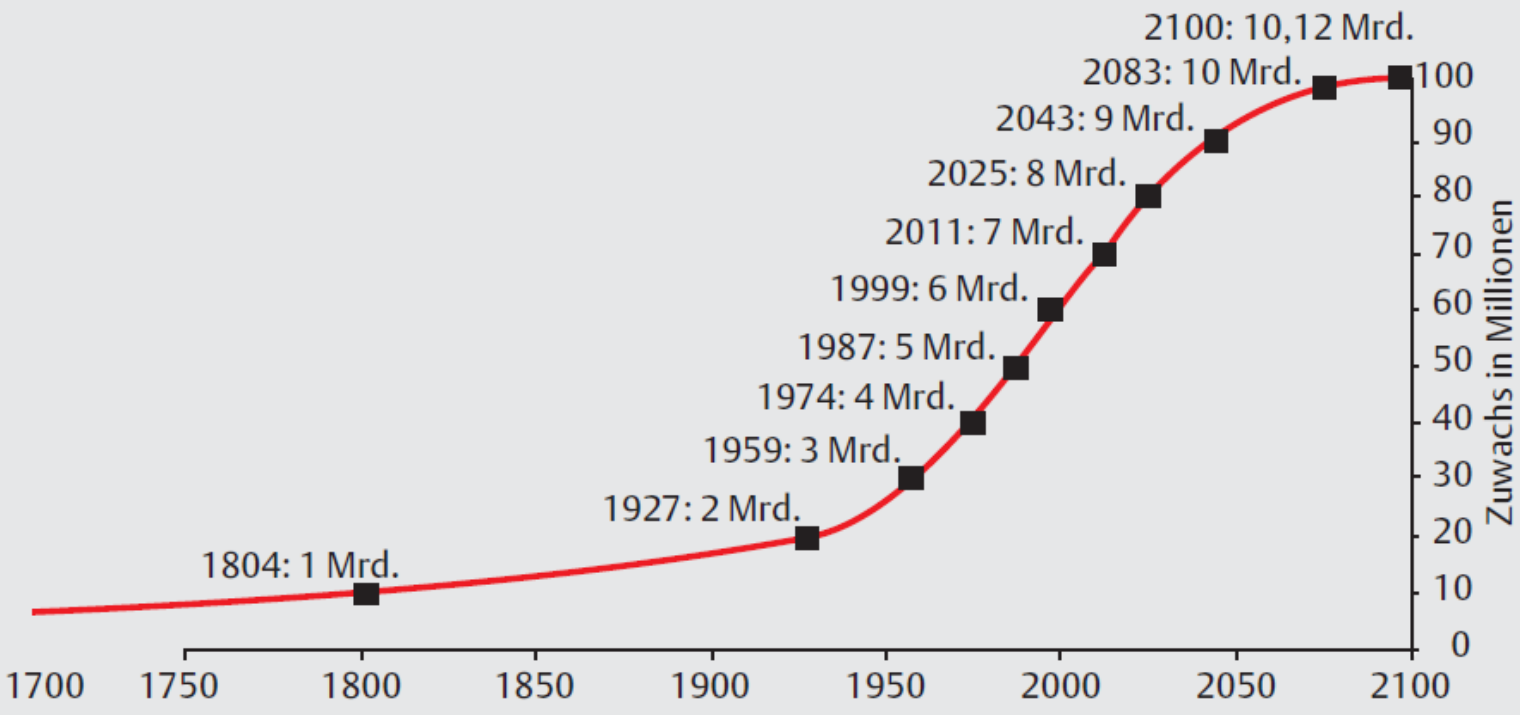
4000 ltr. Kuh: 123 kg Methan/Jahr
10.000 ltr. Kuh: 145 kg Methan/Jahr

Beitrag der deutschen Rinderproduktion zur Emission von Klima-relevanten Gasen

- Weltweite CO_2 Emission: 0,08% aus deutscher Rinderhaltung
- Weltweite Methan Emission: 0,04% aus deutscher Rinderhaltung
- Beitrag der weltweiten Rinderhaltung zu Methanemissionen: 3,7%

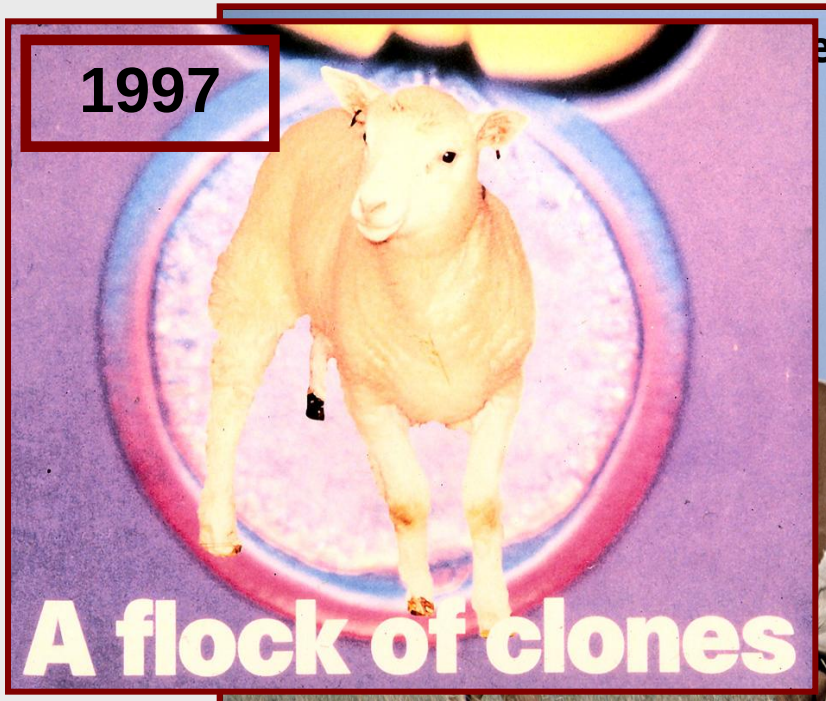
Projizierte Zunahme der Weltbevölkerung

ABB. 3 | ENTWICKLUNG DER WELTBEVÖLKERUNG

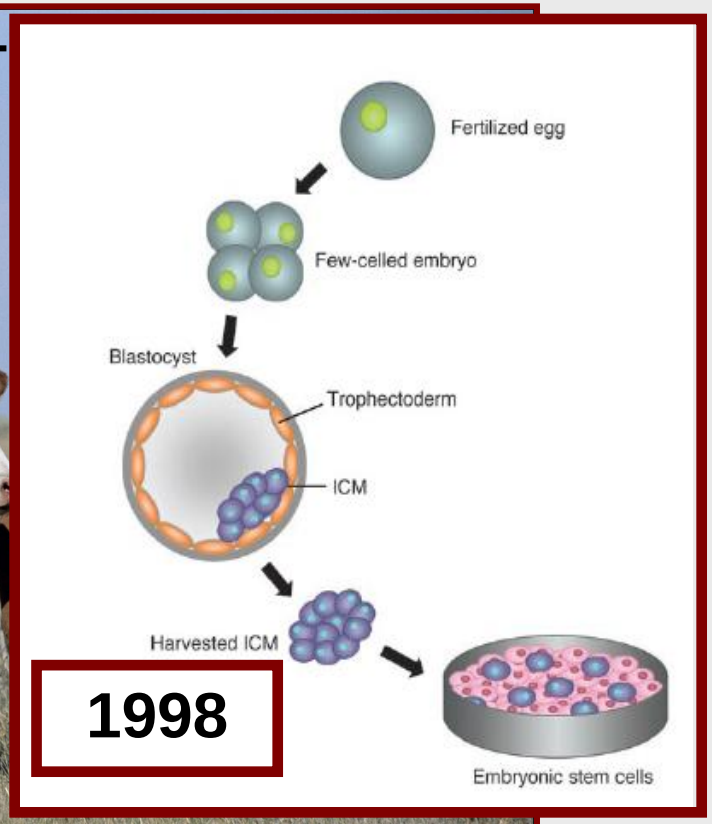


Quelle: UN, World Population Prospects: The 2010 Revision, 2011

Ein neues Zeitalter der Biologie: Genomik, epigenetische Reprogrammierung und Plastizität in der Entwicklung



es Rinder-



genom

2012: Schweinegenom erwartet

Sequenzierung und Annotierung des Rindergenoms

- Bovines Genom hat ~22,000 Gene, ähnlich wie Mensch und andere Säuger (http://BovineGenome.org)
- Grösse des Genoms: 2,87 (Gbp) Gigabase pairs, 60 Chromosomen
- ~5% des Genoms sind genomisch aktiv, d.h. werden abgelesen
- Hoher Grad der Homologie (14,345 orthologe Gene) der bovinen Gensequenz mit Mensch, Hund, Ratte, Maus; Transposons und Wiederkäuer-spezifische Repeats
- Rinder-spezifische Variationen bei Genen, die mit **Laktation**, Reproduktion, Energie Effizienz und **Immunabwehr** zu tun haben,

Nutzung der neuen genomischen Kenntnisse

- Transcriptomics/Proteomics/Phenomics
- Genauere Zuchtprogramme

  Genomische Zuchtwertschätzung; Direktsequenzierung
- Erstellung transgener Tiere
- Neue Erkenntnisse über genetische Vielfalt
- Abstammungsstudien
- Vergleichende Genomik

Genomische Zuchtwertschätzung

- SNP-Marker und Typisierungen (54 K Chip)
- Abgleichung der SNP Muster mit bekannten Leistungsgenen
- Einbringen in genomische Schätzformel
- Voraussetzung ist gute phänotypische Charakterisierung
- Erhebliche Kosten- und Zeiteinsparungen durch Verwendung junger Tiere (Embryonen) statt Testbullen.
- Höhere Aussagesicherheit als mit bisherigem Pedigree basiertem Zuchtwert.

Sicherheit genomischer Zuchtwerte

Merkmal	Si. V-P.I.	Si. dGW	Si. gZW
RZM	33 %	72 %	**75 %**
RZS	31 %	73 %	**75 %**
RZE	30 %	63 %	**69 %**
RZN	27 %	48 %	**53 %**
RZR	28 %	45 %	**48 %**
KVp	33 %	41 %	**45 %**
KVm	28 %	40 %	**43 %**
RZD	28 %	65 %	**70 %**

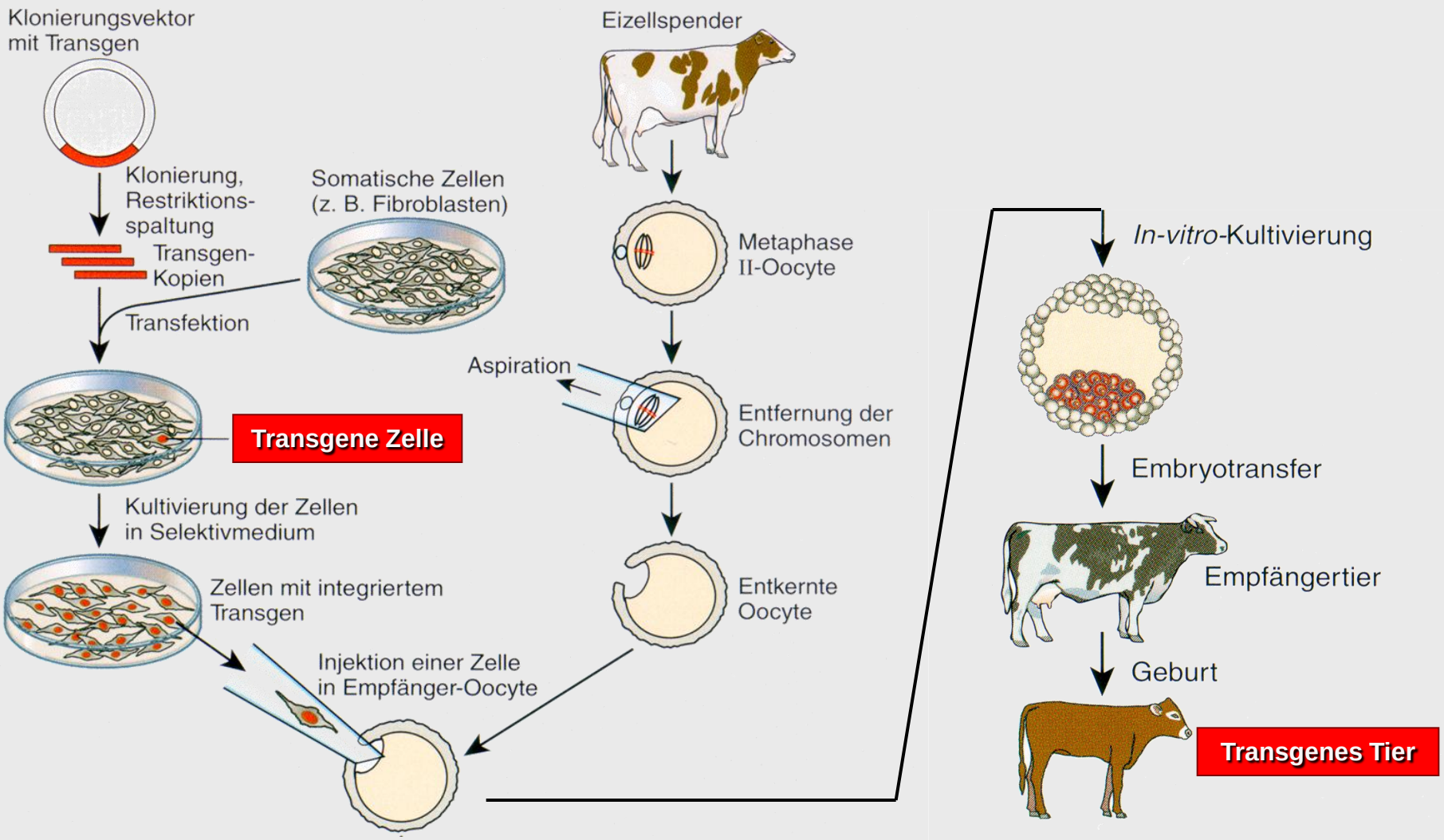
Entwicklung der Genomsequenzierung: Schneller, kleiner, billiger

QUICKER, SMALLER, CHEAPER

Genome sequenced (publication year)	HGP (2003)	Venter (2007)	Watson (2008)
Time taken (start to finish)	13 years	4 years	4.5 months
Number of scientists listed as authors	> 2,800	31	27
Cost of sequencing (start to finish)	$2.7 billion	$100 million	< $1.5 million
Coverage	8–10 ×	7.5 ×	7.4 ×
Number of institutes involved	16	5	2
Number of countries involved	6	3	1

Nature 452, 2008

Erstellung transgener Tiere mit Hilfe des somatischen Kerntransfers



Vor- und Nachteile von Mikroinjektion und somatischem Kerntransfer zur Produktion transgener Tiere

	Mikroinjektion	Somatischer Kerntransfer
Integrationseffizienz:	+	+++
Integrationsort:	zufällig	zufällig/gezielt
Gen-knock-out:	-	+++
Konstruktgröße:	>50 kb (Art.Chr.)	~30-50 kb
Technische Anforder.:	++	+++
Chimärismus:	+++	-
Expr. Screen. in vitro:	(+)	+++
Expressionsmuster:	variabel	kontrolliert, konsistent
Multi-Transgene	+	+++
Zeitaufwand	++++	+

Neue Methoden zur Produktion transgener Nutztiere

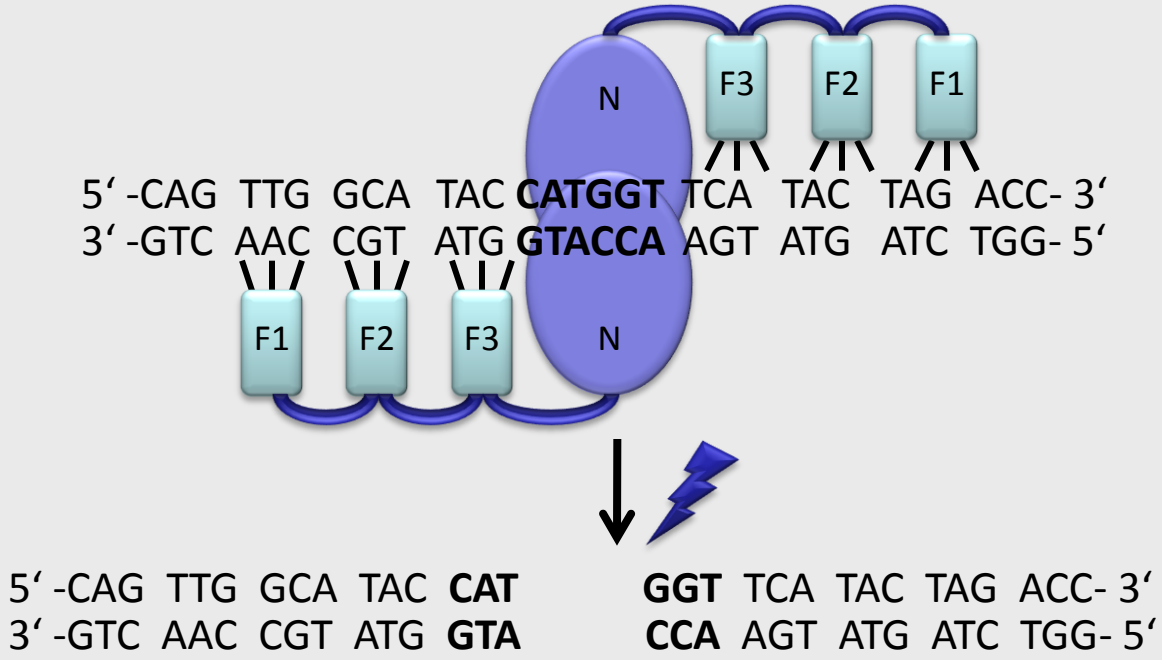
- **Meganukleasen (ZFN Moleküle, TALEN)**
- **Transposons (SB, PiggyBac, Tol 2)**
- **Pluripotente, reprogrammierte Zellen**

Zinkfinger-Nucleasen (ZFN)

- **Nucleasen dimerisieren, um DNA zu schneiden**

→2 ZFN Moleküle sind erforderlich

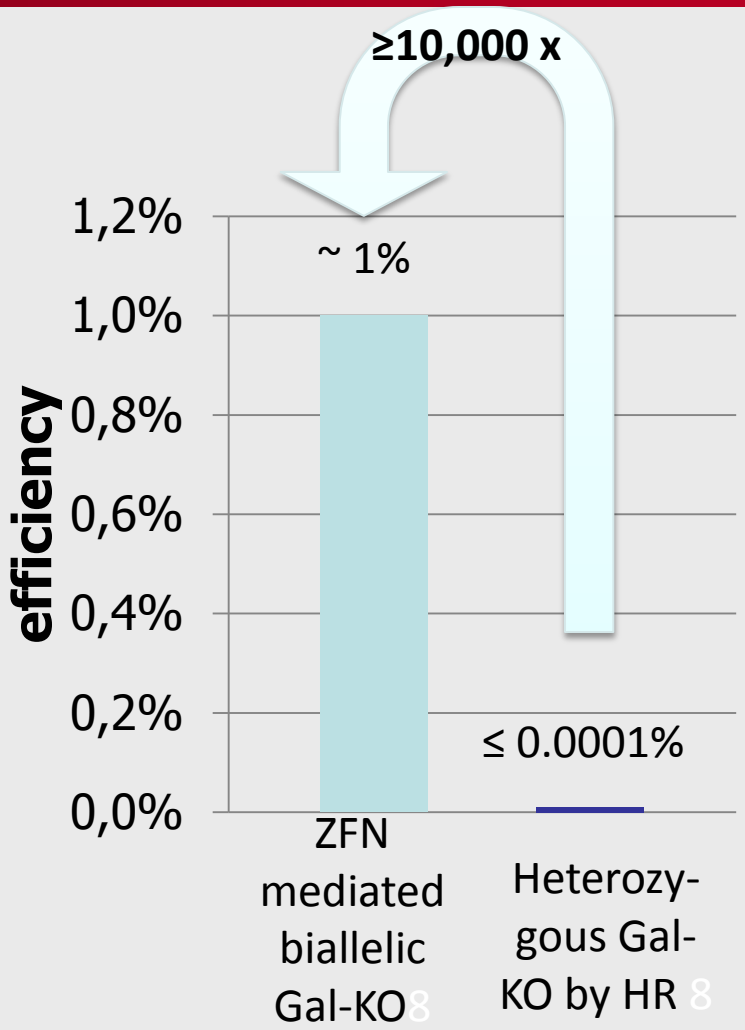
→ Spezifische Erkennung von 18 bp



Effektivität der ZFN vermittelten homologen Rekombination (HR)

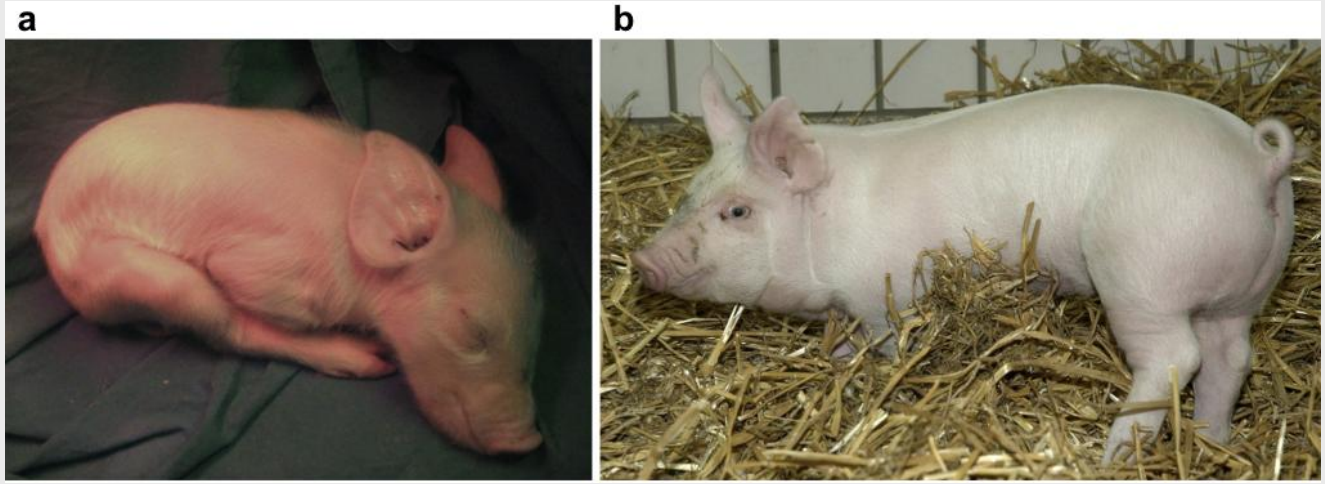
- **~ 1% Gal-negative Zellen (biallelischer KO)**

- **Vergleich zum konventionellen heterozygoten Gal-KO →Steigerung der Effektivität >10,000 fach**



8

Schweine aus Klonen mit Zellen mit einem homozygoten Gen-Knockout, vermittelt über spezifische ZFNs

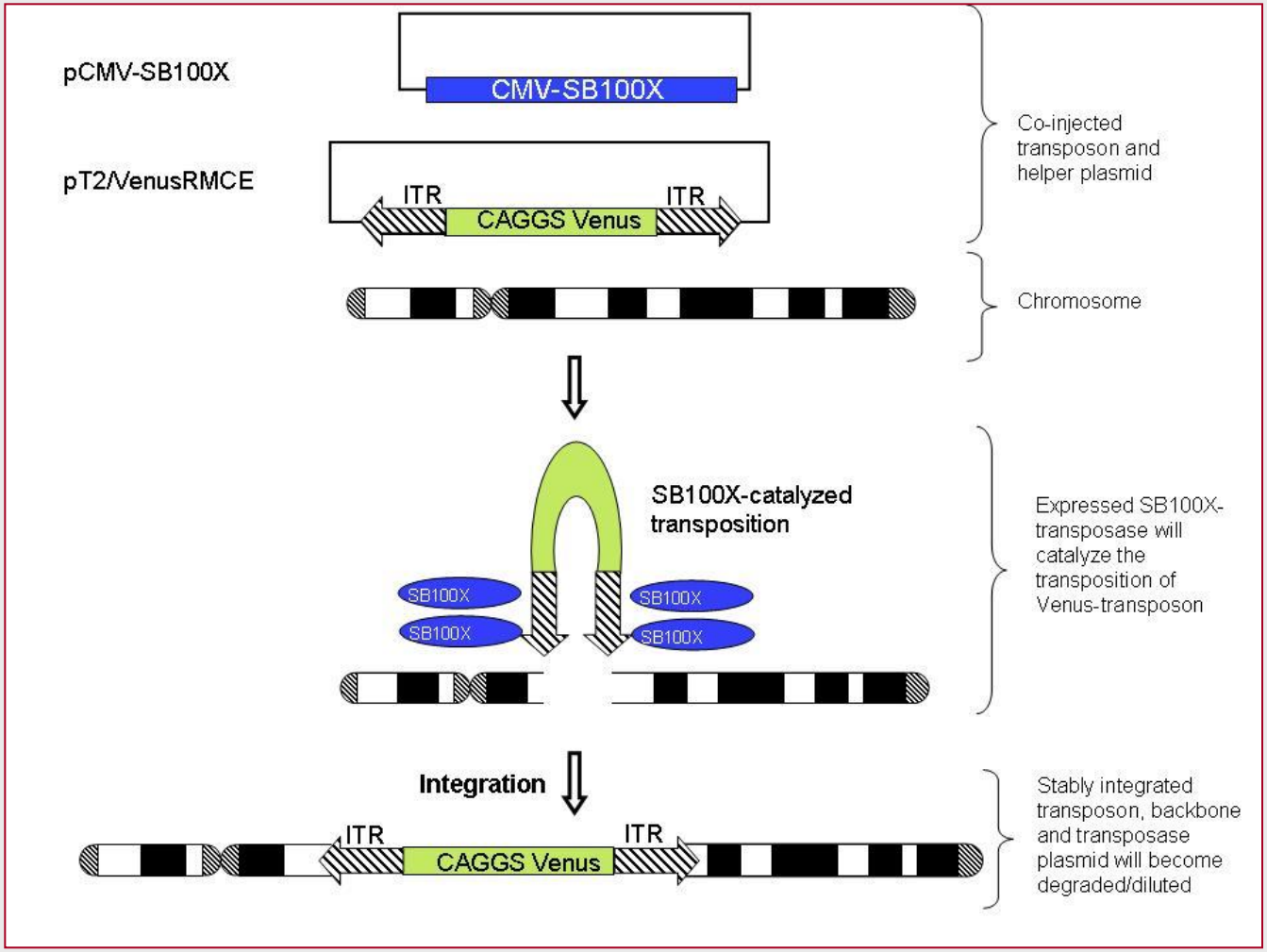


Left: First pig with an ZFN-induced homozygous KO of an endogenous gene (Liliy, born 20.12.11, had to be euthanized) Right: Lia (born 06.01.11, still alive)

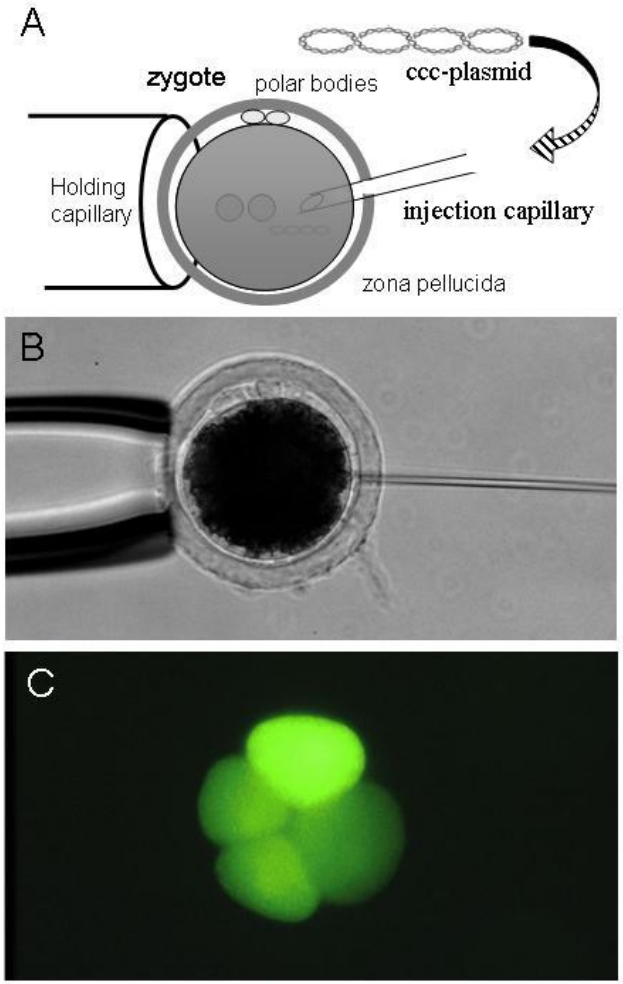
Three ZFN GalKO piglets born on 14.04.11 (two are still alive and healthy)

Hauschild et al.(2011) PNAS publ online July 4th

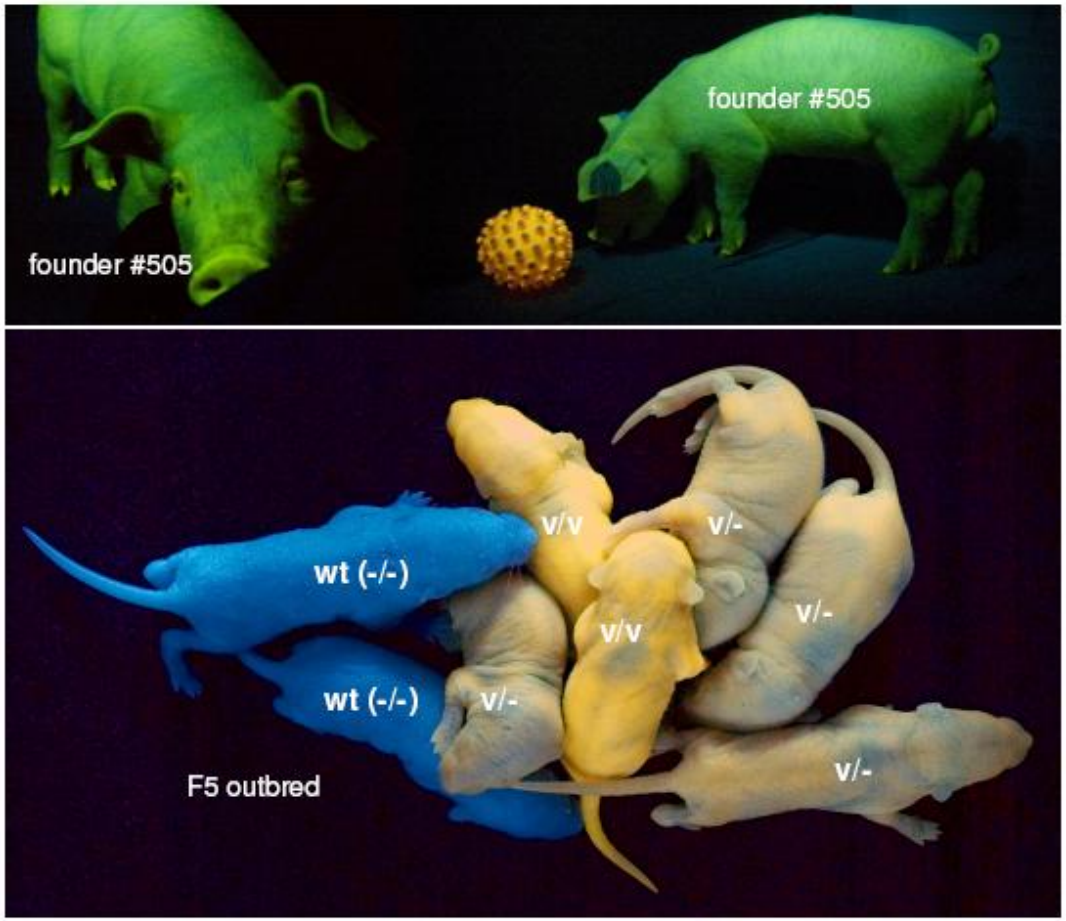
Nutzung von Transposons für die Produktion transgener Tiere



Produktion transgener Schweine durch cytoplasmische Injektion von SB Transposon basierten Konstrukten



Transgene Mäuse und Schweine produziert über Transposon vermittelten Gentransfer



Garrels et al., 2011, PLos One

Geklonte Rinder mit Resistenz gegen BSE

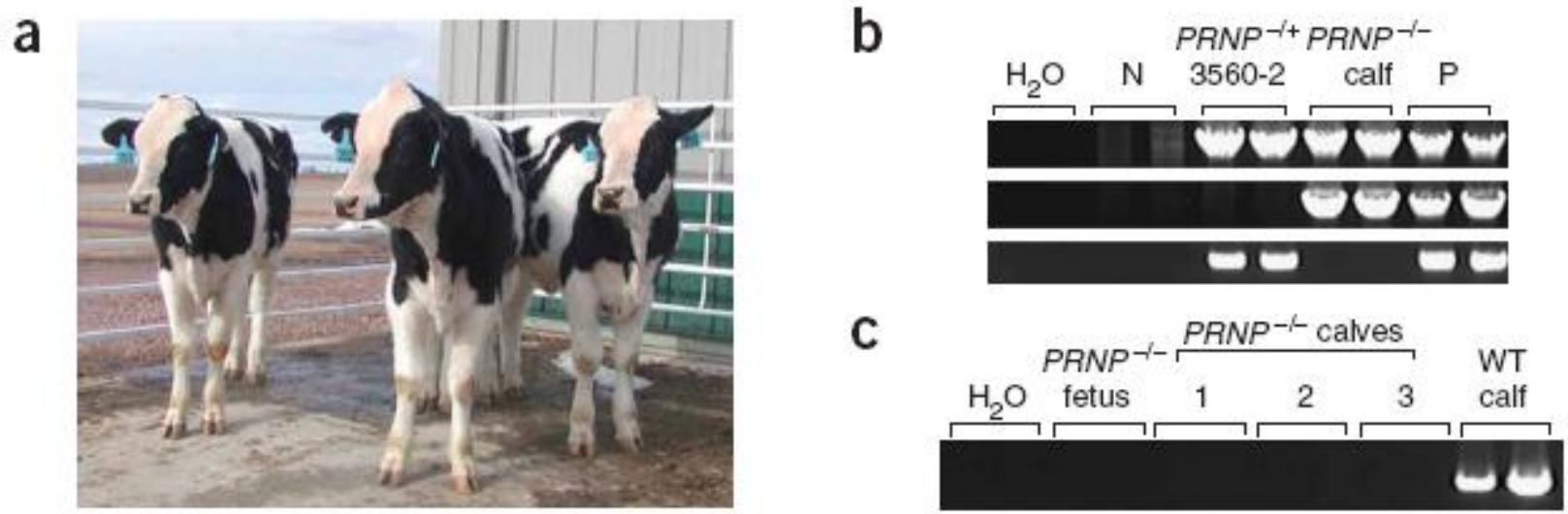
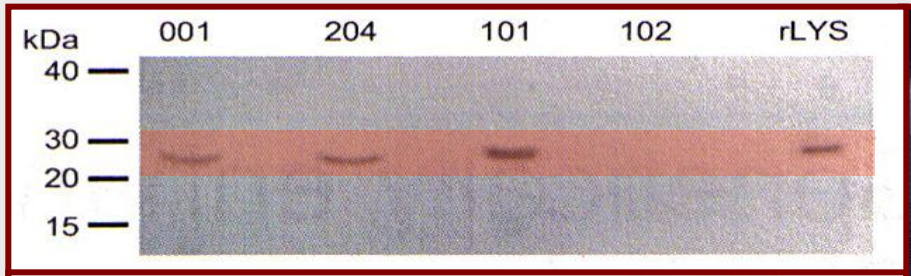


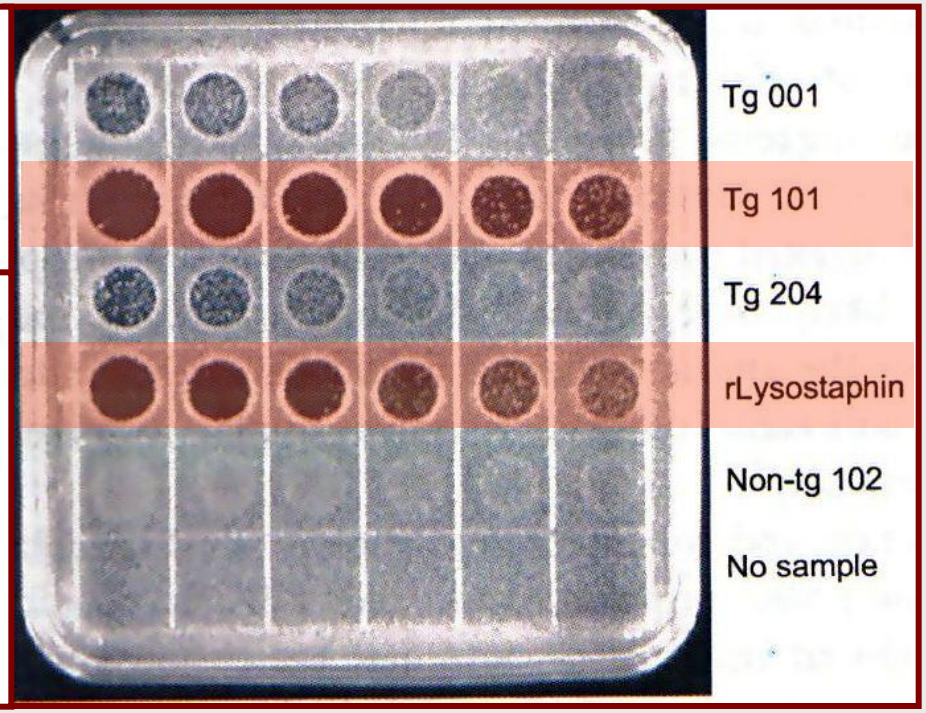
Figure 1 Generation of $PRNP^{-/-}$ cattle. (**a**) $PRNP^{-/-}$ cattle at 13 months of age. (**b**) Verification of $PRNP^{-/-}$ genotype in the ear biopsy fibroblasts by genomic PCR. P, positive control[6]; N, negative

Richt et al., Nature Biotechnology 25, 132- 138, 2007

Transgene Kühe mit Lysostaphin induzierter Resistenz der Milchdrüse gegenüber Infektionen mit Staphylococcus aureus



ID (Sex)	Generation	Founder ID	Assay method: ELISA Mean ± s.e.m. (μg/ml)	Assay method: Lysis assay Mean ± s.e.m. (μg/ml)
001 (F)[a]	Founder	001	0.87 ± 0.08	0.08 ± 0.01
101 (F)[a]	Founder	101	11.03 ± 0.38	2.50 ± 0.20
204 (F)[a]	Founder	204	0.92 ± 0.03	0.13 ± 0.01
214 (M)[b]	G_1	004	5.2 ± 0.5	na
215 (F)[b]	G_1	004	5.6 ± 0.9	na
312 (F)[b]	G_1	104	13.8 ± 4.4	na



Resistenz gegen St. aureus Infusionen: Tg: 18/21(85,3%)
(Infektion nur bei sehr hohen Dosen) vs. Nicht-Tg 13/47 (31,7%)

Wall et al. (2005), Nature Biotechnol., 23, 445-451

Produktion transgener Rinder mit erhöhtem Milchgehalt an ß- und k-Casein

- Transfektion zusätzlicher Kopien von CSN2 (ß) und CSN3 (k) in bovine Fibroblasten
- Somatisches Klonen mit vier Zelllinien: 11 Kälber
- Induktion der Laktation durch hormonale Injektionen im Alter von 7-9 Monaten
- Bei 9 Rindern:

➢ 8-20% mehr ß-casein,

➢ doppelt so viel k-Casein,

➢ Verändertes k-Casein und Gesamt-Casein Verhältnis

Brophy et al. 2003, Nature Biotechnology 21, 157-162

Production of ß-lactoglobulin free milks in siRNA-ß-lac transgenic cows

Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of β-lactoglobulin-free, high-casein milk

Anower Jabed[a,b,1,2], Stefan Wagner[a,2], Judi McCracken[a], David N. Wells[a], and Goetz Laible[a,2]

[a] AgResearch, Hamilton 3240, New Zealand; and [b] Department of Biological Sciences, University of Waikato, Hamilton 3240, New Zealand

Edited by R. Michael Roberts, University of Missouri, Columbia, MO, and approved August 28, 2012 (received for review June 22, 2012)

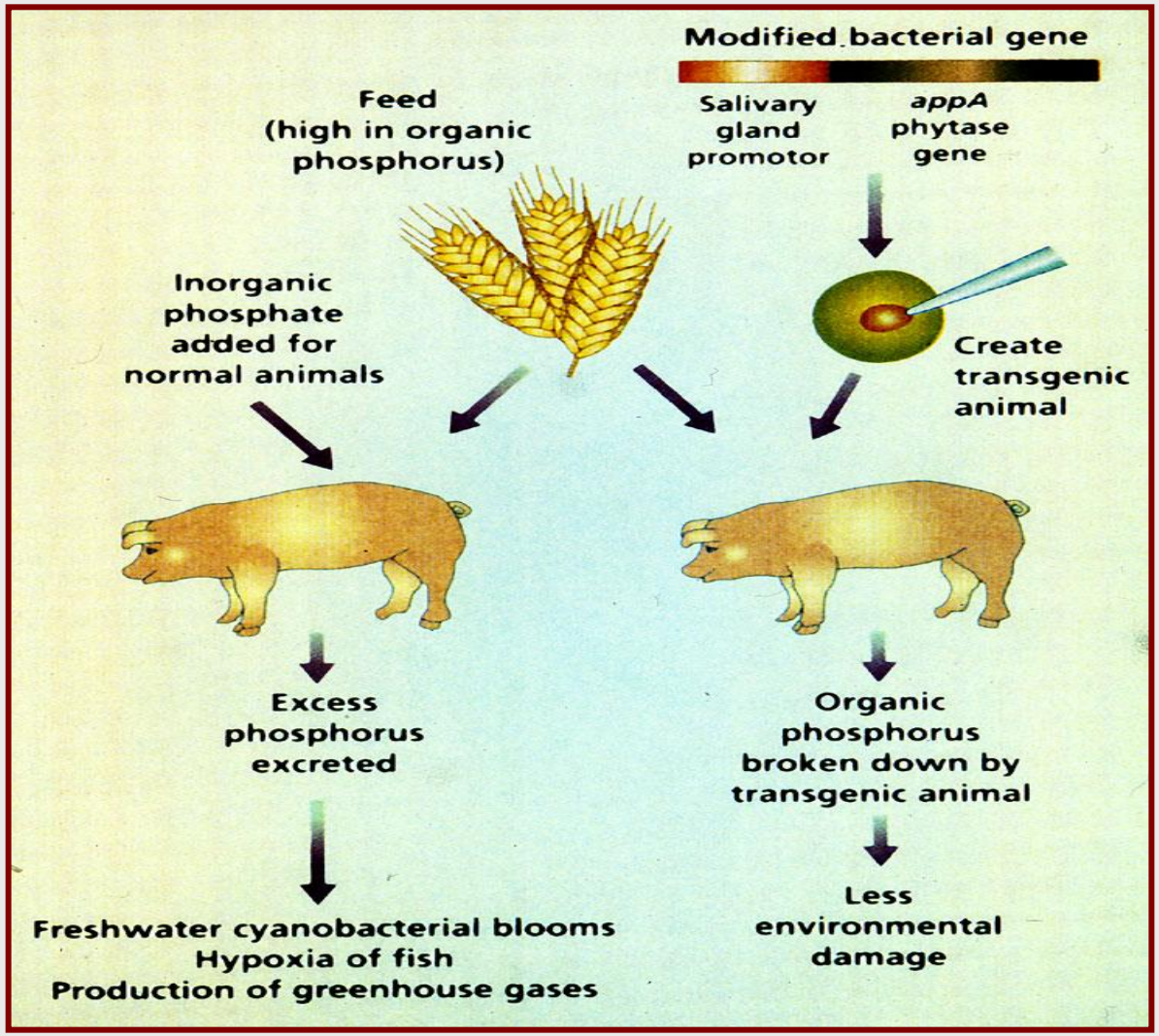
Milk from dairy cows contains the protein β-lactoglobulin (BLG), which is not present in human milk. As it is a major milk allergen, we wished to decrease BLG levels in milk by RNAi. In vitro screening of 10 microRNAs (miRNAs), either individually or in tandem combinations, identified several that achieved as much as a 98% knockdown of BLG. One tandem construct was expressed in the mammary gland of an ovine BLG-expressing mouse model, resulting in 96% knockdown of ovine BLG in milk. Following this in vivo validation, we produced a transgenic calf, engineered to express these tandem miRNAs. Analysis of hormonally induced milk from this calf demonstrated absence of BLG and a concurrent increase of all casein milk proteins. The findings demonstrate miRNA–mediated depletion of an allergenic milk protein in cattle and validate targeted miRNA expression as an effective strategy to alter milk composition and other livestock traits.

nuclear transfer | transgenic cattle

allergenicity of cows' milk (9). Moreover, RNAi could allow fine-tuning of BLG expression, which may be advantageous if some BLG is required for normal milk physiology. Artificial RNAi molecules that enable the knockdown of target transcripts, either by mRNA degradation or a block of translation, have been used in different forms such as siRNAs, shRNAs, or miRNAs (12, 13).

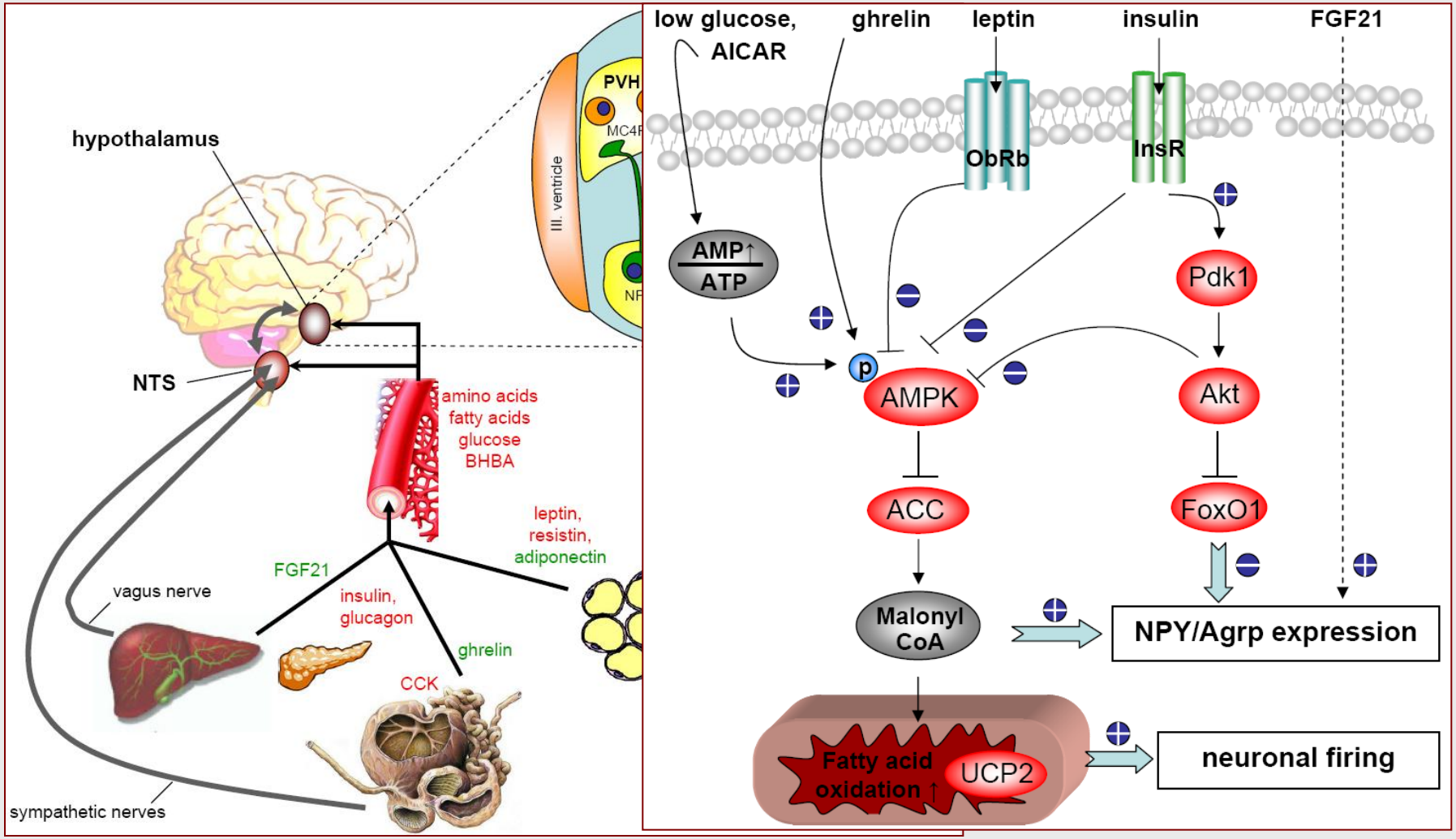
A recent in vitro study demonstrated the effectiveness of several shRNAs and miRNAs directed against the porcine variant of BLG (14). We used artificial miRNAs based on the murine miRNA-155 to knock down BLG. miRNAs can be driven by Pol II promoters, which enable spatiotemporally restricted expression and greatly limit off-target effects that may arise from constitutive miRNA expression. Indeed, constitutive expression of BLG-specific RNAi constructs negatively affects primary cell growth, indicating that abundant interfering RNAs aimed at BLG may be toxic (14). When the same RNAi constructs were

Transgene Schweine mit Expression von Phytase in der Speicheldrüse



Golovan et al. Nat. Biotechnol. 19, 741-745, 2001

Komplexes biologisches System zur Regulation von Futteraufnahme und Fütterungseffizienz



Moleküle mit Potential für Studien zur Produktion Futter-effizienterer Nutztiere, I

(transgene Nagermodelle)

Zielmolek.	Expression	Spezies	Zielorgan	Futteraufn.	Kandidatengen
NPY	**Knock-in**	**Ratte, Maus**	**PVN, LH**	↑	**x**
NPY	Knock-out	Maus	ubiquitär	=	
Agrp	**Knock-in**	**Maus**	**Sk-muskel**	↑	**x**
Agrp	Knock-out	Maus	ARC	↓	
CART	Knock-in	Ratte	PVN	↑	
CART	Knock-out	Ratte	ubiquitär	=	
POMC	Knock-out	Maus	ubiquitär	↑	
MCH	Knock-out	Maus	ubiquitär	↓	
GH	**Knock-in**	**Maus**	**ZNS**	↑	**x**
ObRb	Knock-out	Maus	NTS	↑	
CCK1R	Knock-out	Ratte	ubiquitär	↑	

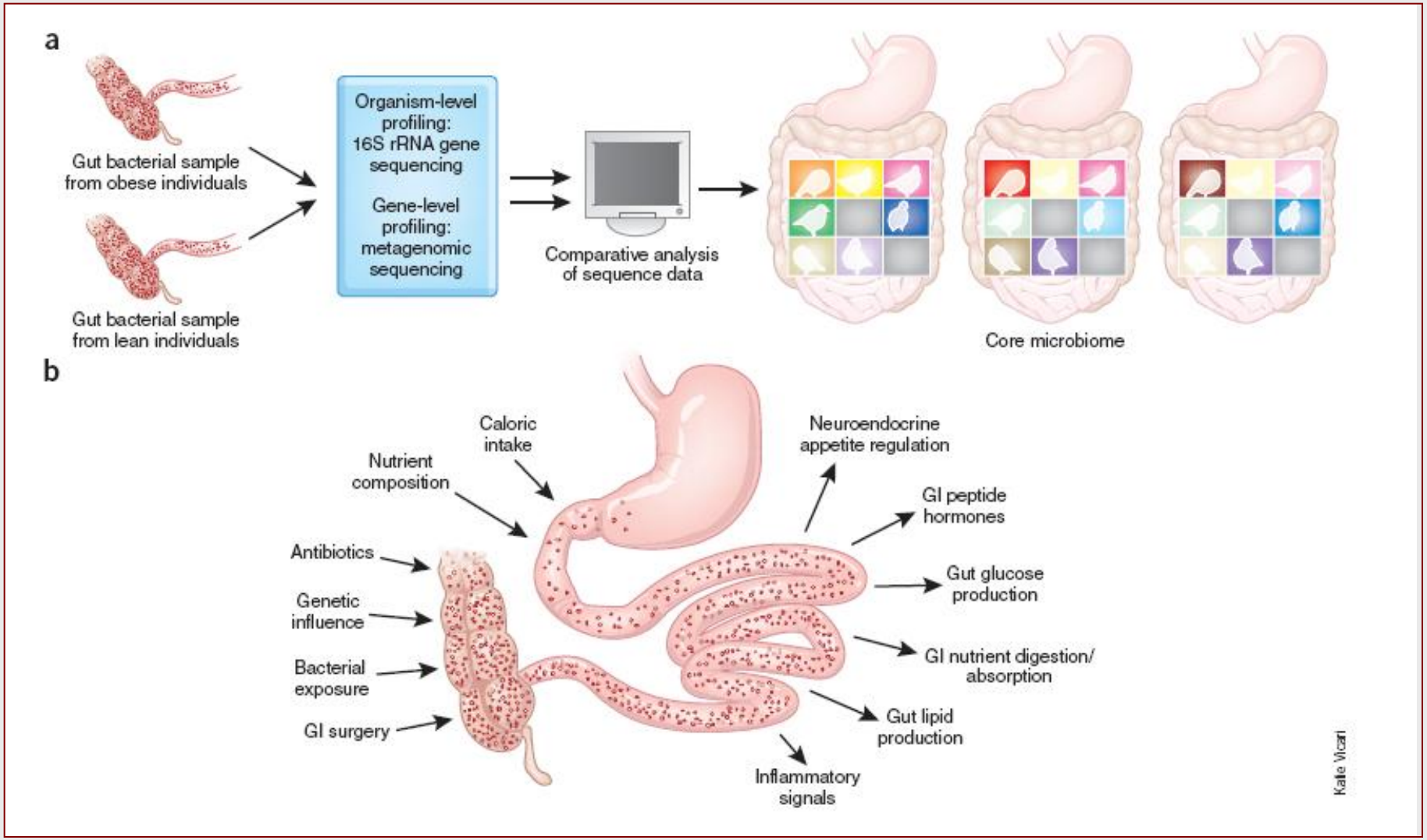
Moleküle mit Potential für Studien zur Produktion Futter-effizienterer Nutztiere, II

(transgene Nagermodelle)

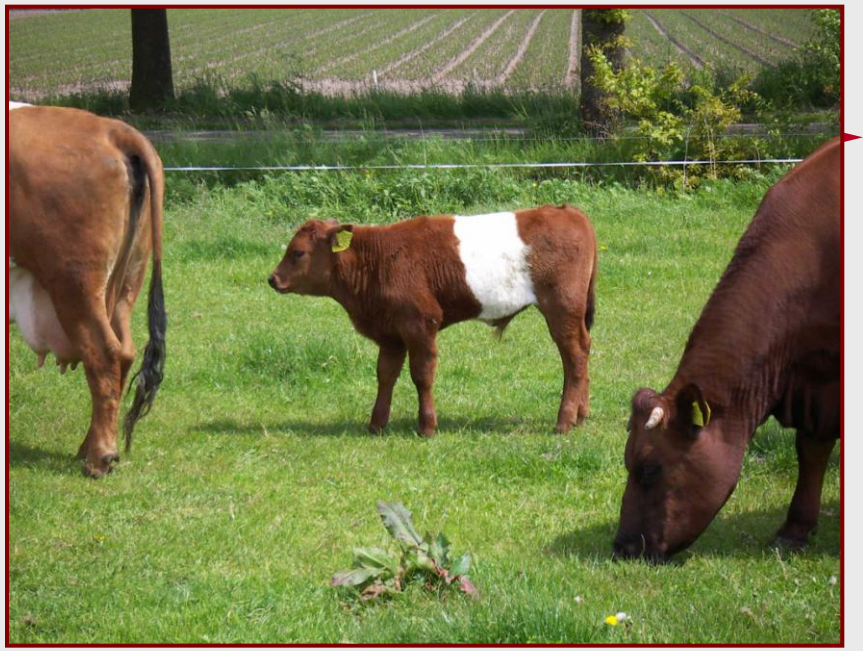
Zielmolekül	Expression	Spezies	Transgene Expression	Futter-aufnahme	Kandidatengen
MC4R	Knock-out	Maus	ubiquitär	↑	
Y2	Knock-out	Maus	ubiquitär	↓	
MCH1R	Knock-out	Maus	ubiquitär	↑	
GHR	Knock-out	Maus	ubiquitär	↑	
Ghrelin	**Knock-in**	**Maus**	**ubiquitär**	↑	**x**
PDK1	Knock-out	Maus	POMC Neuronen	↑	
FoxO1	Knock-out	Maus	POMC Neuronen	↓	
AMPK	dominant-negativ	Ratte	Hypothalamus	↓	
AMPK	dominant-aktiv	Ratte	Hypothalamus	=	
MCD	**Knock-in**	**Ratte**	**Hypothalamus**	↑	**x**
UCP2	**Knock-in**	**Maus**	**ubiquitär**	↑	**x**
UCP3	**Knock-in**	**Maus**	**ubiquitär**	↑	**x**

(MCD: Malonyl-CoA Decarboxylase, UCP: Uncoupling proteins 2 and 3)

Microbiome: Neue Optionen zur Reduktion Klima relevanter Emissionen



Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

- Nutztiere tragen nur in begrenztem Umfang zur Emission Klima-relevanter Emissionen bei.
- Die Fortschritte in der Genomforschung ermöglichen genauere und schnellere Zuchtprogramme als bisher.
- Die Verfügbarkeit von neuen molekularen Techniken erlaubt die präzise und effiziente Veränderung des Genoms landwirtschaftlicher Nutztiere.
- Die neuen genom-analytischen und gentechnologischen Verfahren bieten Optionen zur **zielgenauen und effizienteren** Züchtung von Nutztieren mit weniger Klima-relevanten Emissionen.
- Allerdings ist davon auszugehen, dass viele Leistungsmerkmale einer komplexen genetischen/ epigenetischen Regulation unterliegen, und deshalb züchterisch schwierig zu bearbeiten sein werden.

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit