

Vortragstagung der DGfZ und GfT am 11./12. September 2019 in Gießen

Analyse equiner SNP Arrays mittlerer Dichte im Hinblick auf ihre Einsatzmöglichkeiten beim Reitpferd

*M. Wobbe^{1,2}, S. Lehner³, K. F. Stock^{1,2}, S. Vosgerau⁴, N. Krattenmacher⁴,
M. von Depka Prondzinski³, E. Kalm⁴, R. Reents¹, W. Nolte⁵
C. Kühn⁵, J. Tetens⁶, G. Thaller⁴*

¹Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung w.V. (vit), 27283 Verden (Aller)

²Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung, 30559 Hannover

³Werlhof-Institut MVZ, 30159 Hannover

⁴Christian-Albrechts-Universität Kiel, Institut für Tierzucht und Tierhaltung, 24098 Kiel

⁵Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN), Institut für Genombiologie 18196 Dummerstorf

⁶Georg-August-Universität Göttingen, Department für Nutztierwissenschaften, 37077 Göttingen

1 Einleitung

Bei immer mehr Tierarten kommen mittlerweile routinemäßig genomische Anwendungen zum Einsatz, was nachhaltige Verbesserungen der Tierzucht in vielen Bereichen ermöglichte (Stock & Reents 2013). Auch zum Reitpferd gibt es bereits einige Studien, die Hinweise auf das große Potential der genomischen Selektion liefern (u. a. Grønegård Favrelle 2017). Um dieses Verfahren zu implementieren, startete 2017, die Zukunfts- und Wettbewerbsfähigkeit der deutschen Pferdezeit im Blick, ein Gemeinschaftsprojekt mehrerer deutscher Pferdezeitverbände. Mit dem Ziel, gemeinsam eine aussagekräftige, ausreichend große Lernstichprobe zusammenzustellen, wurde damit begonnen, ausgewählte Pferde mit einem SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Array mittlerer Dichte zu genotypisieren. Im Laufe des Lernstichproben-Aufbaus erfolgte eine Erweiterung des SNP-Markersatzes. Dies gab den Anlass, sich mit dem Vergleich der beiden verwendeten SNP Arrays hinsichtlich der SNP Verteilung im Genom und ihrer Einsatzmöglichkeiten beim Reitpferd näher zu befassen. Im folgenden Beitrag werden zunächst Kennzahlen zum Aufbau der SNP Arrays vergleichend analysiert, bevor anhand einiger Beispiele von Genen bzw. Genomregionen das Spektrum der spezifischen Einsatzmöglichkeiten im Rahmen künftiger Routineanwendungen beim Reitpferd aufgezeigt wird.

2 Material und Methoden

Bisher wurden 1.196 Pferde der Rassen Holsteiner (HOL), Oldenburger (OL, OS), Trakehner (TRAK) und Westfalen (WESTF) auf dem GGP Equine Plus Beadchip (Neogen / Illumina) genotypisiert. Dieser Chip wurde im Vergleich zur Vorgängerversion GGP Equine 70k Beadchip, auf dem 788 Pferde genotypisiert wurden, um 6.790 Marker ergänzt, keine Marker wurden entfernt. Um beide Arrays im Hinblick auf ihren Nutzen miteinander zu vergleichen, wurden zwei Gruppen von Markern gebildet und anhand des identischen Pferdmaterials untersucht: 1) Alle SNPs des GGP Equine Plus Beadchips (N = 71.947), 2) SNPs des GGP Equine 70k Beadchips (N = 65.157). Für den Vergleich wurden nur Pferde mit einer GGP Equine Plus Genotypisierung und einer Call rate ≥ 0.9 berücksichtigt.

Kennzahlen zu beiden Arrays, wie die Anzahl SNPs pro Chromosom und die Abstände der SNPs untereinander, wurden mit der Statistiksoftware R (V. 3.5.1; R Core Team 2014) berechnet. Die Minor Allele Frequencies (MAFs) wurden mittels der Software PLINK (V. 1.90; Purcell et al. 2007) bestimmt. Um den Informationszuwachs durch die Erweiterung des Markersets zu analysieren, wurden genotypisierte Pferde mit einem Stockmaß von ≥ 168 cm (N = 511) und ≤ 163 cm (N = 116) ausgewählt und mittels PLINK separat für die Markergruppen beider Chips (s.o.) einer genomweiten Assoziationsanalyse im Case-Control Ansatz unterzogen. Da bekannt ist, dass das *LCORL* (*ligand dependent nuclear receptor corepressor-like*) Gen einen sehr großen Effekt auf die Widerristhöhe beim Pferd hat (z. B. Tetens et al. 2013), wurde die Größe beispielhaft für den direkten Vergleich der Arrays herangezogen. Des Weiteren wurden auf dem Chip vorhandene und mit Merkmalen für Leistung (Springveranlagung), Krankheitsanfälligkeit (Equine rezidivierende Uveitis) und -resistenz (*Rhodococcus equi*) assoziierte SNPs extrahiert und im Material untersucht.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der vergleichenden Betrachtung der Kennzahlen zu beiden Arrays ergaben eine bessere Genomabdeckung des erweiterten Chips (Tabelle 1). Der Vergleich der Verteilungen der Markerallele auf den beiden Arrays zeigte, dass überwiegend SNPs mit sehr hohen MAFs für die Erweiterung ausgewählt wurden. Der daraus resultierende Anstieg der durchschnittlichen MAF von 0,23 auf 0,25 belegte eine gewisse Verbesserung des GGP Equine Plus Arrays gegenüber der Vorgängerversion. Das geringe Ausmaß des MAF-Anstieges erklärt sich damit, dass die 6.790 zusätzlichen Marker nur 9,4% aller SNPs auf dem erweiterten Array ausmachen. Beim direkten

Vergleich der beiden Arrays anhand des Merkmals Stockmaß und mit Fokus auf dem *LCORL* Gen auf dem equinen Chromosom 3 zeichnete sich in der genomweiten Assoziationsanalyse eine geringfügig deutlichere Unterstützung der signifikanten Position ab. Es ist davon auszugehen, dass sich die erhöhte Markerdichte in Abhängigkeit der Nähe zusätzlicher SNPs zu kausalen Genorten in zukünftigen Assoziationsstudien vorteilhaft auswirken kann.

Tabelle 1: Kennzahlen zur Marker-Anordnung auf den für das Pferd verfügbaren SNP Arrays mittlerer Dichte (GGP Equine 70k, GGP Equine Plus) im Vergleich.

Array	Gesamtzahl SNPs	Anzahl SNPs pro Chromosom			SNP-Distanz in Basenpaaren		Anzahl SNP-Dubletten
		Mw.	Min.	Max.	Mw.	Max.	
GGP Equine 70k	65.157	2.036	640	4.890	36.495	1.012.182	55
GGP Equine Plus	71.947	2.248	721	5.438	33.006	587.409	55
Differenz	+6.790	+212	+81	+548	-3.489	-424.773	0

Mw. = Mittelwert, Min. = Minimum, Max. = Maximum, SNP Dubletten = Anzahl doppelt belegter Positionen

Zur Illustration der Einsatzmöglichkeiten der equinen SNP Arrays mittlerer Dichte dienten SNPs, für die Assoziationen zur Springveranlagung (SVA1, Schröder et al. 2014; SVA2, Brard & Ricard 2014), Krankheitsanfälligkeit hinsichtlich Equiner rezidivierender Uveitis (ERU1 und ERU2, Kulbrock et al. 2013) und Krankheitsresistenz gegenüber Infektionen mit *Rhodococcus equi* (RRE, McQueen et al. 2014), beschrieben wurden. Aus Tabelle 2 gehen die Verteilungen der entsprechenden SNP-Genotypen im vorliegenden Datenmaterial hervor.

Tabelle 2: Prozentuale Verteilung der als vorteilhaft (GT1), neutral (GT2) und ungünstig (GT3) beschriebenen Genotypen für die Merkmale Springveranlagung (SVA), Equine rezidivierende Uveitis (ERU) und Krankheitsresistenz gegenüber Infektionen mit *Rhodococcus equi* (RRE) bei Pferden der gemeinsamen Lernstichprobe.

Merkmal	SNP	Material	GT1	GT2	GT3
SVA1 (SVA deutsches WB)	BIEC2_1036317	G	4,5	28,2	67,3
		S (nS)	11,3 (1,3)	47,5 (19,0)	41,2 (79,7)
SVA2 (SVA französisches WB)	BIEC2_31196	G	1,1	21,7	77,2
		S (nS)	2,3 (0,4)	28,8 (18,3)	68,9 (81,3)
ERU1 (ERU Symptome)	BIEC2_421990	G	67,0	29,9	3,1
ERU2 (ERU Anfälligkeit)	BIEC2_536712	G	71,6	26,7	1,7
RRE	UKUL3936	G	5,0	32,5	62,5

WB = Warmblut, G = alle genotypisierten Pferde (N = 1.984), S = Teildatenbestand Springen (genotypisierte Pferde der Verbände HOL und OS, N = 639), nS = Teildatenbestand Verbände ohne Spring-Spezialisierung (genotypisierte Pferde der Verbände OL, TRAK, WESTF; N = 1.345)

Für die Springveranlagung deckte sich das Muster der Genotyp-Verteilung mit den züchterischen Schwerpunkten der beteiligten Verbände: Der als vorteilhaft beschriebene Genotyp trat in höherer Frequenz in den Springpferdepopulationen (HOL, OS) auf. Der Unterschied zwischen den Verbänden mit und ohne Spezialisierung auf die Springleistung war deutlicher für SVA1 (11,3 % vs. 1,3 %) als für SVA2 (2,3 % vs. 0,4 %) ausgeprägt, was sich zum einen durch die Größen der geschätzten SNP-Effekte und zum anderen durch die zugrundeliegenden Studienpopulationen erklären lässt. Auch bei den übrigen Merkmalen entsprach die Verteilung in vorliegendem Material den Erwartungen: Es dominierten die Genotypen für geringe Disposition gegenüber ERU und fehlende RRE. Eine Aussage zur Verteilung in der Gesamtpopulation lässt sich daraus nicht ableiten.

In dieser Studie zeigte sich, dass mit der Erweiterung zum GGP Equine Plus das kommerziell verfügbare SNP-Array mittlerer Dichte für das Pferd verbessert wurde. Regionen, die bereits als wesentlich für die Ausprägung züchterisch relevanter Merkmale beim Reitpferd beschrieben wurden, sind weiterhin berücksichtigt. Gleichzeitig unterstützt die erhöhte Markerdichte, das Potential der genomweiten SNP-Genotypisierung als Basis künftiger Routineanwendungen beim Reitpferd für eine große Bandbreite von Leistungs- und Krankheitsmerkmalen zu erschließen.

4 Danksagung

Die Autoren danken der H. Wilhelm Schaumann Stiftung für die finanzielle Förderung.

5 Literatur

- Brard, S. & Ricard, A. (2014): Genome-wide association study for jumping performances in French sport horses. *Anim. Genet.* 46: 78-81.
- Grønegård Favrelle, S.A. (2017): Implementing genomic information in the breeding schemes of Danish Warmblood horses. Masterarbeit in Agrobiologie, Universität Aarhus.
- Kulbrock, M., Lehner, S., Metzger, J., Ohnesorge, B. & Distl, O. (2013): A Genome-Wide Association Study Identifies Risk Loci to Equine Recurrent Uveitis in German Warmblood Horses. *PLoS ONE* 8(8): e71619.
- McQueen, C.M., Doan, R., Dindot, S.V., Bourquin, J.R., Zlatev, Z.Z, Keith Chaffin, M., Blodgett, G.P., Ivanov, I. & Cohen, N.D. (2014): Identification of Genomic Loci Associated with *Rhodococcus equi* Susceptibility in Foals. *PLoS ONE* 9(6): e98710.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I.W., Daly, M.J. & Sham, P.C. (2007): PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 559-575.
- R Development Core Team (2014): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Wien, Österreich.
- Schröder, W., Klostermann, A., Stock, K.F. & Distl, O. (2011): A genome-wide association study for quantitative trait loci of show-jumping in Hanoverian warmblood horses. *Anim. Genet.* 43: 392-400.
- Stock, K.F. & Reents, R. (2013): Genomic Selection: Status in Different Species and Challenges for Breeding. *Reprod. Dom. Anim.* 48: 2-10.
- Tetens, J., Widman, P., Kühn, C. & Thaller, G. (2013): A genome-wide association study indicates LCORL/NCAPG as a candidate locus for withers height in German Warmblood horses. *Anim. Genet.* 44: 467-471.