

Designererkälber oder Chancen und Risiko des Gene-Editing bei Nutztieren

- Einleitung
- Anwendungsbeispiele
- Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Björn Petersen
Institut für Nutztiergenetik
Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)
Mariensee, Deutschland



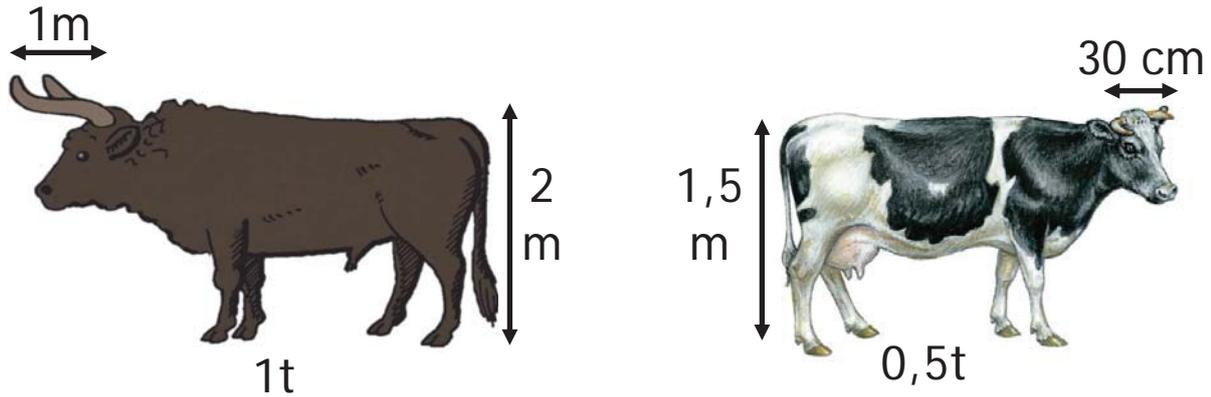
1

Entwicklung der Nutztierzucht

- Domestikation ~ 20.000 v.C.
- Vermehrung „nützlicher“ Populationen
- Selektion nach dem Exterieur
- Selektion nach spezifischen Merkmalen
- Entwicklung von statistischen Konzepten für systematisierte Zuchtprogramme ~16. Jahrh. n.C.
- Systematische Zucht auf der Basis von Populationsgenetik und Statistik ~1950 n.C.
- Reproduktionsbiotechnologien (AI,ET,IVP,SCNT, etc.)
- Molekulargenetik und Genom basierte Zuchtkonzepte (SNPs, GBZWS, etc.) Gegenwart

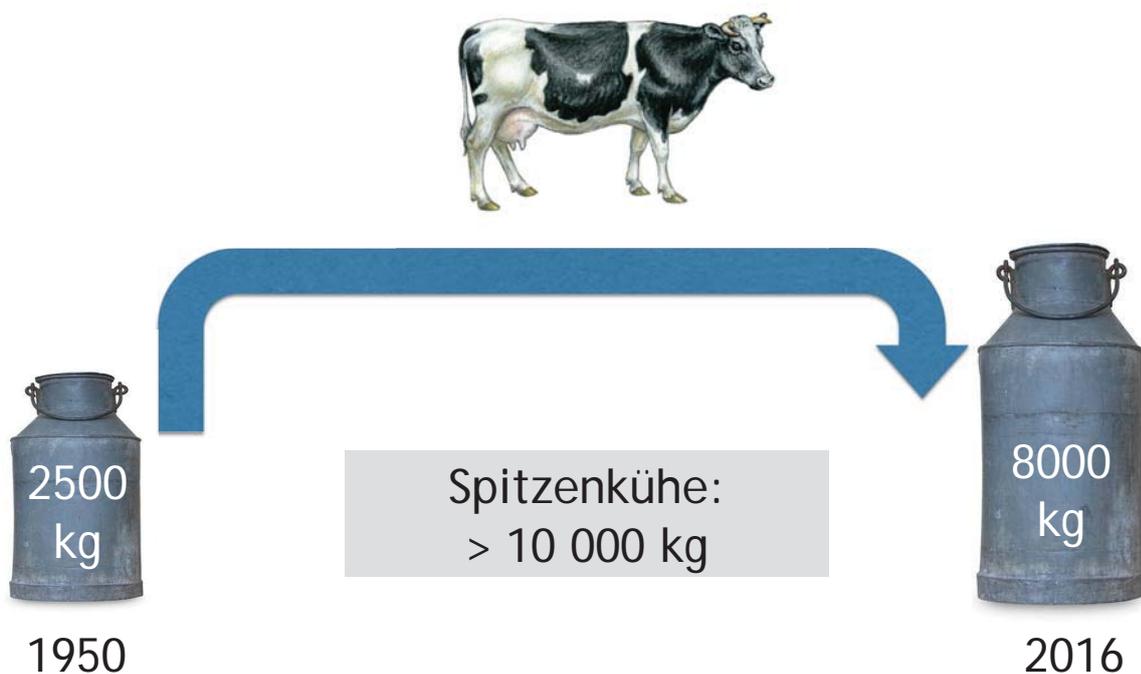
2

Die Domestikation des Rindes



- Kürzere Hörner
- Mächtigerer Rumpf
- Kürzere Beine
- Züchtung auf Milch- oder Fleischertrag
- Letzter Auerochse 1627 verstorben

Die Domestikation des Rindes

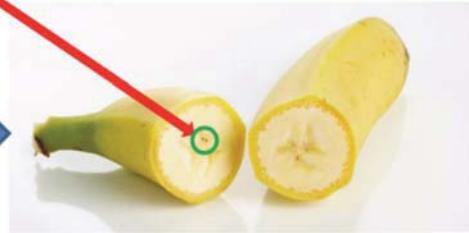


Domestikation und Züchtung: Eine 10.000 Jahre alte Erfolgsgeschichte

Banane



Züchtung



Tomaten

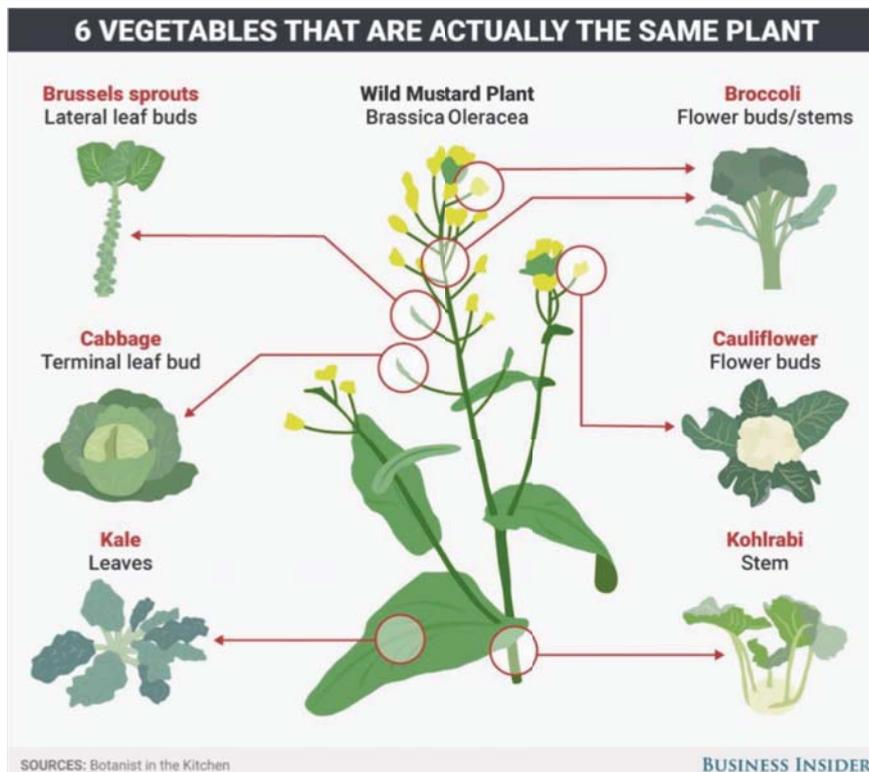


Züchtung



Provided by Thorben Sprink (JKI)

Durch Zucht entstandene neue Pflanzen



Provided by Thorben Sprink (JKI)

Tierzucht damals und heute

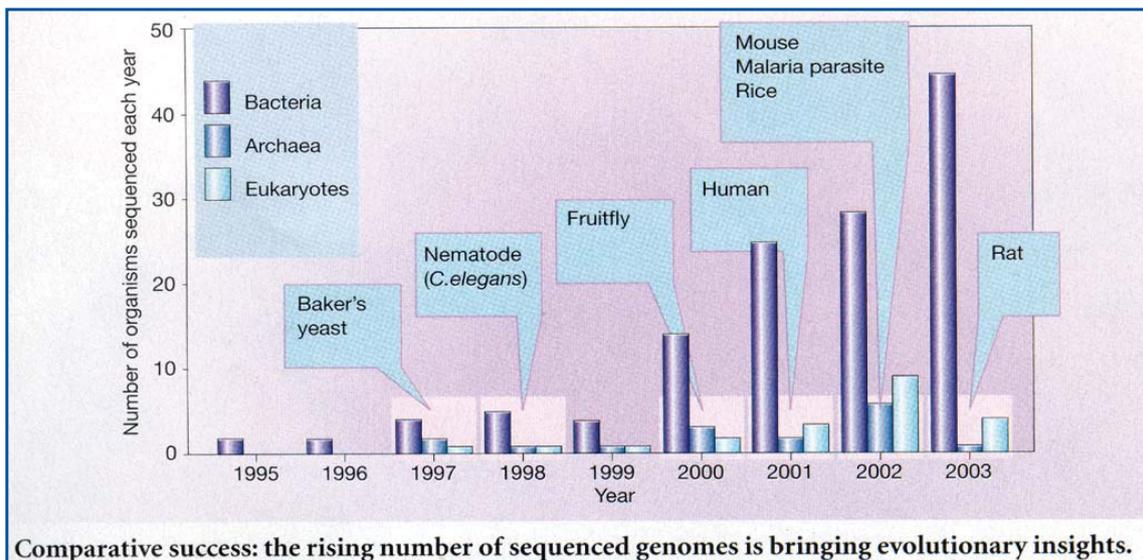


Hengstkörung 1870
(Nachkommenbasierte Einschätzung)
(<https://www.schweres-warmblut-nrw.de/rassestandard/anfaenge-der-zucht/>)



Genombasierte Zuchtwertschätzung
(Zuchtwert basiert auf Genomdaten)

Gegenwärtiger Stand der Genomsequenzierung



2004: Geflügel

2006: Biene

2009: Rind, Pferd

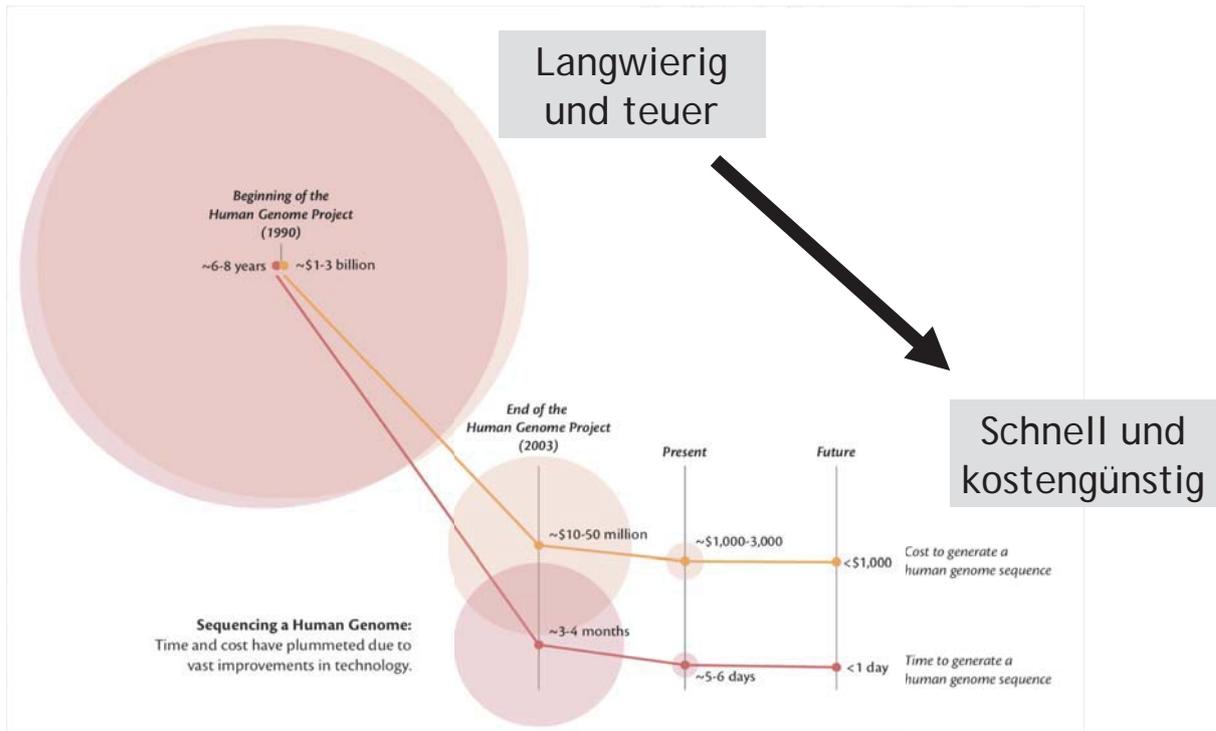
2012: Schwein

2014: Schaf

2017: Ziege

Nature 426, 2003

Kosten und Dauer einer Genomsequenzierung



Gene Editing Werkzeuge



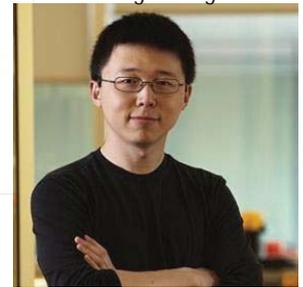
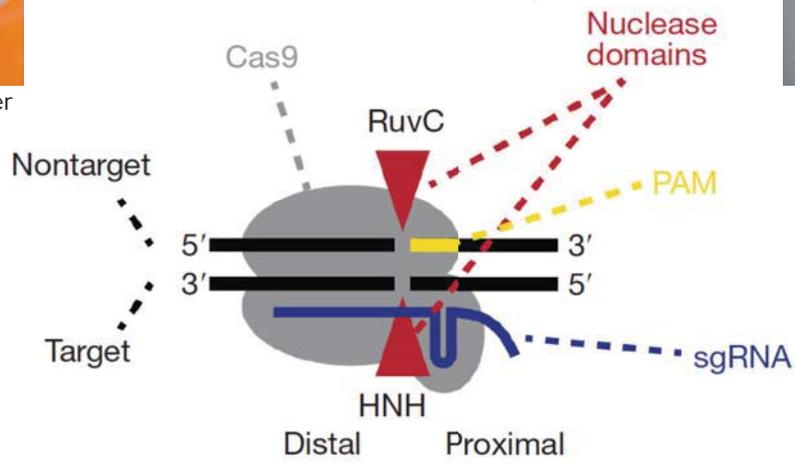
CRISPR/Cas



Emmanuelle Charpentier



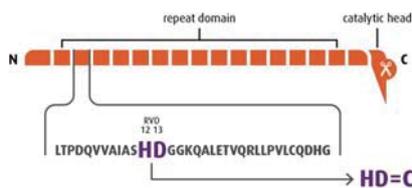
Jennifer Doudna



Feng Zhang

Richardson et al., Nature Biotechnol (2016), Vol 34 (3), 339-44

Gene Editing Werkzeuge

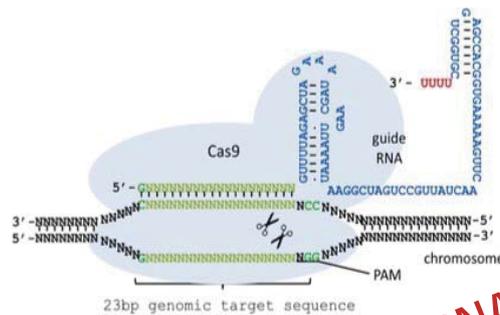


Transcription activator- like effektor nucleases (TALENs)

Protein-basiert



Zinc-Finger Nucleases



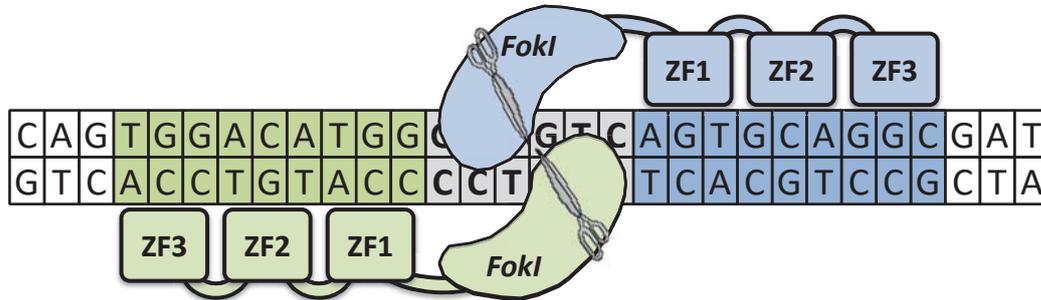
CRISPR/CAS

RNA-basiert

Wie funktioniert Gene Editing?

Schnittdomäne

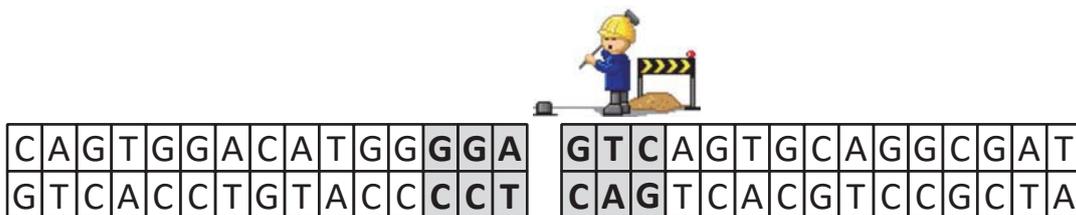
Erkennungsdomäne



Gene Editing beginnt mit einem Doppelstrangbruch!

Petersen, B., and Niemann, H. (2015),
Transgenic Res 24, 381-396.

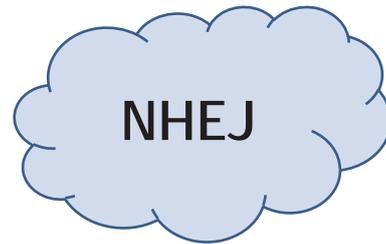
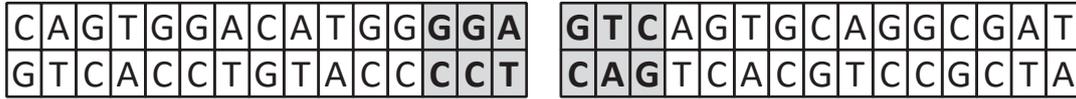
Wie funktioniert Gene Editing?



HDR

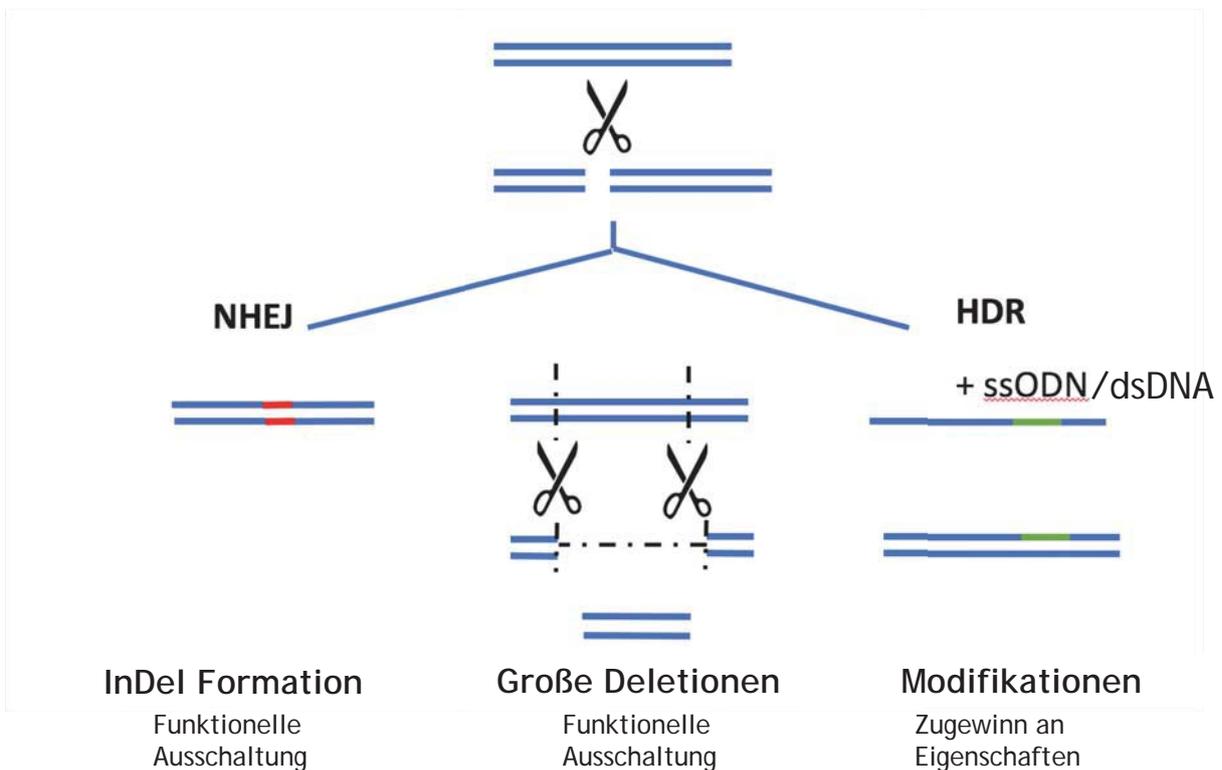
NHEJ

Wie funktioniert Gene Editing?



Petersen, B., and Niemann, H. (2015),
Transgenic Res 24, 381-396.

Verwendung von GE zur Veränderung des Nutztiergenoms



Genom-Chirurgie

- Einsatz einer Gen-Schere zur Korrektur eines Gens



Es kann der Dümme nicht in Frieden leben, wenn es dem bösen Nachbar nicht gefällt.



Es kann der Dümme nicht in Frieden leben, wenn es dem bösen Nachbar nicht gefällt.

X

X

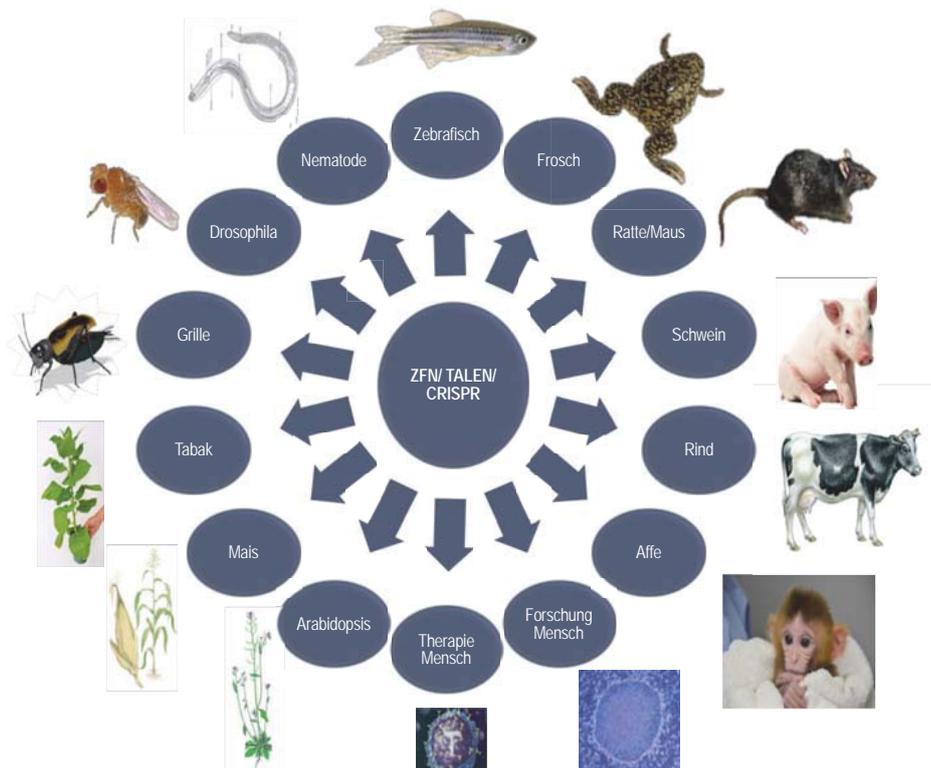
kann der Frömmste nicht in Frieden



Es kann der Frömmste nicht in Frieden leben, wenn es dem bösen Nachbar nicht gefällt.

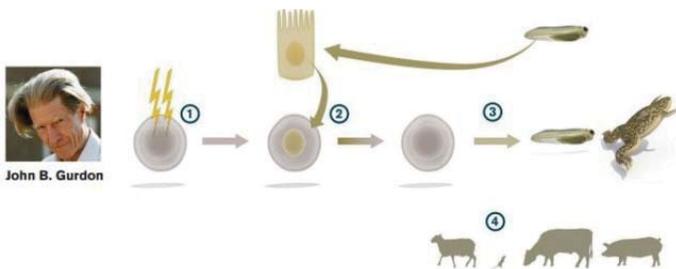
(Friedrich Schiller, Wilhelm Tell)

Universelle Anwendung vom Gene Editing



Dolly verändert die Biotechnologie

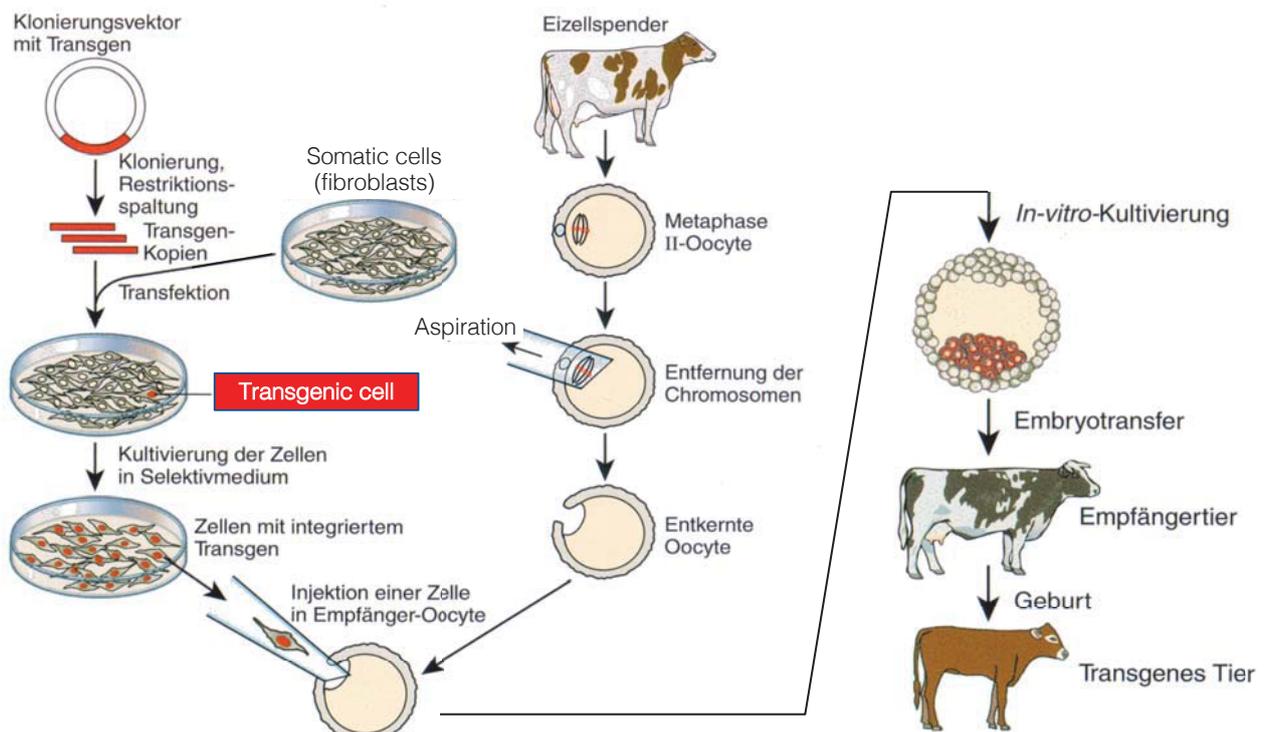
Gurdon 1962



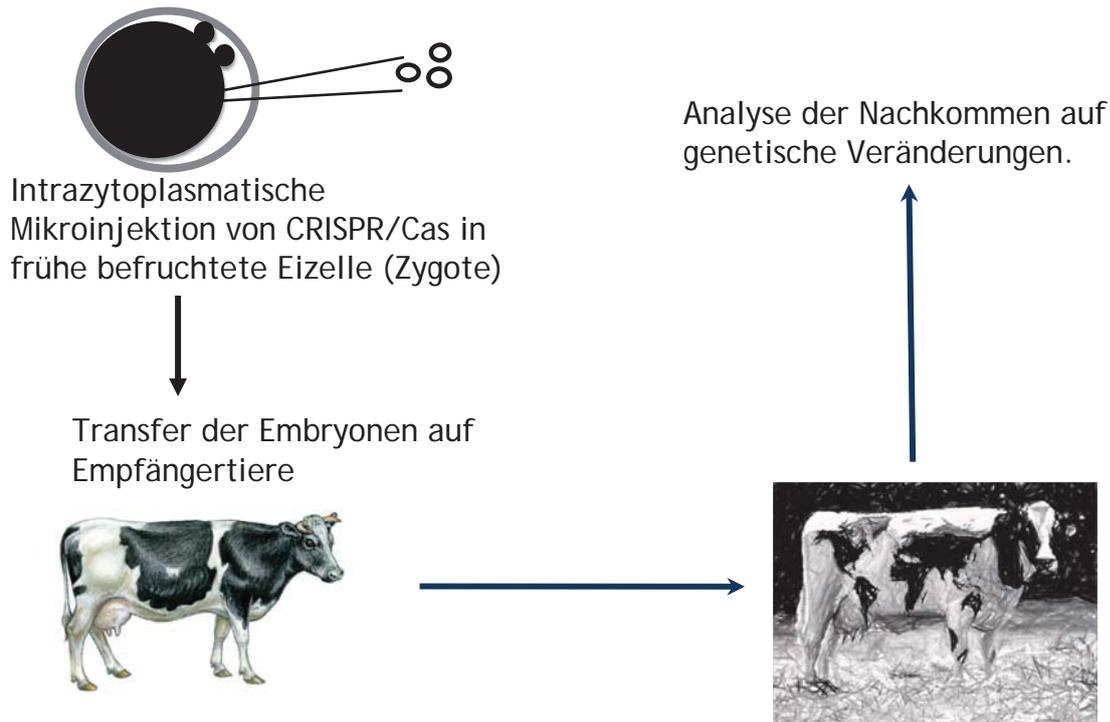
Sir John Gurdon, Nobelpreisträger 2012
(zusammen mit Shinya Yamanaka)

Dolly 1996-2003, mit Sir Ian Wilmut

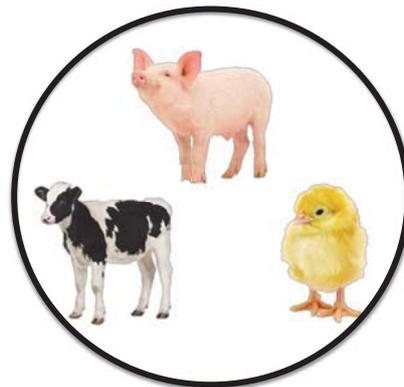
Erstellung genetisch veränderter Rinder mit Hilfe des Klonens



Knockout durch intrazytoplasmatische CRISPR/Cas Mikroinjektion



Anwendungen von Gene Editing beim Nutztier



Landwirtschaft

- Hornlosigkeit
- Wachstum und Entwicklung
- Laktation (Menge, Bestandteile)
- Woll-/Fleischproduktion
- Reproduktion (Genome Sexing)
- Umweltverbesserungen
- Diätetische Verbesserungen

Biomedizin

- Gene Pharming
- Humaner Blutersatz
- Xenotransplantation

Grundlagenforschung

- Modelle für humane Erkrankungen
- Epigenetische Reprogrammierung
- Krankheitsresistenz (ASP, PRRS, KSP, BSE, TB, etc.)

Hornlosigkeit beim Rind



Milking a polled cow ("Cow with a tear", sarcophagus of Kawit, 11th Dynasty, Theben, ~ 2000 B.C)

Hornlosigkeit beim Rind



Belted Galloway

Kategorie	Rasse
komplett hornlos	Aberdeen Angus Belted Galloway Galloway Swedish Red Polled (S) Old Norwegian Red Vestland
> 20 % hornlos	Norwegian Red Welsh Black
< 5 % hornlos	Holstein Jersey Simmental Fleckvieh Ayreshire Dexter Charolais Limousin Salers
nicht hornlos	Highland Cattle

Enthornung von Rindern



Haltung und Mast

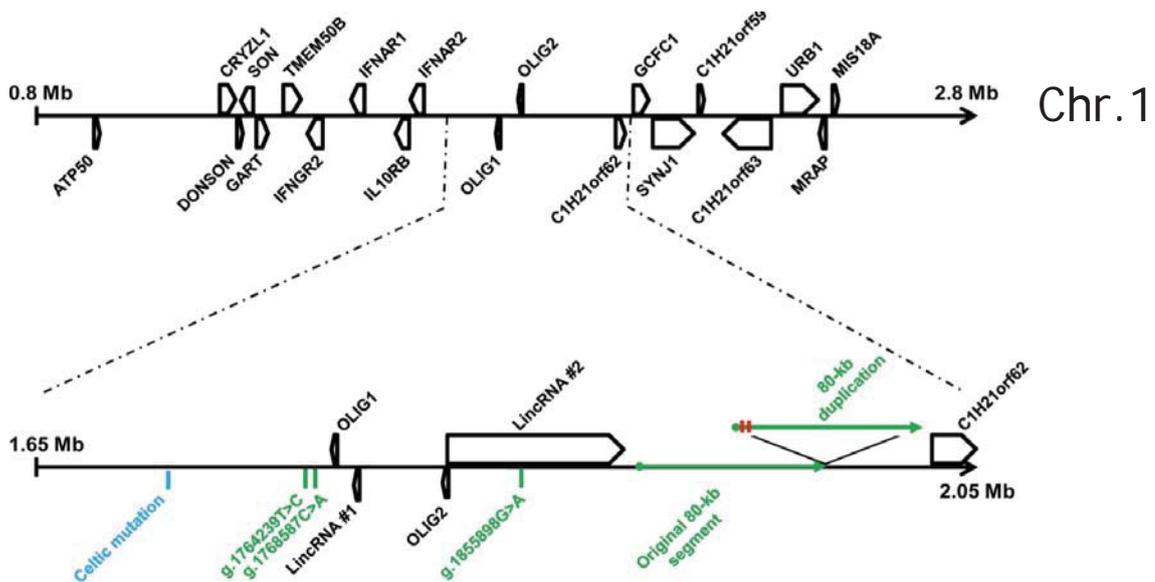
Rinderhaltung: 6.000 Unfälle in 2014

bei 17 Prozent aller Unfälle und bei der Hälfte der tödlichen Unfälle ein **Kopfstoß der Tiere** ursächlich war. In 19 Prozent dieser Unfälle wiederum war ein Horn Unfallverursacher. Dass bei lediglich einem Fünftel der Kopfstöße ein Horn beteiligt war, kann wohl auf die schon weit verbreitete **fach- und tierschutzgerechte Enthornung von Rindern** zurückgeführt werden. Es verdeutlicht aber auch das



Quelle: Agrar heute

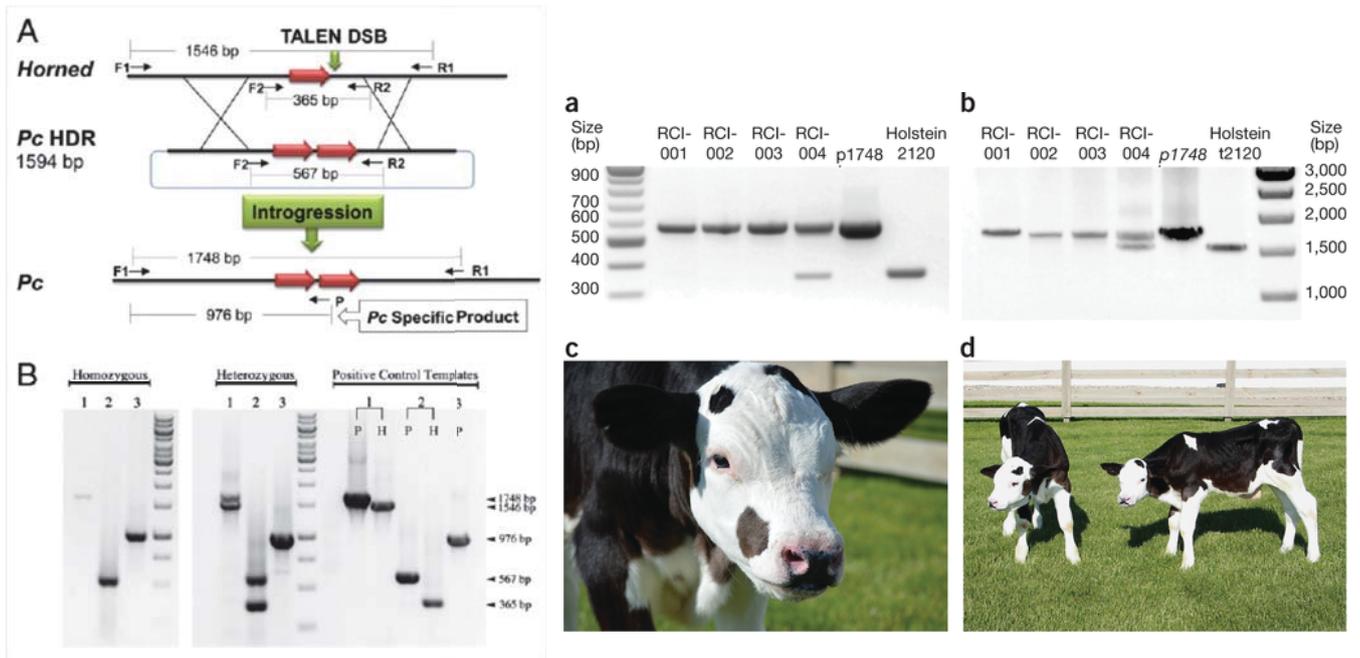
Kausative Mutationen für den hornlos Phänotyp im Horned-Lokus



Keltische Mutation:
Holstein-Friesian:

208bp Duplikation + 6bp Deletion
80kb Duplikation + Punktmutationen

Etablierung des Hornlos-Phänotyps mittels Gene Editing



Carlson et al., 2016,
Nature Biotechnology 34, 479-481



RECOMBINETICS AND SEMEX FORM ALLIANCE TO IMPROVE ANIMAL WELL-BEING

MAY 28, 2018

Recombinetics has formed an alliance with Semex, a Canadian-based, farmer-owned cattle genetics organization, to implement a precision breeding program that improves animal health and well-being through hornless dairy cattle genetics.

The dehorning of calves is a routine procedure, designed to prevent injuries both to other animals and to handlers. This is uncomfortable for animals and is an unpleasant task for farm personnel. By using precision breeding technology, polled genetics can be reliably introduced into elite dairy lines, eliminating the need to dehorn calves.

Dairy farmers prefer hornless (polled) cattle, but traditional breeding for this trait, more commonly found in certain breeds of beef cattle, is inefficient and reduces productivity. The alliance's objective is to seamlessly integrate the polled trait into high-merit dairy genetics through precision breeding.

The project is being led by Tad Sonstegard, Ph.D., Chief Scientific Officer of Acceligen, Recombinetics' agriculture division. Sonstegard states, "The polled trait has been part of bovine genetics for more than 1,000 years, and it has been conventionally bred and selected for in some cattle breeds, but not in most high-merit dairy breeds. We have proven we can safely introduce the polled trait into any breed of horned dairy cattle with complete precision. This new partnership will provide unique opportunities for dairy farmers and artificial insemination companies to introduce polled genetics without losing genetic diversity or production potential."

Precision breeding uses gene editing to make small adjustments to the genome of an animal to delete, repair, or replace individual elements of DNA. In this case, the cell's natural repair function is used to replace the horned gene with a naturally occurring polled gene. The result is dairy calves that are born naturally hornless, providing a direct benefit to the animals' well-being and health.

Francois-Xavier Grand, Corporate Veterinarian for Semex says, "By eliminating the need to dehorn, we eliminate the stress and health concerns associated with the procedure. This benefits the cattle, the farmers and consumers who value animal health and well-being."

This alliance will begin with a multi-year implementation and regulatory process that will include government regulators, food processors, retailers and other stakeholders.



Myostatin (MSTN)- Knockout



Mutation des MSTN-Gens durch Gene Editing

- Myostatin (*MSTN, GDF-8*) ist ein negativer Regulator des Muskelwachstums
- Inhibition des MSTN-Gens durch Mutationen führt zum Doppellender-Phänotyp
- Natürliche Mutations sind von Blauen Belgiern und Piedmontese bekannt, was zu einer 20% erhöhten Muskelmasse führt.



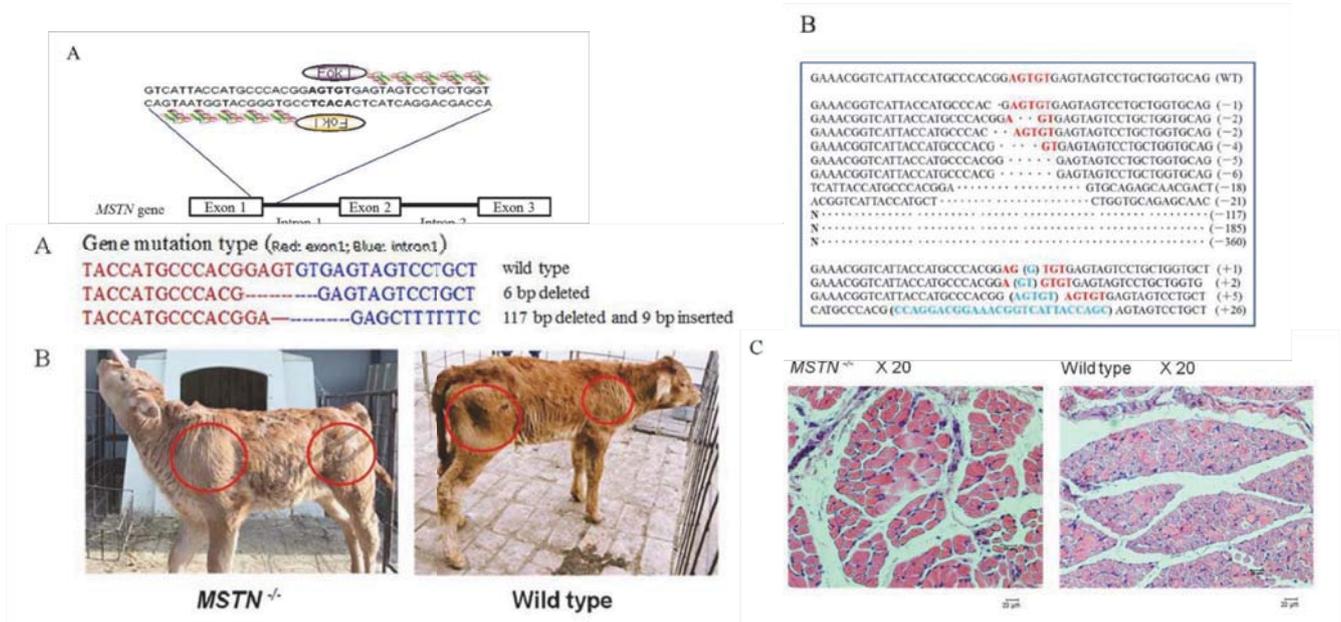
Blue Belgian



Piedmontese

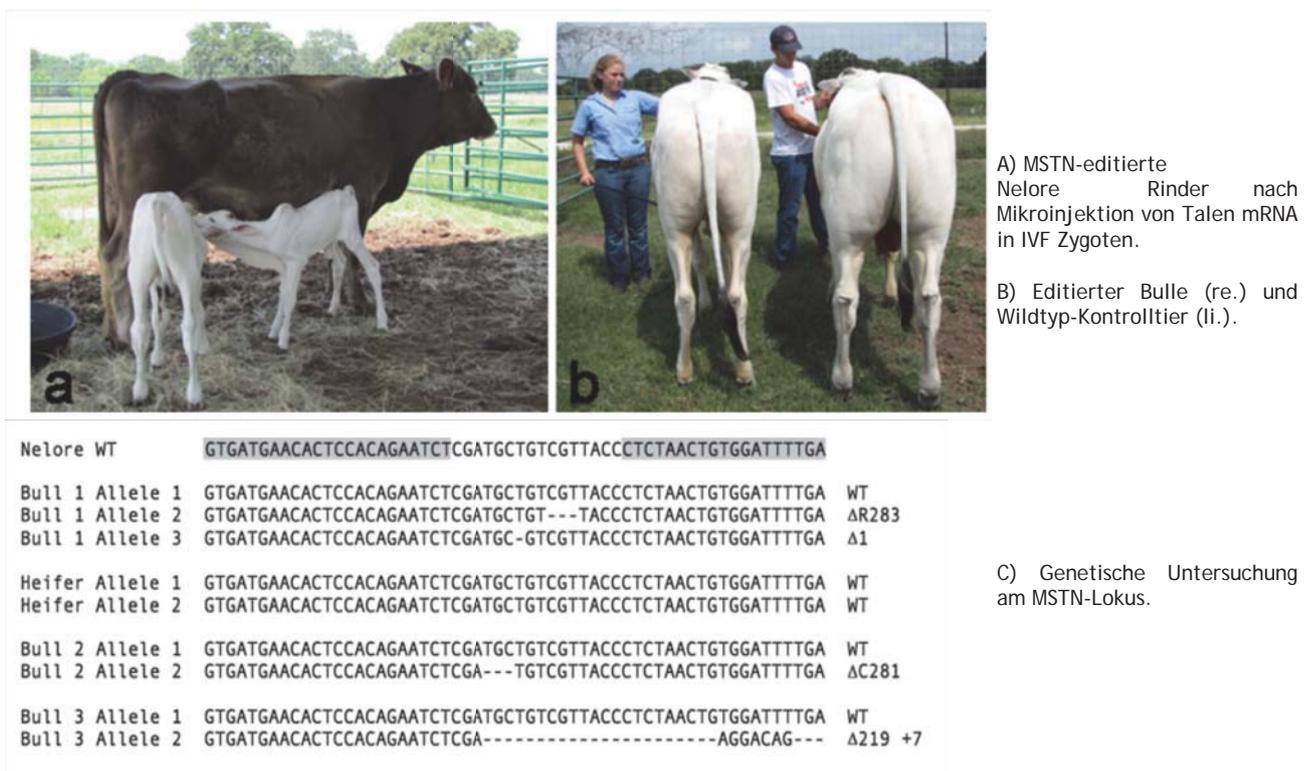
Mutation des MSTN-Gens durch Gene Editing

- Vollständige Ausschaltung von *MSTN* durch ZFN im chinesischen Gelbvieh
- Zellen im Klonen verwendet, 35 Trächtigkeiten, 18 Geburten



Luo et al. (2014) PLoS ONE 9(4): e95225

Mutation des MSTN-Gens durch Gene Editing

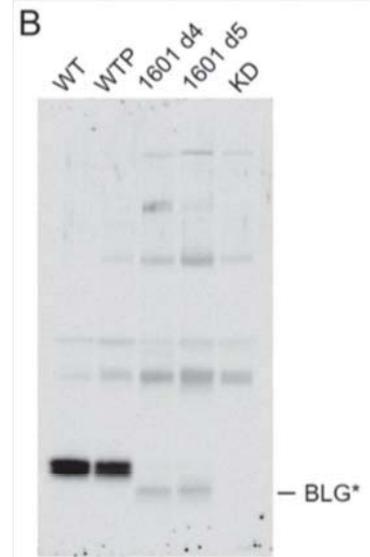


Hypoallergene Milch von Milchkühen

- Beta-Laktoglobulin Hauptallergen in Kuhmilch (Hauptprotein, nicht in menschl. Milch)
- Symptome treten verzögert auf: Rötung, Quaddeln, Juckreiz, Durchfall, aufgeblähter Bauch, Erbrechen, Übelkeit etc.
- 5-10% der Kinder im Alter von 5-10 Jahren zeigen allergische Reaktion.



Figure 2. Cattle, genome-edited for a precise disruption of the *LGB* gene. Shown are the 1601 female and 1602 male with biallelic edits of a repair template-directed nine bp deletion at the age of 19 months that were produced by zygote-mediated HDR editing.

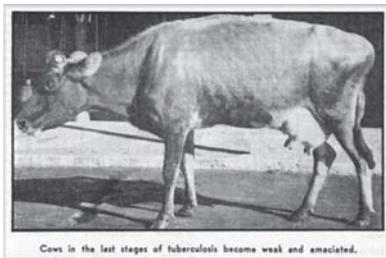


Krankheitsresistenz



Gesteigerte Resistenz gegen Tuberkulose

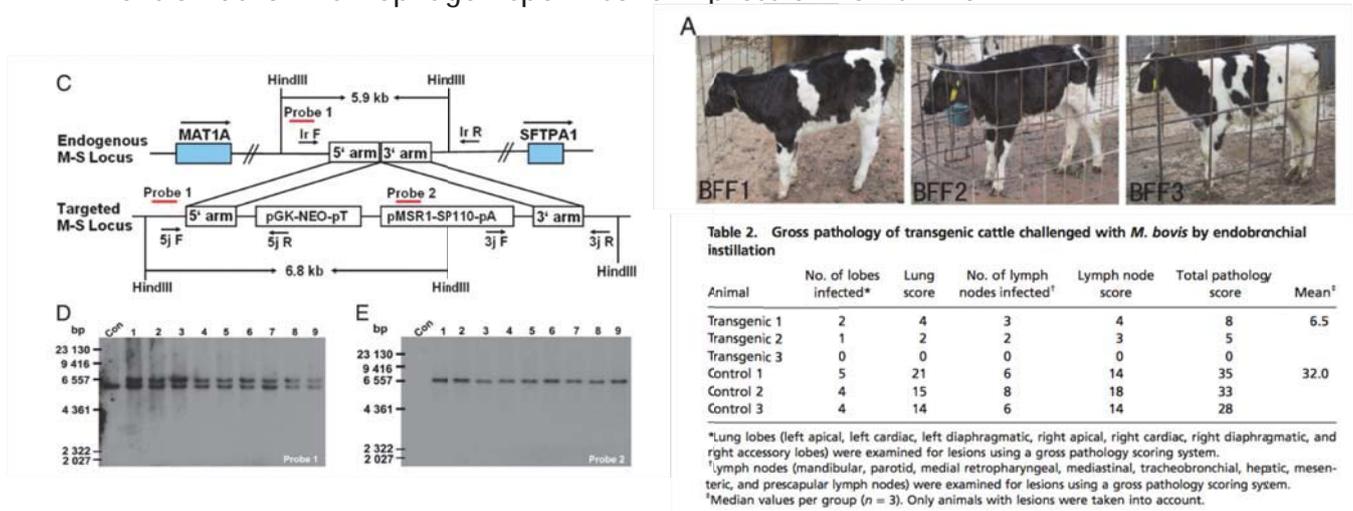
- Tuberkulose ist eine chronische Infektionskrankheit (Erreger: *Mycobacterium bovis*).
- *M. bovis* überlebt 1-8 Wochen in Kot.
- *M. bovis* kann Menschen infizieren.
- Verbreitung in Tröpfchen, Milch, Speichel, Urin, Kot, Läsionen, (alle Körperausscheidungen).
- Hauptsächlich Atemwegserkrankung.
- Ernsthafte Bedrohung der Landwirtschaft in vielen Regionen der Welt, wie Neuseeland, England und Wales.
- 2013: Mehr als 26,000 Rinder in UK gekeult (Schaden >£100m)



WU et al. Proc Natl Acad Sci USA
2015; 112: E1530-E1539.

Gesteigerte Resistenz gegen Tuberkulose

- Das *SP110* Gen aus der Maus kann die Vermehrung von *M. bovis* in Makrophagen durch Apoptose-Induktion in infizierten Zellen kontrollieren.
- Das Einbringen des murinen *SP110* Gens in das Holstein-Friesian Genom (Macrophage Scavenger Receptor (*MSR1*)-locus) durch TALENs führte zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber einer *M. bovis* Infektion durch Makrophagen-spezifische Expression von *SP110*.



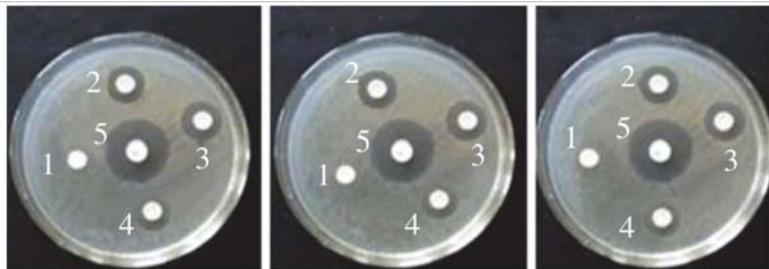
WU et al. Proc Natl Acad Sci USA
2015; 112: E1530-E1539.

Mastitis resistente Kühe durch Expression von humanem Lysozym vom β -Kasein Lokus

Table 4. Infection rate of three types of bacterium infused into mammary glands of five transgenic and five non-transgenic lactating cows. During each challenge experiment, each gland was infused with one of the three types of bacterium and the fourth gland was infused with PBS. TG, transgenic cows; WT, non-transgenic cows.

group	mammary glands treated	mammary glands infected ^a	number of bacteria ($\times 10^3$ CFU ml ⁻¹)			
			0 h	12 h	24 h	48 h
TG	5 (<i>Sta. aureus</i>)	0	0	0	0	0
TG	5 (<i>Str. agalactiae</i>)	0	0	0	0	0
TG	5 (<i>E. coli</i>)	0	0	0	0	0
TG	5 (PBS)	0	0	0	0	0
WT	5 (<i>Sta. aureus</i>)	5	0	1.9 \pm 0.4	3.2 \pm 0.7	4.8 \pm 0.5
WT	5 (<i>Str. agalactiae</i>)	4	0	1.4 \pm 0.3	5.9 \pm 0.8	5.7 \pm 0.7
WT	5 (<i>E. coli</i>)	5	0	1.6 \pm 0.2	4.5 \pm 0.6	4.1 \pm 0.8
WT	5 (PBS)	0	0	0	0	0

^aInfection was defined as bacterium growth in two consecutive milk samples collected 12–24 h apart.



Sta. aureus

E. coli

Str. agalactiae

Liu et al., Proc. Biol. Sci. (281), 2014

Entwicklung der Nutztierzucht

- Domestikation
- Vermehrung „nützlicher“ Populationen
- Selektion nach dem Exterieur
- Selektion nach spezifischen Merkmalen
- Entwicklung von statistischen Konzepten für systematisierte Zuchtprogramme
- Systematische Zucht auf der Basis von Populationsgenetik und Statistik
- Reproduktionsbiotechnologien (AI, ET, IVP, SCNT, etc.)
- Molekulargenetik und Genom basierte Zuchtkonzepte (SNPs, GBV, etc.)
- Gene Editing: Precision Breeding (Tierproduktion 2.0)

~ 20.000 v.C.



~16. Jahrh. n.C.



~1950 n.C.



Gegenwart

Ein Blick in die Zukunft: Diversität von landwirtschaftlichen Produkten

- Normale Vollfett Milch
- Milch für Joghurtproduktion (verstärkte Casein Expression)
- Milch für Käseproduktion (verstärkte Casein Expression)
- Milch für Kaffee Weißer und Creme Liquor (β -casein Überexpression)
- Kleinkindermilch (verstärkte Lactoferrin Expression)
- Verbesserte Eutergesundheit (Lysostaphin, Lysozyme)
- Fett reduzierte oder -freie Milch (Knockout von Schlüsselenzymen der Fettsynthese)
- Hypo-allergene/allergenfreie Milch (reduziertes/ohne β -Lactoglobulin)
- Lactose freie oder -reduzierte Milch (α -Lactalbumin Knockout, zusätzliche Lactase Expression)
- Klimatolerante Tiere (Slick-Gen)
- Höherer Fleischanteil, veränderte Fettsäurezusammensetzung
- Umweltverträglicher Tierproduktion
- Pharmazeutische Proteine (Gene Pharming)

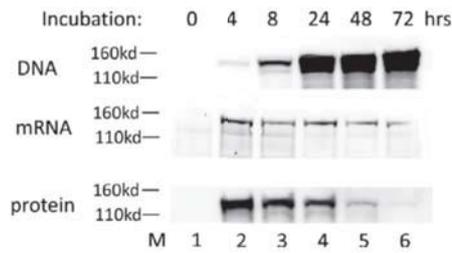


Off-target Aktivität

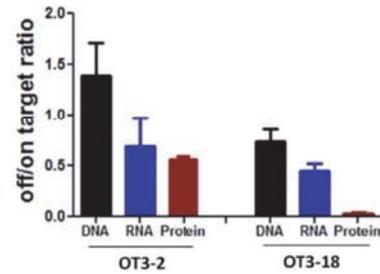


Das Verhältnis von on/off target Aktivität ist stark abhängig von der Cas9 Form und der Wahl der gRNA

(C) Western Blot



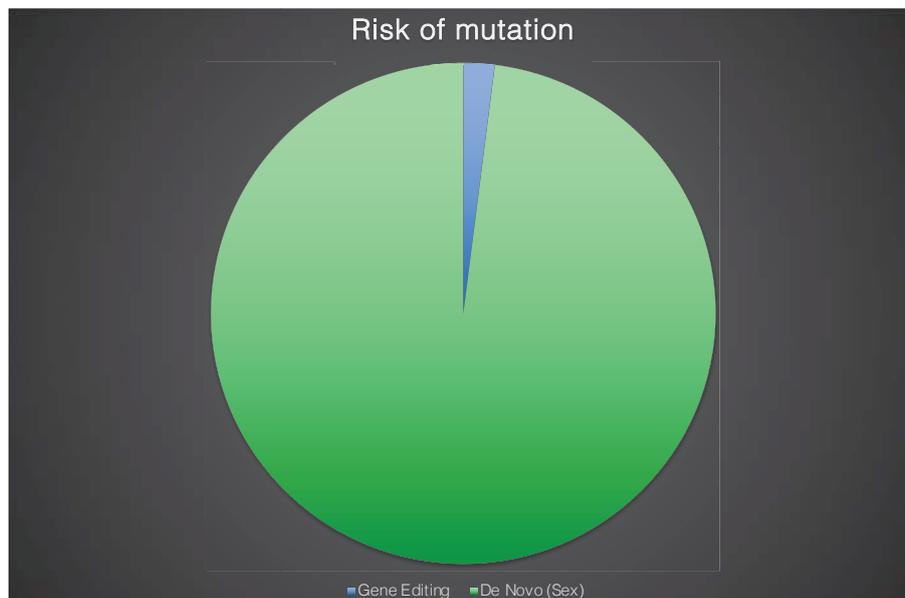
(D) Off-target Indel production

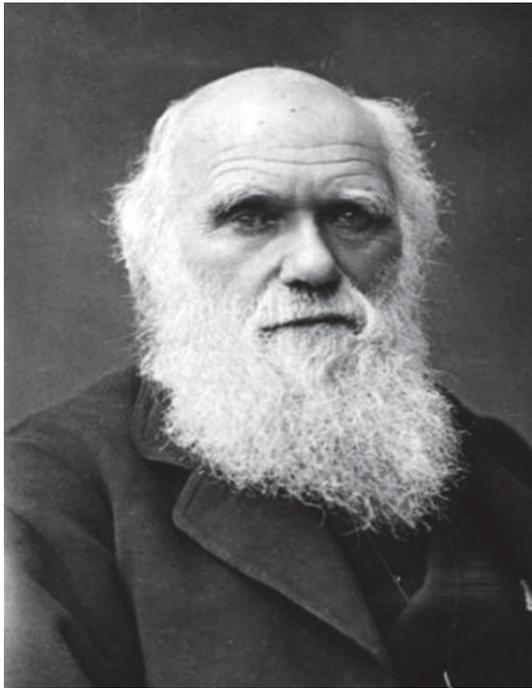


Liang X, Potter J, et al. (2015) Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol*, 208:44–53.

Off-target Risiko durch Gene Editing

Ungefähr 50 Mutationen werden auf die nächste Generation nach sexueller Reproduktion übertragen!





Charles Darwin (1809-1882)

Mutationen ermöglichen
Evolution:

- Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen („survival of the fittest“)
- Nur möglich durch ein flexibles Genom

Einordnung neuer Züchtungsverfahren- GVO vs. Non GVO juristische Interpretation

Frankreich: Anrufung des EuGH

Das französische Verwaltungsgericht bittet den EuGH in einem Vorabentscheidungsverfahren um Klärung/Auslegung des Begriffes Mutagenese (RL 2001/18/EG) und ihre Anwendbarkeit auf (einige) neue Züchtungsverfahren.

Statement des Generalanwalts der EU:

Tieren und Pflanzen, deren Genom mittels Genome Editing verändert wurde, können Ausnahmen im Rahmen der Richtlinie sein= kein GVO!!!

EuGH - Entscheidung:

Alle Tiere und Pflanzen deren Genom mittels Genome Editing verändert wurden, fallen unter die RL 2001/18/EG und sind damit als GVO einzustufen!

Definition:

1.2. genetisch veränderter Organismus (GVO) : ein Organismus mit Ausnahme des Menschen, dessen genetisches Material so verändert worden ist, wie es auf natürliche Weise durch Kreuzen und/oder natürliche Rekombination nicht möglich ist.

(1) Diese Richtlinie gilt nicht für Organismen, bei denen eine genetische Veränderung durch den Einsatz der im Anhang I B aufgeführten Verfahren herbeigeführt wurde.

Anhang I B

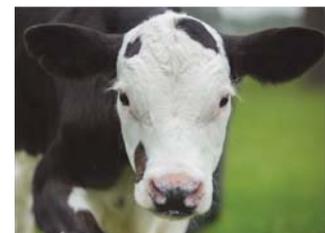
1. Mutagenese

2. Zellfusion

Regulierung editierter Nutztiere



X



>1.5 Mrd. Kombinationen
Keine Regulierung



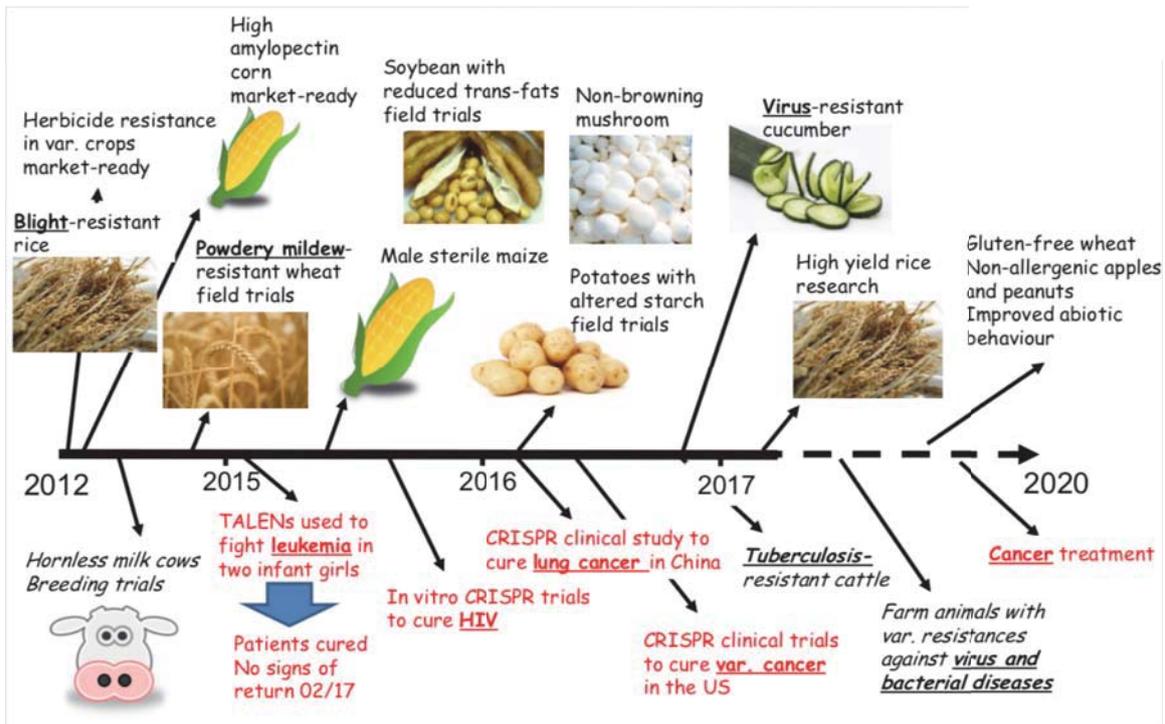
GE:

Einführung einer
einzelnen
Genveränderung



FDA stuft Nachkommen
als Arzneimittel ein

Anwendung von Gene Editing in der Biomedizin und Landwirtschaft



Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

- Klimawandel und wachsende Weltbevölkerung stellen eine gewaltige Herausforderung für die Landwirtschaft dar.
- Die Nahrungsmittelproduktion muss bis 2050 um 70% steigen, um die wachsende urbane und reichere Population zu ernähren (Quelle:FAO).
- Diese Steigerung der Produktion muss zudem, unter Einbeziehung moderner Biotechnologie, mit einer verminderten Umweltbelastung (20% Treibhausgase) und einem gesteigerten Tierwohl einhergehen.
- Gene Editing kann das Nutztiergenom so verändern, dass Nutztiere resistent gegen spezifische Erreger werden (PRRS, BSE, Tuberkulose), oder um gewünschte Eigenschaften in das Nutztiergenom (Hitzeresistenz, Produktqualität) zu integrieren. Zudem stellen genetisch-modifizierte Nutztiere wichtige neue Modelle der Biomedizin und der Grundlagenforschung dar.
- Die Entscheidung des EuGH unter Nicht-Beachtung wissenschaftlicher Erkenntnisse verhindert die Anwendung von Genome Editing in der Tier- und Pflanzenzucht innerhalb der EU und stellt zukünftig einen Wettbewerbsnachteil dar.

Regulierung von GE sollte:

- Wissenschaftlich- und Produkt-basiert, nicht Prozess-basiert stattfinden.
- Dem exponentiellen Erkenntnisgewinn in der Wissenschaft Rechnung tragen.
- Die Risiken, die durch den Verzicht der Anwendung dieser Technologie entstehen, mit berücksichtigen.



Wissenschaftlicher Bericht zu den neuen Techniken in der Pflanzenzüchtung und der Tierzucht und ihren Verwendungen im Bereich der Ernährung und Landwirtschaft

- überarbeitete Fassung vom 15.11.2017 -



Bundesinstitut für Risikobewertung



Bundesinstitut für Risikobewertung

Durchführung von Fokusgruppen zur Wahrnehmung des Genome Editings (CRISPR/Cas9)

Abschlussbericht



**Freiwillige Selbstverpflichtung zum Gene Editing
in der Rinder- und Schweinezucht**

Für einen verantwortungsvollen Umgang mit den neuen Züchtungstechniken

Juni 2017

Danksagung:



DFG funded TR-CRC 127: Biology of xenogeneic cell, tissue and organ transplantation-from bench to bedside



51



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!!!

E-mail: bjoern.petersen@fli.de

*„Voraussagen sind sehr schwierig- besonders über die Zukunft.“
(Niels Bohr 1885-1962)*



52