

Abschlussbericht zum Forschungsprojekt

Einstieg in die molekulare Analyse gesundheitlich und züchterisch relevanter Merkmale beim Alpaka am Beispiel von Vliestyp- und Fellfarben-Varianten
[Entering into the molecular analysis of health and breeding traits of alpacas – exemplarily applied on fleece type and coat color variants]

gefördert durch den Verein zur Förderung der Forschung im Gesundheitssektor von Lamas und Alpakas e.V.

Förderzeitraum: 16.10.2018 bis 31.10.2020
Berichtszeitraum: 16.10.2018 bis 15.01.2021

Projektpartner:

Prof. Dr. med. vet. Gesine Lühken, Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Ludwigstraße 21, 35390 Gießen

Prof. Dr.med. vet. Cord Drögemüller, Universität Bern, Institut für Genetik, Bremgartenstr. 109a, 3001 Bern

Dr. agr. Henrik Wagner, Justus-Liebig-Universität Gießen, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz, Frankfurter Straße 106, 35392 Gießen

Prof. Dr. med. vet. Patrik Zanolari, Universität Bern, Vetsuisse-Fakultät, Wiederkäuerklinik, Department für klinische Veterinärmedizin, Bremgartenstrasse 109a 3012 Bern

Kooperationspartner:

Prof. Dr. med. vet. Thomas Wittek, Universität Wien, Universitätsklinik für Wiederkäuer, Veterinärplatz 1, 1210 Wien

1. Projektziele

Ziel dieses Projektes war es zum einen, eine Übersicht zum Vorkommen von mit Fellfarben und Vlieseigenschaften zusammenhängenden Besonderheiten oder Defekten in der Alpakapopulation des deutschsprachigen Raums (Deutschland, Schweiz, Österreich) zu gewinnen und von Individuen mit entsprechenden Merkmalen Proben für spätere DNA-Analysen zu sammeln. Zum anderen sollen die aktuellen Möglichkeiten der Identifizierung von Genvarianten, die solchen möglicherweise vererbten Besonderheiten oder Defekten zugrunde liegen, für das Alpaka eruiert und verbessert werden. Hierzu sollen die Methoden der Gesamtgenomsequenzierung und der SNP-Chip-Genotypisierung zur beispielhaften Identifizierung von Genvarianten mit Einfluss auf den Vliestyp (Huacaya/Suri) und auf Fellfarben angewendet werden. Die gewonnenen Populations- und molekulargenetischen Daten sowie die gesammelten Proben sollen potenziellen Folgeprojekten, die der Aufklärung und anschließenden Bekämpfung von genetisch bedingten Anomalien und Krankheiten beim Alpaka dienen, eine Grundlage bieten.

2. Ergebnisse des Projektes

2.1 Übersicht zum Vorkommen von Fellfarben, Vliestypen und Defekten bei Neuweltkameliden (NWK) in Deutschland, Österreich und in der Schweiz

Dieser Projektteil wurde entgegen der ursprünglichen Planung auf Lamas ausgeweitet. Zur Erhebung der Daten wurde ein Fragebogen für NWK-Züchter entwickelt (Deutschland und Österreich sowie Schweiz). Die Fragebögen wurden über die Zuchtverbände über einen Online-Link und als PDF-Datei den Züchtern zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden 146 Fragebögen zurückgesandt, die Daten von 69 Betrieben aus Deutschland, 16 Betrieben aus Österreich und 61 Betrieben aus der Schweiz enthielten. Insgesamt wurden in den zurückgesandten Erhebungen Daten zu 2770 Tieren gemeldet. Etwa 85% der Betriebe halten Alpakas und ca. 15% Lamas, wobei die Lamas in der Schweiz eine größere Rolle spielen als

in Deutschland und Österreich. Die häufigste Alpakarasse war Huacaya (87,7%), während bei den Lamas der zahlenmäßige Unterschied zwischen den verschiedenen Rassen nicht so deutlich war. Die drei Fellfarbgruppen einfarbig weiß (24,8%), braun und schwarz (64,8%) und grau (10,4%), traten mit unterschiedlicher Häufigkeit auf. Überwiegend kommen einheitlich einfarbig gefärbte Tiere vor (81,4%), seltener wurden Fellmusterungen wie Pinto (8,8%), gesprenkelt (6,4%) und gefleckt bzw. Appaloosa (3,4%) angegeben.

Etwa 7% der NWK mit einfarbig weißem Fell zeigten blau-pigmentierte Augen (blue-eyed white, BEW). Für mehr als jedes zweite BEW-Tier wurde angegeben, dass es taub sei. Andere Anomalien im Zusammenhang mit Fellfarbe, -musterung oder Vliestyp wurden nicht genannt. Insgesamt wurden 161 Beobachtungen von angeborenen Störungen, die über einen Zeitraum von 5 Jahren auftraten, angegeben. Die häufigsten Erkrankungen gehören in die Gruppe der Muskel-Skelett-Erkrankungen, wie z.B. spiralförmiges Zehenwachstum (16,4%), Hyperextension des Fesselgelenkes (12,3%), Gliedmaßenfehlstellungen (11,0%) und axiale Rotation der Gliedmaßen (8,2%). Weitere Detail-Ergebnisse der Umfrage finden sich in der resultierenden Open-Access- Veröffentlichung (Jost et al. 2020), die auch diesem Bericht beiliegt.

2.2 Sammlung von Proben von Alpakas mit verschiedenen Fellfarben und Vliestypen sowie mit eventuell vorkommenden Besonderheiten oder Defekten

Bis heute (30.09.2020) wurden im Rahmen des Projektes über 200 Proben von Alpakas der beiden Vliestypen Huacaya und Suri sowie mit verschiedenen Fellfarben und -mustern gesammelt. Aus allen Proben, die in die weiteren, unten beschriebenen Analysen einbezogen wurden, wurde DNA isoliert. Da nicht bei allen Tieren EDTA-Blutproben genommen werden konnten, ist bei einem Teil dieser Proben die verfügbare DNA-Menge (z.B. aus Material wie Haarwurzeln) allerdings nicht ausreichend für umfassendere Analysen wie Genomsequenzierung oder SNP-Chip-Analyse. Diese Proben eignen sich aber nach Etablierung eines entsprechenden Gentests zur Genotypisierung von bestimmten DNAVarianten (z.B. Defekt-Allele).

Die gesammelten Proben stammen aus Deutschland und der Schweiz. Unter den gesammelten Proben sind auch Proben von insgesamt 5 BEW-Tieren sowie von drei Elterntieren. Weiterhin befindet sich die Probe von einem Alpaka mit Verdacht auf genetisch bedingte Hypophosphatämie sowie von einem Alpaka mit einer Vulva-Missbildung im Probenstand. Es ist damit zu rechnen, dass im Nachgang zur oben beschriebenen Umfrage noch weitere Proben von NWK mit Anomalien und möglicherweise auch verwandten Tieren für Folgeprojekte eingeworben werden können.

2.3 Genomanalysen zur Identifizierung von Genvarianten mit Einfluss auf bestimmte Fellfarben und den Vliestyp

Aufgrund der veterinärmedizinischen und züchterischen Bedeutung wurden als Zielmerkmale exemplarisch ausgewählt:

- Fellfarbe Grau (classic grey)
- Fellfarbe Weiß, mit blauen Augen (blue-eyed white, BEW)
- Vliestyp (Huacaya/Suri)

Kurz nach Beginn des Projektes wurde eine neue, verbesserte Alpaka-Referenzgenomsequenz verfügbar (VicPac3.1, Richardson et al. 2019). Dadurch erschien die Anwendung der Genomsequenzierung für die Ziele des Projektes deutlich vielversprechender als die Verwendung des SNP-Chips, zumal eine nach Projektbeginn veröffentlichte Studie gezeigt hat, dass der bovine HD-SNP-Chip für das Alpaka nur rund 400 tatsächlich nutzbare SNPs liefert (More et al. 2019) und damit überraschend deutlich weniger als die bisher vermuteten rund 75 000 SNPs (Bertolini et al. 2016). Die Anzahl der genomsequenzierten Tiere wurde von bisher geplanten 4 nach und nach auf insgesamt 11 erhöht, was auch dadurch möglich war, dass die Preise für die Genomsequenzierung kontinuierlich fallen. Unter diesen Tieren waren 7 Huacayas und 4 Suris. Bezogen auf die Fellfarben waren 3 BEW-Tiere, 1 silbergraues Tier, 2 weiße Tiere mit dunklen Augen, sowie einige schwarze und braune Tiere mit weißen Flecken oder Abzeichen darunter. Zwei der Tiere waren Vater und Mutter von

demselben BEW-Tier. Außerdem konnten 3 publizierte Genomsequenzen von Huacayas (ohne Information zur Fellfarbe) mit in die Analysen einbezogen werden.

2.3.1 Ergebnisse der molekulargenetischen Analysen zur grauen Fellfarbe beim Alpaka

Die ersten beiden im Rahmen des Projektes generierten Genomsequenzen waren die von einem schwarzen Suri sowie einem silbergrauen Huacaya. Zu dem Zeitpunkt, als im Projekt mit der Analyse dieser Genomsequenzen begonnen werden konnte, veröffentlichten Jones und Mitarbeiter die kausale Mutation für Grau beim Alpaka (Jones et al. 2019). Es handelt sich um einen Nukleotidaustausch an Position 376 der kodierenden Sequenz des KIT-Gens (c.376G>A), der einen Aminosäureaustausch verursacht. Diese Mutation befand sich ebenfalls in der Liste der Sequenzvarianten, die sich nach der im Projekt durchgeführten Filterung der Genomsequenzen der beiden sequenzierten Alpakas auf eine dominante, funktionelle Variante, die zwischen Grau und nicht-Grau differenziert, ergab. Es wurde für diese Variante ein Gentest entwickelt, mit dem bisher DNA-Proben von insgesamt 108 Alpakas mit unterschiedlichen Fellfarben analysiert wurden. Die Genotypisierungsergebnisse sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Genotypisierungsergebnisse bezüglich der Grau-Mutation bei Alpakas aus verschiedenen Fellfarb-Gruppen

Fellfarb-Gruppe (n)	Genotyp c.376G>A im KIT-Gen		
	GG	AG	AA
Beige (15)	15	0	0
BEW (5)	0	5	0
Braun (21)	19	2	0
Grau (29)	0	29	0
Schwarz (18)	18	0	0
Schwarz oder Braun mit Weiß (5)	3	2	0
Weiß (15)	15	0	0
Gesamt (108)	70	38	0

A = Grau-Allel; G = Wildtyp-Allel

Bei keinem Tier wurde das Grau-Allel homozygot (AA) nachgewiesen. Alle 29 Tiere mit grauer Fellfarbe (silvergry, rosegrey etc.) waren heterozygot für die Grau-Mutation (AG). Keines der 108 Alpakas war homozygot für die Grau-Mutation (Tab. 1). Dies bestätigt die schon lange vermutete Letalität dieser Genvariante im homozygoten Zustand (Munyard, 2011). Grau ist bei Tieren mit hellen Fellfarben wie z.B. Beige (fawn) und Weiß nicht sichtbar (Munyard, 2011). Unter den im Rahmen des Projektes genotypisierten 15 beigen und 15 weißen Alpakas konnte allerdings überraschenderweise kein Grau-Träger identifiziert werden (Tab. 1). Jones et al. (2019) identifizierten dagegen 13,4 und 9,2% Grau-Träger unter Alpakas mit beiger fawn) bzw. weißer (nicht BEW) Fellfarbe. Alle 5 der im aktuellen Projekt genotypisierten BEW-Tiere waren heterozygot für Grau. Die Vermutung, dass BEW aus einer Kombination der Grau-Mutation mit einer weiteren, bisher noch nicht identifizierten Genvariante resultiert (Jones et al. 2019, Munyard 2011), wird dadurch bestätigt. Eines der beprobten BEW-Elterntiere, schwarz mit weißem Kopf und Flecken, war ebenfalls Grau-Träger. Interessanterweise zeigte dieses Tier keine deutliche) Grau-Färbung. Dies war auch bei drei weiteren dunkel gefärbten Alpakas der Fall. Für die Vermeidung der Entstehung von BEW-Tieren ist es zumindest bis zur Identifizierung der zweiten beteiligten Mutation (siehe 2.3.2) relevant, alle Grau-Träger zu erkennen. Der Gentest für die Grau-Mutation ist mittlerweile als Dienstleistung für Alpakazüchter verfügbar. [Download](#)
Eine Publikation zu den Ergebnissen der Grau-Genotypisierung ist in Vorbereitung.

2.3.2 Ergebnisse der molekulargenetischen Analysen zum blue-eyed white (BEW)-Phänotyp beim Alpaka

Für die Suche nach der zweiten kausalen Mutation (neben der Grau-Mutation) für BEW konnten zu Beginn des Projektes nur zwei BEW-Alpakas beprobt und genomsequenziert werden. Es wurde nach Sequenzvarianten gefiltert, die zwischen BEW-Tieren und Tieren mit anderen Fellfarben (z.B. Grau, Weiß mit dunklen Augen) nach bestimmten Vererbungsmodellen (dominant, rezessiv) abweichen müssen. Hierbei lag aufgrund vorliegender Kenntnisse das besondere Augenmerk auf der Region des KIT-Gens. Durch die Kombination mit dem Grau-Allel kann die zweite BEW-Mutation potenziell bei allen Tieren, die nicht das Grau-Allel tragen, vorhanden sein. Daher lieferten die Analysen bisher immer eine viel zu hohe Anzahl an potenziellen Varianten, um sie nachfolgend auf Kausalität überprüfen zu können. Im letzten Drittel des Projektzeitraums konnte ein weiteres BEW-Tier einschließlich der Elterntiere (eines davon Grau-Träger) beprobt werden. Leider lieferte das Servicelabor in China zunächst Genomsequenzen mit schlechter Genomabdeckung, so dass die Sequenzierung zwar kostenlos wiederholt wurde, allerdings auch einen Zeitverlust von rund 4 Monaten verursachte. Die drei neuen Genomsequenzen lagen seit Mitte September 2020 vor und wurde gemeinsam mit den bereits vorhandenen Genomsequenzen analysiert. Eine mit dem Merkmal BEW segregierende Genvariante im KIT-Gen selbst wurde nicht gefunden. Die Filterung von Genvarianten eines größeren Bereichs um das KIT-Gen herum ergab eine einzige Sequenzvariante, die theoretisch einen Einfluss auf die Funktion des betroffenen Gens haben könnte. Es handelt sich um einen Aminosäureaustausch (Val5Met) im Steroid 5 Alpha-Reductase 3-Gen (SRD5A3). Durch die Genotypisierung von weiteren grauen und BEW-Alpakas ergab sich allerdings, dass die gefundene Genvariante nicht kausal für den BEW-Phänotyp sein kann. Auch anhand der Ergebnisse aus anderen Studien (Jones et al. 2019) zeichnet es sich ab, dass die zweite für BEW verantwortliche Mutation sich außerhalb der kodierenden Sequenz des KIT-Gens befinden und/oder dass es sich um eine komplexe strukturelle Variation handeln könnte, die auch im Rahmen des aktuellen Projektes nicht weiter aufgeklärt werden konnte. Zur Identifizierung komplexer struktureller Varianten sind Verfahren wie die Nanopore-Sequenzierung notwendig. Ein Gentest für das Intersexualitäts-Syndrom bei der Ziege konnte erst nach Aufklärung der vollständigen Struktur der kausalen Mutation nach Anwendung der Nanopore-Sequenzierung entwickelt werden (Simon et al. 2020). Weitere Analysen zur Identifizierung der BEW-Mutation(en) sollten die Nanopore-Sequenzierung oder ähnliche Methoden einbeziehen. Außerdem ist es sinnvoll, die molekulargenetische Charakterisierung des BEW-Phänotyps auf das Lama auszuweiten. Zum einen besteht auch beim Lama durch die Verbindung mit Taubheit ein Grund, die Entstehung von BEW-Tieren züchterisch zu vermeiden. Zum anderen könnten durch die enge Verwandtschaft zwischen Alpaka und Lama eine vielversprechende Herangehensweise sein, die generierten Genomsequenzen gemeinsam zu filtern. Unter der Annahme, dass BEW-Tiere bei beiden Spezies durch die selbe/n Mutation/en verursacht werden, kann so eine höhere Anzahl von nicht mit dem Merkmal zusammenhängende Varianten direkt ausgeschlossen werden und eine geringere Zahl an zu überprüfenden Varianten übrigbleiben.

2.3.3 Ergebnisse der molekulargenetischen Analysen zum Vliestyp (Huacaya/Suri) beim Alpaka

Bisher wurden im Rahmen des Projektes generierte Genomsequenzen von 4 Huacayas und 4 Suris in die Analysen einbezogen, hinzu kamen 3 Huacaya-Sequenzen aus der öffentlich verfügbaren Genomsequenz-Datenbank. Die Variantenfilterung unter Annahme einer einfachen dominant-rezessiven Vererbung ergab eine sehr hohe Anzahl potenzieller Kandidaten. Eine Variante in einem Keratin-assoziierten Protein-Gen wurde in rund 30 Proben von Huacayas und Suris genotypisiert und zeigte leider keinen eindeutigen Zusammenhang mit dem Merkmal. Wie beim Merkmal BEW ist allerdings davon auszugehen, dass (mindestens) zwei Genvarianten beteiligt sind. Im Gegensatz zum Merkmal BEW gibt es bisher keine Genregion, für die bereits vermutet werden kann, dass dort kausale Genvarianten lokalisiert sind. Für Eingrenzung der Merkmals-beeinflussenden Genomregionen wäre die Genotypisierung von über das Genom verteilte Genvarianten mit einer kostengünstigeren Methode als der Gesamtgenomsequenzierung bei einer größeren Anzahl von Tieren, z.B. von jeweils rund 30 Huacayas und 30 Suris ein vielversprechender Ansatz. Während der Laufzeit dieses Projektes konnte zwar eine ausreichende Zahl an Proben von Huacayas und Suris

gesammelt werden, allerdings war bisher keine kostengünstige Methode für die Genotypisierung von genomweiten Genvarianten vorhanden. Seit kurzem ist jedoch ein Chip zur Genotypisierung von rund 70.000 SNPs beim Alpaka verfügbar und daher eine vielversprechende Option für weiterführende Untersuchungen.

4. Literatur

Bertolini F. (2016) Applicability of using bovine, ovine and caprine SNP chips for alpaca and dromedary genomic studies. *J Anim Sci* 94: 85.

Jones M, Sergeant C, Richardson M, Groth D, Brooks S, Munyard K. (2019) A non-synonymous SNP in exon 3 of the KIT gene is responsible for the classic grey phenotype in alpacas (*Vicugna pacos*). *Anim. Genet.* 50:493-500.

Jost SM, Knoll A, Lühken G, Drögemüller C, Zanolari P (2020) Prevalence of coat colour traits and congenital disorders of South American camelids in Austria, Germany and Switzerland *Acta Vet. Scand.* 62: 56.

More M, Gutiérrez G, Rothschild M, Bertolini F and Ponce de León FA (2019) Evaluation of SNP genotyping in alpacas using the bovine HD genotyping beadchip. *Front. Genet.* 10:361.

Richardson MF, Munyard K, Croft LJ, Allnut TR, Jackling F, Alshanbari F, Jevit M, Wright GA, Cransberg R, Tibary A, Perelman P, Appleton B and Raudsepp T (2019) Chromosome-Level Alpaca Reference Genome VicPac3.1 Improves Genomic Insight Into the Biology of New World Camelids. *Front. Genet.* 10:586.

Simon R, Lischer HEL, Pierkowska-Schelling A, Keller I, Häfliger IM, Letko A, Schelling C, Lühken G, Drögemüller C. (2020) New genomic features of the polled intersex syndrome variant in goats unraveled by long-read whole-genome sequencing. *Anim. Genet.* 51:439-448.

5. Fazit und Ausblick

Die im Projekt durchgeführte Umfrage liefert erste Einblicke über die Häufigkeit verschiedener Farb- und Vliesmerkmale und Anomalien in der aktuellen NWK-Population von Deutschland; Österreich und der Schweiz. Im Zusammenhang mit der Fellfarbe spielt in diesen Populationen anscheinend nur die Verbindung zwischen dem blue-eyed white (BEW)-Phänotyp und Taubheit eine größere Rolle. Die Identifizierung der häufigsten Muskel-Skelett-Erkrankungen können die Züchter ermutigen, betroffene Tiere aus ihrem Zuchtprogramm zu eliminieren. Die hierbei hilfreiche Identifizierung von kausalen Mutationen sowie die bei Merkmalen wie z.B. dem spiralförmigen Zehenwachstum notwendige Abgrenzung zu nicht-genetischen Ursachen sollte weiterverfolgt werden. In einem Folgeprojekt sollen daher wie schon in diesem Projekt kontinuierlich weiter Proben von NWK-Familien mit Anomalien, die eine genetische Ursache haben könnten, gesammelt und dann auch analysiert werden, wenn eine erfolgsversprechende Anzahl von Proben vorhanden ist.

Im Rahmen des Projektes wurden Proben für DNA-Analysen von über 200 Alpakas gesammelt. Darunter befinden sich vor allem Huacayas und Suris mit vielen verschiedenen Fellfarben, 5 blue-eyed white (BEW)-Tiere und drei Elterntiere, ein Tier mit angeborener Hypophosphatämie sowie ein Tier mit einer Vulva-Missbildung. Von insgesamt 13 Tieren wurden Genomsequenzen generiert, die drei letzten erst kurz vor Ende der Projektlaufzeit, so dass sich die Beendigung des Projektes um einige Monate verzögert hat.

Für die Genvariante, die beim Alpaka die klassisch graue Fellfarbe verursacht, wurde ein Gentest entwickelt. Grau-Träger, die nicht immer äußerlich erkannt werden – wie auch bei einigen im Projekt beprobten Tieren - können mit Hilfe dieses Gentests identifiziert werden. Dies ist vor allem im Zusammenhang mit der Entstehung von BEW-Tieren wichtig, für die gezeigt werden konnte, dass sie immer Grau-Träger sind.

Die zweite für BEW verantwortliche Mutation sowie die für die Vliestypen Huacaya und Suri verantwortlichen mindestens zwei Genvarianten konnten in diesem Projekt nicht identifiziert werden. Beide Fragestellungen im Rahmen eines Folgeprojektes weiterverfolgt werden, auch unter Einbeziehung von neuesten Sequenziermethoden (z.B. Nanopore), die speziell für die Aufklärung von komplexen Sequenzvarianten geeignet sind. Beide Merkmale (BEW und Vliestyp) spielen auch beim Lama eine Rolle. Daher sollen sie in einem Folgeprojekt auch Proben von Lamas mit entsprechendem Genotyp molekulargenetisch untersucht werden. Dies bietet große Synergieeffekte, da durch die enge Verwandtschaft beider Spezies Genomsequenzinformationen wechselseitig verwendet werden können.

In dem von uns zu beantragenden Nachfolgeprojektes wollen wir uns primär zum ersten Mal mit der genetischen Diversität der Alpaka-Populationen im deutschsprachigen Raum beschäftigen. Die Erhaltung bzw. ggf. Erhöhung der genetischen Diversität einer Rasse ist essentiell für die Gesundheit und Fitness der Tiere. Es wäre äußerst sinnvoll, die Populationen von Deutschland, Österreich und der Schweiz diesbezüglich zu analysieren und zu vergleichen, um beispielsweise festzustellen, ob Zuchttiere zwischen den Populationen ausgetauscht werden sollten und ob Einzeltiere mehr oder weniger zur genetischen Diversität beitragen.