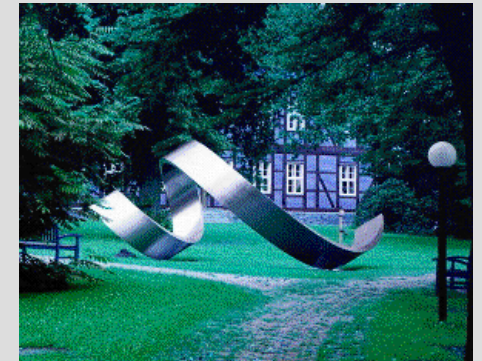


# Neue Techniken der Genommodifikation - Anwendungen in der Nutztierzucht

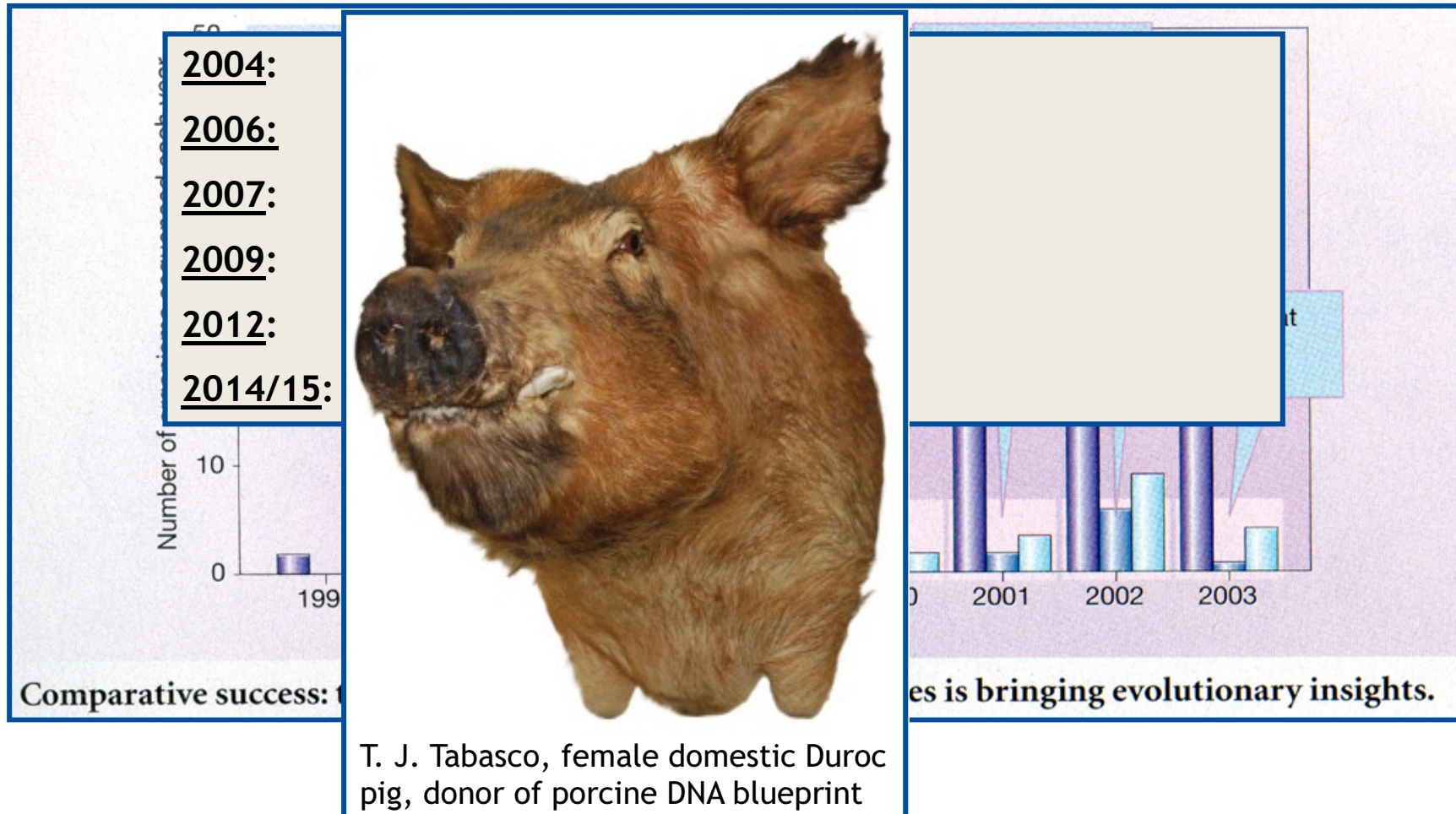
- Zur Genomforschung bei Nutztieren
- Genetische Veränderung durch DNA Nukleasen (Gen-Editing)
- Anwendungsperspektiven

**Heiner Niemann**

Institut für Nutztiergenetik, FLI  
Mariensee, Neustadt, Germany



# Aktueller Stand der Genomsequenzierung



Nature 426, 2003

# Eigenschaften des Schweinegenoms

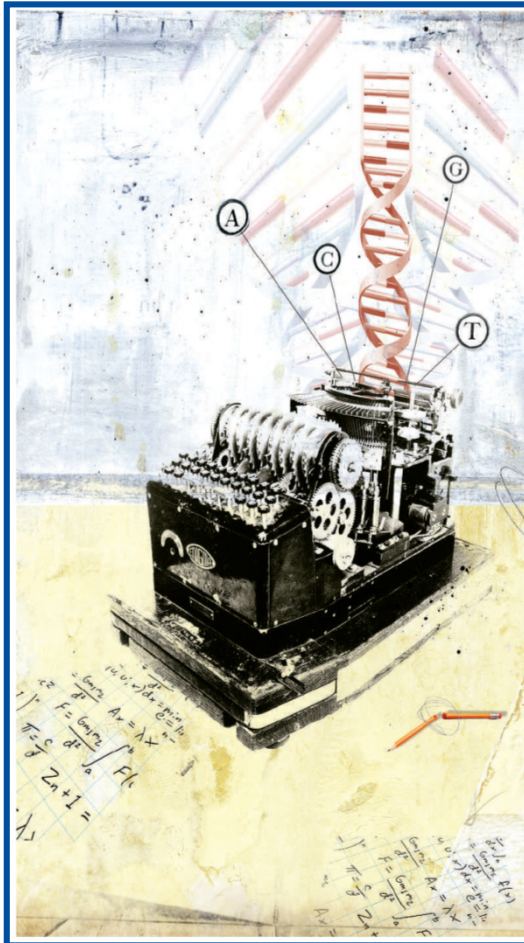
---

- Phylogenetische Auftrennung zwischen europäischen und asiatischen Schweinen vor ~1Mill. Jahren;
- Schweinegenom enthält ~21,640 Protein kodierende Gene, 380 Pseudogene, ~3000 nc RNAs, 197,700 Genexons und ~26,500 Gentranskripte;
- ~5% des Genoms werden transkribiert;
- Sehr großes Repertoire an olfaktorischen Genen;
- Schweinegenom hat 39 Typ I interferongene (doppelt soviel wie Mensch und Maus);
- 112 genomische Positionen, wo das porcine Protein die gleiche Aminosäuresequenz hat, die mit einer Humanerkrankung verbunden ist, incl. Fettleibigkeit, Diabetes mellitus, Parkinson`s oder Alzheimer Erkrankung;
- Schweinegenom hat weniger PERV Loci als viele Vertebraten; diese sind zudem meist auch defekt.

---

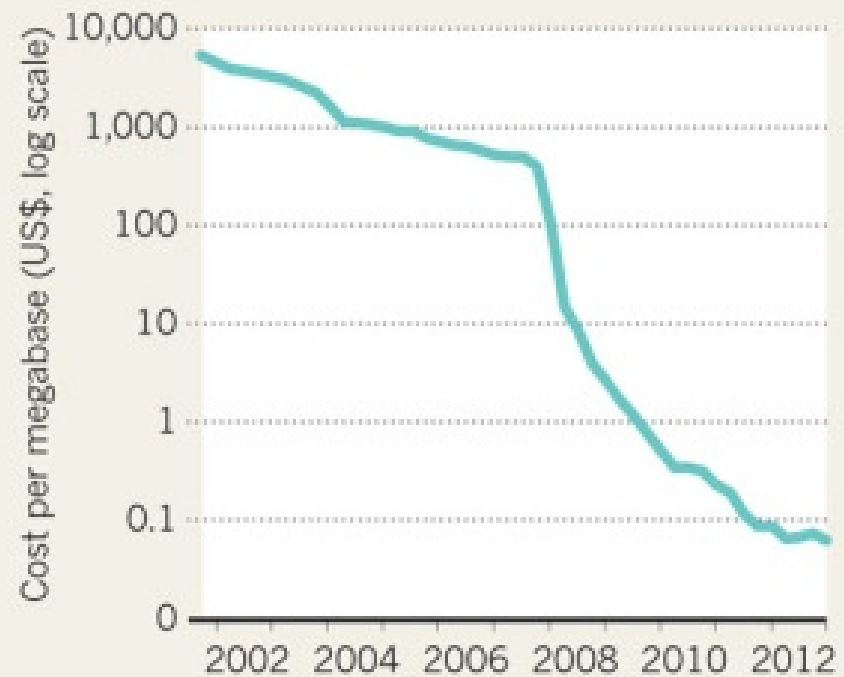
Groenen et al., 2012 Nature 491, 393-398

# Schnelle und drastische Reduktion der Kosten für genomische Sequenzierung



## PLUMMETING COSTS

Advances in sequencing technologies have driven a sharp drop in price.



Nature 497, 2013

# Nutzung der neuen genomischen Kenntnisse

---

- Genauere Zuchtprogramme
- ***Genomische Zuchtwertschätzung; Direktsequenzierung***

Der genomische Zuchtwert kann auf die Testbullenhaltung verzichten und ist zudem genauer und sicherer in der Aussage.

- Transcriptomics/Proteomics/Phenomics
- Erstellung genetisch modifizierter Tiere (Gen-Editing)
- Neue Erkenntnisse über genetische Vielfalt
- Abstammungsstudien
- Vergleichende Genomik

# Präzise genetische Veränderungen durch DNA Nukleasen

---

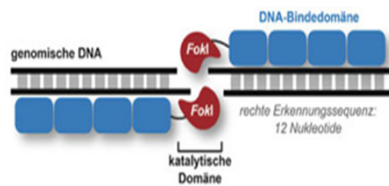




# Verschiedene Klassen von Gen-Scheren

## In der Praxis (Klinik) eingesetzte Gen-Scheren

### Zink-Finger- Nukleasen (ZFN)



Erkennungs-  
sequenz:

~24 bp

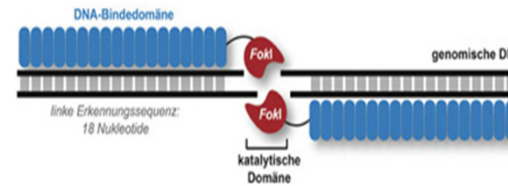
Eingesetzt:

seit 2003

In Praxis (Klinik):

seit 2013

### TAL-Effektor- Nukleasen (TALEN)

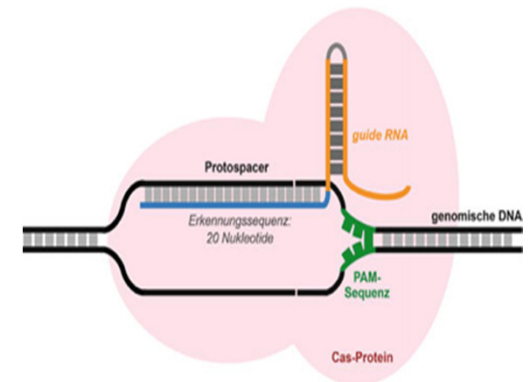


~36 bp

seit 2011

seit 2016

### CRISPR/Cas- Nukleasen (CRISPR)



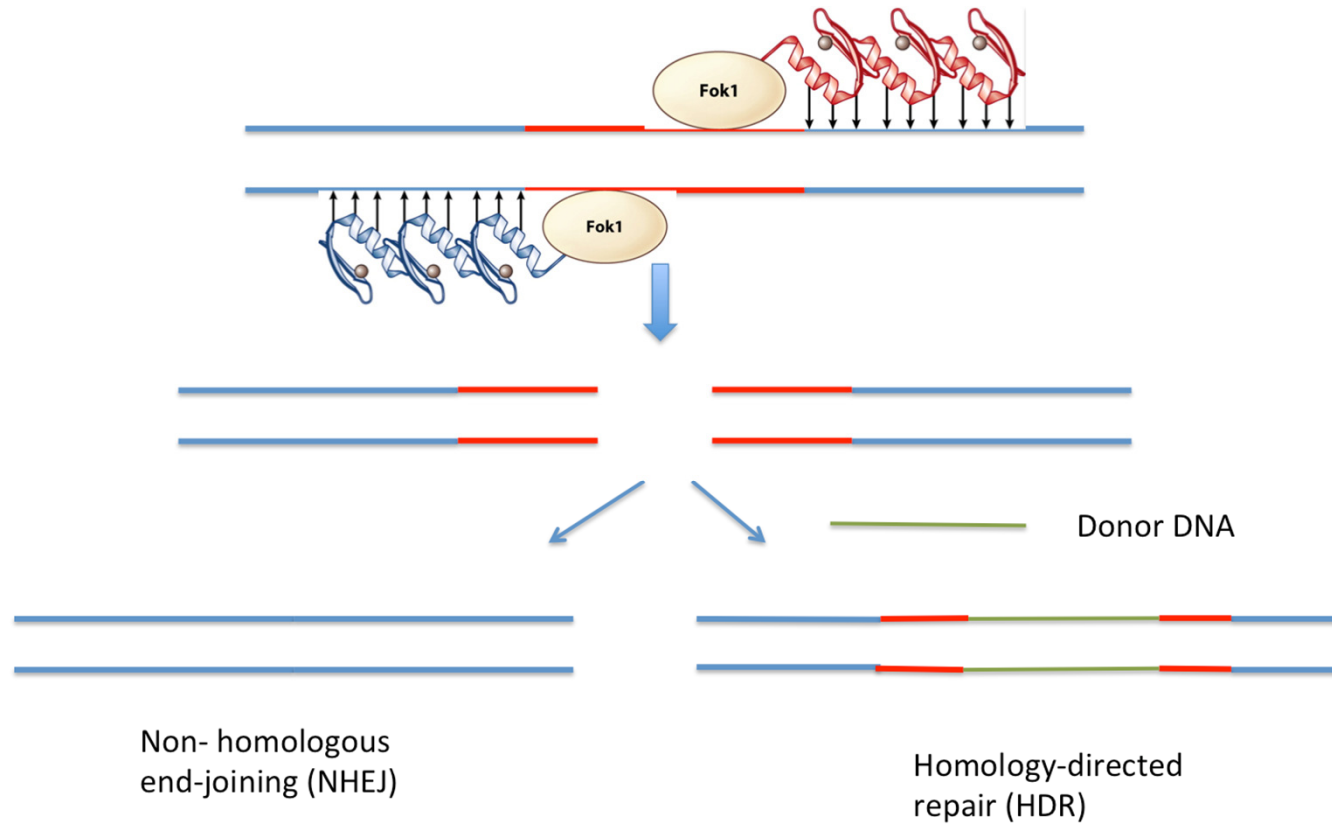
~22 bp

seit 2013

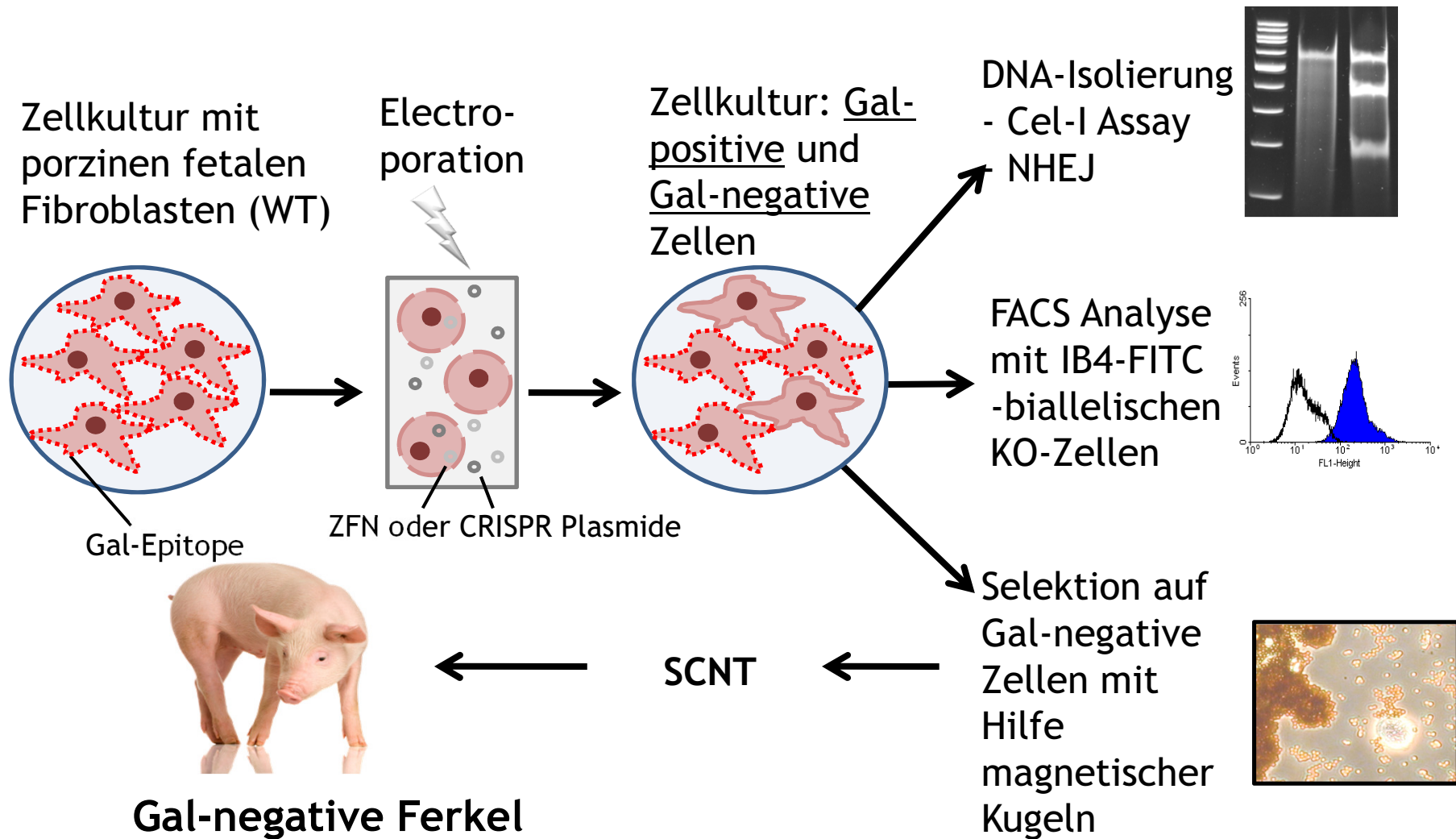
seit 2016



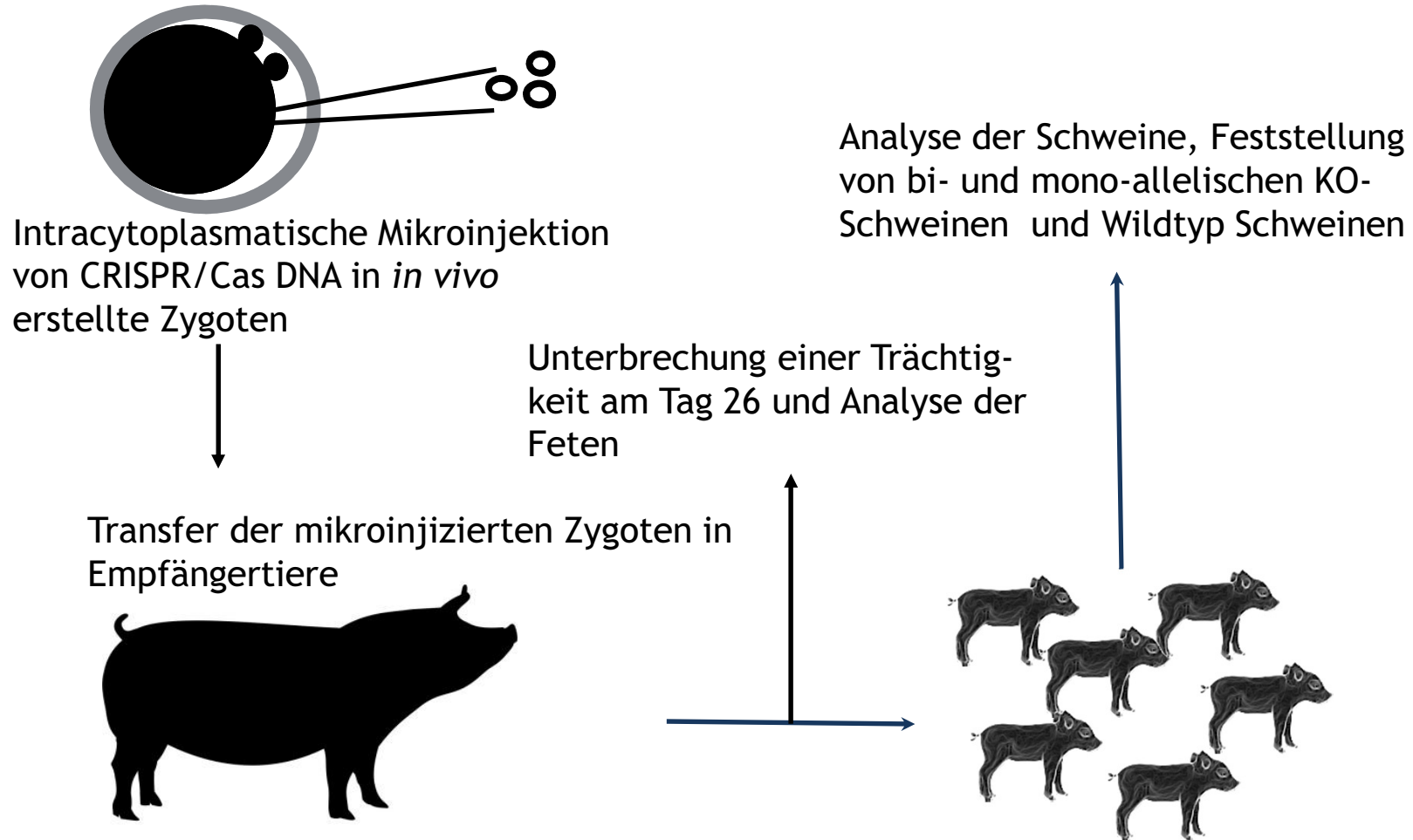
# Funktionalität von Zinc-Finger Nukleasen (ZFNs)



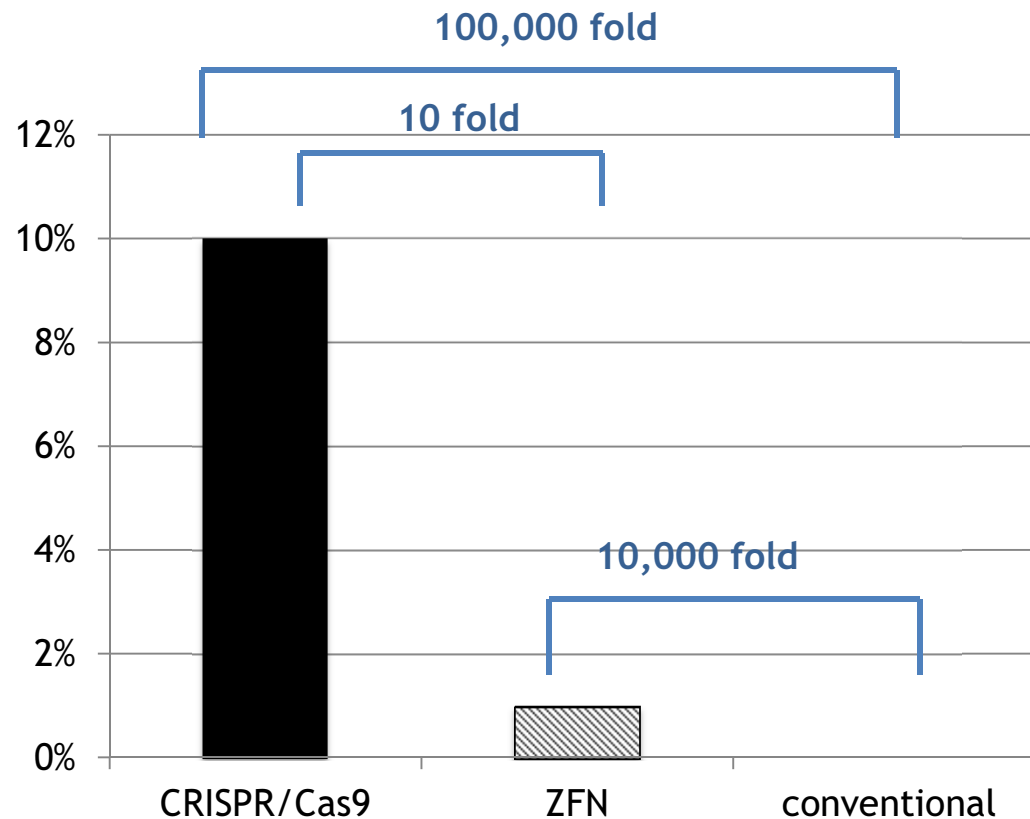
# Strategie zur Produktion von Schweinen mit einem homozygoten Knockout für GGTA1



# Produktion von GGTA1-KO Schweinen durch Injektion von CRISPR/Cas Plasmiden



# Gen-Targeting Effizienz des porcinen GGTA1-Locus mit unterschiedlichen DNA Nukleasen

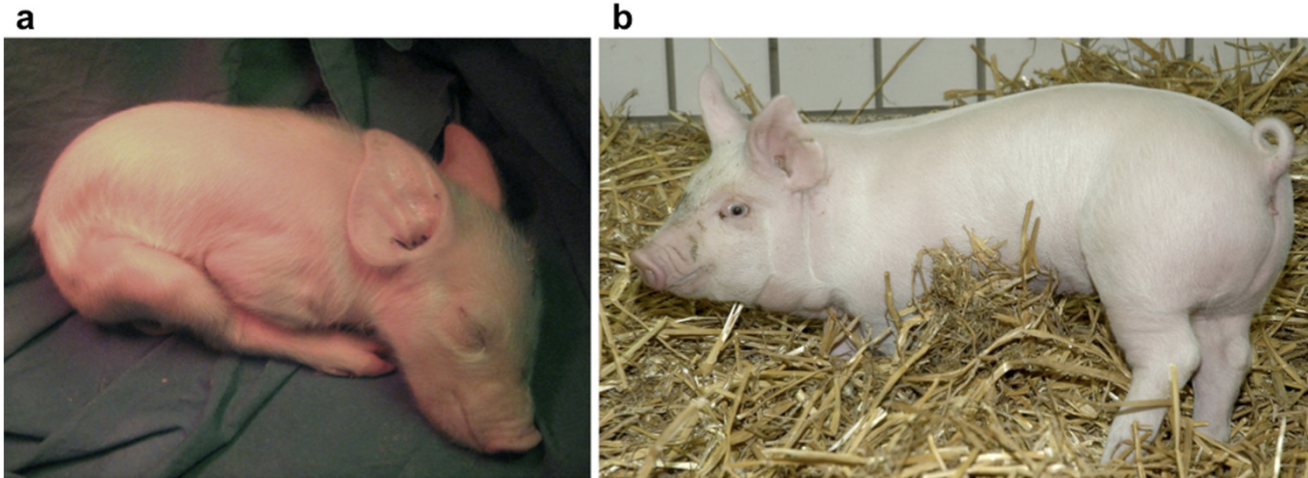


Petersen et al., unpublished data



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT  
**FLI**  
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit  
Federal Research Institute for Animal Health

# Schweine mit ZFN vermitteltem homozygoten Knock-out für $\alpha$ -Gal



Left: First pigs with an ZFN-induced homozygous KO of an endogenous gene (Liliy, born 20.12.2011) Right: Lia (born 06.01.2011)



Three ZFN GalKO piglets born on 14.04.2011

# Sequenzierung des ZFN mutierten Gal-Locus

	ZFN-GGTA1-23713	ZFN-GGTA1-23714	WT	
	<b>WT: CGGTGGCTCAGCTACAGGCCTGGTGGTACAAGGCAC</b>			
<b>E41</b>	<b>C1F1:</b>	CGGTGGCTCAGCTACAG-CCTGGTGGTACAAGGCAC CGGTGGCTCAG-T-----CTGGTGGTACAAGGCAC		
	<b>C1F2:</b>	CGGTGGCTCAGCTACA----TGGTGGTACAAGGCAC CGGTGGCTCAGCTACAGGCCTGGTGGTACAAGGCAC		
	<b>C1F3:</b>	CGGTGGCTCAGCTACAG-CCTGGTGGTACAAGGCAC CGGTGGCTCAG-T-----CTGGTGGTACAAGGCAC		
	<b>C1F4:</b>	CGGTGGCTCAGCTACAG-CCTGGTGGTACAAGGCAC		
	<b>C1F5:</b>	CGGTGGCTCAGCTACAG-CCTGGTGGTACAAGGCAC CGGTGGCTCAG-T-----CTGGTGGTACAAGGCAC		
	<b>C1F6:</b>	CGGTGGCTCAGCTACAG-CCTGGTGGTACAAGGCAC		
<b>E45</b>	<b>C2F1:</b>	CGGTGGCTCAGCTACAGGCCT-----ACAAGGCAC CGGTGGCTCAGCTAC-----TGGTGGTACAAGGCAC	→ Lia	
	<b>C2F2:</b>	ATGGACGTGGAT--(-96bp)--ATACGAGAGGCGG		

Hauschild et al. PNAS 108, 12013 -12017 (2011)

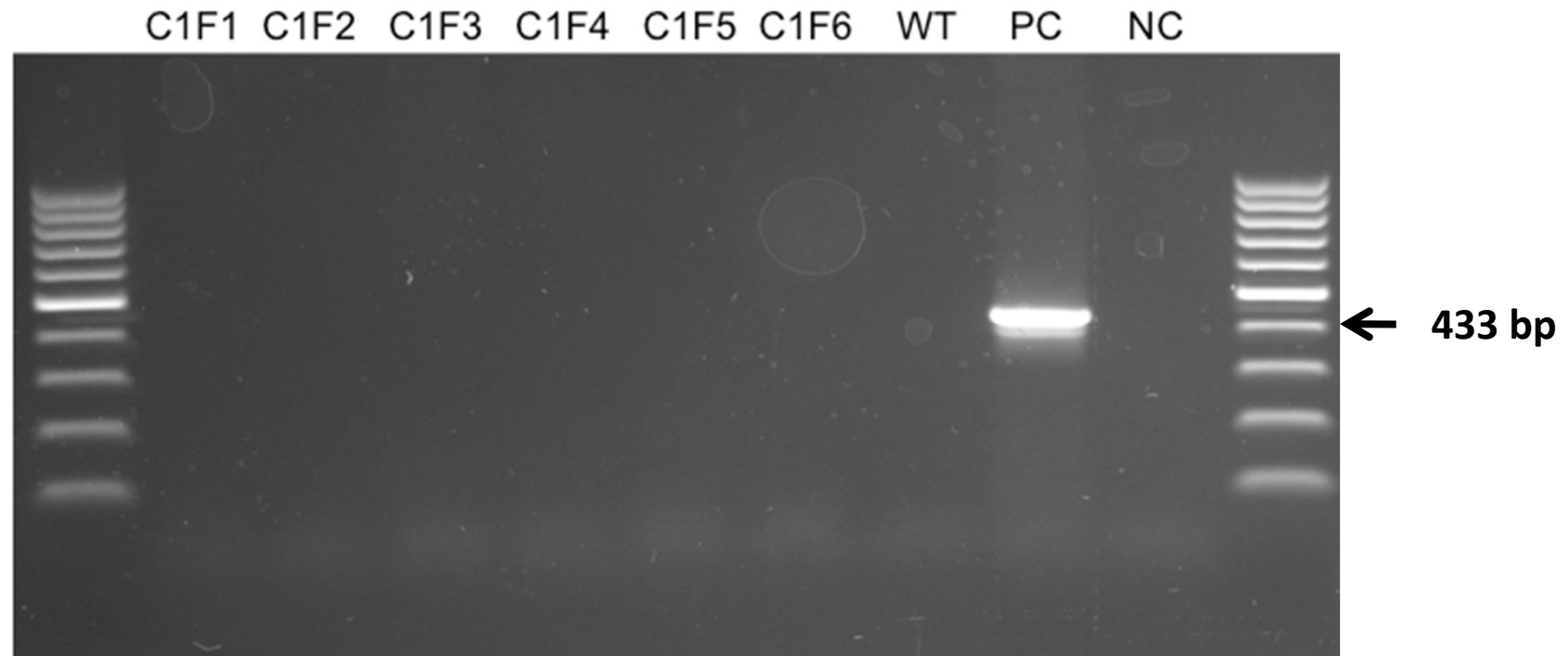
→ alle Mutationen führten zum Gal-Knock-out

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

**FLI**

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit  
Federal Research Institute for Animal Health

# Ausschluss der Plasmid Integration

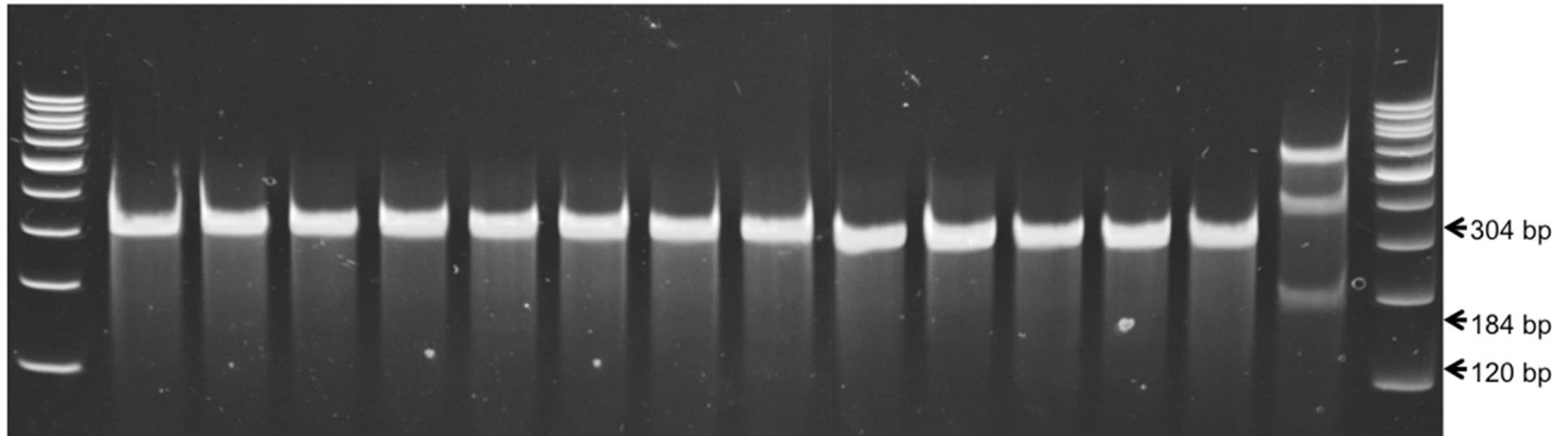


- PCR Amplifikation von *FokI* in PC-haltiger Plasmid DNA  
→ Keine Plasmid Integration detektiert

# Ausschluss von Off-target Mutationen

c1 OTS-3

C1F1 C1F1 C1F2 C1F2 C1F3 C1F3 C1F4 C1F4 C1F5 C1F5 C1F6 C1F6 WT PC  
+WT +WT +WT +WT +WT +WT +WT +WT +WT +WT +WT Gal



- Die 10 wahrscheinlichsten Off-Target Stellen (OTS) wurden mit PCR Amplifikation und Mutation Detection Assay untersucht (nur 1 OTS wird gezeigt)

→ **keine Off-Target Mutationen nachgewiesen**



# Einsatzbereiche von DNA-Nukleasen (Gen Editing) bei Nutztieren

---

- Genetische Krankheitsresistenz
- Verbesserungen im Tierschutz (Hornlose Rinder)
- Nutztiere für die Humanmedizin (Xenotransplantation)
- Verbesserungen in der tierischen Nahrungsmittelproduktion (Geschlechtsbeeinflussung)
- Entfernung von allergen Molekülen (Eiweiss, Milch)
- Erhaltung bedrohter Spezies (Rassen)
- Haustiere (Minipigs, Koi, Hunde)
- Krankheitsmodelle (autistische Affen, *MECP2*)
- Vektor Kontrolle (Mücken, Mosquitos)

# Rinder und Schafe mit TALEN induziertem Knockout für Myostatin



Nelore WT	<u>GTGATGAACACTCCACAGAATCTCGATGCTGTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGA</u>		
Bull 1 Allele 1	GTGATGAACACTCCACAGAATCTCGATGCTGTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGA	WT	
Bull 1 Allele 2	GTGATGAACACTCCACAGAATCTCGATGCTGT---TACCCTCTAACTGTGGATTTTGA	ΔR283	
Bull 1 Allele 3	GTGATGAACACTCCACAGAATCTCGATGC-GTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGA	Δ1	
Heifer Allele 1	GTGATGAACACTCCACAGAATCTCGATGCTGTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGA	WT	
Heifer Allele 2	GTGATGAACACTCCACAGAATCTCGATGCTGTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGA	WT	
Bull 2 Allele 1	GTGATGAACACTCCACAGAATCTCGATGCTGTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGA	WT	
Bull 2 Allele 2	GTGATGAACACTCCACAGAATCTCGA---TGTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGA	ΔC281	
Bull 3 Allele 1	GTGATGAACACTCCACAGAATCTCGATGCTGTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGA	WT	
Bull 3 Allele 2	GTGATGAACACTCCACAGAATCTCGA-----AGGACAG---	Δ219 +7	
Sheep WT	<u>GTGATGAGCACTCCACAGAATCTCGATGCTGTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGA</u>		
Sheep Allele 1	GTGATGAGCACTCCACAGAATCTCGATGCTGTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGA	WT	
Sheep Allele 2	GTGATGAGCACTCCACAGAATCTCGATGCTGT---TACCCTCTAACTGTGGATTTTGA	ΔR283	

# Myostatin knockout Schweine, nach Einsatz von TALENs

---



Produziert in Korea 2015

---

Nature, Juli 2015

# PRRS resistente Schweine nach CRISPR/Cas vermitteltem Knockout von CD 163

---



Drei mit der CRISPR/Cas-Technik behandelte Ferkel wurden zusammen mit sieben normalen Tieren in einer Gruppe gehalten. Alle Tiere wurden mit dem PRRV-Virus infiziert. Nach fünf Tagen zeigten die normalen Ferkel die bekannten Symptome von PRRV-Erkrankungen, die drei anderen jedoch nicht. Obwohl sie über 35 Tage zusammen mit den erkrankten Ferkeln gehalten wurden, blieben die editierten Schweine gesund und vital.

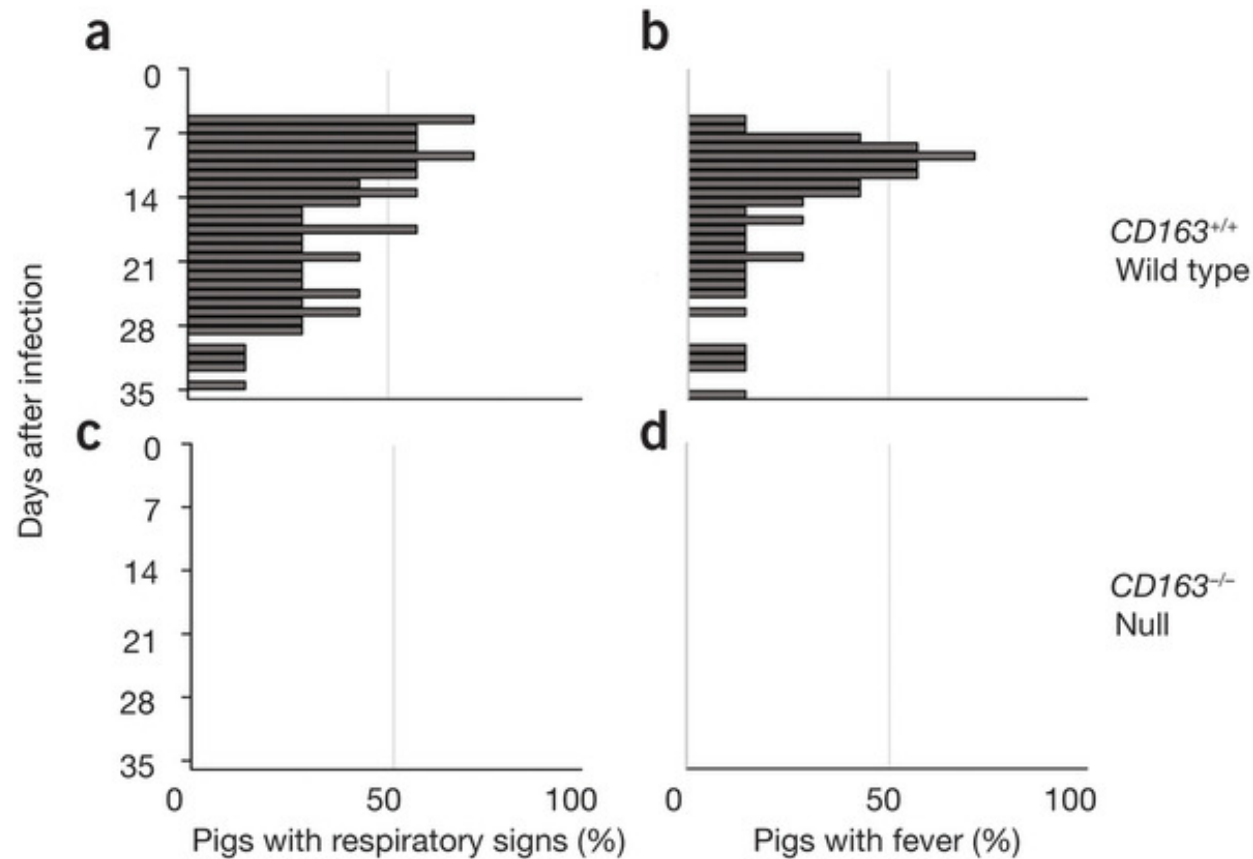
**(PRRS: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *CD163* is a macrophage differentiation antigen belonging to the scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) family of membrane proteins)**

---

Whitworth et al., Nature Biotechnology 34, 20-22 (2016)

Foto: University of Missouri

# PRRS resistente Schweine nach CRISPR/Cas vermitteltem Knockout von CD 163



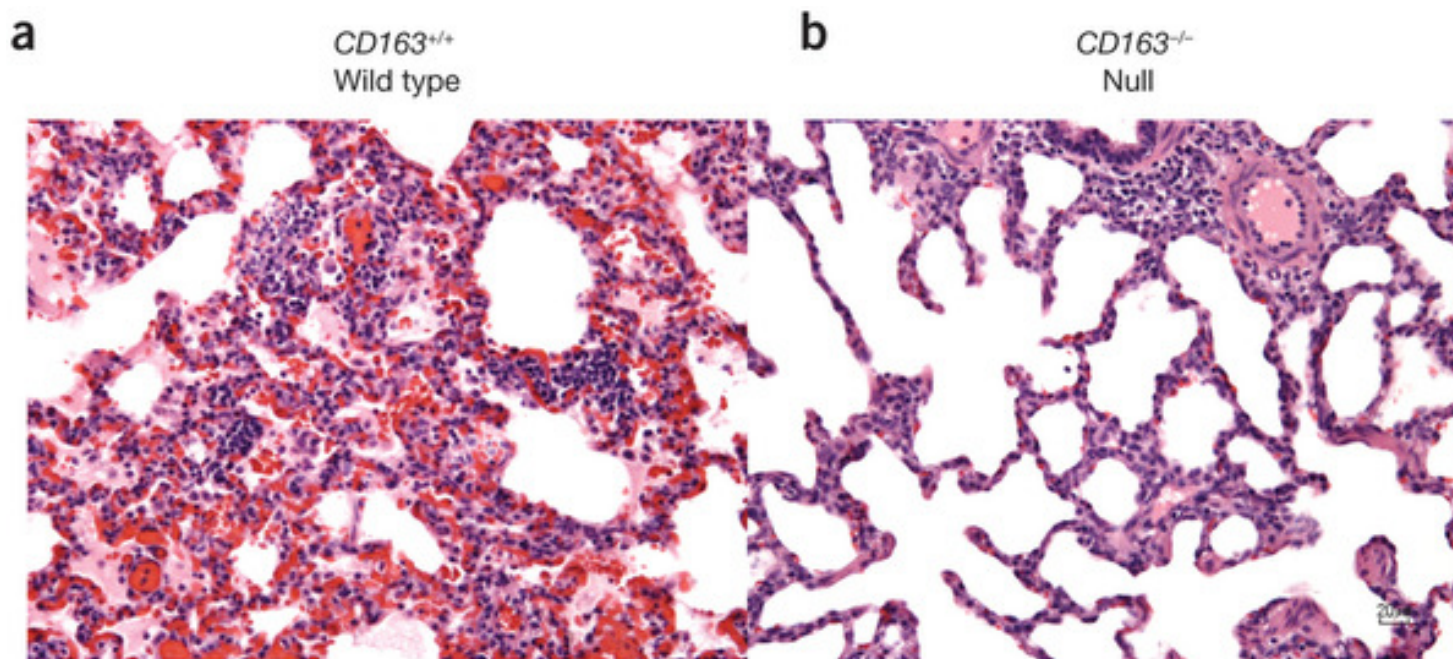
**PRRS: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus**

Whitworth et al., Nature Biotechnology 34, 20-22 (2016)

# PRRS resistente Schweine nach CRISPR/Cas vermitteltem Knockout von CD 163

---

Mikroskopisches Bild in der Lunge von CD163<sup>+/+</sup> und CD163<sup>-/-</sup>



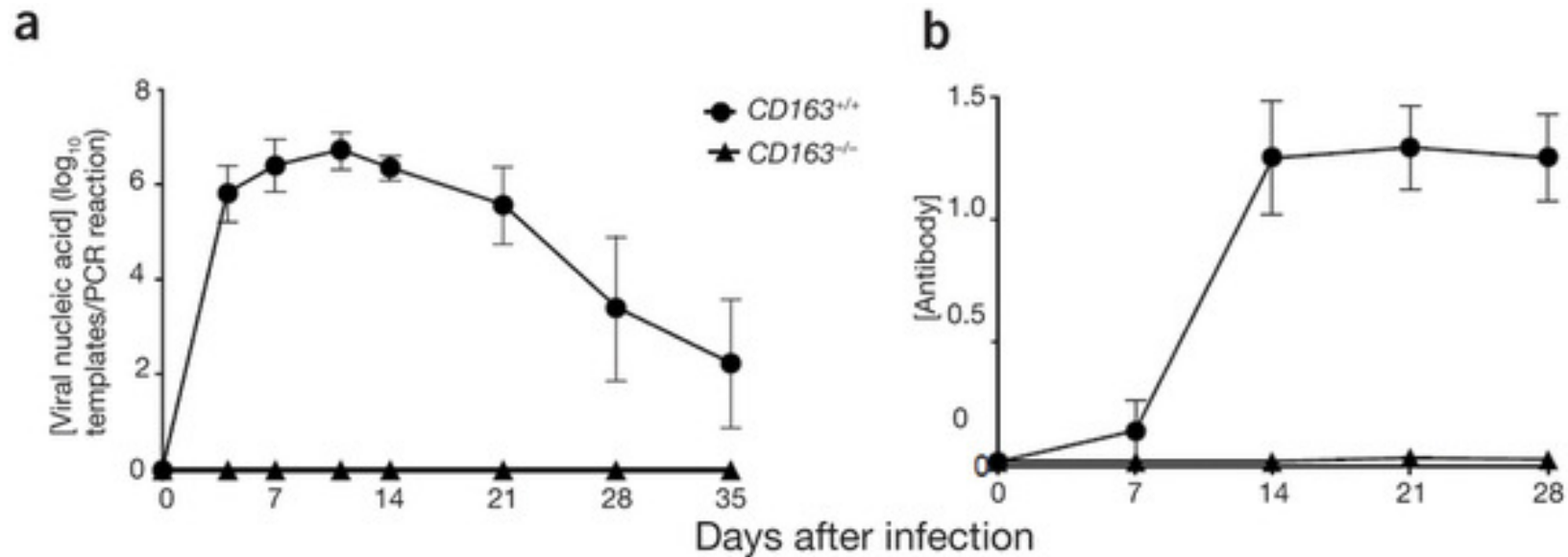
PRRS: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

---

Whitworth et al., Nature Biotechnology 34, 20-22 (2016)

# PRRS resistente Schweine nach CRISPR/Cas vermitteltem Knockout von CD 163

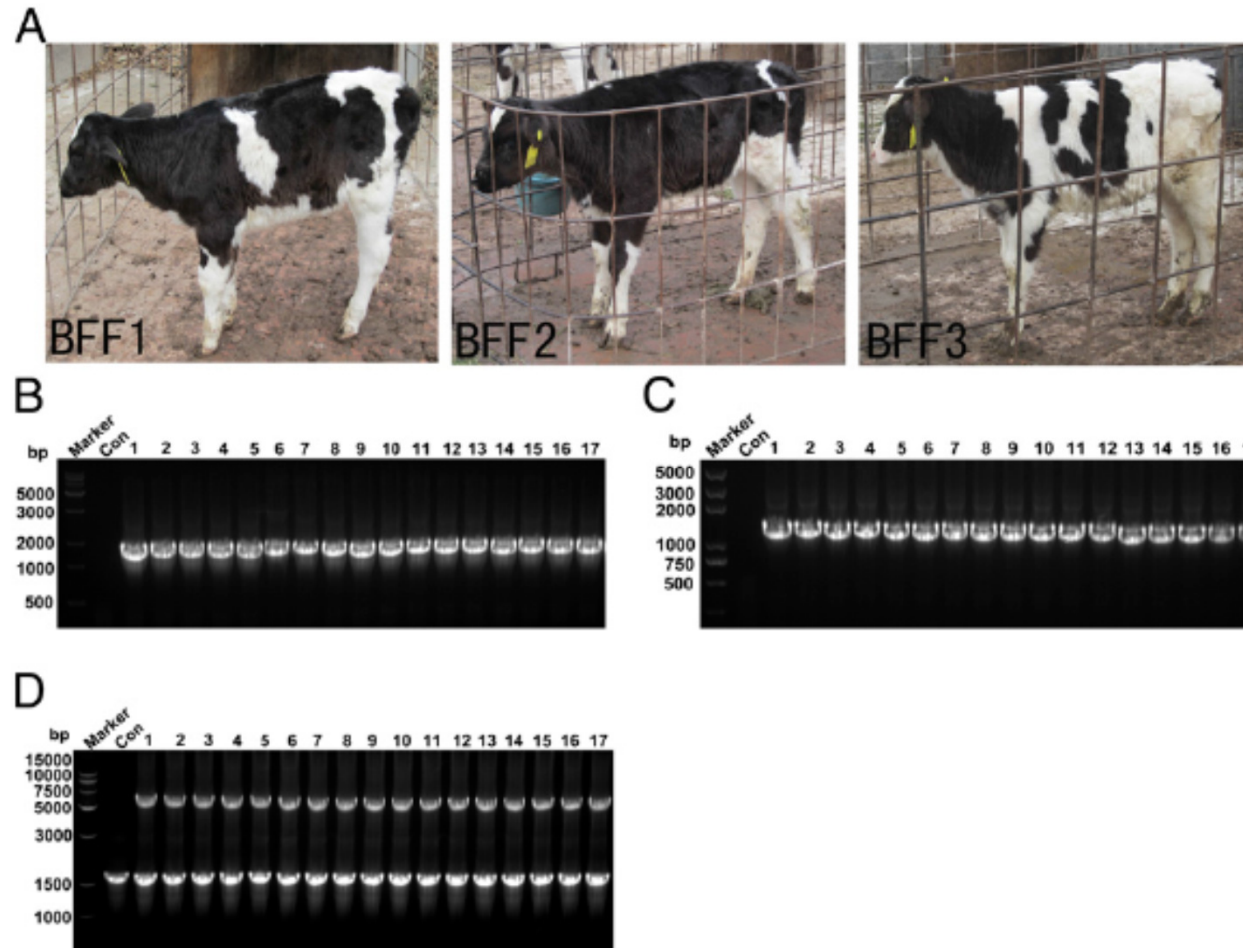
## PRRS spezifische DNA (a) und Antikörper (b)



PRRS: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

Whitworth et al., Nature Biotechnology 34, 20-22 (2016)

# Rinder mit genetischer Resistenz gegen Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis*, nach Einsatz von Gen Editing





# Rinder mit genetischer Resistenz gegen Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis*, nach Einsatz von Gen Editing

**Table 2. Gross pathology of transgenic cattle challenged with *M. bovis* by endobronchial instillation**

Animal	No. of lobes infected*	Lung score	No. of lymph nodes infected <sup>†</sup>	Lymph node score	Total pathology score	Mean <sup>‡</sup>
Transgenic 1	2	4	3	4	8	6.5
Transgenic 2	1	2	2	3	5	
Transgenic 3	0	0	0	0	0	
Control 1	5	21	6	14	35	32.0
Control 2	4	15	8	18	33	
Control 3	4	14	6	14	28	

\*Lung lobes (left apical, left cardiac, left diaphragmatic, right apical, right cardiac, right diaphragmatic, and right accessory lobes) were examined for lesions using a gross pathology scoring system.

<sup>†</sup>Lymph nodes (mandibular, parotid, medial retropharyngeal, mediastinal, tracheobronchial, hepatic, mesenteric, and prescapular lymph nodes) were examined for lesions using a gross pathology scoring system.

<sup>‡</sup>Median values per group ( $n = 3$ ). Only animals with lesions were taken into account.

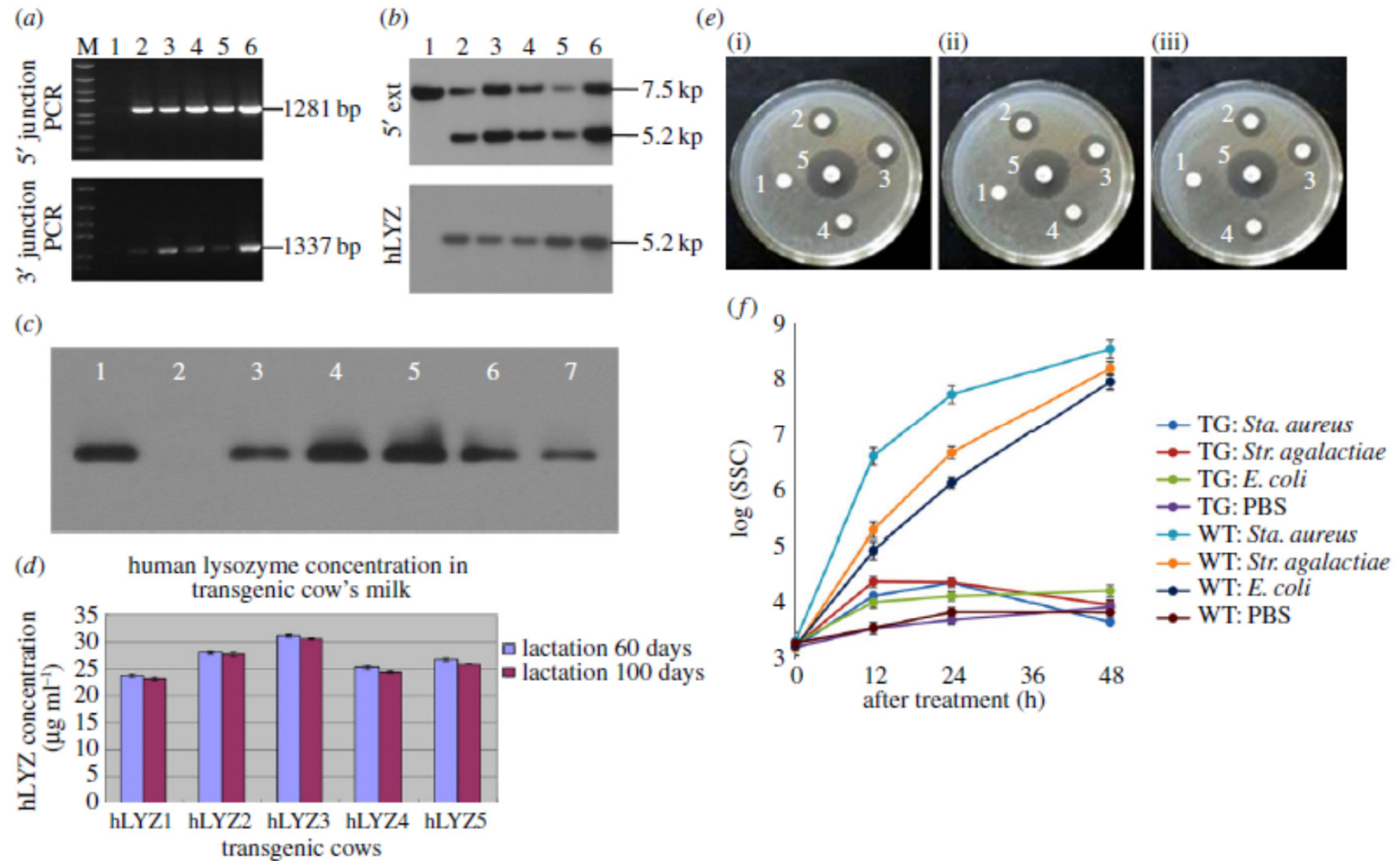
# Mastitis resistente Kühe durch Expression von humanem Lysozym vom $\beta$ -Casein Locus

**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 <sup>a</sup>	number of bacteria ( $\times 10^3$ CFU ml <sup>-1</sup> )			
			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

<sup>a</sup>Infection was defined as bacterium growth in two consecutive milk samples collected 12–24 h apart.

# Mastitis resistente Kühe durch Expression von humanem Lysozym vom $\beta$ -Casein Locus



# Gene-editing record smashed in pigs

---

Researchers modify more than 60 genes (PERV) in effort to enable organ transplants into humans.



The gene-edited pigs will be raised in isolation from pathogens.

Also ~20 genes altered related to immunology and relevant for Xenotransplantation

# Ausschalten multipler Genloci (PERV)

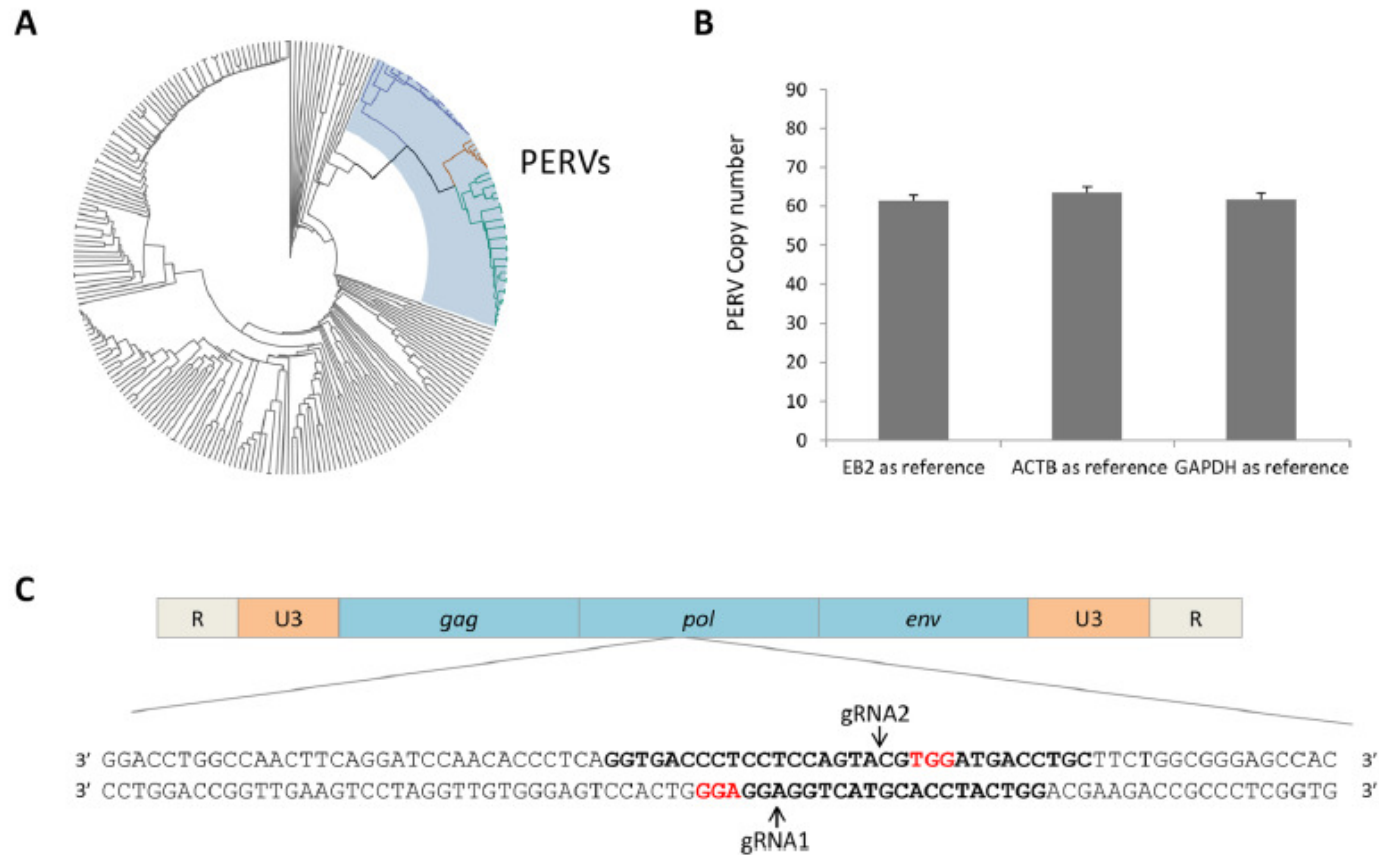
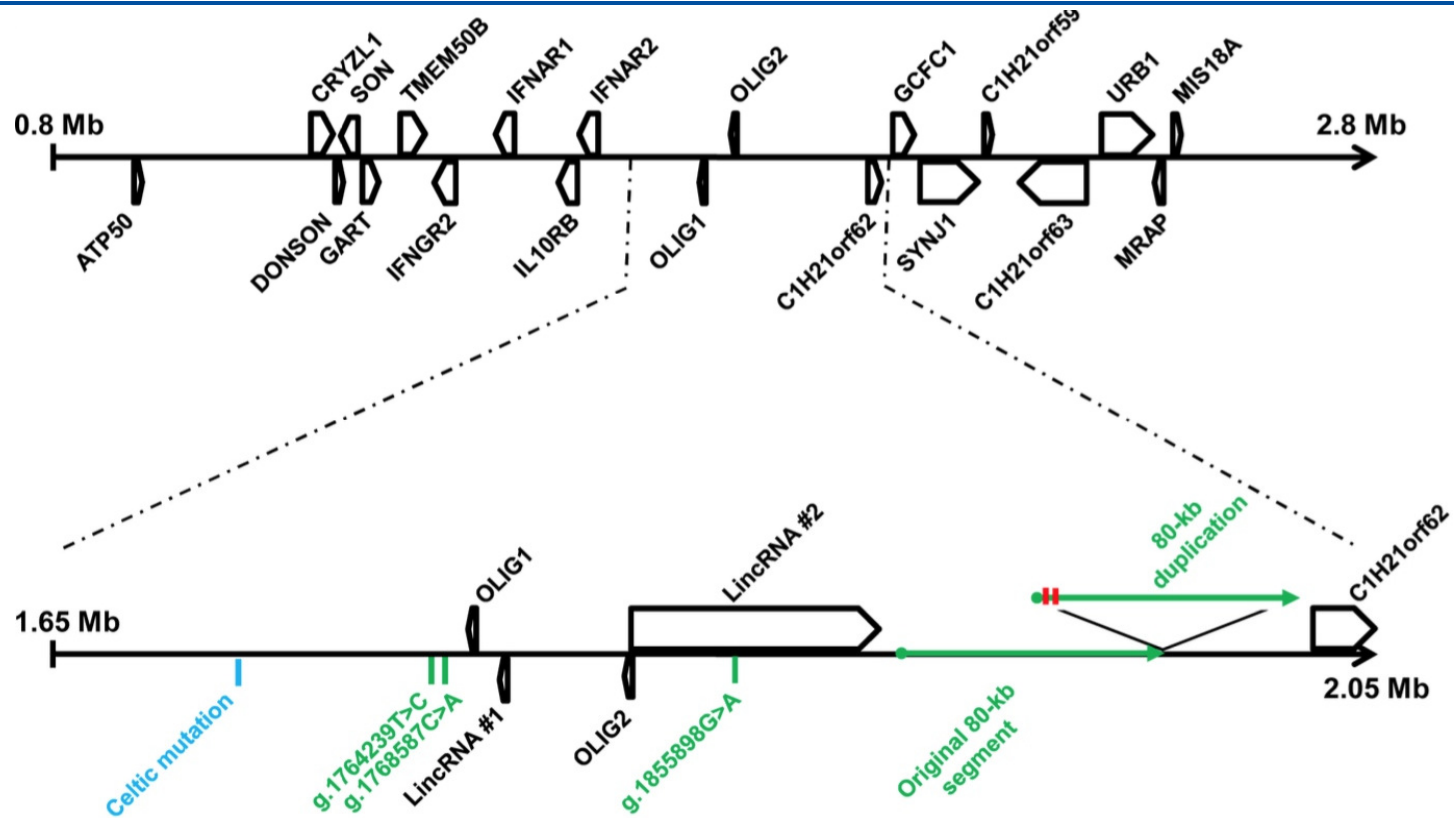


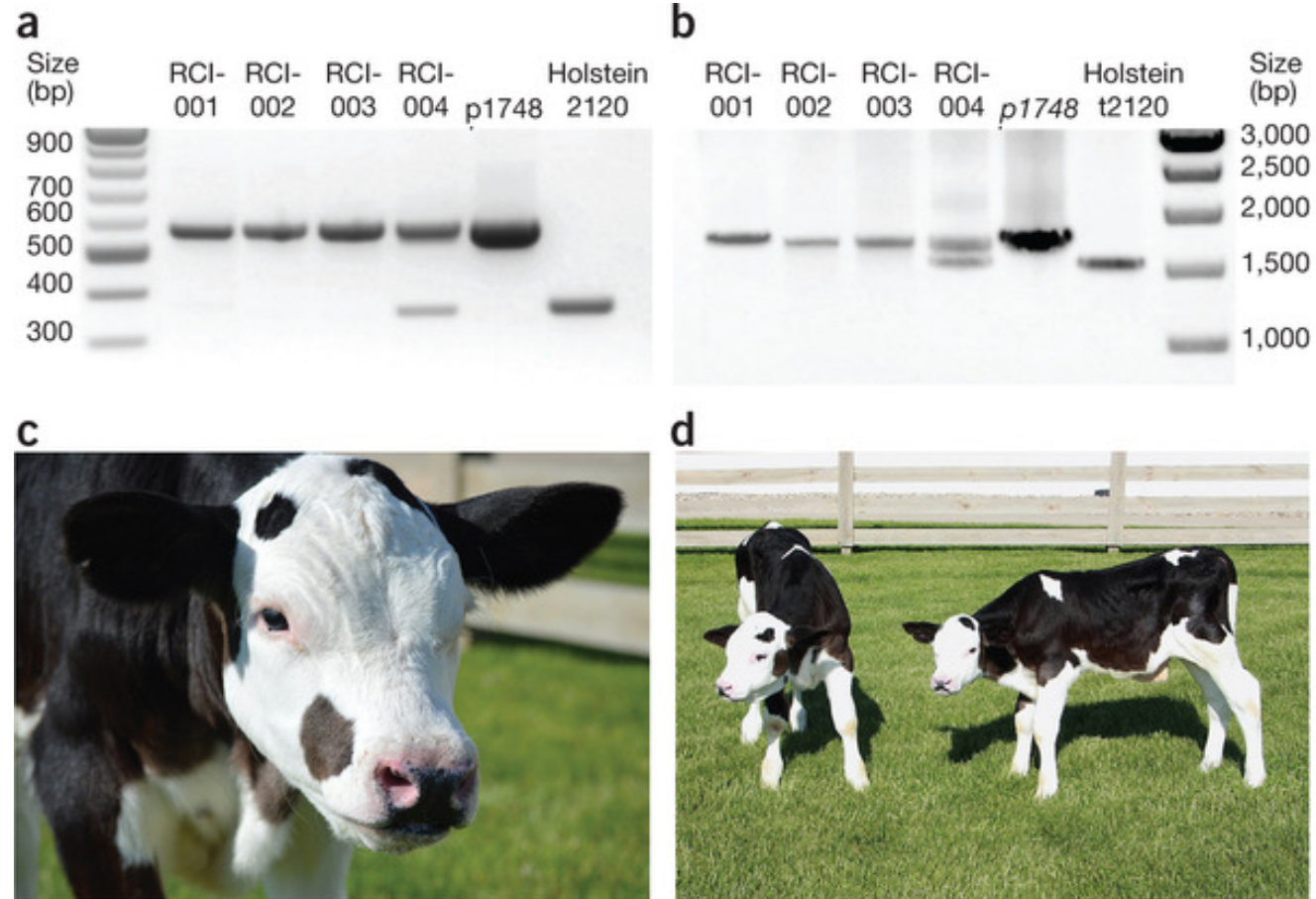
Fig. 1. CRISPR-Cas9 gRNAs were designed to specifically target the *pol* gene in 62 copies of PERVs in PK15 cells. (A) Phylogenetic tree representing endogenous retroviruses present in the pig genome. PERVs are highlighted in blue. (B) Copy number determination of PERVs in PK15 cells.

# Kandidatenmutationen für den Phänotyp „Hornlos“ im Polled Locus



**Keltische Variante** (Celtic Mutation) besteht aus einer 212 Basen Insertion und 10 Basen Deletion, in Holstein Friesian ist eine 80 Kilobasen Duplikation vorherrschend. Im Anfangsbereich der Duplikation finden sich zwei Sequenzvariationen zur Originalsequenz (rote Striche). Lokalisation Weitere 3 Kandidatenmutationen sind 1764239T>C, 1768587C>A, 1855898G>A.

# Gen Editing des Polled-Locus zur Produktion hornloser Rinder



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

# Produktion $\beta$ -Lactoglobulin freier Milch durch siRNA- $\beta$ -lac genetisch modifizierte Kühe

AS PNAS PNAS

## Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of $\beta$ -lactoglobulin-free, high-casein milk

Anower Javed<sup>a,b,1,2</sup>, Stefan Wagner<sup>a,2</sup>, Judi McCracken<sup>a</sup>, David N. Wells<sup>a</sup>, and Goetz Laible<sup>a,3</sup>

<sup>a</sup>AgResearch, Hamilton 3240, New Zealand; and <sup>b</sup>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  $\beta$ -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).

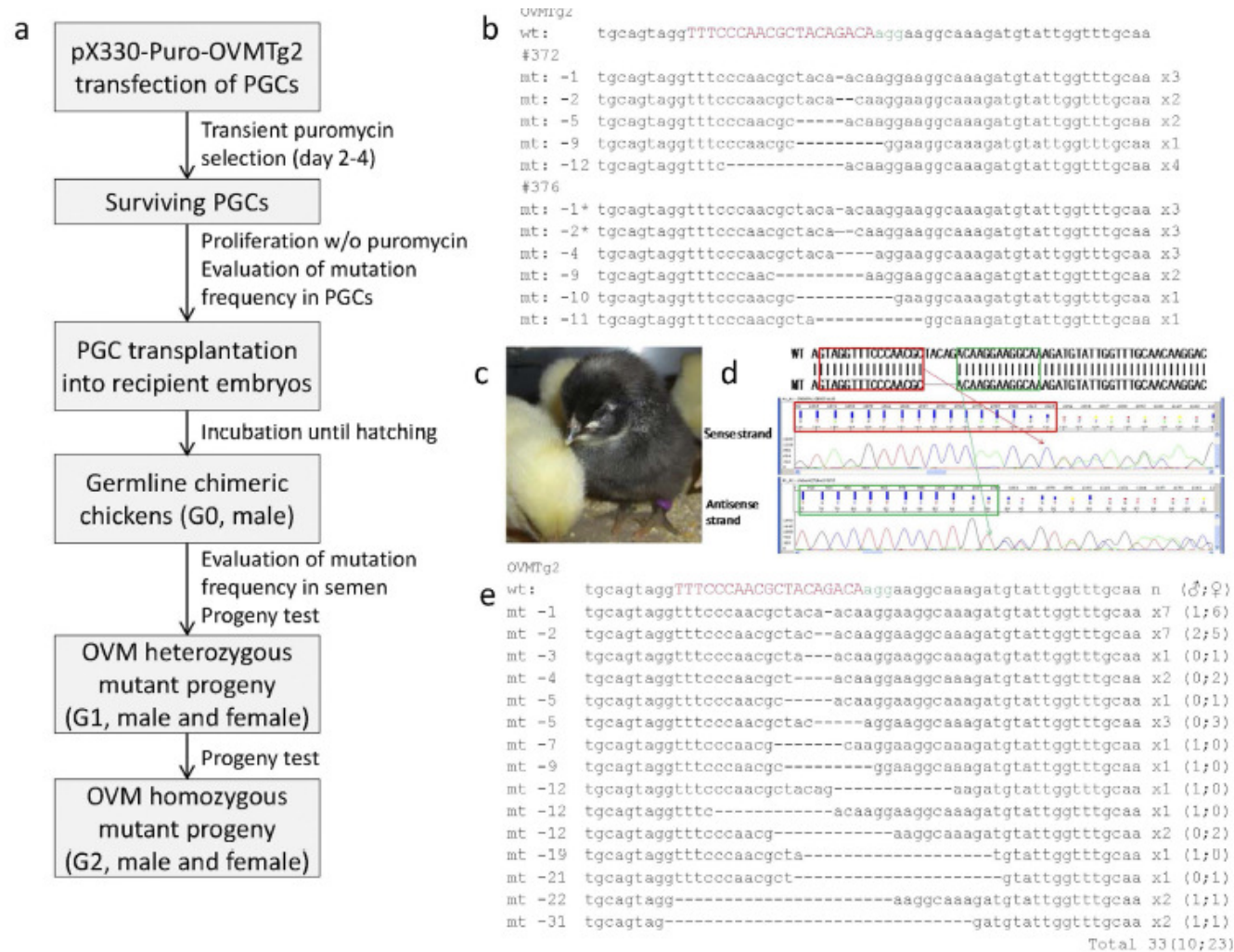
A recent in vitro study demonstrated the effectiveness of several shRNAs and miRNAs directed against the porcine variant of BLG (14). We used artificial miRNAs based on the murine miRNA-155 to knock down BLG. miRNAs can be driven by Pol II promoters, which enable spatiotemporally restricted expression 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 controlled by a lactation-specific promoter, they showed no ad-



# Targeted microRNA Expression in Milchkühen führt zur Produktion $\beta$ -Lactoglobulin-freier, Casein reicher Milch

Cow	Milk	Total Casein, mg/g	Whey, mg/g			Total
			$\alpha$ -Lac	BLG-A	BLG-b	
miRNA 6-4	Induced, day 1	98.2	3.9	0.0	0.0	3.9
miRNA 6-4	Induced, day 2	96.8	3.5	0.0	0.0	3.5
miRNA 6-4	Induced, day 3	106.6	4.3	0.0	0.0	4.3
miRNA 6-4	Induced, day 4	128.6	5.3	0.0	0.0	5.3
WT-1	Natural, day 69	39.6	1.5	5.7	0.6	7.8
WT-2	Induced, day 5	38.8	1.5	7.6	0.7	9.8
WT-3	Induced, day 5	32.5	1.5	7.3	0.9	9.4
WT-4	Colostrum, day 1	48.1	1.7	10.1	4.0	15.7
SEM-*	-	1.27	0.09	0.12	0.11	0.12

# Effizienz der CRISPR/Cas induzierten Mutation von OVM in G0 Sperma und G1 Nachkommen



Oishi et al., 2016 Scientific Reports, 6:23980. doi: 10.1038/srep23980

## Effizienz der CRISPR/Cas induzierten Mutation von OVA (Ovalbumin) und OVM (Ovomucoid) in PGCs zur Produktion allergen freier Eier

Vector	Antibiotic	Analyzed clones	Mutated clones	Mutation frequency (%)
OVATg3-neo	–	45	3	6.7
OVATg3-neo	neomycin (0.5 mg/ml)	29	10	34
OVATg3-puro	puromycin (1 µg/ml)	12	12	100
OVATg3-zeo	zeocin (50 µg/ml)	12	11	92
OVMTg2-neo	–	24	0	0
OVMTg2-neo	neomycin (0.5 mg/ml)	24	3	13
OVMTg2-puro	puromycin (1 µg/ml)	23	21	91
OVMTg2-zeo	zeocin (50 µg/ml)	12	11	92

Table 1. Efficiency of induction of OVA and OVM mutations in PGCs.

OVM, OVA: egg white proteins, with major allergenic properties

# Effizienz der OVM Mutation in Go Sperma und G1 Nachkommen

Parent (G0)	Number of mutated TA clones from G0 semen (%) <sup>a</sup>	Number of donor-derived chicks (G1) (%) <sup>b</sup>	Mutants from donor-derived chicks (%)
#372	12/13 (92%)	33/42 (79%)	19/33 (58%)
#376	15/16 (94%)	29/43 (67%)	14/29 (48%)
#387 <sup>c</sup>	3/20 (15%) <sup>d</sup>	NT <sup>e</sup>	NT <sup>e</sup>



Oishi et al., 2016 Scientific Reports, 6:23980. doi: 10.1038/srep23980

# Gen-edited Minischweine als Haustiere

---



BGI announced its plan to sell the micropigs as pets at a summit in Sherzhen, China.

---

Cyranoski, Nature 526, 2015

# Anwendungsperspektiven für Gene Editing bei Nutztieren

---

- Einbringung von (Punkt)-mutationen (SNPs)
- Knockout von Genen (hetero-, homozygot)
- Homologe Rekombination
- „Reparatur“ von Gendefekten (Erbfehlern)
- Ausschaltung multipler Gene
- Induktion epigenetischer Veränderungen
- .....

---

# Gene editing could rapidly alter the dairy breeding landscape

**T**HE process of gene editing — or altering specific sites in the genome — has made large advances in the last five years. We have now reached the point where gene-editing technologies could be incorporated rapidly into the genetic improvement programs of cattle and other species. Given that potential, I would like to consider possible uses of gene editing and regulatory issues.



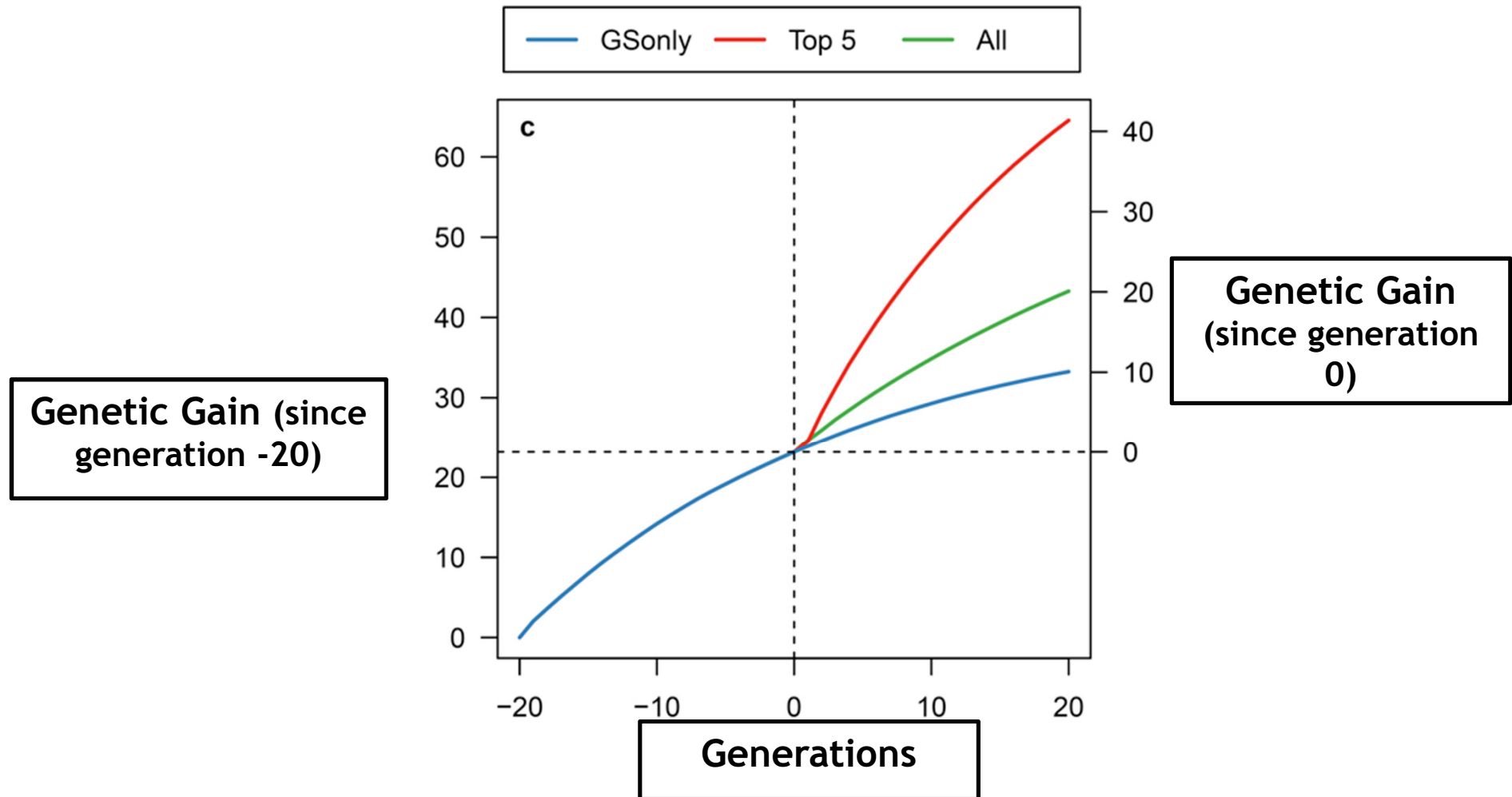
Dechow

Multiple techniques now allow precise altering of the genome, and these technologies have been collectively termed “gene editing” or “genome engineering.” However, not all transgenic technologies are considered



**MULTIPLE FORMS OF GENE-EDITING TECHNOLOGY** are being pursued and each one could rapidly alter the dairy breeding landscape. Additional research power and revenue have been pumped into the landscape by a number of companies in California's Silicon Valley.

# Fixed editing resources to 500 edits per generation



Courtesy John Hickey, Roslin Institute, UK, August 2015

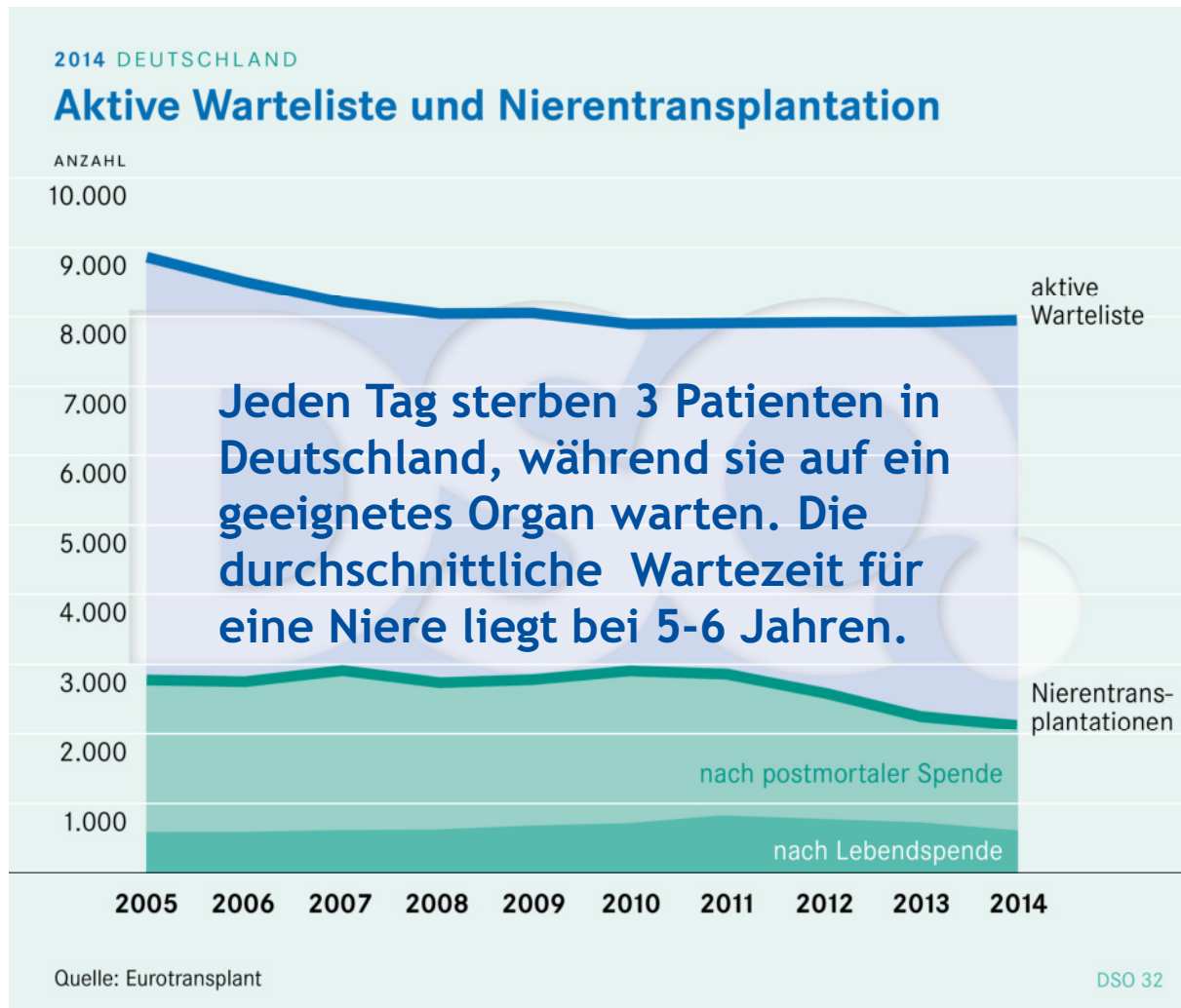


# Gesetzliche Regulierung von genetisch veränderten Nutztieren

---

- **FDA** Final guidance on regulating genetically engineered animals (2009)
- **EFSA** Guidance on the risk assessment of food and feed from genetically modified animals including animal health and welfare aspects (2011)
- **Codex Alimentarius**, 2008. Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Animals. Codex Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organisation, Rome.
- **DNA-Nukleasen**: noch keine Regulierung, Tendenz geht z.Zt. dahin “Gene Editing” nicht gesetzlich zu regulieren (zumindest in USA).

# Warteliste und durchgeführte Nierentransplantationen (Deutschland, 2005-2014)

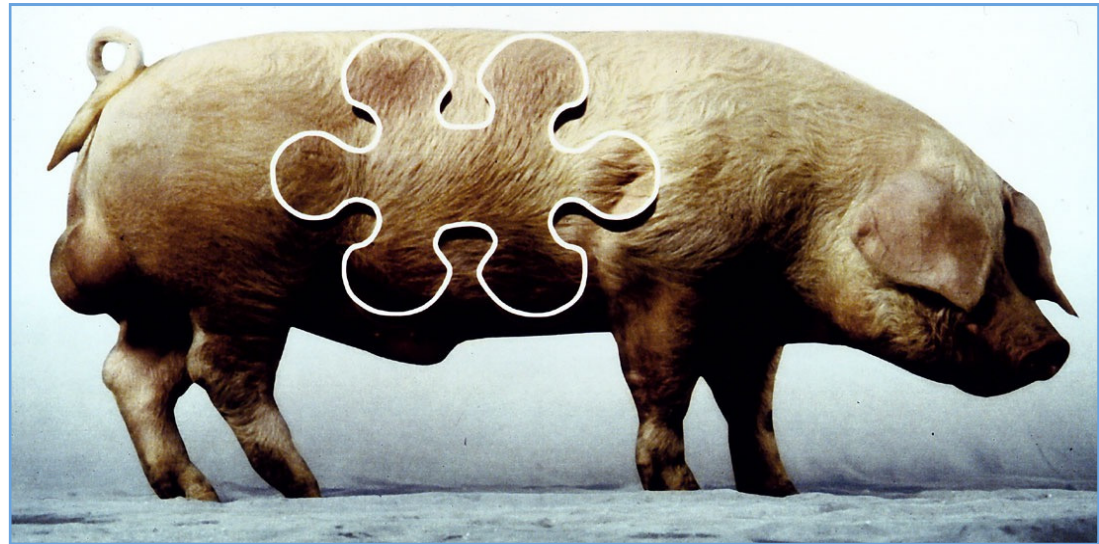


FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

**FLI**

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit  
Federal Research Institute for Animal Health

# Das Schwein als potentielle Spenderspezies für humane Organe



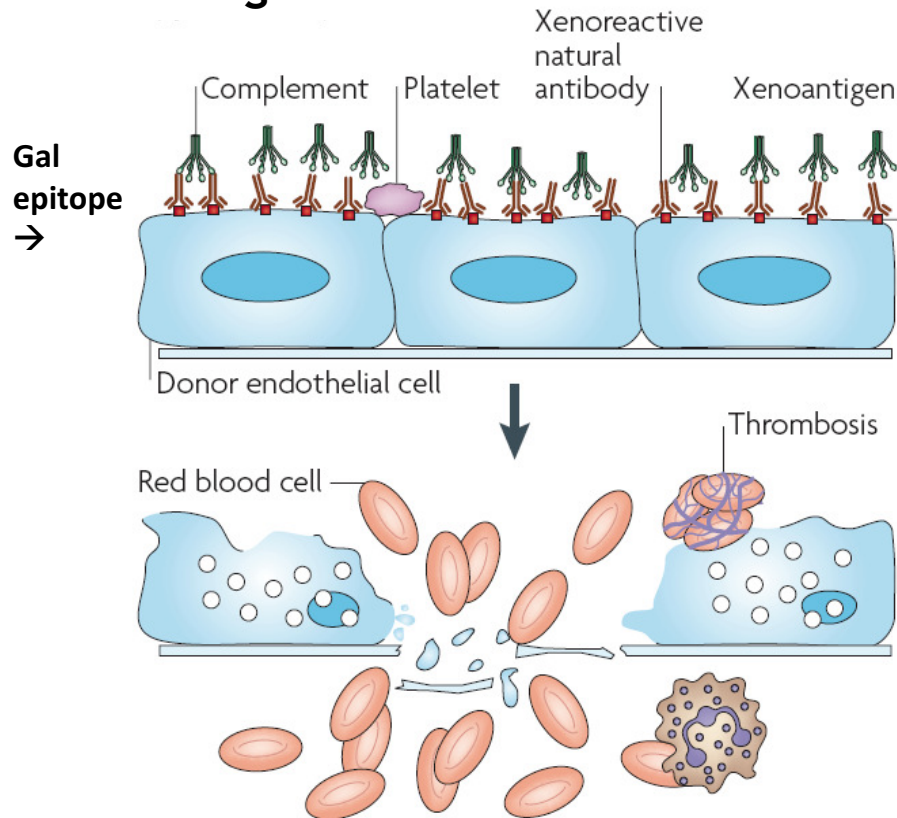
- Domestizierte Spezies;
- Hohe Fertilität, viele Tiere;
- Genom, Anatomie, Physiologie nicht zu verschieden vom Menschen;
- Frühere erfolgreiche Anwendungen: Insulin, Herzklappen, Haut;
- Haltung unter strikten hygienischen Konditionen möglich;
- Genetische Veränderungen möglich.

I like pigs; dogs look up to us, cats look down to us, pigs treat us as equal.

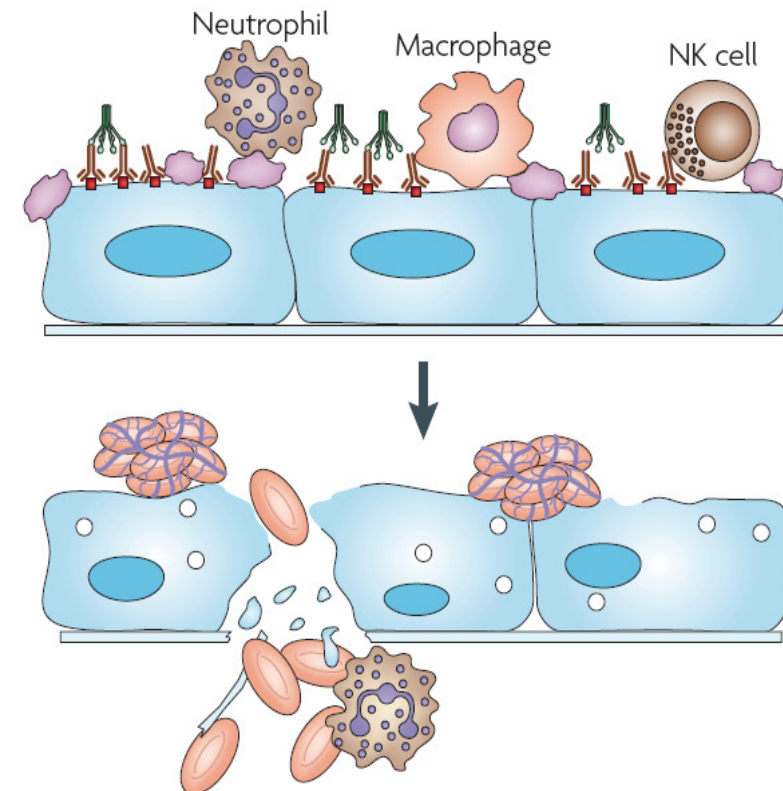
(Winston Churchill)

# Abstoßungsreaktionen nach Übertragung porciner Transplantate auf Primaten (Xenotransplantation)

## Hyperakute Abstoßungsreaktion



## Akut vaskuläre Abstoßungsreaktion



mod. Yang & Sykes, Nature Reviews Immunology, 2007

# GalKO/hHO-1/hA20 transgene Schweine „Peggy“ and „Penny“ geb. 22.01.14

---



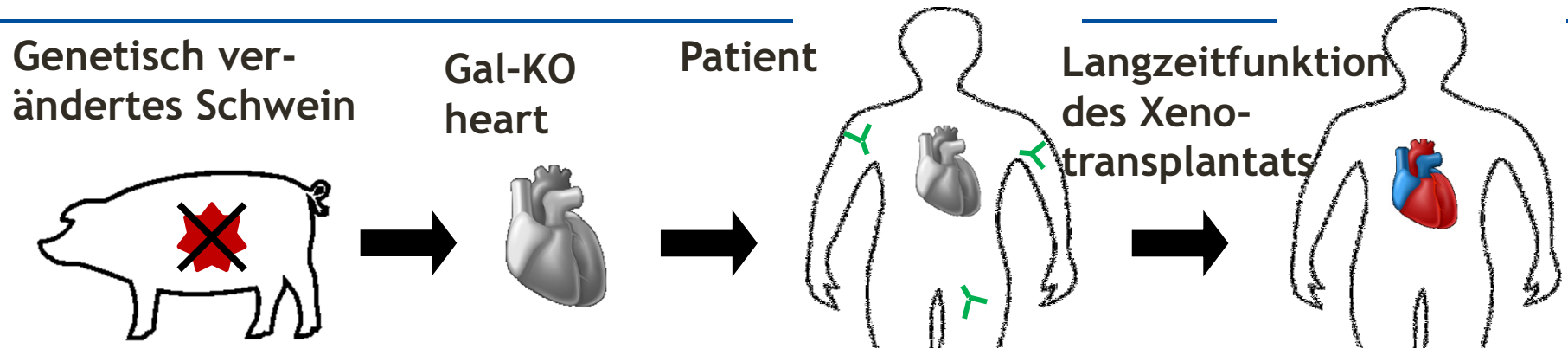
---

Ahrens et al., Transplantation Direct, 2015



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT  
**FLI**  
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit  
Federal Research Institute for Animal Health

# Genetisch veränderte Schweine als Organspender



Type of genetic engineering	Organ transplanted into baboons	Max. survival (days)	Authors
GGTA1-KO	Kidney	83	Yamada et al. 2005, Nat Med (11): 32
GGTA1-KO	Heart, heterotopic	179	Tseng et al. 2005, Transplantation (80): 1493
GGTA1-KO/hCD46/hTM	Heart, heterotopic	More than 900 days	Cooper et al. 2014, Xenotransplantation(21)1: 13-15



# Auf dem Weg zum optimierten Spenderschwein

## CHOICE CUTS

Researchers are looking to source an increasing variety of living tissues, including solid organs, from pigs. Many are attempting to genetically engineer the animals to reduce the risk of rejection and infection in humans.

**CORNEA**  
Pig corneas were approved for marketing in China in April.

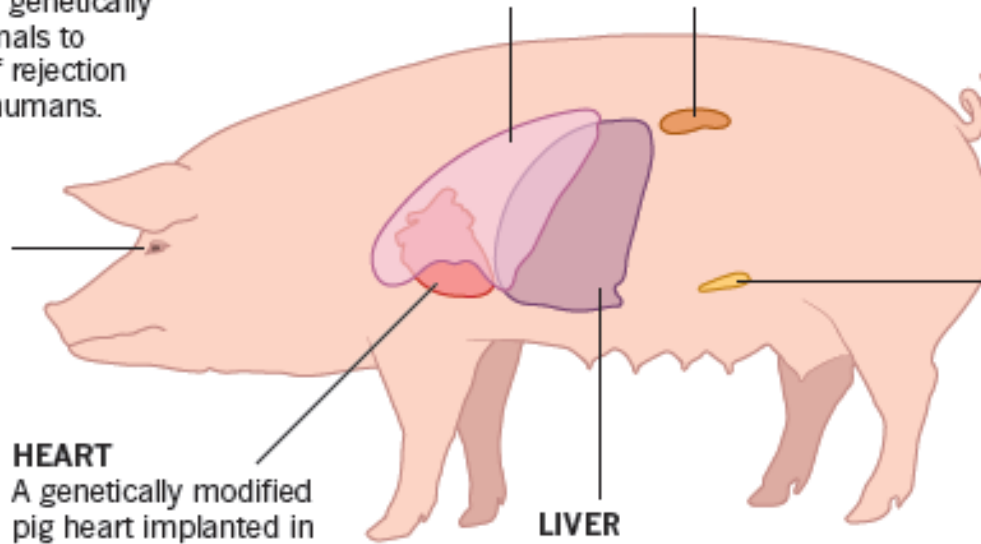
**HEART**  
A genetically modified pig heart implanted in a baboon's abdomen survived for 2.5 years.

**LUNG**  
A factory farm is being designed to produce 1,000 pig lungs per year.

**KIDNEY**  
A kidney with six genetic modifications supported a baboon's life for 4 months.

**PANCREAS**  
Phase III clinical trials of insulin-producing islet cells are under way.

**LIVER**  
Livers could be engineered to produce their own antibodies against primate immune cells.



# Ein Blick in die Zukunft: Zielgenaue und diversifizierte Milchproduktion (precision breeding)

---

- Normale Vollfett Milch
- Fett reduzierte oder -freie Milch (Knockout von Schlüsselenzymen der Fettsynthese)
- Milch für Joghurtproduktion (verstärkte Casein Expression)
- Milch für Käseproduktion (verstärkte Casein Expression)
- Milch für Kaffee Weißer und Creme Liquor ( $\beta$ -casein Überexpression)
- Hypo-allergene/allergenfreie Milch (reduziertes/ohne  $\beta$ -Lactoglobulin)
- Lactose freie oder -reduzierte Milch ( $\alpha$ - Lactalbumin Knockout, zusätzliche Lactase Expression)
- Kleinkindermilch (verstärkte Lactoferrin Expression)
- Verbesserte Eutergesundheit (Lycostaphin, Lysozyme, etc.)
- Pharmazeutische Proteine (Gene Pharming)



# Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

---

- Die Genome der landwirtschaftlichen Nutztiere sind inzwischen sequenziert worden; damit liegen informative Genkarten vor, die züchterisch genutzt werden können (GBV).
- Neue molekulare Hilfsmittel wie z.B. DNA-Nukleasen erlauben zuverlässig präzise genetische Veränderungen (Gen Editing), die relativ einfach und effizient einzubringen sind. Die Risiken liegen vor allem bei der Induktion von „Off-target“ Mutationen.
- Die Nutzung der neuen genomischen Kenntnisse und Verfahren des Gen Editings erlauben die Entwicklung neuer Zuchtstrategien für die landwirtschaftliche Tierproduktion und die Biomedizin.
- Komplexe gesetzliche Regeln für die Anwendung transgener Tiere sind vorhanden. Der Einsatz von Gen Editing ist z.Zt. gesetzlich nicht geregelt, und könnte deshalb in der praktischen Anwendung der landwirtschaftlichen Tierzucht erfolgen.

---

**Vielen Dank für Ihr Interesse  
und Ihre Aufmerksamkeit.**

