

Chromosomen-Veränderungen bei einem subfertilen Lisztäffchen

A. Pieńkowska-Schelling¹, F. Wyss², A. Baumeyer², C. Wenker², C. Schelling³

¹Institut für Genetik, Vetsuisse-Fakultät Bern, Universität Bern, ²Zoo Basel, Basel, ³Klinik für Reproduktionsmedizin und Zentrum für klinische Studien, Vetsuisse-Fakultät Zürich, Universität Zürich

Zusammenfassung

Dieser Fallbericht beschreibt ein als Weibchen registriertes Lisztäffchen (*Saguinus oedipus*), das vom Zoo Basel als Zuchttier übernommen wurde. Aufgrund häufigen Markierens ohne ersichtlichen medizinischen Grund, dominanten Verhaltens, fehlender Fruchtbarkeit und eines phänotypisch nicht eindeutigen äusseren Genitales wurde von den Zootierärzten die vorläufige Verdachtsdiagnose auf eine Störung der Geschlechtsentwicklung gestellt. In einem ersten Schritt wurden die Chromosomen des Äffchens untersucht. Es konnten 6 Zell-Linien mit unterschiedlichen Karyotypen nachgewiesen werden. Am häufigsten wurden die beiden Karyotypen 46,XX und 46,XY beobachtet, die für weibliche bzw. männliche Lisztäffchen normal sind. Die anderen weit weniger häufigen Zell-Linien wiesen numerische Veränderungen der diploiden Chromosomenzahl mit und ohne Marker-Chromosom auf. Biologische Besonderheiten der Krallenaffen, wie Mehrlingsträchtigkeit und genetischer Chimärismus erschwerten die Aufklärung der Pathogenese und verhinderten eine verlässliche Prognose zur Fruchtbarkeit des Lisztäffchens.

Schlüsselwörter: Lisztäffchen, *Saguinus oedipus*, reduzierte Fruchtbarkeit, chromosomales Mosaik, Chimärismus

Chromosomal aberrations in a subfertile cotton-top tamarin

The present case report describes a female cotton-top tamarin which was taken over by the Zoo Basel to form a new breeding pair. The animal demonstrated increased marking behavior without any obvious medical reasons, dominant behavior, failure to become pregnant and its external genitals were ambiguous. A disorder of the sexual development (DSD) was suspected by the zoo veterinarians and in a first step, the chromosomes of the monkey were analyzed. Six cell lines with different karyotypes were observed. The two most frequent cell lines had a 46,XX or a 46,XY karyotype which are normal chromosome complements of female and male cotton-top tamarins, respectively. The other much less frequent cell lines showed numerical aberrations with and without a marker chromosome. Specific biological features of the *Callitrichidae*, such as natural twinning and genetic chimerism impeded the clarification of the pathogenesis and prevented a reliable prognosis on the fertility of the cotton-top tamarin.

Keywords: cotton-top tamarin, *Saguinus oedipus*, subfertility, chromosomal mosaic, chimerism

<https://doi.org/10.17236/sat00122>

Eingereicht: 12.12.2016
Angenommen: 02.05.2017

Einleitung

Bei den Haustieren ist die Fruchtbarkeit nicht nur ein Spiegel der genetischen Fitness einer Population, sondern sie beeinflusst auch das Selektionspotential und andere wichtige Parameter, die in einem direkten Zusammenhang mit dem Erfolg eines Zuchtprogrammes stehen (Beuing et al., 2006). Neben vielen anderen Faktoren können Veränderungen der Chromosomen die Fruchtbarkeit eines Individuums negativ beeinflussen. Bradford und Mitarbeiter (2013) weisen darauf hin, dass auch Zootiere mit einer verminderten Fruchtbarkeit zytogenetisch auf Veränderungen der Chromosomen

untersucht werden sollten. Zytogenetische Untersuchungen exotischer Tierarten sind eine Herausforderung, da oft nur wenige Individuen einer Art untersucht wurden und somit keine standardisierten Karyotypen zur Verfügung stehen. Für das Lisztäffchen (*Oedipus saguinus*) sind die Chromosomen beschrieben worden (Nagamachi et al., 1997; Müller et al., 2001). Lisztäffchen gehören zur Familie der Krallenäffchen (*Callitrichidae*) und bilden mit über 10 Arten die Gattung *Saguinus*. Obwohl die diploide Anzahl der Chromosomen der des Menschen entsprechen ($2n = 46$), haben Krallenäffchen ein anderes Verhältnis von zwei- und einarmigen Chromosomen. Eine Besonderheit der Krallenäffchen ist der

Chromosomen-Veränderungen bei einem subfertilen Lisztäffchen

A. Pieńkowska-Schelling et al.

sehr hohe Anteil von Trächtigkeiten mit mehr als einer Frucht, der sowohl in der freien Wildbahn als auch in Gefangenschaft beobachtet wurde. In einem Forschungszentrum für Primaten waren Mehrlingsgeburten bei Krallenäffchen (dizygote Zwillinge, 59%; trizygote Drillinge, 15,7%; tetrazygote Vierlinge, 0,3%) weitaus häufiger als Einzelgeburten, die nur in 25% der Fälle beobachtet wurden (Ward et al., 2014). Durch Anastomosen der Blutgefäße kommt es zwischen den Zwillingen zu einem Austausch von hämatopoietischen Zellen. Die Folge davon sind die klassischen Blutchimären, die nicht nur ihren eigenen Genotyp, sondern auch den des Zwillingen zeigen. Neuere Untersuchungen berichten (Ross et al., 2007), dass der Chimärismus bei Krallenäffchen nicht nur auf die blutbildenden Zellen beschränkt sein muss, sondern auch andere Gewebe und sogar die Keimzellen betreffen kann. Für den vorliegenden Fall war eine zytogenetische Untersuchung angezeigt, weil das nicht-eindeutige äussere Genitale, die fehlende Fruchtbarkeit und das untypische Verhalten auf eine Störung der Chromosomen hindeuten könnten.

Fallbeschreibung

Anamnese

Im Frühjahr 2016 übernahm der Zoo Basel ein Lisztäffchen aus einem anderen Zoo. Das als Weibchen registrierte Tier (Abb. 1) war 2009 nach einer Zwillingssträchtigkeit mit einem normalen und fertilen weiblichen

Zwilling geboren worden. Es sollte mit einem männlichen Tier das neue Zuchtpaar bilden. Obwohl sich das Weibchen gut an die neue Umgebung adaptierte und sich gut mit dem Männchen verstand, wurde sie nicht trüchtig. Zudem wurden ein verstärktes Markieren sowie ein dem Männchen gegenüber dominantes Verhalten beobachtet. Die medizinischen Abklärungen (Blutanalyse, Röntgen, Ultraschall, Kultur) zeigten keine Abnormalitäten. Phänotypisch war das äussere Geschlecht mehrheitlich weiblich. Die Vulva war normal ausgebildet und es waren kein Penis und keine Hoden zu erkennen. Jedoch war ventral der Vulva eine Struktur ohne Inhalt vorhanden, die einem Hodensack gleich (Abb. 2). Die Messung des Testosterons mittels CLA (Chemiluminescence Assay) ergab einen Wert (1,4 ng/ml) an der Obergrenze für weibliche Rhesusaffen (Perachio et al., 1977). Die nicht eindeutig weibliche Ausprägung des äusseren Genitale und die Verhaltensauffälligkeit waren starke Hinweise dafür, dass es sich um ein Tier mit einer Störung der Geschlechtsentwicklung (Intersex) handeln könnte. In einem ersten Schritt sollte abgeklärt werden, ob allenfalls Chromosomen-Veränderungen für das klinische Bild verantwortlich sein könnten.

Zytogenetische Untersuchungen

Die Präparation der Chromosomen aus kultivierten Lymphozyten wurde bereits beschrieben (Pieńkowska-Schelling et al., 2014). Als bestmögliche Kontrolle wurden die Chromosomen des männlichen Lisztäffchens des Zoo Basel präpariert. Die Chromosomen wurden



Abbildung 1: Weibliches Lisztäffchen Gitana.



Abbildung 2: Äusseres Geschlecht eines normalen weiblichen Lisztäffchens mit Klitoris und Vulva (links) des abnormalen weiblichen Lisztäffchens mit hodensack-ähnlicher Struktur und Vulva (mitte) und des normalen männlichen Lisztäffchens mit Hodensack und Penis (rechts).

einer DAPI-Bänderung unterzogen, um die Anzahl und grobe Struktur der Chromosomen beurteilen zu können. Das männliche Lisztäffchen wies in 50 Metaphasen einen einheitlichen Karyotyp mit 46, XY ohne strukturelle Auffälligkeiten auf (nicht gezeigt). Nach der Untersuchung von 153 Metaphasen des weiblichen Tieres stand fest, dass in den Lymphozyten dieses Individuums chromosomaler Mosaizismus vorlag. Der Begriff chromosomaler Mosaizismus beschreibt das Vorliegen von zwei oder mehreren Zell-Linien mit unterschiedlichen Karyotypen in einem Individuum, das sich aus einer einzelnen Zygote entwickelt hat. Die unterschiedlichen Zell-Linien des weiblichen Lisztäffchens sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Am häufigsten waren die beiden Zell-Linien 46,XY (normaler männlicher Karyotyp) und 46,XX (normaler weiblicher Karyotyp). Seltener wurden eine Monosomie X (45,X) und Karyotypen mit Marker-Chromosomen gefunden (46,X+mar; 47,XX+mar; 47,XY+mar). Marker-Chromosomen sind zusätzliche Chromosomen, die neben dem normalen Chromosomensatz gefunden werden und nicht mit Chromosomenbänderungen allein identifiziert werden können. Als Beispiel sind in Abbildung 3 vier repräsentative Metaphasen von unterschiedlichen Zell-Linien dargestellt.

Diskussion

Numerische und/oder strukturelle Chromosomen-Veränderungen können die normale Geschlechtsentwicklung beim Menschen und bei den Haustieren negativ beeinflussen. Im vorliegenden Fall konnten für das of-

fiziell als Weibchen registrierte Lisztäffchen (Patient) mindestens 6 Zell-Linien mit unterschiedlichen Karyotypen in den Lymphozyten nachgewiesen werden. Das deutet auf eine Prädisposition für Fehler während der Zellteilungen hin und erhärtete den Verdacht, dass eine chromosomale Störung die normale Geschlechtsentwicklung verhindert hat. Eine Schwierigkeit von zytogenetischen Untersuchungen besteht darin, dass wir nicht genau wissen können, wie sich der Chromosomen-Status während der kritischen Zeitpunkte der Geschlechtsentwicklung des Patienten präsentiert hat. Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass auch ein kleiner Anteil von Zellen mit einer Chromosomen-Veränderung (sogenannter „low-level mosaicism“) klinisch relevant sein kann (Gersak und Veble, 2011). Erschwerend für die Klärung der Pathogenese kommt hinzu, dass bei den Krallenäffchen Mehrlingsträchtigkeiten mit Blutschimärismus die Regel sind.

Beim Hausrind sind weibliche Individuen aus einer verschiedengeschlechtlichen Zwillingssträchtigkeits sehr oft unfruchtbar und werden als Freemartins oder Zwicken

Tabelle 1: Beobachtete Zell-Linien des als weiblich registrierten Lisztäffchens.

Anzahl Metaphasen	Karyotyp der Zell-Linie	Bewertung
79	46,XX	normaler weiblicher Karyotyp
9	45,X	Monosomie X
2	46,X+mar	Monosomie X plus Marker-Chromosom
57	46,XY	normaler männlicher Karyotyp
3	47,XX+mar	weiblicher Karyotyp mit Marker-Chromosom
3	47,XY+mar	männlicher Karyotyp mit Marker-Chromosom

Chromosomen-Veränderungen bei einem subfertilen Lisztäffchen

A. Pieńkowska-Schelling et al.

bezeichnet. Grund für die Störung der normalen Geschlechtsentwicklung sind Hormone des fetalen Hodens im männlichen Zwilling, welche über Gefässanastomosen in den weiblichen Embryo gelangen. Obwohl etwa 95% der Mehrlingsträchtigkeiten bei Krallenäffchen mit Blutchimärismus einhergehen, scheint es in weiblichen Tieren aus einer Zwillingssträchtigkeit mit einem männlichen Tier nicht zu einer Maskulinisierung und Verminderung der Fruchtbarkeit zu kommen. French und Mitarbeiter (2016) postulieren einen Schutzmechanismus, der durch artspezifische Allel-Varianten in wichtigen Genen zustande kommt und der eine normale Geschlechtsentwicklung bei weiblichen Tieren aus einer verschiedengeschlechtlichen Trächtigkeit sichert. Dieser Schutzmechanismus scheint aber in Einzelfällen die teilweise Maskulinisierung des äusseren Genitale nicht verhindern zu können. In der Literatur fanden sich keine Hinweise für einen negativen Effekt auf die normale männliche Geschlechtsentwicklung durch Einflüsse eines weiblichen Zwillings. Aufgrund der zurzeit verfügbaren zytogenetischen Ergebnisse kann nur spekuliert werden. Es ist möglich, dass das chromosomale Geschlecht der Zygote, aus dem sich der Patient entwickelt hat, männlich war (46,XY) und dass das Y Chromosom väterlicher Herkunft ist. Die andere häufig beobachtete Zell-Linie (46,XX) wäre dann wahrscheinlich vom dizygoten Zwilling des Patienten aufgrund des Austausches von hämatopoietischen Zellen (Blutchimärismus) während der Trächtigkeit übertragen worden. Dieser Zwilling wurde als Weibchen registriert und hat erwiesenermassen Nachkommen geboren. Es kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass der Patient aus einer Trächtigkeit mit trizygoten Drillingen stammt. Wenn diese dritte Frucht männlich war, aber nicht ausgetragen wurde, könnte das Vorhandensein der XY Zell-Linie im Patienten aufgrund von Blutchimärismus erklärt werden. Beide Hypothesen zur Herkunft des Y Chromosoms sind plausibel. Unter der Annahme der ersten Hypothese mit einem funktionellen Y Chromosom, könnte man die gestörte Geschlechtsentwicklung mit dem Phänomen einer Sex-Umkehr (sex reversal) erklären. Dabei führen Mutationen in Genen der Geschlechtsentwicklung, die nach der Expression des *SRY*-Gens aktiviert werden, zu Gonaden, die nicht dem chromosomalen Geschlecht entsprechen. Sanchez-Morgado und Mitarbeiter (2003) präsentierten einen solchen Fall eines Weissbüscheläffchens, das ungeachtet eines funktionellen *SRY*-Gens normale Ovarien und Uterus aufwies. Nur das äussere Genitale war untypisch. Unter der Annahme der zweiten Hypothese hätte der postulierte Schutzmechanismus (French et al., 2016) versagt und zu einem nicht eindeutigen äusseren Genitale geführt.

Zusätzlich zeigte ein sehr kleiner Anteil der Zellen Monosomie X (45,X) ohne oder mit einem Marker-Chromosomen. Mosaik mit einer Monosomie X wurden mit reduzierter Fruchtbarkeit bei Frauen beobachtet (Gersak und Veble, 2011). Ein Marker-Chromosom wurde auch in wenigen männlichen und weiblichen Zellen (47,XY+mar bzw. 47,XX+mar) nachgewiesen. Marker-Chromosomen wurden beim Menschen mit reduzierter Fruchtbarkeit und gestörter geistiger Entwicklung in Verbindung gebracht (Armanet et al., 2015; Jafari-Ghahfarokhi et al., 2015). Wenn die oft kleinen Marker-Chromosomen genetisch aktives Material enthalten, entspricht ihre Wirkung derer einer partiellen Trisomie. Im vorliegenden Fall waren die Marker-Chromosomen aber gross und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die betroffenen Zellen eine vollständige Trisomie eines Autosoms aufwiesen. Ohne weitere aufwendige Experimente ist es sehr schwierig, die Bedeutung der Marker-Chromosomen für den vorliegenden Fall zu bewerten.

Die Geschlechtsbestimmung und Geschlechtsentwicklung bei Säugetieren ist ein komplexer Prozess, der beim Modelltier Maus und beim Menschen am besten untersucht ist. Trotzdem bleibt die Aufklärung abnormaler Phänotypen auch für diese Spezies oft eine Herausforderung. Die biologischen Besonderheiten der Krallenäffchen machen es noch schwieriger, die genetischen

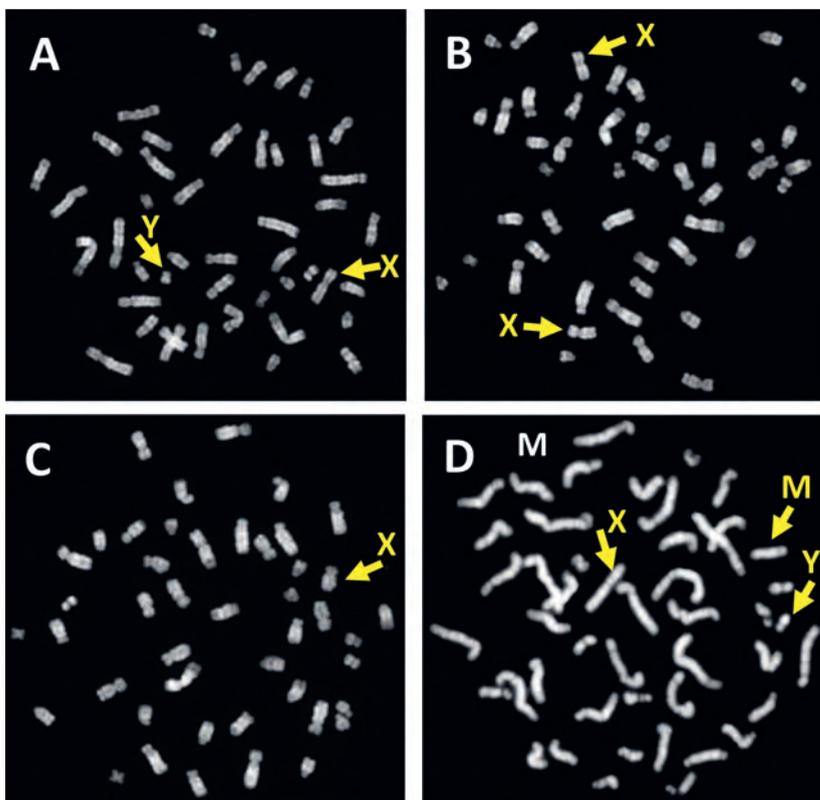


Abbildung 3: Metaphasen mit unterschiedlichen Karyotypen (A-D) des als weiblich registrierten Lisztäffchens nach DAPI-Staining. A und B: normaler männlicher (46,XY) bzw. weiblicher (46,XX) Karyotyp. C: Monosomie X (45,X). D: männlicher Karyotyp mit Marker-Chromosom (47,XY+mar). Das X-, das Y- und das Marker-Chromosom sind mit Pfeilen und den Buchstaben X, Y bzw. M markiert.

und die endokrinen Einflüsse auf die Geschlechtsentwicklung zu entwirren (Smith et al., 2013). Der vorliegende Fall zeigt dies beispielhaft - und deshalb war es nicht möglich, die Pathogenese genau abzuklären und eine verlässliche Prognose bezüglich der Fruchtbarkeit des Patienten abzugeben.

Dank

Die Autoren danken Frau B. Pineroli für die Unterstützung der Laborarbeiten. Ein Teil der Laborarbeiten wurde im Zentrum für klinische Studien der Vetsuisse-Fakultät Zürich, Universität Zürich, durchgeführt.

Chromosomen-Veränderungen bei einem subfertilen Lisztäffchen

A. Pierkowska-Schelling et al.

Literatur

Armanet N., Tosca L., Brisset S., Liehr T., Tachdjian G.: Small supernumerary marker chromosomes in human infertility. *Cytogenet. Genome Res.* 2015, 146: 100–108.

Beuing R., Jannsen N., Brand H.: Analysis of fertility in canine populations in respect to genetic and environmental influence. 5th Biannual EVSSAR Congress. Budapest, Hungary 2006, p. 60–4.

Bradford C. M., Tupa L., Wiese D., Hurley T. J., Zimmerman R.: Unusual Turner syndrome mosaic with a triple X cell line (47,X/49,XXX) in a western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). *J. Zoo Wildlife Med.* 2013, 44: 1055–1058.

French J. A., Frye B., Cavanaugh J., Ren D., Mustoe A. C., Rapaport L., Mickelberg J.: Gene changes may minimize masculinizing and defeminizing influences of exposure to male cotwins in female callitrichine primates. *Biol. Sex Diff.* 2016, 7:28, Doi: 10.1186/s13293-016-0081-y.

Gersak K., Veble A.: Low-level X chromosome mosaicism in women with sporadic premature ovarian failure. *Reprod. BioMed. Online* 2011, 22: 399–403.

Jafari-Ghahfarokhi H., Moradi-Chaleshtori M., Liehr T., Hahmzadeh-Chaleshtori M., Teimori H., Ghasemi-Dehkordi P.: Small supernumerary marker chromosomes and their correlation with specific syndromes. *Adv. Biomed. Res.* 2015, 4:140, doi: 10.4103/2277-9175.161542. eCollection 2015

Müller S., Neusser M., O'Brien P. C. M., Wienberg J.: Molecular cytogenetic characterization of the EBV-producing cell line B95-8 (*Saguinus oedipus*, Platyrrhini) by chromosome sorting and painting. *Chromosome Res.* 2001, 9: 689–693.

Nagamachi C. Y., Pieczarka J. C., Schwarz M., Barros R., Mattevi M. S.: 43: 265–276. Chromosomal similarities and differences between Tamarins, *Leontopithecus* and *Saguinus* (Platyrrhini, primates). *Am. J. Primatol.* 1997, 43: 265–276.

Perachio A. A., Alexander M., Marr L. D., Collins D. C.: Diurnal variations of serum testosterone levels in intact and gonadectomized male and female Rhesus Monkeys. *Steroids* 1977, 29: 21–33.

Pierkowska-Schelling A., Becker D., Bracher V., Pineroli B., Schelling C.: Zytogenetische und molekulargenetische Abklärungen bei einem Pferd mit SRY-negativer Sex-Umkehr. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 2014, 156: 341–344.

Ross C. N., French J. A., Orti G.: Germ-line chimerism and paternal care in marmosets (*Callithrix kuhlii*). *PNAS* 2007, 104: 6278–6282.

Sanchez-Morgado J. M., Haworth R., Morris T. H.: XY female Marmoset (*Callithrix jacchus*). *Comp. Med.* 2003, 53: 539–544.

Smith A. S., Birnie A. K., French J. A.: Prenatal androgens affect development and behavior in primates. In: *Building Babies-Primate Development in Proximate and Ultimate Perspective*. Hrsg. K. B. H. Clancy, K. Hinde, J. N. Rutherford, Springer-Science, New York, 2013, 103–131.

Ward J. M., Buslov A. M., Vallender E. J.: Twinning and survivorship of captive common marmosets (*Callithrix jacchus*) and cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2014, 53: 7–11.

Korrespondenz

Dr. Claude Schelling
Klinik für Reproduktionsmedizin
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Winterthurerstrasse 260
8057 Zürich
Tel.: ++41 (0)44 635 91 01
Fax: ++41 (0)44 635 89 38
E-Mail: cschelling@vetclinics.uzh.ch