

# Schistosoma reflexum bei einem weiblichen Rinderfetus mit synaptonemalen Komplex-Störungen

B. Z. Kovács, G. Stranzinger

Institut für Nutztierwissenschaften, Gruppe Züchtungsbiologie der Eidgenössischen Technischen Hochschule und der Universität Zürich

## Zusammenfassung

In dieser Studie werden die Ergebnisse mitotischer- und meiotischer Untersuchungen bei einem anatomisch abnormalen Rinderfetus präsentiert. Die Abnormalität zeigt grosse Ähnlichkeit zum «Schistosoma reflexum», welches im fetalen Stadium noch nie in der Literatur beschrieben wurde. Der untersuchte Fetus zeigte in den mitotischen Chromosomenpräparationen aus Fibroblastenkulturen keine auffallenden Abweichungen der Chromosomen vom Standard. Synaptonemale Komplexe (SC) wurden beim Fetus im Alter von 92 Tagen post coitum präpariert. In den SCs traten in 43.75% aller untersuchten Zellen Abnormalitäten im Paarungsverhalten der Chromosomen in Form von «Schlinge», «nicht homologe Paarung» und «Multivalent» auf. Vergleichsweise wurden bei normalen Feten weniger als 5% abnormale Pachytänstadien gefunden.

**Schlüsselwörter:** Mitose – Meiose – Synaptonemale Komplexe – Schistosoma Reflexum – Fetus

## Schistosoma reflexum in a female bovine fetus with synaptonemal complex abnormalities

In this study we present mitotic- and meiotic investigations in an anatomical abnormal bovine fetus. The abnormality could be classified as “schistosoma reflexum”, which was never described in fetuses in the literature. In the mitotical chromosome preparations from fibroblast cultures the examined fetus showed no chromosomal difference in comparison to the standard synaptonemal complexes (SC) which were prepared from the fetus at the age of 92 days post coitum. In the SCs from the abnormal fetus 43.75% of the investigated cells showed abnormalities such as “loop,” “non-homologue pairing” and “multivalency” in the pairing behavior of the chromosomes. In comparison, less than 5% of the cells in normal embryos showed such abnormalities.

**Key words:** mitosis – meiosis – synaptonemal complexes – schistosoma reflexum – fetus

## Einleitung

Im Rahmen einer Abklärung über die X-Chromosomenmorphologie und das Paarungsverhalten der Chromosomen im Pachytän bei Eringerkühen wurden auch Feten zytogenetisch untersucht. Neben mehreren normalen Rinderfeten wurde auch ein abnormaler Rinderfetus vorgefunden. In diesem Fall handelt es sich um eine bei Rindern im Geburtsverlauf öfter auftretende und beschriebene Abnormalität, mit der Bezeichnung «Schistosoma reflexum». Richter et al. (1993) beschrieb diese Form folgendermassen: – Es kommt ziemlich häufig beim Rind, äusserst selten beim Pferd, vereinzelt bei Schaf, Ziege, Schwein, Katze und Kaninchen vor. Beim Hund wurde es bisher nicht beobachtet. Es handelt sich um eine vom Brusteingang bis zum Becken reichende Längsspalte

der Brust- und Bauchhöhle, starke Lordose der Rückenwirbelsäule in der Lendengegend, Aufbiegung des seitlichen Brust- und Bauchfelles; die Eingeweide liegen frei im Uterus; Kopf und Beine hingegen – nach einer Richtung zeigend – werden von der Aussenseite der Haut m. o. w. umschlossen.

Schistosoma reflexum wurde in der Literatur von anderen Autoren während der Geburtsphase auch erwähnt und beschrieben (Bidstrup, 1981). Es liegen jedoch keine Beschreibungen aus dem Zeitraum des ersten Trimesters p. c. vor (siehe Herzog, 2000).

Das Ziel dieser Arbeit ist, die Resultate der zytogenetischen Untersuchungen dieses abnormalen Fetus zu präsentieren. Im weiteren wurde das Paarungsverhalten meiotischer Chromosomen aus dem Fetalovar untersucht.

## Tiere, Material und Methoden

Neben mehreren Embryonenspendertieren wurde ein geschlechtsreifes Rind aus der Kreuzung zwischen Holstein und Jersey mit Samen von einem Stier der Eringerrasse besamt. Das Rind wurde an der Versuchsstation Chamau der ETH unter normalen Bedingungen gehalten, beobachtet und mittels Ultraschall auf Trächtigkeit überprüft. Vom trächtigen Tier wurden Blutproben genommen und Kurzzeitkulturen (Leukozytenkulturen) angelegt. Nach einer Trächtigkeit von 92 Tagen wurde das Rind geschlachtet und der Fetus aus dem Uterus genommen (Scheitel-Steisslänge = 16.5 cm). Kurz nach Entnahme des Fetus aus dem Uterus wurden die Ovarien (ca. 4–6 mm gross) freigelegt und Zellen für meiotische Untersuchungen, wie Synaptonemale Komplexe (SC), vorbereitet. Die SC Präparationen basierten auf der von Counce und Meyer (1973) beschriebenen und von Switonski et al. (1987) an Hodengewebe modifizierten Methode. Mit diesen Veränderungen der Technik und zusätzlich mit eigenen Modifikationen konnten auch bei Ovarien auswertbare Resultate erreicht werden. Beim Rind kann die Prophase der Meiose nur im 1. Trimester präpariert werden. Als Präparate dienten primär SC, die eine genaue Aussage über die Vorgänge und Verläufe im Pachytän erlauben, der Phase der Meiose, in der auch die Rekombinationsvorgänge ablaufen. Besondere Beachtung wurde dem Verhalten der Geschlechtschromosomen während ihrer Paarung geschenkt und zusätzlich wurde festgestellt, ob Chromosomenanomalien vorhanden waren. Lichtmikroskopische Beobachtungen von gefärbten mitotischen Metaphasen ergänzten die elektronenmikroskopischen Analysen.

Der Fetus wurde ebenfalls mitotisch, mittels Langzeitkulturen aus Fibroblasten untersucht (Nett, 1995). Metaphasen wurden mit Giemsa angefärbt, «R» gebändert, photographiert und zu Karyogrammen verarbeitet. Sie wurden mit dem Internationalen Standard (ISCN, 1990) verglichen.

## Ergebnisse

### Mutter des Fetus

Aus dem Leukozytenkulturen wurden nach entsprechender Präparation 25–30 Metaphasen untersucht. Das Tier zeigte eine normale Chromosomenzahl ( $2n = 60, XX$ ) und es wurden keine lichtmikroskopisch sichtbaren Chromosomenaberrationen, wie Zentromerfusion, Chimerismus und Geschlechtschromosomenaberrationen festgestellt. Diese 3 Mutationsformen machen ca. 90–95% aller Chromosomenveränderungen bei Rindern aus.

### Der Fetus

Vom Rinderfetus wurde eine Muskelbiopsie entnommen und Langzeitkulturen angelegt. Die Resultate zeigten eine normale Chromosomenzahl ( $2n = 60, XX$ ) und in den mit Giemsa gefärbten Präparaten wurden keine sichtbaren Aberrationen gefunden. Zur genaueren Abklärung der Chromosomen wurde R-Bandfärbung eingesetzt. Die Metaphasen wurden karyotypisiert. Das Karyogramm wurde im Vergleich zum internationalen Standardkaryotyp als normal bezeichnet.

Für SC Präparate wurden 5 Objektträger angefertigt. Pro Objektträger wurden 5 bis 8 Kupfergitterchen angelegt. 32 Zellen wurden unter dem Elektronenmikroskop untersucht, photographiert und ausgewertet. 15% der sich teilenden Zellen waren noch im Zygotän, Spätzygotän, oder im frühpachytänen Stadium. Im Zygotän waren die Bivalente teilweise noch in Paarung. In diesem Stadium konnte das Geschlechtsbivalent noch nicht identifiziert werden. 56.25% der Zellen waren normal. Abbildung 1a zeigt ein Beispiel dieser Präparationsart.



Abbildung 1a: Normale Zelle beim Fetus im Pachytänstadium. Vergrößerung 1900 $\times$ .

In diesen Fällen konnten inklusive der XX-Geschlechtsbivalente, total immer 30 Bivalente gezählt werden. Das Pachytänstadium war aufgrund der vollständig gepaarten Bivalente erkennbar. Sowohl die autosomalen Bivalente, als auch die XX-Bivalente zeigten die typische SC-Struktur. Zwischen den zwei Lateralelementen war in den meisten Fällen das Zentralelement zu sehen. Rekombinationsnodule konnten ebenfalls festgestellt werden. Feine Haftplättchen (attachment plaques) kennzeichneten die telomeren Enden der Bivalente. Bei den akrozentrischen bis telozentrischen Autosomen markierte, neben den Haftplättchen, das dunkel gefärbte und diffuse Zentromer das terminale Bivalentende. Die Zentromere der Autosomen waren terminal angeordnet, meistens ohne Abstand von den Haftplättchen.

Die Sexbivalente wurden speziell betrachtet. Die XX-Bivalente konnten mit Hilfe der submetazentrisch gelegenen Zentromere identifiziert werden. Es wurde ein durchschnittliches Chromosomenarmlängenverhältnis von 1:2.05 (kurzer Arm: langer Arm) gemessen, was auch den mitotischen Zentromerindex (Levan et al., 1964) entsprach. Die lateralen Elemente der Geschlechtsbivalente waren in allen Pachytänzellen vollständig gepaart. In allen Stadien der Prophase blieben die Achsen einzeln und dünn wie bei Autosomenbivalenten. Die synaptonemalen Komplexe der X-Chromosomen zeigten keinerlei Assoziationen zu irgendwelchen autosomalen Bivalenten. Es konnte keine bevorzugte Lage der XX-Bivalente innerhalb der Zellkerne ausgemacht werden. Abbildung 1b ist ein Beispiel für XX-Bivalente einer normalen Zelle.

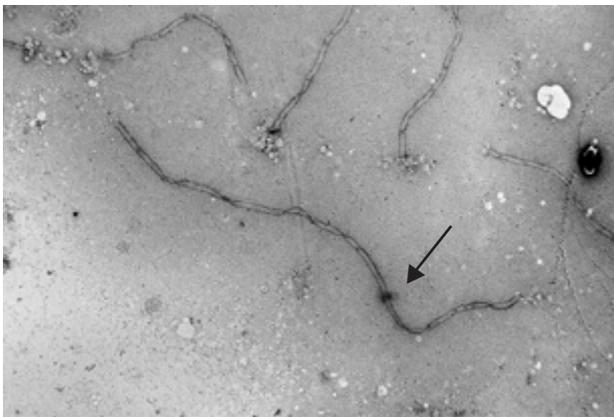


Abbildung 1b: Normale Zelle vom Fetus mit dem XX-Bivalent. Vergrößerung 1900×. Der Pfeil zeigt die Position des Zentromeres.

In 43.75% aller untersuchten Zellen wurden Abnormalitäten im Paarungsverhalten der Chromosomen gefunden. Tabelle 1 zeigt die Resultate der SC Untersuchungen mit den unterschiedlichen Formen möglicher chromosomaler Veränderungen. Die meisten Abnormalitäten wurden während des frühen Pachytänstadiums entdeckt.

In 12.5% der untersuchten Zellen wurden Schlingen (Loop) gefunden (Abb. 2a). In wenigen Prozenten der Zellen haben die Bivalente unterschiedliche Lateralelemente. Abbildung 3b zeigt eine nicht homologe Paarung. Multivalente und

dreifache Paarungen wurden ebenfalls beobachtet (Abb. 2c und 2a).

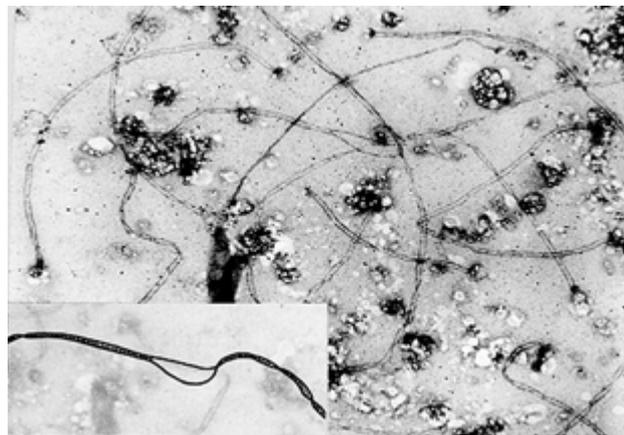


Abbildung 2a: Auflockerung des zentralen Elementes (Schlinge) beim Fetus. Vergrößerung 1900×.

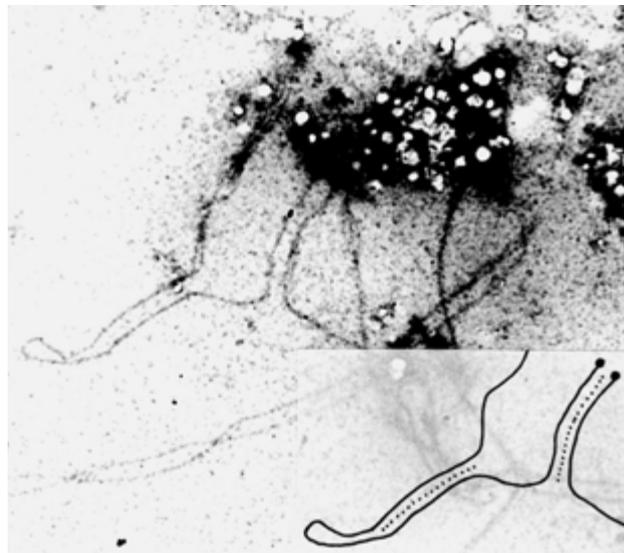


Abbildung 2b: Paarungsunregelmässigkeit (nicht homologe Paarung) beim Fetus. Vergrößerung 7100×.

## Diskussion

Bei Rindern sind die Präparationen zwischen dem 85. und 116. Trächtigkeitstag für SC erfolgreich. Allerdings variierte die Zahl der Pachytänzellen auch in dieser Zeitspanne von Tier zu Tier stark, da die Ovarien in Reiskorngrösse unterschiedlich entwickelt waren. In normalen Zellen in allen

Tabelle 1: Verhältnis von abnormalem zu normalem Paarungsverhalten der Chromosomen in SC Untersuchungen beim Fetus.

Typ der Zellen	Normale Zellen	Schlinge	Nicht homologe Paarung	Multivalente	*Komb. Abnormalitäten in einer Zelle
Anzahl abnormaler Zellen zum Total und in %	18 / 32 56.25%	4 / 32 12.5%	4 / 32 12.5%	6 / 32 18.75%	3 / 32 9.38%

\* In 3 Zellen waren mehrere Abnormalitäten gleichzeitig vorhanden.

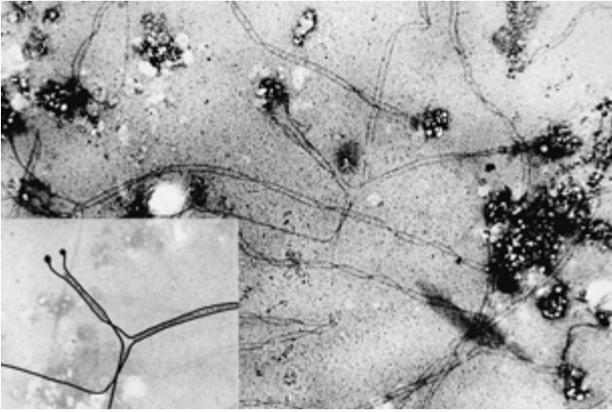


Abbildung 2c: Multivalentbildung unterschiedlicher Chromosomen beim Fetus. Vergrößerung 3400 $\times$ .

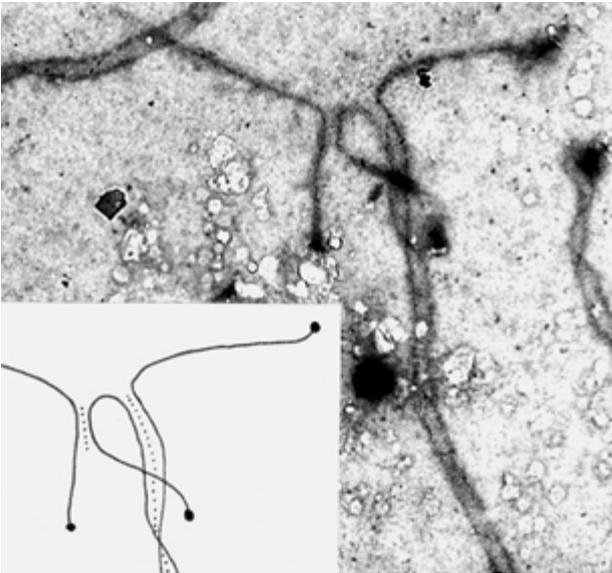


Abbildung 2d: Multivalentbildung unterschiedlicher Chromosomen beim Fetus. Vergrößerung 5700 $\times$ .

autosomalen synaptonemalen Komplexen waren die dreiteilige Struktur, die deutlich erkennbaren Haftplättchen an den beiden Enden und die sporadisch auftretenden Rekombinationsnodule gemeinsam. Das Zentralelement des SCs scheint dabei eine wesentliche Rolle bei der Verteilung der Rekombinationsknoten zu spielen. Dies wird durch die Ergebnisse bei Hefen bestätigt, wo aufgrund eines genetischen Defektes kein vollständiges SC ausgebildet wird und bei denen die Verteilung der Crossing-over nicht geordnet erfolgt (Sym und Roeder, 1994).

Der Abstand zwischen Haftplättchen und Zentromer ist unterschiedlich ausgeprägt und Switonski et al. (1990) beschreiben auch hier spezifische Unterschiede. Die Kinetochore auf den Bivalenten der akrozentrischen Autosomen schlossen in den meisten Fällen stets unmittelbar an das eine Haftplättchenpaar an, ohne dazwischen einen Achsenabschnitt sichtbar werden zu lassen. Das X-

Chromosom ist beim Rind das einzige submetazentrische Chromosom des weiblichen Karyotyps (Ford et al., 1980) und das XX-Bivalent ist somit einfach zu identifizieren. Die vollständig gepaarten Achsen und die klassische dreiteilige Synaptonemalkomplexstruktur verliehen dem weiblichen Geschlechtsbivalent das Aussehen eines submetazentrischen Autosomenbivalents.

Die Oocyten dieses abnormalen Fetus zeigten neben den normalen Chromosomenpaarungen viele Synapsisfehler (43.75% von allen untersuchten Zellen). Bei den normalen Rinderfeteten wurden nur in geringem Ausmass (5% der Zellen) Synapsisfehler gefunden. In 12.5% der abnormalen Zellen wurden «Schlingen» gefunden. Ungepaarte Chromosomen führen zu einer Fehlverteilung (Non-Disjunction) oder zu einem Abbruch der Meiose. Es ist bekannt, dass sich im Pachytänstadium der meiotischen Prophase I normale Chromosomen und Inversionenschlingen bilden können (Switonski und Stranzinger, 1998). Die Abwesenheit der Paarung, als Asynapsis bezeichnet, deutet auf Unterschiede im Aufbau der Homologen hin. Ebenfalls in 12.5% der abnormalen Zellen wurde «nicht homologe Paarung» gefunden. Die Paarung der Nichthomologen ist eine Heterosynapsis. Derartige Konfigurationen, wo die asynaptische Terminalregionen von einem SC mit einem Lateralelement von einem anderen SC gepaart war und das SC ungleiche Längen von lateralen Elementen zeigte, deuteten auch auf Umlagerungen der Chromosomen in der Embryogenese hin. Koykul et al. (1997) untersuchten X-Chromosomen-Bivalente in Rinderoozyten. Dabei traten als Fehler im Pachytän die Asynapsen auf. In 18.75% der abnormalen Zellen wurden «Multivalente» gefunden. Die meiotische Paarung homologer Abschnitte strukturell veränderter Chromosomen kommt durch die Bildung abnormer Bi- oder Multivalente zustande, deren Komplexität je nach Art der betreffenden Abänderung wechselt. Die grössten Auswirkungen haben Inversionen und reziproke Translokationen, die meist zum Abbruch der Meiose führen (Ansari et al., 1993). Beim untersuchten Rinderfetus weisen die Missbildung und die meiotischen Teilungsprobleme auf eine gemeinsam ausgeprägte Störung in der Embryogenese hin, die auch umweltbedingte Faktoren als Auslöser haben könnte.

## Dank

Die Autoren danken Herrn Dr. E. Wehrli vom Institut für Zellbiologie (Service-Labor für Elektronenmikroskopie) für die Hilfsbereitschaft.

### Schistosoma reflexum chez un fœtus bovin femelle avec une désorganisation du complexe synaptonémal

Dans cette étude sont présentés les résultats d'examen mitotiques et méiotiques chez un fœtus bovin anatomiquement anormal. L'anomalie est très semblable au «Schistosoma reflexum» qui n'a encore jamais été décrit au stade fœtal. Le fœtus examiné n'a révélé aucune différence frappante avec les chromosomes du standard dans les préparations de chromosomes mitotiques provenant de cultures de fibroblastes. Les complexes synaptonémaux ont été préparés chez le fœtus âgé de 92 jours après le coït. Dans les complexes synaptonémaux, des anomalies étaient présentes dans 43.75% de toutes les cellules en ce qui concerne le comportement de couplage des chromosomes sous la forme de «boucle», de «couplage non homologue» et «multivalent». Comparativement moins de 5% de stades pachytènes ont été décelés chez les fœtus normaux.

### Schistosoma reflexum in un feto femmina di manzo con disturbi del complesso sinaptonemale

In questo studio vengono presentati i risultati di esami mitotici e meiotici in un feto di manzo anatomicamente anormale. L'anormalità è molto simile allo «Schistosoma reflexum», che allo stadio fetale non è mai stato descritto nella bibliografia. Il feto esaminato non presentava differenze di cromosomi rispetto allo standard nelle preparazioni cromosomiche mitotiche di culture di fibroblasti. I complessi sinaptonemali (SC) sono stati preparati nel feto all'età di 92 giorni post coitum. Nei SC sono comparse, nel 43.75% di tutte le cellule esaminate, anomalie nell'accoppiamento dei cromosomi sotto forma di «cappio»; «accoppiamento non omologo» e «multivalenza». In confronto, in feti normali sono stati trovati meno del 5% di stadi pachiteni.

## Literatur

Ansari H. A., Jung H. R., Hediger R., Fries R., König H., Stranzinger G.: A balanced autosomal reciprocal translocation in an azoospermic bull. Cytogenet. Cell Genet. 1993, 62: 117–123.

Bidstrup I.: Shistosoma reflexum in a twin calf (letter). Aust. Vet. J. 1981, 57: 251.

Counce S. J., Meyer G. E.: Differentiation of the synaptonemal complex and the kinetochore in *Locusta* spermatocytes studied by whole mount electron microscopy. Chromosoma (Berl.). 1973, 44: 231–253.

Ford C. E., Pollock D. L., Gustavsson I.: Proceedings of the First International Conference for the Standardisation of Banded Karyotypes of Domestic Animals. Hereditas 1980, 92: 145–162.

ISCNDA: International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals. In: Proceedings of the second International conference for the standardisation of domestic animal karyotypes, Paris (1989). Cytogenet. Cell Genet. 1990, 53: 65–79.

Herzog A.: Pareys Lexikon der Syndrome, Erb- und Zuchtkrankheiten der Haus- und Nutztiere. Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin, Wien, 2001, 407–408.

Koykul W., Switonski M., Basur P. K.: The X bivalent in fetal bovine oocytes. Hereditas. 1997, 126: 59–65.

Levan A., Fredga K., Sandberg A. A.: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 1964, 52: 201–220.

Nett P.: Meiotic pairing behaviour of autosomes and sex chromosomes in different pure and crossbred bulls with normal and abnormal chromosome complement. Dissertation ETH Zürich, No. 11361, 1995.

Richter J., Goetze R.: Tiergeburtshilfe. Buchverlag Parey, Berlin, 1993.

Sym M., Roeder S. G.: Crossover interference is abolished in the absence of a synaptonemal complex protein. Cell. 1994, 79: 283–92.

Switonski M., Ansari H. A., Mathew A., Jung H. R., Stranzinger G.: Synaptonemal complex analysis in primary spermatocytes of cattle x zebu hybrids (*Bos taurus* x *Bos indicus*). J. Anim. Breed. Genet. 1990, 107: 229–238.

Switonski M., Gustavsson J., Plöen L.: The nature of the 1;29 translocation in cattle as revealed by synaptonemal complex analysis using electron microscopy. Cytogenet. Cell Genet. 1987, 44: 103–111.

Switonski M., Stranzinger G.: Studies of synaptonemal complexes in farm mammals – a review. J. Heredity. 1998, 89: 473–480.

## Korrespondenzadresse:

Institut für Nutztierwissenschaften der Eidgenössischen Technischen Hochschule und der Universität Zürich, Tannenstrasse 1, CH-8092 Zürich, Schweiz

Manuskripteingang: 9. April 2001

In vorliegender Form angenommen: 10. August 2001