

Mikrosezierung von Chromosomen in der Veterinärmedizin

A. Pieńkowska¹, M. Zawada², G. Stranzinger³, C. Schelling³

¹Department of Animal Genetics and Breeding, Agricultural University of Poznań, Poland, ²Institute of Human Genetics, Polish Academy of Science Poznań, Poland, ³Institut für Nutztierwissenschaften der ETH Zürich und der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich

Zusammenfassung

Die Methode zur Mikrosezierung von Chromosomen erlaubt es, einzelne Chromosomen oder Teile davon mechanisch aus einer Metaphase herauszulösen. Nach Vermehrung des DNA-Materials mittels PCR können Genbanken konstruiert, DNA-Sonden für spezifische Regionen entwickelt oder chromosomenspezifische Proben hergestellt werden. In der Veterinärmedizin ist die Mikrosezierung von Chromosomen wertvoll, wenn Abklärungen von numerischen oder strukturellen Chromosomenaberrationen wichtig sind.

Schlüsselwörter: Mikrosezierung – chromosomenspezifische Probe – DOP-PCR

Microdissection of chromosomes in veterinary medicine

Microdissection of chromosomes and subsequent amplification of the DNA material by PCR allow the development of libraries, region-specific DNA probes or chromosome painting probes. Veterinary medicine will benefit from this method in instances where clarification of numerical or structural chromosome aberrations is needed.

Key words: microdissection – chromosome painting – DOP-PCR

Einleitung

Die Mikrosezierung von Chromosomen beschreibt die Technik, um ganze Chromosomen oder Teile davon mechanisch aus dem Verband einer Metaphase herauszulösen und in ein Reagenzgefäß zu bringen, in dem dieses DNA-Material für weitere Zwecke zur Verfügung steht. Diese Methode wurde erstmals 1981 erfolgreich eingesetzt, um Abschnitte von polytären Chromosomen aus Speicheldrüsenpräparationen von *Drosophila* zu isolieren und nachfolgend zu klonieren (Scalenghe et al., 1981). Sehr schnell wurde die Mikrosezierung auch beim Menschen und der Maus eingesetzt, um bestimmte Chromosomenabschnitte zu klonieren und anschliessend genetische Marker für diese Regionen zu entwickeln. Von den kleinen Säugetier-Chromosomen mussten aber noch sehr viele Kopien (>200) eines Chromosoms mikrosezieren werden, um ausreichend Material für die Klonierung zur Verfügung zu haben. Lüdecke et al. (1989) und Saunders et al. (1989) beschrieben, wie das mikroseziierte DNA-Material vor dem Klonierungsschritt mit Hilfe der PCR vermehrt werden konnte. Dadurch wurde es möglich, mit weit weniger Kopien (20–30) umfangreichere Genbanken herzustellen. Die Mikrosezierung von Chromosomen wurde auch bei verschiedenen Nutztierarten zur Entwicklung von

chromosomenspezifischen DNA-Sequenzen für die Suche in Genbanken (Goldammer et al., 1996; Zimmer et al., 1997) sowie zur Konstruktion von Genbanken (Ponce de Leon et al., 1996) und zum Vergleich der Struktur von homologen Chromosomen nahe verwandter Spezies (Goldammer et al., 1997) eingesetzt.

Für zytogenetische Untersuchungen war die Arbeit von Meltzer et al. (1992) ein Meilenstein. Hier wurde eine effiziente Methode beschrieben, um Proben für einzelne Chromosomen herzustellen (engl. chromosome painting probe). Dabei werden einige Kopien eines Chromosoms mikrosezieren und mit Hilfe der DOP-PCR (degenerate oligonucleotide primer-PCR) vermehrt und anschliessend mit Biotin markiert. Diese chromosomenspezifische Probe wird dann mit Metaphasen-Chromosomen, sehr oft anderer Arten, hybridisiert und färbt so die homologen Chromosomenabschnitte spezifisch an. Die starke Konservierung von DNA-Sequenzen im Verlauf der Evolution erlauben es, mit solchen chromosomenspezifischen Proben homologe Abschnitte zwischen unterschiedlichen Spezies zu definieren. Diese als Zoo-FISH (Übersichtsarbeit: Chowdhary und Raud-

sepp, 2001) bezeichnete Anwendung ist für Untersuchungen der Evolution von Karyotypen wichtig und kann für die Suche nach Kandidatengenen von Produktionsmerkmalen oder Erbkrankheiten eingesetzt werden. Die Mikrosezierung von Chromosomen unter dem Mikroskop mit Hilfe von Mikroglasnadeln ist aufwändig, hat aber den Vorteil, dass nicht nur ganze Chromosomen, sondern auch Teile davon, wie beispielsweise ein Chromosomenarm oder ein Chromosomenband, isoliert werden können. Besonders interessant ist diese Technik in Fällen, bei denen strukturell veränderte Chromosomen, überzählige Chromosomenbrückstücke (engl. marker chromosome) oder Mikrokerne auftreten. Solche Phänomene werden mit Intersexualität, Sterilität, verminderter Fruchtbarkeit, geistiger Retardierung und Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht. Die vorliegende Publikation soll die Mikrosezierungsmethode kurz beschreiben und deren Einsatz in der Veterinärmedizin beleuchten.

Material und Methodik zur Mikrosezierung von Chromosomen

Für erfolgreiche Mikrosezierungsexperimente sind qualitativ einwandfreie Präparationen von Chromosomen die Voraussetzung. Als Ausgangsmaterial dienen normalerweise Lymphozyten des Blutes oder Fibroblasten (Muskel- oder Hautbiopsien), die vorwiegend im Brutschrank kultiviert werden müssen. Sind genügend Zellen gewachsen, werden die sich in Teilung befindlichen Zellen durch Zugabe von Colcemid (synthetisches Kolchizin) in der Metaphase blockiert. Nach einer hypotonen Behandlung werden die Zellen mit einem Gemisch von Eisessig und Methanol fixiert. Kleine Proben dieser Chromosomenpräparationen werden auf Deckgläser aufgetropft. Im einfachsten Fall kann nach einer Kurzfärbung mit Giemsa, welche die Identifizierung der Chromosomen erleichtert, mit der Mikrosezierung begonnen werden. Normalerweise ist jedoch zur genauen Identifizierung eines bestimmten Chromosoms eine Bänderungsfärbung erforderlich.

Die Mikrosezierung der Chromosomen erfolgt unter einem Invertoskop mit Hilfe von Mikroglasnadeln, die durch einen Mikromanipulator in 3 verschiedenen Achsen bewegt werden können. Unter Sichtkontrolle wird mit einer Mikroglasnadel das ausgewählte Chromosom an der Glasnadelspitze festgeklebt und direkt, durch Abbrechen der Nadelspitze, in ein PCR-Reaktionsröhrchen, das 2 µl Sammelpuffer enthält, überführt. Dieser Vorgang wird mit neuen Mikroglasnadeln wiederholt bis 5–10 Kopien des Chromosoms mikrosezieren sind. Durch eine Proteinase K-Behandlung werden die Proteine des Chromatins abgebaut, um das mikroseziierte DNA-Material

für die folgenden enzymatischen Vermehrungsschritte besser zugänglich zu machen. Eine Negativkontrolle (PCR-Reaktionsröhrchen mit Sammelpuffer und Proteinase K, aber ohne mikroseziiertes DNA-Material) kann mitgeführt werden und erleichtert später die Erfolgsbeurteilung des Experimentes.

In zwei sich folgenden PCR-Reaktionen wird das mikroseziierte DNA-Ausgangsmaterial vermehrt, um genügend Material für die Herstellung von Painting-Proben oder für die Mikroklonierung zur Verfügung zu haben. Diese beiden PCR-Reaktionen sind durch den verwendeten DOP-Primer (5' CCGACTCGANNNNNTGTGG 3') und durch sehr tiefe Annealingtemperaturen charakterisiert. Dadurch wird die möglichst gleichmässige, unspezifische Vermehrung des vorhandenen DNA-Materiales angestrebt. Nach einer Stabilisierung des amplifizierten DNA-Materiales mit EDTA wird die chromosomenspezifische Probe bei -20°C eingefroren. Um die Qualität des Mikrosezierungsexperimentes zu beurteilen, wird normalerweise eine Probe mit Biotin markiert und mit Metaphasen-Chromosomen hybridisiert. Abbildung 1 zeigt Ergebnisse solcher Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) mit einer bovinen X bzw. Y chromosomenspezifischen Probe. Mit einem Mikrosezierungsexperiment können normalerweise 30–50 chromosomenspezifische Proben für FISH-Experimente hergestellt werden.

Einsatz der Mikrosezierung in der Veterinärmedizin

Die Mikrosezierung wurde von den Autoren bis heute mit Chromosomen des Haushundes, des Rindes und des Menschen durchgeführt. Unser Interesse für diese Methode wurde in Zusammenhang mit einem Intersex-Hund geweckt (Schelling et al., 2001), der hier als Beispiel für die Anwendung der Mikrosezierung dienen soll. Zum Zeitpunkt der Untersuchung wäre es ohne die Mikrosezierung nicht möglich gewesen, die strukturelle Chromosomenaberration genauer zu definieren. Der als Weibchen registrierte Hund wies ein männlich chromosomales Geschlecht auf, hatte Ovotestes und wies phänotypisch weibliche Genitalien auf (mit vergrößerter Klitoris). Die genauere chromosomale Analyse ergab, dass der Hund ein Mosaik 78,XY/78,XYrcp (X; Autosom) war. Ein Teil der Lymphozyten wies ein strukturell verändertes X Chromosom auf, das durch eine reziproke Translokation zwischen dem kurzen Arm des X Chromosomes und einem Teil eines Autosomes zustande gekommen war. Die Identifizierung des an der Translokation beteiligten Autosomes kam eine sehr grosse Bedeutung zu, weil Gene auf diesem Chromosomenabschnitt potentielle Kandidatengene für die Differenzierung des Geschlechtes sein könnten. Der normale Karyotyp

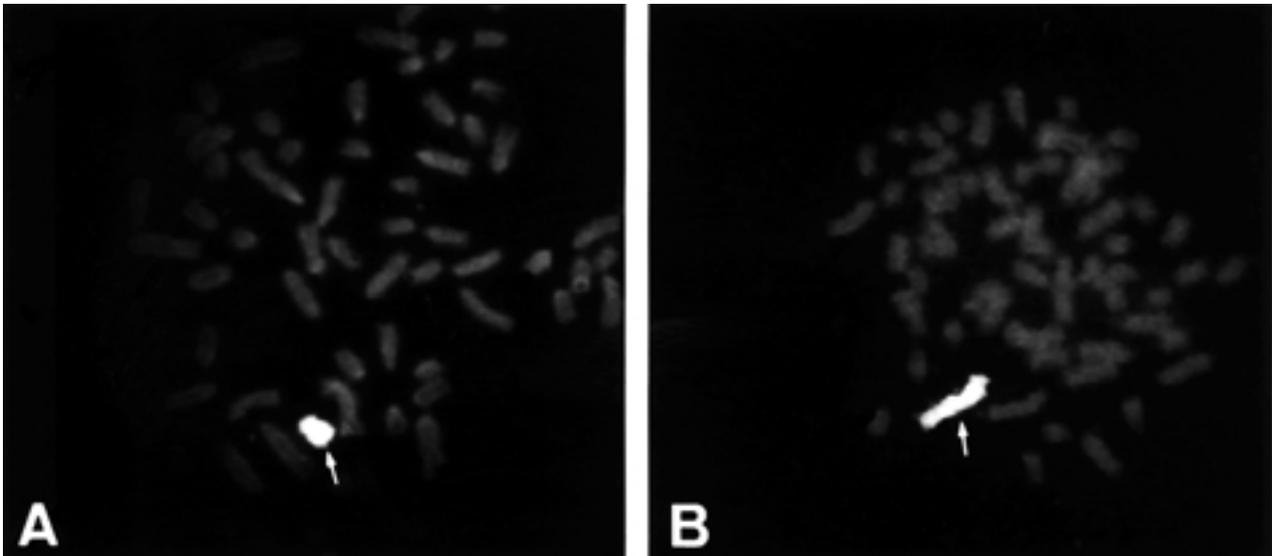


Abbildung 1: Metaphasen-Chromosomen eines männlichen Rindes nach erfolgreicher Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit einer bovinen Y (A) bzw. X (B) chromosomenspezifischen Probe. Die sehr starke Fluoreszenz mit der Y chromosomenspezifischen Probe lässt das Chromosom sehr gross erscheinen.

des Hundes ($2n = 78$) ist sehr komplex und es ist nicht möglich, die Autosomen 22–38 aufgrund von Bänderungsmustern allein zu unterscheiden. Für diese müssen chromosomenspezifische Cosmid-Klone oder chromosomenspezifische Proben eingesetzt werden, um sie zu unterscheiden. Ohne die Mikrosezierung wären 17 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) mit caninen chromosomenspezifischen Proben notwendig gewesen, um das Autosom zu identifizieren. Der viel kürzerer Weg führte über die Mikrosezierung des strukturell veränderten X Chromosomes des Intersex-Hundes und der nachfolgenden Herstellung einer spezifischen Probe. Weil die chromosomalen Homologien zwischen Hund und Mensch aufgeklärt wurden (Yang et al., 1999), reichte ein FISH- Experiment (chromosomenspezifische Probe des strukturell veränderten X Chromosomes) mit Chromosomen des Menschen aus, um abzuleiten, dass das Chromosom 24 des Hundes an der Translokation beteiligt war. Dieses Beispiel zeigt deutlich, dass der sinnvolle Einsatz der Mikrosezierung von Chromosomen in Zukunft für die Untersuchung von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen liegen wird. Die Mikrosezierung von normalen Chromosomen zur Entwicklung von chromosomenspezifischen Proben wird jedoch in Zukunft an Bedeutung verlie-

ren, da heute für viele Spezies mit den Methoden des Flow-Sorting und der Entwicklung von BAC-Genbanken interessante Alternativen bestehen.

Schlussbemerkungen

Mit diesem Bericht wollen wir interessierte Tierärztinnen und Tierärzte daran erinnern, dass es möglich und sinnvoll ist, wertvolle Zuchttiere auf ihren Karyotyp hin untersuchen zu lassen, bevor sie zur Zucht eingesetzt werden. Ausserdem wäre es interessant, wenn mehr Intersex-Tiere auch zytogenetisch untersucht würden. Mit der Mikrosezierung könnten auch komplexe strukturelle Veränderungen der Chromosomen aufgeklärt werden. Diese Daten von Nutz- und Heimtieren könnten zur genauen Aufklärung der komplexen Prozesse und zur Identifizierung von weiteren Genen, welche die Entwicklung des Geschlechtes steuern, beitragen.

Dank

This work has been supported by the State Committee for Scientific Research, Poland (6P06D 028 21)

Microdissection de chromosomes pour la médecine vétérinaire

La microdissection des chromosomes permet de détacher un fragment de chromosome mécaniquement d'un stade de métaphase. L'amplification par PCR de l'ADN permet de développer des banques de gènes, des sondes d'ADN spécifiques ou des sondes spécifiques pour un chromosome. La microdissection est précieuse en médecine vétérinaire pour l'élucidation d'aberrations chromosomales numériques ou structurales.

Microsezione di cromosomi per la medicina veterinaria

Il metodo per la microsezione di cromosomi permette di estrarre meccanicamente singoli cromosomi o parti di essi dalla metafase. Dopo una moltiplicazione di questo DNA tramite PCR, banche di geni possono essere costruite, region-specifiche DNA sonde possono essere sviluppate o campioni di cromosomen-painting possono essere fabbricati. Nella medicina veterinaria la microsezione di cromosomi sarà preziosa per i settori nei quali è importante una chiarificazione di aberrazioni numerali o strutturali di cromosomi.

Literatur

Chowdhary B.P., Raudsepp T.: Chromosome painting in farm, pet and wild animal species. *Meth. Cell. Sci.* 2001, 23: 37–55.

Goldammer T., Weikard R., Brunner R.M., Schwerin M.: Generation of chromosome fragment specific DNA sequences by microdissection and DOP-PCR. *Mamm. Genome* 1996, 7: 291–296.

Goldammer T., Brunner R.M., Schwerin M.: Comparative analysis of Y chromosome structure in *Bos taurus* and *B. indicus* by FISH using region-specific, microdissected, and locus-specific DNA probes. *Cytogenet. Cell Genet.* 1997, 77: 238–241.

Ludecke H.J., Gabriele S., Claussen U., Hosrthemke B.: Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* 1989, 338: 348–350.

Meltzer P.S., Guan X.Y., Burgess A., Trent J.M.: Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nature Genet.* 1992, 1: 24–28.

Ponce de Leon F.A., Ambady S., Hawkins G.A., Kappes S.M., Bishop M.D., Robl J.M., Beattie C.W.: Development of a bovine X chromosome linkage group and painting to asses

cattle, sheep, and goat X chromosome segment homologies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93: 3450–3454.

Saunders R.D.C., Glover D.M., Ashburner M., Siden-Kiamos I., Louis C., Monastiriotti M., Savakis C., Kafatos F.: PCR amplification of DNA microdissected from a single polytene chromosome band: A comparison with conventional microcloning. *Nucl. Acids Res.* 1989, 17: 9027–9037.

Scalenghe F., Turco E., Edstrom J.E., Pirota V., Melli M.: Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosoma* 1981, 82: 205–216.

Schelling C., Pieńkowska A., Arnold S., Hauser B., Świtoński M.: A male to female sex-reversed dog with a reciprocal translocation. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 2001, 57: 435–438.

Zimmer R., King W.A., Verrinder Gibbins A.M.: Generation of chicken Z-chromosome painting probes by microdissection for screening large-insert genomic libraries. *Cytogenet. Cell Genet.* 1997, 78: 124–130.

Yang F., O'Brien P.C.M., Milne B.S., Graphodatsky A.S., Solanky N., Trifonow V., Rens W., Sargan D., Ferguson-Smith M.A.: A complete comparative chromosome map for the dog, red fox and human and its integration with canine genetic maps. *Genomics* 1999, 62: 189–202.

Korrespondenzadresse

Dr. C. Schelling, Arbeitsgruppe Veterinärmedizinische Genetik, Institut für Nutztierwissenschaften der ETH Zürich und der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich, Tannenstrasse 1, CH-8092 Zürich
Tel: ++41-1-632-32-49, Fax: ++41-1-632-11-67, E-mail: claudeschelling@inw.agrl.ethz.ch

Manuskripteingang: 3. Mai 2002

In vorliegender Form angenommen: 28. Mai 2002