

Zytogenetische und molekulargenetische Abklärungen bei einem Pferd mit SRY-negativer Sex-Umkehr

A. Pieńkowska-Schelling¹, D. Becker², V. Bracher³, B. Pineroli¹, C. Schelling¹

¹Klinik für Reproduktionsmedizin, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, ²Institut für Genetik, Vetsuisse-Fakultät Universität Bern, ³Tierklinik Leimental, Biel-Benken

Zusammenfassung

Numerische und strukturelle Veränderungen der Chromosomen führen zu Fehlbildungen, embryonalen Verlusten und zu reduzierter oder fehlender Fruchtbarkeit. Während die Fruchtbarkeit bei Pferden auf der männlichen Seite durch die Sperma-Untersuchungen der Hengste evaluiert wird, fehlen für Stuten verbindliche Auflagen zum Zuchteinsatz. Deshalb kann es vorkommen, dass Stuten ausgewählt werden, die aufgrund ihrer Chromosomen-Veränderungen gar nicht trächtig werden können. Der vorliegende Fallbericht beschreibt ein Pferd, das offiziell als Stute registriert wurde und für die, anlässlich der Zuchttauglichkeitsprüfung, kleine, inaktive Ovarien festgestellt wurden. Die zytogenetische Untersuchung schloss zwar eine numerische oder lichtmikroskopisch sichtbare strukturelle Veränderung der Chromosomen aus, aber der Karyotyp (64,XY) entsprach nicht dem einer Stute, sondern dem eines Hengstes oder Wallachs. Die Diagnose Sex-Umkehr (männlich zu weiblich – SRY-negativ) schliesst aus, dass dieses Pferd trächtig werden kann. Der Fall unterstreicht die Bedeutung einer vorgängigen zytogenetischen Abklärung für Stuten, die in der Zucht eingesetzt werden sollen.

Schlüsselwörter: Pferd, Chromosomen, Sex-Umkehr, Fruchtbarkeit

Cytogenetical and molecular analyses in a horse with SRY-negative sex reversal

Numerical and structural aberrations of chromosomes may cause malformations, embryonal losses and reduced or missing fertility. In male horses the fertility is rather well controlled through their semen evaluation. For mares there are no mandatory regulations which specify their use in a breeding programme. Therefore, mares with chromosomal aberrations, which exclude reproduction success may be chosen for breeding. The present case describes a horse, officially registered as a female, which was presented for a breeding exam. On this occasion, small and inactive ovaries were diagnosed. Although the cytogenetical analysis excluded a numerical or gross structural chromosome aberration, the karyotype (64,XY) corresponded to the male sex. The diagnosis male to female sex-reversal (SRY-negative) excludes reproductive success for this horse. This case underlines the importance of a cytogenetic analysis for female horses, before they enter a breeding programme.

Keywords: horse, sex-reversal, chromosomes, fertility

Einleitung

Die wichtigsten Folgen von Chromosomen-Veränderungen sind angeborene Fehlbildungen, Embryonen-Verluste und herabgesetzte oder fehlende Fruchtbarkeit. Fruchtbarkeitsstörungen bei Hengsten und Stuten führen jährlich zu grossen wirtschaftlichen Verlusten. Deshalb ist eine möglichst sichere Früherkennung von Individuen, die Träger von chromosomalen Veränderungen sind, sehr wünschenswert. Ähnlich der Situation beim Menschen

und anderen Spezies, sind auch bei Hauspferden mit Fruchtbarkeitsstörungen aus zytogenetischer Sicht vor allem strukturelle und numerische Veränderungen der Geschlechtschromosomen sowie Geschlechtsumkehr-Syndrome beobachtet worden (Lear und Bailey, 2008). Für letztere stimmt jeweils das chromosomale Geschlecht nicht mit dem gonadalen und/oder dem phänotypischen Geschlecht überein. Obwohl die Abklärung von Fruchtbarkeitsstörungen durch die Verbindung zytogenetischer und molekulargenetischer Ansätze in den letzten Jahren

342 Fallberichte/Case reports

verbessert wurde, bleiben immer noch viele Fragen offen: wie sollen die Befunde in die Prognose bezüglich Fruchtbarkeit einfließen. Erschwerend wirkt hier die Tatsache, dass die phänotypische Variation innerhalb einer Gruppe von Pferden mit derselben zytogenetischen Diagnose sehr gross sein kann. Deshalb ist es wichtig, möglichst viele Fälle von Stuten mit Fruchtbarkeitsstörungen zytogenetisch, aber auch molekulargenetisch abzuklären.

Anamnese

Ein 12 Jahre altes Pferd, das als Stute der Koninklijk Warmbloed Paard Nederland-Rasse registriert worden war, wurde zur Zuchttauglichkeitsprüfung vorgestellt (Abb. 1). Laut Besitzer zeigte das Pferd ein normales, einer Stute entsprechendes Verhalten. Das äussere Genitale und der Uterus waren unauffällig, aber es wurden kleine, inaktive Ovarien festgestellt. Ausserdem war eine für eine untrainierte Stute gute Bemuskelung auffällig. Die vorläufige Diagnose lautete auf Gonadendysgenese. Eine Heparin- und eine EDTA-Blutprobe wurden entnommen und eine Untersuchung der Chromosomen in Auftrag gegeben.

Zytogenetische Abklärungen

Die Kultivierung der Lymphozyten aus der Heparin-Blutprobe und die Aufarbeitung der in der Metaphase arretierten Chromosomen erfolgten nach einem Standardprotokoll (Arkki und Sparkes, 1963). In einem ersten Untersuchungsschritt wurden die Metaphasen-Chromosomen auf einem Objektträger mit Giemsa angefärbt, um eine numerische Chromosomen-Veränderung lichtmikroskopisch erkennen zu können. Nach der Auszählung von 100 Metaphasen stand fest, dass die diploide Chromosomenzahl ($2n$) 64 betrug, wie sie für das Hauspferd als normal gilt. Als zweite Methode wurde eine CBG-Bänderung (C-bands by Barium hydroxide using Giemsa) der Chromosomen durchgeführt (Sumner, 1972), um die Konstitution der Geschlechtschromosomen X und Y zu beurteilen. Die CBG-Bänderung ist deshalb wertvoll, weil sie spezifisch heterochromatische Regionen nachweist und dadurch die Identifizierung und Beurteilung der Geschlechtschromosomen von Hauspferden erlaubt. Das Y Chromosom des Pferdes ist submetazentrisch und weist einen sehr grossen heterochromatischen Block auf seinem langen Arm auf. Das submetazentrische X Chromosom entspricht in seiner Grösse etwa dem drittgrössten Autosom (ECA 3) und zeigt auf dem langen Arm ebenfalls einen charakteristischen heterochromatischen Block (Xq2.1). Nach der Auswertung von 100 Metaphasen war klar, dass das als Stute registrierte Pferd in allen untersuchten Zellen ein X und ein Y Chromosom aufweist (Abb. 2) und somit das chromosomale Geschlecht (64,XY) eines Hengstes oder Wallachs besitzt. Mit einer Y Chromosomen-Painting Probe (Pieńkowska-Schelling et al., 2006) konnte dieses Resultat bestätigt werden (Abb. 3). Beide Geschlechtschromosomen zeigten die typischen Fluoreszenz-Signale. Während das Y Chromosom auf seiner gesamten Länge starke Signale aufwies, blieben die Signale auf dem X Chromosom auf den heterochromatischen Block beschränkt. Alle anderen Chromosomen zeigten keine Signale.

Molekulargenetische Abklärungen

Die genomische DNA des Pferdes wurde mit einer ProteinaseK-Phenol-Extraktionsmethode nach einem Standardprotokoll aus der EDTA-Blutprobe isoliert (Sambrook et al., 1989). Mit Hilfe der PCR-Amplifikation kann genomische DNA eines Individuums auf das Vorhandensein von Abschnitten des SRY-Genes untersucht werden. Im vorliegenden Fall wurden PCR-Primer (Forward-Primer: 5'TGC TAT GTC CAG AGT ATC CAA CA; Reverse Primer: 5'TGA GAA AGT CCG GAG GGT AA) eingesetzt, die ein Produkt in der Länge von 714 Basenpaaren (bp) des equinen SRY-Genes amplifizieren (Han et al., 2010). In Abbildung



Abbildung 1: «Stute» mit 64,XY Sex-Umkehr (SRY-negativ).

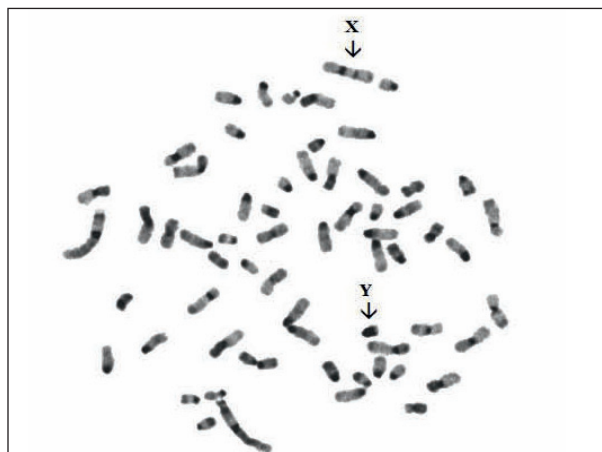


Abbildung 2: Metaphase nach C-Bänderung. Es kann ein X Chromosom und Y Chromosom identifiziert werden (Pfeile).

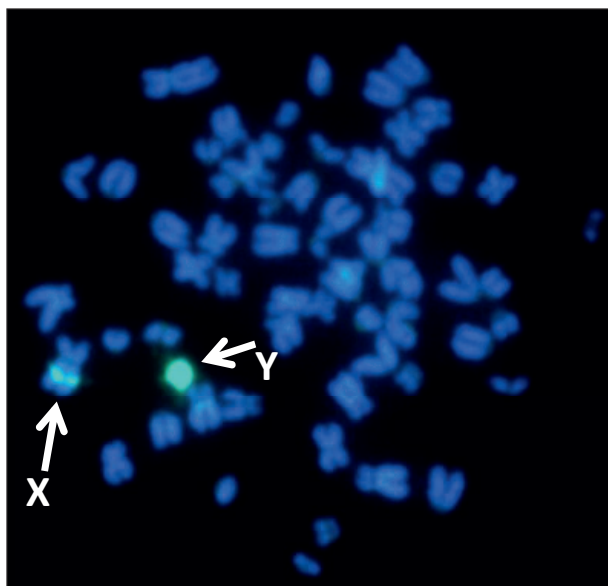


Abbildung 3: Metaphase nach Anfärbung mit einer Y Chromosomen-Painting Probe. Das ganze Y Chromosom und der heterochromatische Block auf dem langen Arm des X Chromosoms zeigen Fluoreszenz-Signale (Pfeile).

4 sind die Resultate dargestellt: Als Kontrollen wurde DNA von phänotypisch normalen Wallachen und Stuten eingesetzt. Wie erwartet, ist die Zielsequenz des *SRY*-Genes in allen vier Wallachen vorhanden, während sie in den Stuten fehlt. Die Stute mit der 64,XY Sex-Umkehr zeigte zwei Amplifikationsprodukte, die aber beide kürzer waren und nicht der Länge des Amplifikationsproduktes der Wallache

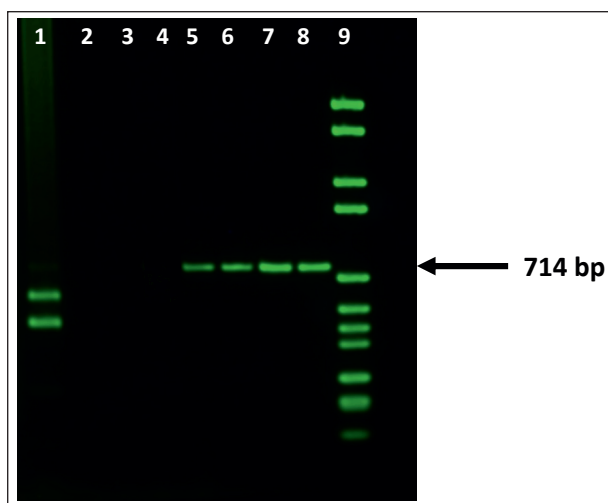


Abbildung 4: Auftrennung des *SRY* PCR-Produkts. Die Kontrollgruppe der vier Wallache (5–8) zeigt die erwartete Bande von 714 (bp). Diese Bande ist in der Kontrollgruppe der Stuten (2–4) nicht nachweisbar. Das Pferd mit der 64,XY Sex-Umkehr zeigt zwei Banden, die sich aber vom PCR-Produkt der Wallache deutlich in ihrer Länge (580 bp bzw. 267 bp) unterscheiden.

entsprochen. Um eine klare Diagnose stellen zu können, wurden die beiden PCR-Produkte sequenziert.

Diskussion

Der Nachweis einer Dysgenese der Ovarien bei Stuten mit normalem äusseren Phänotyp und einer Chromosomen-Aberration wurde erstmals von Chandley und Mitarbeitern (1975) erbracht. Es ist wahrscheinlich die am häufigsten gestellte klinische Diagnose, wenn Stuten mit reduzierter oder fehlender Fruchtbarkeit für eine Untersuchung vorgestellt werden. Lear and McGee (2012) schlagen vor, Störungen der Geschlechtsentwicklung beim Hauspferd in 4 Grundtypen zu unterteilen. Im vorliegenden Fall konnte die Analyse der Chromosomen das Vorliegen einer reinen Monosomie des X Chromosoms (63,X) oder eines Mosaikes (63,X/64,XX) ausschliessen. Diese beiden Aneuploidien des X Chromosoms sind mit ca. 35 % bzw. 30 % die häufigsten zytogenetischen Befunde bei Stuten mit Fruchtbarkeitsstörungen (Power, 1990; Bugno et al., 2007). Im vorliegenden Fall konnte für die äusserlich phänotypisch normale Stute ein männlicher Karyotyp (64,XY) nachgewiesen werden. Damit konnte ein weiterer Fall dokumentiert werden, der zur Gruppe mit sogenannter Sex-Umkehr Syndromen (engl. male to female sex-reversal) gehört. Diese scheinen in den letzten Jahren häufiger gesehen zu werden, wobei nicht klar ist, ob ihre Häufigkeit wirklich zugenommen hat, oder ob sie einfach besser erkannt werden (Lear und Bailey, 2008). Diese Sex-Umkehr Syndrome sind komplex (Raudsepp et al., 2010) und müssen von chromosomalen Veränderungen abgegrenzt werden, weil sie durch Mutationen in der DNA (Genmutationen, Insertionen, Duplikationen) von Genen, die an der Geschlechtsentwicklung beteiligt sind, verursacht werden. Umwelteinflüsse sind schlecht untersucht, können aber nicht als Ursache für das Entstehen solcher Syndrome ausgeschlossen werden. Bei Hauspferden wird die 64,XY Sex-Umkehr (äusserer Phänotyp normalerweise weiblich, aber variabel) häufiger beobachtet als die 64,XX Sex-Umkehr (äusserer und innerer Phänotyp sehr variabel), die mit einer Virilisierung und hohen Testosteron-Spiegeln einhergeht. Um den *SRY*-Status des Pferdes zu überprüfen, wurden die beiden PCR-Produkte sequenziert. Beide PCR-Produkte mit 580 bp und 267 bp zeigten keine Homologie mit der Sequenz des equinen *SRY*-Gens. Für das längere PCR-Produkt wurde eine sehr grosse Homologie (99%) mit einem Abschnitt auf dem Pferdechromosom 24 (NC_009167.2) gefunden. Das kürzere PCR-Produkt zeigte eine sehr grosse Homologie (97%) mit einer Sequenz des Pferdechromosoms 11 (NC_009154.2). Beide unspezifischen PCR-Produkte werden aufgrund von teilweise übereinstimmenden Primer-Bindungsstellen amplifiziert. Damit handelt es sich um einen Fall von *SRY*-negativer Sex-Umkehr (64,XY) und es muss davon ausgegangen werden, dass das in diesem Fallbericht vorgestellte Pferd unfruchtbar ist.

Literatur

Arkki D. T., Sparkes R. S.: Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogenet.* 1963, 2: 57–60.

Bugno M., Slota E., Koscielny M.: Karyotype evaluation among young horse populations in Poland. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2007, 149: 227–232.

Chandley A. C., Fletcher, J., Rossdale P. D., Peace C. K., Ricketts S. V. et al.: Chromosome abnormalities as a cause of infertility of mares. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1975, 23: 377–383.

Han S. H., Yang B. C., Ko M. S., Oh H. S., Lee S. S.: Length difference between equine ZFX and ZFY genes and its application for molecular sex determination. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2010, 27: 725–728.

Lear T. L., Bailey E.: Equine clinical cytogenetics: the past and future. *Cytogenet. Genome Res.* 2008, 120: 42–49.

Lear T. L., McGee R. B.: Disorders of sexual development in the domestic horse, *Equus caballus*. *Sex. Develop.* 2012, 6: 61–71.

Pieńkowska-Schelling A., Bugno, M., Owczarek-Lipska M., Schelling C., Slota E.: Probe generated by Y chromosome microdissection is useful for analysing the sex chromosomes of the domestic horse. *J. Anim. Feed Sci.* 2006, 15: 173–178.

Power M. M.: Chromosomes of the horse. In: *Advances in veterinary science and comparative medicine, domestic animal cytogenetics.* Hrsg. R.A. McFeely, Academic Press Inc., San Diego, 1990, 34: 131–167.

T. Raudsepp T., Durkin K., Lear T. L., Das P. J., Avila F., Kachro P., B. P. Chowdhary B.P.: Molecular heterogeneity of XY sex reversal in horses. *Anim. Genet.* 2010, 41: 41–52.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: *Molecular cloning – A Laboratory Manual.* Cold (2nd Edition). Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA

Sumner A. T.: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin; *Exp. Cell. Res.* 1972, 75: 304–306.

Korrespondenz

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

Manuskripteingang: 11. Oktober 2013

Angenommen: 15. Januar 2014