

Rozwój technik badawczych w cytogenetycznej analizie prawidłowości kariotypu koni*

Katarzyna Kowalska, Klaudia Pawlina, Magdalena Wojtaszek,
Wojciech Witarski, Monika Bugno-Poniewierska

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Genomiki i Biologii Molekularnej Zwierząt,
32–083 Balice k. Krakowa*

Problemy reprodukcyjne wynikające z nieprawidłowości kariotypu obejmujących chromosomy płci są u koni częściej wykrywane niż u innych gatunków zwierząt gospodarskich (Iannuzzi i in., 2004). Ocenia się, że 93% mutacji chromosomowych jest związanych z heterochromosomami, natomiast kolejne 1,5% obejmuje aberracje chromosomów płci wraz z autosomami (Chowdhary i Raudsepp, 2000). Niejednokrotnie konie obciążone aberracjami chromosomowymi nie przejawiają efektów fenotypowych czy behawioralnych, co skutkuje włączeniem ich do rozrodu. Z uwagi na to, że klacze późno osiągają dojrzałość hodowlaną oraz fakt, że są przeważnie eliminowane dopiero po drugim nieźrebnym sezonie rozrodczym, hodowca ponosi znaczne straty ekonomiczne związane z utrzymaniem jałowej bądź jałowięcej klaczy przez okres średnio 5 lat. Ze względu na wymierne straty finansowe spowodowane nosicielstwem nieprawidłowości kariotypu diagnozy cytogenetyczne mają ogromną wagę dla hodowli zwierząt gospodarskich (Bugno i Słota, 2007 a).

Pierwsze badania cytogenetyczne u koni zostały przeprowadzone na początku XX w. przez Kirillowa. Sądono, że kariotyp koni występuje

w systemie X0, a liczba chromosomów waha się od 20 do 34 (Wodsedalek, 1914). Dopiero dzięki badaniom przeprowadzonym przez Makino w 1942 r. opisano prawidłowy, występujący u koni system XY (Makino, 1942). Wraz z rozwojem technik analiz cytogenetycznych stwierdzono, że koń posiada 32 pary chromosomów, co potwierdziły późniejsze badania (Makino i in., 1963).

W latach 70. XX w. nastąpił rozwój technik barwienia różnicowego chromosomów – prążki G- (Seabright, 1971), Q- (Caspersson i in., 1970), C- (Arrighi i Hsu, 1971; Sumner, 1972), R- (Dutrillaux i Lejeune, 1971) oraz NOR (Goodpasture i Bloom, 1975), co umożliwiło pogłębioną analizę struktury chromosomów, jak również zaowocowało identyfikacją wielu rearanżacji chromosomowych. Obecnie obowiązujący wzorzec kariotypu konia został opracowany i opublikowany na II Międzynarodowej Konferencji Standaryzacji Kariotypów Zwierząt Domowych w Jouy-en Josas we Francji w 1989 r. (Richer i in., 1990). Podstawową rolę w opracowywaniu wzorców kariotypów odgrywa barwienie prążków G, gdyż pozwala ono na uzyskanie nawet kilkuset prążków (w zależności od stopnia kondensacji chromosomów) uwidaczniających obszary heterochromatyny bogatej w adeninę i tyminę, a tym samym ułatwia identyfikację par chromosomów homologicznych (fot. 1).

Heterochromatyna konstytutywna, będąca silnie skondensowaną i polimorficzną frakcją chromatyny, zawierającą niewiele genów, jest cennym źródłem wiedzy na temat chromosomów. Zazwyczaj bloki heterochromatyny konstytutywnej występują w okolicach centromerów, jednak

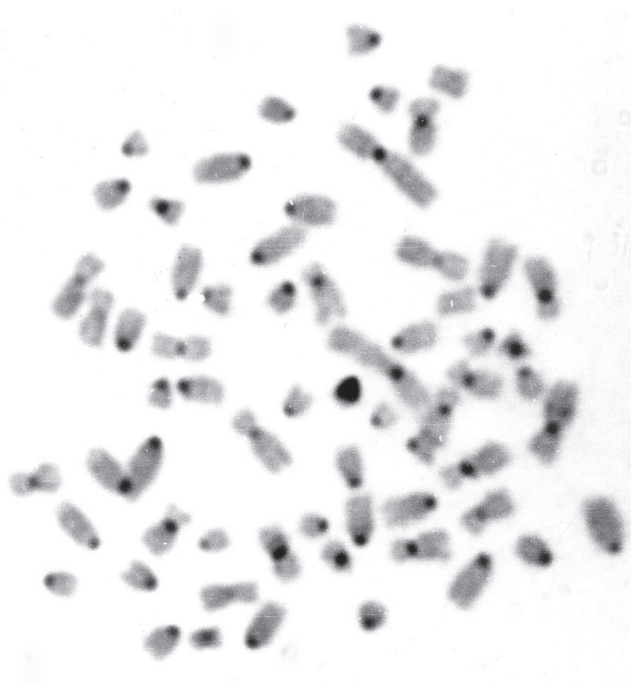
*Praca wykonana w ramach projektu „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju” współfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG, nr umowy: BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016.

mogą również znajdować się w części dystalnej ramion chromosomów. Ich wielkość może różnić się pomiędzy poszczególnymi parami chromosomów. Bloki te można uwidocznic techniką barwienia prążków C (Świtoński i in.,2006). U koni prążki C występują w okolicy centromerów

wszystkich par chromosomowych, poza parą jedenasną. W chromosomie X konia, poza dużym prążkiem w okolicy proksymalnej obserwuje się niewielki prążek heterochromatyny konstytutywnej w części interstycjalnej ramienia q (Richer i in., 1990) (fot. 2).



Fot. 1. Przykładowe zdjęcie przedstawiające obraz mikroskopowy chromosomów ogiera wybarwionych techniką GTG
Phot. 1. An indicative photo depicting microscope picture of stallion chromosomes stained with GTG technique



Fot. 2. Przykładowe zdjęcie przedstawiające obraz mikroskopowy chromosomów ogiera wybarwionych techniką CBG
Phot. 2. An indicative photo depicting microscope picture of stallion chromosomes stained with CBG technique

Kolejną metodą barwienia różnicującego zasługującą na uwagę jest barwienie obszarów jaderkotwórczych (NOR) azotanem srebra. W obszarach jaderkotwórczych zlokalizowane są geny kodujące rybosomalne kwasy rybonukleinowe (rRNA), a ich liczba jest cechą stałą i charakterystyczną dla danego gatunku (Weisenberger i Scheer, 1995). Istotą tej metody jest wysokie powinowactwo NOR do metali ciężkich. Jako efekt wysrebrzenia uzyskuje się obraz żółto-brązowych chromosomów i czarne obszary odpowiadające lokalizacji NOR. Należy jednak pamiętać, że metoda ta pozwala na obserwację jedynie tych miejsc zawierających geny rRNA, które były aktywne przy tworzeniu jąderka w poprzedzającej mitozę fazie (Babu i Verma, 1985; Verma i Babu, 1995). Wielkość depozytów srebra różnicuje chromosomy, umożliwiając identyfikację par homologicznych. U konia aktywne obszary jaderkotwórcze zlokalizowano w obrębie par 1, 28 oraz 31 (Richer i in., 1990; Świtoński i in., 1994; Kubień i Opiela, 2002). Badania Loginova i in. (1996) oraz Derjusheva i in. (1998) wykazały, że depozyty srebra można obserwować również na chromosomach 27 pary u koni zimnokrwistych i koników polskich.

Metody cytogenetyki klasycznej polegają na analizie obrazu prążków, uzyskanego przy wykorzystaniu konkretnego barwienia i porównaniu go z dostępnym wzorcem badanego gatunku. Jakość uzyskanych w hodowli płytek metafazowych, ich przejrzystość i rozmieszczenie chromosomów, a także ich indeks mitotyczny decydują o powodzeniu analizy. Metody opierające się na barwieniach różnicowych pozwalają na identyfikację aberracji o wielkości nie mniejszej niż 5 milionów par zasad.

Przełomem w cytogenetycznej diagnostyce występowania aberracji chromosomów, umożliwiającej szybką i precyzyjną analizę płytek metafazowych, było zastosowanie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (ang. *fluorescent in situ hybridization*; FISH), która w przeciwieństwie do technik prążkowych pozwala na analizę większej ilości płytek metafazowych, nawet o gorszej jakości i różnym stopniu spiralizacji chromosomów. Jest to szczególnie ważne w analizie prawidłowości kariotypu koni, u których większość nieprawidłowości występuje w formie

mozaiki o niskim procentowym udziale metafaz z zaburzeniami w liczbie chromosomów. Dzięki zastosowaniu techniki FISH możliwe jest precyzyjne określenie częstotliwości występowania poszczególnych linii oraz wykrycie mozaiki lub chimeryzmu, występujących już na poziomie 1% (Hook, 1977; Bugno i Słota, 2007 a, b; Bugno i in., 2007).

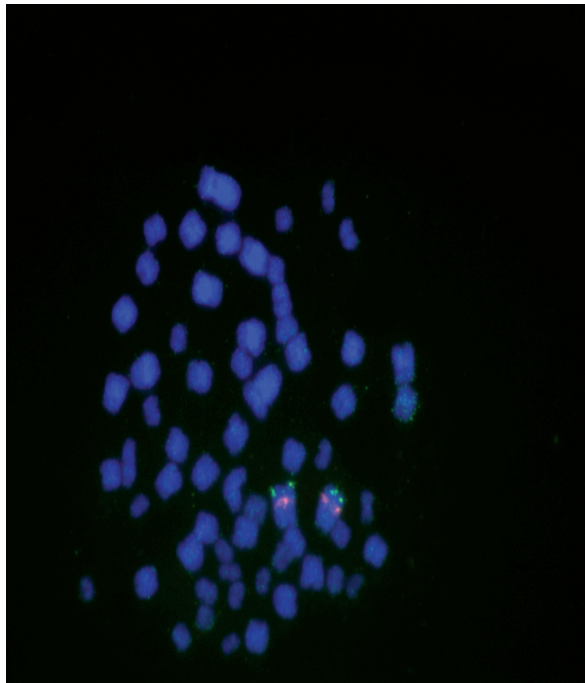
Hybrydyzacja *in situ* jest techniką, w której chromosom utrwalony na preparacie mikroskopowym wiąże się z komplementarną sondą w postaci wyznakowanego DNA. W technice tej są stosowane sondy molekularne dwojakiego typu w zależności od potrzeb diagnostyki. Wyróżnia się sondy locus-specyficzne zawierające konkretne fragmenty badanych genów oraz sondy malujące, będące mieszaniną fragmentów DNA charakterystycznych dla konkretnego chromosomu, obejmujące całe chromosomy bądź fragmenty ich ramion. Istotnym ograniczeniem metody jest potrzeba uprzedniego zaprojektowania konkretnej sondy, komplementarnej do chromosomu bądź jego fragmentu, w którym spodziewamy się zmiany.

Obecnie, dzięki rozwojowi molekularnych technik cytogenetycznych do analizy kariotypu możliwe jest wykorzystanie techniki porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH), polegającej na hybrydyzacji dwóch genomowych DNA: badanego i referencyjnego, wyznakowanych fluorescencyjnie dwoma różnymi barwnikami i zmieszanych w tej samej proporcji. Dysproporcje w intensywności fluorescencji w próbie badanej w stosunku do DNA referencyjnego świadczą o zaburzeniach w liczbie kopii analizowanych fragmentów genomu.

W odróżnieniu od fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, badanie metodą aCGH umożliwia identyfikację zmian w genomie bez uprzedniej wiedzy o ich istnieniu. Porównawcza hybrydyzacja genomowa na macierzach pozwala na ocenę wszystkich chromosomów w jednym badaniu. Istotnymi zaletami porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy aCGH są: czas badania, nie przekraczający kilku dni oraz możliwość identyfikacji niewidocznych w standardowym badaniu cytogenetycznym aberracji submikroskopowych z niespotykaną jak dotąd rozdzielczością, sięgającą kilkuset, a w niektó-

rych przypadkach kilku-kilkunastu par zasad (Szczałuba i in., 2010). Co istotne, do przeprowadzenia badania aCGH niepotrzebne są dobrej jakości preparaty mikroskopowe, lecz izolaty DNA. Metoda pozwala na jednoczesną identyfikację aneuploidii, duplikacji, delecji oraz amplifikacji każdego fragmentu genomu obecnego na macierzy. Ograniczeniem techniki jest natomiast niemożność wykrycia zrównoważonych aberracji chromosomowych, które nie wiążą się z nadmiarem lub utratą materiału genetycznego (translokacji wzajemnych czy inwersji).

Analiza wyników uzyskanych z macierzy, ze względu na ich specyficzną formę (tysiące punktów na szklanej płytce o różnej intensywności fluorescencji) oraz liczbę danych, wymaga zastosowania specjalistycznego oprogramowania. Zwykle oprogramowanie to jest dostarczane przez producenta macierzy i umożliwia określenie jakości badania, sprawdzenie czy są zachowane wszystkie parametry konieczne do uzyskania wiarygodnego wyniku, a także analizę danych, umiejscowienie zmian w genomie i określenie charakteru danej zmiany.



Fot. 3. Przykładowe zdjęcie przedstawiające obraz mikroskopowy chromosomów klaczy po zastosowaniu techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*

Phot. 3. An indicative picture depicting microscope picture of mare chromosomes after the application of fluorescence in situ hybridization technique

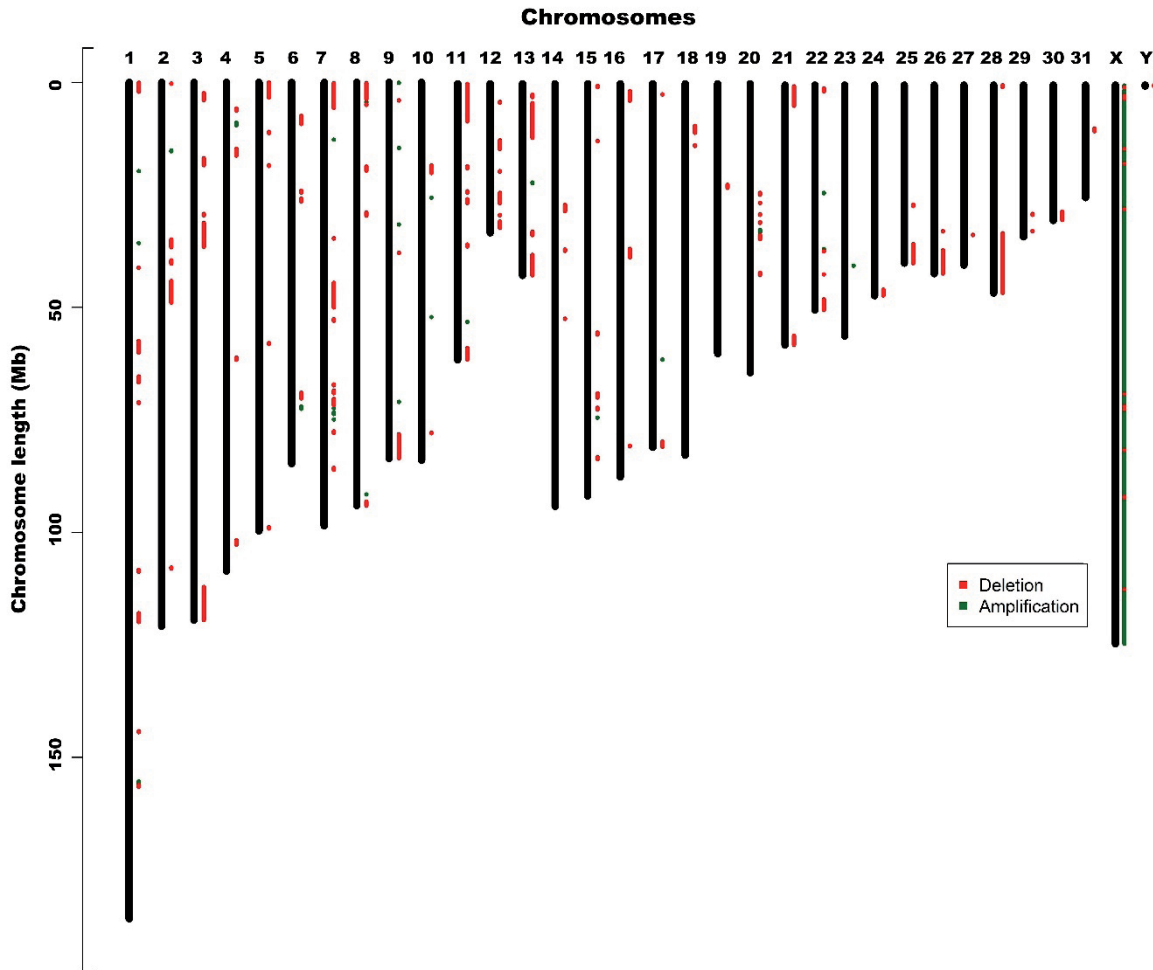
Początkowo twierdzono, że główną przyczyną genetycznej zmienności w populacji jest polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP) (Sachidanandam i in., 2001), który jest uważany za najpowszechniejszą formę polimorfizmu w genomie ssaków. W 2004 r. w dwóch niezależnych badaniach wykazano, że poza zmiennością typu SNP, w genomie ludzkim istnieje również polimorfizm strukturalny, tzw. zmienność ilości kopii (ang. *Copy Number Variation*) (Sebat i in., 2004;

Iafrate i in., 2004). Kolejne badania potwierdziły obecność CNV w genomach innych ssaków (Fadista i in., 2008; Fontanesi i in., 2010; Hou i in., 2011; Gurgul i in., 2013), w tym również koni (Doan i in., 2012). Warianty liczby kopii są definiowane jako segmenty DNA o wielkości od 1 kbp do kilku Mbp, w których zaobserwowano relatywne zwiększenie lub zmniejszenie liczby kopii w porównywanych genomach (Scherer i in., 2007). Zmienna ilość kopii DNA może mieć

istotny wpływ na fenotypową różnorodność, przystosowanie środowiskowe oraz podatność na choroby (Lin i in., 2009).

Technika porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH) pozwala na

identyfikację CNV, a co za tym idzie zmienności w genach kontrolujących rozwój płciowy, funkcje rozrodcze czy regulację hormonalną organizmu. Jest ona innowacyjną, wysoko precyzyjną metodą, dostarczającą ogromnych ilości danych.



Ryc. 1. Przykładowy wykres przedstawiający mapę rozmieszczenia CNV na chromosomach konia, uzyskany po analizie techniką porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (schemat własny)

Fig. 1. An indicative diagram depicting copy number variation arrangement map on horse chromosomes, obtained after the analysis with array comparative genomic hybridization technique (one's own scheme)

Kluczową rolę w diagnostycznych badaniach cytogenetycznych odgrywa dobór technik badawczych oraz czytelność uzyskiwanych obrazów mikroskopowych. Rozwój metod cytogenetyki molekularnej (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* – FISH, mikromacierze CGH – aCGH) umożliwia obecnie zwiększenie precyzyjności diagnostyki zaburzeń kariotypu. Dlatego też,

celem niniejszych badań jest pogłębiona analiza kariotypu koni, mających problemy rozrodcze i/ lub niedorozwój narządów płciowych. W celu wykonania badań zgromadzono materiał badawczy od 22 koni. Z krwi założono hodowlę limfocytów oraz wyizolowano DNA i zabezpieczono je do dalszych analiz. U 15 koni przeprowadzono analizę techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in*

situ z sondami specyficznymi dla heterosomów, zidentyfikowano 3 aberracje – 1 monosomię chromosomu X oraz 2 trisomie chromosomu X. Wykonano pogłębioną analizę z wykorzystaniem

porównawczej genomowej hybrydyzacji CGH na mikromacierzach u czterech koni o interseksualnym rozwoju narządów rozrodczych. Wyniki są aktualnie analizowane bioinformatycznie.

Literatura

- Arrighi F.E., Hsu T.C. (1971). Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*, 10 (2): 81–86.
- Babu K.A., Verma R.S. (1985). Structural and functional aspects of nucleolar organizer regions (NORs) in human chromosomes. *Int. Rev. Cytol.*, 94: 151–176.
- Bugno M., Słota E. (2007 a). Monitoring kariotypu koni pod kątem diagnozy wad genetycznych. *Wiad. Zoot.*, 45 (4): 41–44.
- Bugno M., Słota E. (2007 b). Application of arm-specific painting probes of horse X chromosome for karyotype analysis in an infertile Hutsul mare with 64, XX/65, XX+ Xp karyotype: case report. *Acta Vet. Hung.*, 55 (3): 309–314.
- Bugno M., Słota E., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C. (2007). A detection of equine X chromosome mosaicism in a mare using an equine X whole chromosome painting probe (WCPP) – a case report. *Acta Vet. Hung.*, 55 (2): 207–212.
- Caspersson T., Zech L., Johansson C. (1970). Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 60 (3): 315–319.
- Chowdhary B.P., Rausepp T. (2000). *Cytogenetics and physical gene map*. CAB international 2000. The genetics of the horse (Bowling A.T., Ruvinsky A., eds), pp. 171–242.
- Derjusheva S.E., Loginova J.A., Parada R., Chiryaeva O.G., Smirnov A.F., Jaszczak K. (1998). The comparative analysis of NOR polymorphism detected by FISH and Ag-staining on horse chromosomes. *Caryologia*, 51: 1–11.
- Doan R., Cohen N., Harrington J., Veazey K., Juras R. i in. (2012). Identification of copy number variants in horses. *Genome Res.*, 22: 899–907.
- Dutrillaux B., Lejeune J. (1971). Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *CR Acad. Sci. (Paris)*, 272: 2638–2640.
- Fadista J., Nygaard M., Holm L.E., Thomsen B., Bendixen C. (2008). A snapshot of CNVs in the pig genome. *PLoS One*, 3: e3916.
- Fontanesi L., Martelli P.L., Beretti F., Riggio V., Dall'Olio S. i in. (2010). An initial comparative map of copy number variations in the goat (*Capra hircus*) genome. *BMC Genomics*, 11: 639.
- Goodpasture C., Bloom S.E. (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*, 53 (1): 37–50.
- Gurgul A., Rubiś D., Ząbek T., Żukowski K., Pawlina K., Semik E., Bugno-Poniewierska M. (2013). The evaluation of the usefulness of pedigree verification-dedicated SNPs for breed assignment in three polish cattle populations. *Mol. Biol. Rep.*, 40: 6803–6809.
- Hook E.B. (1977). Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90% and 95%, and 99% confidence limits and comments on use. *Am. J. Hum. Genet.*, 29: 94–97.
- Hou Y., Liu G.E., Bickhart D.M., Cardone M.F., Wang K. i in. (2011). Genomic characteristics of cattle copy number variations. *BMC Genomics*, 12: 127.
- Iafate A.J., Feuk L., Rivera M.N., Listewnik M.L., Donahoe P.K. i in. (2004). Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat. Genet.*, 36: 949–951.
- Iannuzzi L., Di Meo G.P., Perucatti A., Spadetta M., Incarnato D., Parma P., Iannuzzi A., Ciotola F., Peretti V., Perrotta G., Di Palo R. (2004). Clinical, cytogenetic and molecular studies on sterile stallion and mare affected by XXY and sex reversal syndromes, respectively. *Caryologia*, 57 (4): 400–404.
- Kubień E., Opiela J. (2002). Cytogenetyczna ocena wybranych koni rasy konik polski. *Med. Weter.*, 58 (10): 784–787.
- Lin C.H., Lin Y.C., Wu J.Y., Pan W.H., Chen Y.T. i in. (2009). A genome-wide survey of copy number variations in Han Chinese residing in Taiwan. *Genomics*, 94: 241–246.
- Loginova J., Derjusheva S., Jaszczak K. (1996). Some cases of NOR instability in horse chromosomes. *Arch. Zoot.*, 45: 275–279.

- Makino S. (1942). The chromosomes of the horse (*Equus caballus*). *Cytologia*, 13: 26–38.
- Makino S., Sofuni T., Sasaki M.S. (1963). A revised study of the chromosomes in the horse, the ass and the mule. *Proc. Japan Acad.*, 39 (3): 176–181.
- Richer C.L., Power M.M., Klunder L.R., McFeely R.A., Kent M.G. (1990). Standard karyotype of the domestic horse (*Equus caballus*). *Hereditas*, 112 (3): 289–293.
- Sachidanandam R., Weissman D., Schmidt S.C., Kakol J.M., Stein L.D. i in. (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409: 928–933.
- Scherer S.W., Lee C., Birney E., Altshuler D.M., Eichler E.E., Carter N.P., Hurles M.E., Feuk L. (2007). Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nat. Genet.*, 39: S7–15.
- Seabright M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *The Lancet*, 298 (7731): 971–972.
- Sebat J., Lakshmi B., Troge J., Alexander J., Young J. i in. (2004). Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*, 305: 525–528.
- Sumner A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, 775 (1): 304–306.
- Szczałuba K., Obersztyń E., Mazurczak T. (2010). Zastosowanie nowoczesnych technik cytogenetyki molekularnej w diagnostyce wrodzonych wad rozwojowych. *Perinatol. Neonatol. Ginekol.*, 3 (2): 108–116.
- Świtoński M., Marcolla P., Pieńkowska A., Cholewiński G. (1994). Preliminary investigation on the inter-individual variation of the nucleolar organizer regions (Ag-NORs) in the horse karyotype. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 12 (9): 15–19.
- Świtoński M., Słota E., Jaszczak K. (2006). Diagnostyka cytogenetyczna zwierząt domowych. Wyd. AR w Poznaniu, Poznań; ss. 29–39.
- Verma R., Babu A. (1995). *Human chromosomes: Principles and techniques*. New York, McGraw-Hill Inc., New York, 419, pp. 55.
- Weisenberger D., Scheer U. (1995). A possible mechanism for inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. *J. Cell Biol.*, 129: 561–575.
- Wodśedalek J. (1914). Spermatogenesis of the horse with special reference to the accessory chromosome and the chromatoid body. *Biol. Bull.*, 27 (6): 295–324.

THE DEVELOPMENT OF RESEARCH TECHNIQUES IN CYTOGENETIC ANALYSIS OF HORSE KARYOTYPE REGULARITY

Summary

The main cause of genetic infertility in horses is the abnormality of the karyotype, especially of sex chromosomes. Due to the fact that mares reach sexual maturity relatively late and their elimination from reproduction occurs only after the second non-breeding season, cytogenetic diagnosis plays a crucial role in the breeding of these animals. In cytogenetic studies, the pattern of the karyotype of a particular species, which for the horse was developed in 1989, is of vital importance. Routine classical cytogenetic methods that allow for morphology and chromosome number evaluation include chromosomal banding (G, Q, C, R, and NOR bands). These techniques, however, are characterized by low resolution, require high quality of metaphases plates, and allow identification of aberration of not less than 5 millions base pairs. The dynamic development of cytomolecular methods (fluorescence *in situ* hybridization (FISH), CGH-a CGH microarray) enables enhanced diagnostics of karyotype disorders and the identification of submicroscopic aberrations with high accuracy.

Key words: horses, cytogenetics, FISH, aCGH

Fot. w art.: K. Kowalska