

BÉATA ZSUZSANNA KOVÁCS und GERALD STRANZINGER

Mit Liposomen unterstützte Leukozytenkulturen und Standardisierungsversuche für zytogenetische Präparationen

Herrn Kollegen Kräußlich in dankbarer Erinnerung an die gemeinsamen Tätigkeiten im Dienste einer modernen Tierzucht gewidmet –

Gerald Stranzinger

Summary

Title of the paper: **Liposome supported leukocyte cultures and standardisation for cytogenetic preparations**
There are considerable difficulties in making constant and qualitatively good chromosomal preparations from breeding animals. Varying animal material (without special management information), ingredients of the media, mitogenes, or different qualities of fetal calf serum are all influencing factors. We made experiments with liposomes, which have shown in the literature to improve the quality of chromosomal preparations. There are only a few examinations reported about optimizing the culture conditions for short term cultures, including the following chromosomal preparations as well.
These experiments have shown that fetal calf serum cannot be replaced by liposomes and the mitogene is obligatory for metaphases-

Key Words: leucocyte culture, cytogenetical preparation, liposome

Zusammenfassung

Bei Nutztieren bestehen erhebliche Schwierigkeiten, konstante und qualitativ hochstehende Chromosomenpräparationen zu erstellen. Als Einflussfaktoren können das variierende Tiermaterial ohne spezielle Haltungsinformation, die Medienzusammensetzung, Mitogene und unterschiedliche Qualitäten des fötalen Kälberserums genannt werden. Es wurden Versuche mit Liposomen gemacht, die in Literaturangaben zu einer Verbesserung der Chromosomenpräparationsqualitäten geführt haben. Es sind sehr wenige Untersuchungen zur Optimierung der Kulturbedingungen für Kurzzeitkulturen, inklusive anschließender Chromosomenpräparationen, bekannt. In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass fötales Kälberserum durch Liposomen nicht ersetzt werden kann und Mitogene in allen Fällen für die Bildung von Metaphasen notwendig sind.

Schlüsselwörter: Leukozytenkultur, zytogenetische Präparation, Liposom

Einleitung

Die wesentlichen Charakteristika der Mitose sind in fast allen lebenden Organismen ähnlich, was darauf hinweist, dass dieser Prozess im evolutionären Sinne alt ist. Ausnahmen stellen die Prokaryonten dar, d.h. Bakterien, Viren und blaugrüne Algen, bei denen die Teilung anders verläuft (MC DERMOTT, 1977). Der mitotische Zyklus besteht aus dem Ruhestadium der Interphase -während derer die Chromosomen nicht sichtbar sind- und dem Teilungsstadium der Mitose.

Obwohl schon vor der Jahrhundertwende mit Zellkulturen experimentiert wurde, konnte erst anfangs dieses Jahrhunderts gezeigt werden, dass bestimmte Zellen und Zelltypen *in vitro* normal und über längere Zeit weiterleben können (HARRISON, 1907; CARELL, 1912). Es dauerte aber noch etwa 50 Jahre, bis das Arbeiten mit Zellkulturen der Forschung allgemein zugänglich wurde.

MOORHEAD et al. (1960) erarbeiteten aufgrund bekannter Methoden (KRALLINGER, 1931) zur Kultivierung von Leukozyten und zur Lufttrocknung von Präparaten (ROTHFELS und SIMINOVITS, 1958) eine Technik zur Chromosomenpräparation aus kultivierten menschlichen Leukozyten der peripheren Blutbahn. Diese Methode wurde von CROSSLEY und CLARKE (1962), NICHOLS et al. (1962), BASRUR und GILMAN (1964), LIN et al. (1976) und FECHHEIMER (1971) auf die Präparation von Chromosomen landwirtschaftlicher Nutztiere angewendet.

Die Anlage von Zellkulturen bei Tieren weist einen bemerkenswerten Unterschied zu Kulturen beim Menschen auf, da Tiere meist zeitlich sehr befristet zur Verfügung stehen und somit in der Zeit der Verfügbarkeit der Tiere die Kulturen angelegt werden müssen. Entsprechend muss die Erfolgsrate der Anlage von Kulturen bei Tieren hoch sein und deren Überprüfung schnell erfolgen können.

Für die Zytogenetik und Chromosomenanalyse sind nur einheitlich verlaufende und gut für eine Zellteilung stimulierbare Zellkulturen einsetzbar. Leukozytenkulturen für Chromosomen-Analysen bei Nutztieren variieren in ihrer Qualität sehr stark, trotz langjähriger Erfahrungen und Berücksichtigung der möglicherweise beeinflussenden Faktoren wie:

- Benützte Antikoagulanzen (nur Na-Heparin)
- Blutentnahme mit Vakutainer durch geübtes Personal
- Ruhiges Umgehen mit den Tieren vor und während der Blutentnahme
- Schneller Versand der Blutproben unter Standardbedingungen
- Frühzeitiger Kulturmedienansatz unter Berücksichtigung der Medienzusammensetzung
- Wahl des richtigen Mitogens für die jeweilige Tierart (vorwiegend bei Nutztieren Pokeweed-Lecithin, selten Phythämagglutinin-PHA und Concanavalin)
- Einhaltung der Temperaturen, Gerätschaften, Zeiteinheiten, Durchmischung, etc.

Die Leukozytenkulturen für zytogenetische Analysen, deren Erfolgsquoten gegenwärtig sehr stark variieren, erfordern eine Standardisierung (FREYER et al., 1992). Ausserdem sind sie mit beträchtlichen Kosten verbunden und stellen auch ethische Probleme durch die Verwendung von fötalem Kälberserum (FCS) dar. Diese Komponente ist das einzige „problematische“ Material im Kulturmedium.

Nach unseren Erfahrungen im Zytogenetiklabor mit dem Einsatz des fötalen Kälberserums (FCS) wissen wir, dass diese Komponente einen grossen Einfluss auf die Qualität der Kulturen hat. Dies hat auch CONSTANTOULAKIS et al. (1990) beschrieben. Ein teilweiser oder totaler Ersatz des FCS durch andere Stoffe wäre aus zwei Gründen empfehlenswert:

1. FCS, meistens von ausländischen Firmen geliefert, wird aus Föten von Rindern gewonnen, deren Verwendung aus tierschützerischen Gründen in der Schweiz umstritten ist.

2. Die einzelnen Bestellchargen von verschiedenen Firmen unterscheiden sich in ihrer Qualität sehr stark, zum Teil ist FCS sogar toxisch.

Einerseits stellen Zellkulturen eine Alternative zu Tierversuchen dar, andererseits werden Produkte von Tieren für die Zellkulturen eingesetzt. Dieser Konflikt kann teilweise durch den Ersatz von FCS gelöst werden.

Die Menge des hinzugefügten FCS schwankt von 10% Anteil am Kulturmedium bis 30%, die meisten Autoren gaben 15-20% Anteil am Medium an. Auch Serum-freie Medien wurden zur Kultivierung verwendet, aber meistens waren die Resultate nicht zufriedenstellend (BATISSTA und SODERLAND, 1996; SATO und SUNAMOTO, 1993).

In Publikationen wird darauf hingewiesen, dass die Anwesenheit von Liposomen im Kulturmedium das Zellwachstum und die Mitose stimuliert, und so die gewünschte Standardisierung erreicht werden könnte (SATO und SUNAMOTO, 1993; BUCHBERGER et al., 1996). Diese Information wurde aufgenommen und die Wirkung der verschiedenen liposomalen Präparate untersucht. Die Aufmerksamkeit wurde besonders auf die folgenden Punkte gelenkt:

- Hohe Reproduzierbarkeit der Anlage von Zellkulturen
- Vereinheitlichung der Medienkomponenten
- Vereinheitlichung der Zellstimulation (Mitogene)
- Qualitativ bessere Chromosomenpräparationen für zytogenetische Analysen und weiterführende genetische Analysen
- Ersatz von Kulturkomponenten, wie FCS (fötales Kälberserum)

Werden Liposomen mit Zellkulturen in Kontakt gebracht, so interagieren sie mit den Proteinen und Lipiden der Zellmembrane (OSTRO, 1987; TALSMA und CROMMELIN, 1992).

Im Zusammenhang mit der Qualitätskontrolle von Chromosomenpräparationen bei Routineuntersuchungen in unserem Labor (über 1000/Jahr) konnten folgende zusätzliche zytogenetische Beobachtungen gemacht werden:

- Grosse Variabilität der homologen Chromosomen in der Länge und im Zentromerindex (in Routineuntersuchungen sind Bänderungsfärbungen aufwendig und werden nicht durchgeführt.)
- Grosse Variabilität der Länge bei Y Chromosomen.
- Einzeln auftretende Pulverisierungen der Chromosomen (mögliche Virusinfektion der Tiere unbekannter Natur)
- Chromosomenassoziationen und Verklumpungen (für Verklumpungen (stickiness) sind die Gründe weitgehend unbekannt, ev. könnten Chromatin- und Histonkomponente dafür verantwortlich sein)
- Spezielle Bruchfrequenzen an Chromosomen und einzelnen Tieren
- Auftretende terminale Erosionen, welche die Telomere und ihre Funktion beeinflussen können.

Material und Methoden

Alle Tiere stammten von den schweizerischen KB-Stationen. Von diesen Tieren, deren Haltung optimal und weitgehend standardisiert ist, wurden durch eine Person Blutpro-

ben genommen und nach dem Transport Kurzzeitkulturen (Leukozytenkulturen) angelegt. Die Methoden der Kurzzeitkulturen basieren auf den von HEDIGER (1988) ausgearbeiteten Verfahren.

5-10 ml Blut wurden steril mit Vacutainer aus der Hals- oder Schwanzvene entnommen. Die Röhrchen enthielten vorwiegend Natrium-Heparin, in Einzelfällen auch Lithium Heparin. Das Material wurde an das Institut geliefert und bei 4 °C zwischen wenigen Stunden und einem Tag lang gelagert. Das Blut wurde dann in das frisch vorbereitete Kulturmedium gegeben, wobei von jedem Tier mehrere Kulturflaschen (T 25) zubereitet wurden. Die Zusammensetzung des Standardmediums ist in der Tabelle 1. zusammengefasst.

Tabelle 1

Für Leukozytenkulturen vorbereitetes Standardmedium (Standard medium prepared for leukocyte cultures)

Kulturmediumbestandteile	Die gebrauchte Menge in ml./ Kultur
RPMI 1640	8
FCS	1,5
ABAM	0,1
Pokeweed	0,1
L-Glutamin	0,1

1,5 ml FCS wurde durch Liposomen in Mengen von 0,15 ml/ Kultur und 0,015 ml/ Kultur angesetzt, wobei die Menge und Konzentration empirisch eingestellt wurde. Auswertbare Resultate wurden aber nur durch die Konzentration von 0,015 ml/ Kultur erzielt. Die Konzentration von 0,15ml/Kultur war in allen Fällen toxisch.

Als Mitogen wurde Pokeweed-Lecithin verwendet.

Die Liposomen wurden von der VESIFACT AG geliefert. Die Zusammensetzung wird folgendermassen angegeben:

- Lipid: Soybean lecithin fat-free, pharmaceutical quality
Phosphatdidylcholine (PC) >95%
- Aqueous Phase: Sodium Chloride 0.33% (w/w)- Carrier unrelated substances:
Ethanol abs. 3.97% (w/w)

Grösse der Liposomenpartikel: Zwischen 80 und 100 nm.

Die Kulturflaschen befanden sich zuerst mit offenen Kappen im CO₂-Inkubator (5 % CO₂, 95 % Luft bei 37 °C). So konnte sich der pH-Wert auf 7,5 stabilisieren und die Temperatur angleichen. Nach einer Stunde wurden die Flaschen geschlossen. Das Medium war einen Tag vor dem Blutansatz vorbereitet worden. In alle Kulturflaschen wurde 1 ml Blut gegeben und in dem Brutschrank zuerst für eine Stunde mit offenen Kappen und anschliessend mit geschlossenen Kappen während 72 Stunden kultiviert. Um eine höhere Anzahl von Metaphasen zu erzielen, gab man in alle Kulturflaschen - 45 Minuten vor Kulturrende - das Spindelgift Colcemid in Konzentration von 0,025 µg / ml.

Der Inhalt der Kulturflaschen wurde in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und möglichst alle Zellen durch Spülung mit Medium gewonnen. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt und der Zellrest mit 0,075M KCl, hypoton behandelt. Zuerst wurde tropfenweise KCl, anschliessend kontinuierlich zunehmende Mengen von Flüssigkeit in die Röhrchen bis 8-10 ml appliziert. Nach dieser hypotonen Be-

handlung erfolgten nach den Zentrifugationen und Verwerten des Überstandes die Fixationen. Nach der 4. Fixation wurden die Kulturen in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht gelagert. Am nächsten Tag, nach einer weiteren Fixation, wurden die Zellen in einer empirisch vergleichbaren Konzentration auf Objektträger aufgetropft.

Speziell gereinigte Objektträger (5M HCl Lösung) wurden für die Präparationen verwendet. Zusätzlich wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser durchgespült und in 50 ml Falcon Tuben in bidestilliertem Wasser bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Beim Auftropfen hat man $180\text{ }\mu\text{l}$ Zellsuspension mit einer Pipette (Pipetmen) aufgenommen und die Zellen im Winkel von 45° - 85° auf die Objektträger aufgetropft. Diese wurden anschliessend im Winkel von 80° auf ein Fliesspapier abgestellt und in der Luft getrocknet.

Anschliessend wurden Chromosomenfärbungen durchgeführt, um:

1. die Anzahl Chromosomen zu bestimmen;
2. Aberrationen festzustellen;
3. und artunspezifische Chromosomen identifizieren zu können.

Bei allen Tieren wurde zur Auszählung und Beurteilung die Giemsa-Färbung angewandt. $2,5\text{ ml}$ Giemsa-Farbstoff wurde mit 75 ml Sörensenpuffer bei pH 6,8 gemischt. Die Objektträger wurden 14 Minuten lang in diese Lösung in die Färbeküvetten (hoch) getaucht und nachher mit bidestilliertem Wasser abgespült. Die Rückseiten der Objektträger wurden mit 70% Ethanol gereinigt. Die trockenen Objektträger wurden anschliessend auf Eukit mit Deckgläsern eingedeckt.

Resultate und Diskussion

Im Verlaufe der Experimente waren folgende Modifikationen in der Verarbeitungstechnik beobachtet und registriert worden, jedoch in der Auswertung zusammengefasst.

- Zeitraum zwischen Entnahme des Blutes oder Biopsien und Ansatz der Kultur
- Konzentration des FCSs im Kulturmedium
- Konzentration der Mitogene im Kulturmedium
- Art der Mitogene im Kulturmedium
- Konzentration der Liposomen im Kulturmedium
- Modifikation der Inkubationszeit
- Vergleichende Analyse der Chromosomenausbeute Leukozytenkulturen

Unter Berücksichtigung der Resultate sind vorwiegend die Modifikationen von Bedeutung, die für die Metaphasenzahl sowie „Metaphasenqualität“ verantwortlich sind.

Die Tabelle 2. zeigt folgende Ergebnisse:

64 Einzelexperimente wurden in der Auswertung zusammengefasst. Die zur Verfügung stehenden Tiermaterialien waren Blutproben, die bisher von Stieren der KB-Stationen angeliefert wurden. Zwei Tiere vom Versuchsgut Chamau wurden öfter als Vergleiche eingesetzt. Insgesamt wurden 21 Tiere in die Untersuchung einbezogen. Als Kontrollkulturen wurden die für die Praxis durchgeführten Analysen verwendet. Die Zusammensetzung des Kulturmediums entspricht dem im Institut (Zytopenetiklabor) für Routineuntersuchungen eingesetzten Verfahren.

Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Metaphasenzahl und Metaphasenqualität. Je weniger Metaphasen pro Objektträger vorhanden sind, desto schlechter ist auch die Qualität der Präparationen, wobei einzelne Ausnahmen zu beobachten waren.

Tabelle 2

Die zusammengefassten Ergebnisse der Kulturbedingungen mit und ohne die Komponenten Pokeweed, FCS und Liposomen (Summarised results of the culture condition with and without the components Pokeweed, FCS and Liposomes)

	1	2	3	4	5
Pokeweed	+	+	+	-	-
FCS	+	-	-	-	-
Liposomen	-	+	-	+	-
Anzahl Kulturen	21	23	9	7	4
Viele Meta- phasen in %	100	30,43	33,33	-	-
Wenig Meta- phasen in %	-	21,73	22,22	-	-
Keine Metaphasen in %	-	47,82	44,44	100	100

+: vorhanden, -: nicht vorhanden

viele Metaphasen > 50 pro Objektträger

wenig Metaphasen 5 - 50 pro Objektträger

keine Metaphasen < 5 in schlechter Qualität

Die Einteilung der Anzahl Metaphasen erfolgte nach dem in Tabelle 2 aufgeführten Schema, wobei die Laborerfahrung weitgehend berücksichtigt wurde und keine genauen Auszählungen erfolgten. Die Zusammenfassung der 3 Kategorien wird in Prozentanteilen gegenübergestellt.

FCS ist in Kurzzeitkulturen nicht unbedingt erforderlich und kann eventuell auch einen toxischen Effekt bei bestimmten Kulturansätzen von Tieren auslösen, wie unsere früheren Beobachtungen mit speziellen FCS Chargen zeigten.

Ein Gesichtspunkt, der vor allem in den letzten Jahren in Veröffentlichungen in den Vordergrund gerückt ist, stellt die breite Modifikation der Zusammensetzung des Kulturmediums dar.

Die Menge des hinzugefügten fötalen Kälberserums wurde nie speziell diskutiert und die Angaben schwanken von 10% Anteil am Kulturmedium bis 30 %. Die meisten Autoren geben 15-20% Anteil des fetalen Kälberserums am Kulturmedium an (WALLISER und SOMMER, 1967; VAN DEN BERGHE et al., 1977), ohne eine Begründung dafür zu geben. Auch Serum-freie Medien meist für Langzeitkulturen wurden verwendet (SONODA und OGAWA, 1988).

Eine gezielte Forschung zur Verbesserung der Zellkulturbedingungen, vorwiegend für Chromosomenpräparationen eingesetzt, findet man in geringem Ausmass. Eher empirisch erfasste und abgeleitete Kulturkomponenten sind oft unbegründet und auch meist sehr teuer. Die geringen Forschungsanstrengungen auf dem zytogenetischen Gebiet werden durch die zunehmend dominierende Rolle der Molekulargenetik weiter stark geprägt. In vielen Bereichen ist jedoch die Zytogenetik als Ausgangspunkt für die weiteren Präparationen, zum Beispiel bei der FISH und Zoo-FISH Technik, unabdingbar. Gleichzeitig wird die Chromosomenanalyse bei der genetischen Beratung immer

ein Eckpfeiler der Diagnose bleiben. Aus diesen Gründen wurde versucht, für die Verbesserung der Kulturbedingungen via Lymphozytenkulturen einen Beitrag zu leisten. Aus den Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass

1. Liposomen nicht als Ersatz für FCS dienen können;
2. Das Mitogen Pokeweed absolut notwendig ist, um Metaphasen zu erzielen;
3. Einige Zelltypen bei speziellen Tieren auch ohne FCS und/oder Liposomen eine Zellteilung zeigen.

Danksagung

Wir danken Prof. Dr. H. P. Weder, VESIFACT AG, für die Bereitstellung der Liposomen.

Literatur

- BASRUR, P.K.; GILMAN, J.P.W.:
Blood culture method for the study of bovine chromosomes. *Nature* 204 (1964), 1335-1337
- BATTISTA, P.J.; SODERLAND, C.:
Serum-free culture of human arterial and microvascular endothelial cells. *Focus* 17,3 (1996), 106-108
- VAN DEN BERGHE, H.; BORGSTRÖM, G.H.; BRANDT, L.; CATOVSKII, D.; DE LA CHAPELLE, A.; GOLOMB, H.M.; HOSSFELD, D.K.; LAWLER, S.; LINDSTEIN, J.; LOUWAGIE, A.; MITELMAN, F.; REEVES, B.R.; ROWLY, J.D.; SANDBERG, A.A.; TEERENHOYI, L.; VOUIPIO, P.:
Chromosomes in leukemia: General report on the first workshop on chromosomes in leukemia. *Cytogenet. Cell Genet* 19 (1977), 321-325
- BUCHBERGER, B.; FERNHOLZ, E.; BANTLE, E.; WEIGERT, M.; BOROWSKI, E.; v. d. ELTZ, H.; HINZPETER, M.:
DOSPER Liposomal Transfection Reagent: A Reagent with Unique Transfection Properties. *Biochemica* 2 (1996), 7-10
- CARELL, A.:
On the permanent life of tissues outside of the organism. *J. Exp. Med.* 15 (1912), 516-528
- CONSTANTOULAKIS, P.; NAKAMOTO, B.; PAPAYANOPOULOU, T.; STAMATOYANNOPOULOS, G.:
Fetal calf serum contains activities that induce fetal hemoglobin in adult erythroid cell cultures. *Blood* May 1; 75 (9) (1990), 1962-9
- CROSSLEY, R.; CLARKE, G.:
The application of tissue-culture techniques to the chromosomal analysis of *Bos taurus*. *Genet. Res.* 3 (1962), 167-168
- FECHHEIMER, N.S.:
Cytogenetic considerations in animal breeding. *Ann. Genet. Sel. Anim.* 3 (1971), 43-58
- FREYER, S.; WEUSTER-BOTZ, D.; WANDREY, C.:
Medienoptimierung mit Genetischen Algorithmen. *BioEngineering.* 5-6 (1992), 16-48
- HARRISON, R.G.:
Observations on the living developing nerve fibre. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (NY)* 4 (1907), 140-143
- HEDIGER, R.:
Die In situ Hybridisierung zur Genkartierung beim Rind und Schaf. ETH Zürich, Diss. No. 8725, 1988
- KRALLINGER, H.F.:
Cytologische Studien von einigen Haussäugetieren. *Arch. Tierernährung und Tierzucht* 5 (1931), 127-187
- LIN, C.C.; NEWTON, D.R.; SMINK, W.K.; CHURCH, R.B.:
A rapid and simple method for the isolation and culture of leukocytes for chromosome analysis in domestic animals. *Can. J. Anim. Sci.* 56 (1976), 27-31
- McDERMOTT, A.:
Zytogenetik des Menschen und anderer Tiere. Gustav Fischer Verlag, 1977, Stuttgart
- MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A.:
Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* 20 (1960), 613-616

- NICHOLS, W.W.; LEAVAN, A.; LAWRENCE, W.C.:
Bovine chromosomes by the peripheral blood method. *Hereditas* 48 (1962), 536-538
- OSTRO, M.J.:
Liposomes. *Scientific American*. 256 (1987) 1, 91-99
- ROTHPELS, K.H.; SIMINOVITS, L.:
An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro. *Stain Technol.* 33 (1958), 73-77
- SATO, T.; SUNAMOTO, J.:
Site liposomes coated with polysaccharides. *Liposome technology III* (1993), 179-198
- SONODA, Y.; OGAWA, M.:
Serum-free culture of human hemopoietic progenitors in attenuated culture media. *Am. J. Hematol.* 28 (1988), 227-231
- TALSMA, H.; CROMMELIN, D.J.A.:
Liposomes as Drug Delivery Systems. *Pharmaceutical Technology International*: November 1992: 24-34, December 1992: 34-38, January 1993, 36-42
- WALLISER, S.; SOMMER, K.:
Concentration of phytohemagglutinin and colchicine in examination of human chromosomes. *Stain Technol.* 42 (1967), 231-235

Eingegangen: 17.07.2000

Akzeptiert: 04.05.2001

Korrespondenz ist zu richten an:
Prof. Dr. GERALD STRANZINGER
Institut für Nutztierwissenschaften der ETH Zürich
und Vet. Fakultät der Universität Zürich
Tannenstrasse 1
CH-8092 Zürich
Schweiz