

DNA Diagnostik in der Tiermedizin, I. DNA Fingerprinting

Autor(en): **Schelling, C.P. / Thomann, P.E. / Hübscher, U.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **133 (1991)**

Heft 1

PDF erstellt am: **26.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-588363>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

DNA DIAGNOSTIK IN DER TIERMEDIZIN: I. DNA FINGERPRINTING

C. P. SCHELLING¹, P. E. THOMANN¹, U. HÜBSCHER

ZUSAMMENFASSUNG

Mit dem Aufkommen gentechnologischer Methoden in den letzten 15 Jahren wurde es möglich, genetische Variabilität direkt auf der DNA-Ebene zu untersuchen. Die Entdeckung von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) und hochvariabler Regionen (HVR) auf der DNA haben die Entwicklung von neuen genetischen Markern ermöglicht, welche zur Lokalisation von Genen auf Chromosomen eingesetzt werden können. Zum Teil sind diese Polymorphismen so hochvariabel, dass sie als DNA-Fingerabdruck (=DNA-Fingerprint) zur eindeutigen Identifikation eines Menschen oder Tieres herangezogen werden können.

SCHLÜSSELWÖRTER: hochrepetierte DNA-Sequenzen — DNA-Polymorphismus — DNA-Fingerprinting — Minisatelliten-DNA

EINLEITUNG

Genetische Marker bilden die Basis jeder genetischen Untersuchung. Bis in die späten 70er Jahre waren fast alle biochemischen Marker auf Proteinpolymorphismen, die serologisch oder gelelektrophoretisch nachgewiesen wurden, beschränkt. Die Information für diese Proteinpolymorphismen (Blutgruppen, Gewebsantigene = MHC = major histocompatibility complex, andere Proteine), die zur Identifikation eines Menschen oder Tieres herangezogen werden, ist in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) jedes einzelnen Individuums niedergeschrieben. Die Individualität ist also in der unterschiedlichen Basenabfolge der DNA-Sequenz begründet. Was läge näher, als direkt durch die Analyse der DNA eine fragliche Vaterschaft bei Tieren abzuklären oder beispielsweise die genetische Charakterisierung eines Mäuseinzuchtstammes durchzuführen? Die Entwicklung neuer molekularbiologischer Methoden hat aber nicht nur für die Identifikation einer Person oder eines Tieres grosse Fortschritte gebracht, sondern auch neue Wege in bezug auf die Untersuchung und Aufklä-

DNA-DIAGNOSTIC IN VETERINARY MEDICINE: I. DNA FINGERPRINTING

With the development of recombinant DNA-technology during the last 15 years, it became possible to analyse genetic variability directly at the level of genomic DNA. Restriction-Fragment-Length-Polymorphism (RFLP) and Highly-Variable-Regions (HVRs) lead to the development of new genetic markers, which can be used for the localization of normal and mutated genes. Some polymorphisms are hypervariable and can therefore be applied to carry out DNA-fingerprints thus identifying individuals from man and animals.

KEY WORDS: highly repeated DNA sequences — DNA polymorphism — DNA fingerprinting — minisatellite DNA

rung von bekannten und möglichen Erbkrankheiten eröffnet. So wurde es möglich, einzelne Gene direkt in der DNA zu untersuchen und auf den Chromosomen zu lokalisieren. Die Utopie von gestern, nämlich die direkte Untersuchung des Erbmaterials eines Menschen oder Tieres, ist heute Realität geworden.

Ziel dieser kurzen Übersicht ist es, das Prinzip der DNA-Fingerprinting-Methode zu erläutern und an Hand dreier Beispiele ihre mögliche Anwendbarkeit für Nutz- und Begleittiere aufzuzeigen.

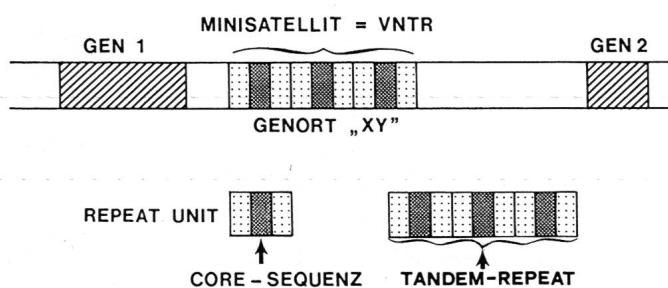
BIOLOGISCHE VORAUSSETZUNGEN

Strukturelle Aspekte der DNA

Der Gehalt an DNA im Genom eines Säugetieres oder Menschen ist weitaus grösser, als für die Kodierung sämtlicher Proteine nötig wäre. Es wird geschätzt, dass nur etwa 3 – 5 % der gesamten DNA kodierende Sequenzen darstellen, die in Proteine übersetzt werden (Nicholas, 1987; Landegren et al., 1988). Die restlichen 95 – 97 % der DNA bestehen zu unge-

fähr einem Drittel aus mittel- bis hochrepetierten Sequenzen, über deren Funktion bis heute wenig gesicherte Daten vorliegen (Nicholas, 1987; Hastie, 1989). Diese repetierten Sequenzen können über das Genom zufällig verstreut oder an einem bestimmten Genort gehäuft vorkommen. Beispiele zum ersten sind die Alu-Elemente (Houck et al., 1979), die SINE-Elemente (Short-Interspersed-Nucleotide Elements) oder die LINE-Elemente (Long-Interspersed-Nucleotide-Elements) (Singer, 1982a, b). Beispiele zu letzteren sind die Satelliten-DNA's. Vertreter dieser Klasse von DNA-Sequenzen sind einerseits die «eigentliche» Satelliten-DNA, die an Zentromer- und Telomer-Regionen der Chromosomen lokalisiert ist und andererseits die Midi-, Mini- bzw. Mikrosatelliten-DNA, die nicht an bestimmte Regionen der Chromosomen gebunden sind. Diese DNA-Abschnitte zeichnen sich dadurch aus, dass eine bestimmte Basensequenz (2 bis zu 7000 Basenpaare) in vielen Kopien hintereinander aufgereiht ist. Eine solche Basensequenz bezeichnet man als «Repeat-Unit» und deren tandemartige Anordnung auf dem Genom als «Tandem-Repeats» (Abb. 1). Die Einteilung dieser DNA-Abschnitte in Maxisatelliten (Gesamtlänge 500 000 – 10 000 000 Basenpaare; Willard und Wayne, 1987), Midisatelliten (Gesamtlänge 250 000 – 500 000 Basenpaare; Nakamura et al., 1987a), Minisatelliten (Gesamtlänge 100 – 200 000 Basenpaare; Jeffreys et al., 1985a) und Mikrosatelliten (Gesamtlänge 60 – 120 Basenpaare; Litt und Luty, 1989) erfolgt anhand der Gesamtlänge dieser Tandem-Repeats.

Abb. 1: Aufbau eines Minisatelliten. Details siehe Text



Polymorphismus (=Variabilität) der DNA

Es ist schon seit vielen Jahren bekannt, dass im Genom von Tieren und Menschen variable (polymorphe) DNA-Abschnitte vorkommen. Zum einen wird geschätzt, dass alle 200–500 Basenpaare zwischen homologen Chromosomen punktuelle Sequenzunterschiede bestehen (White und Lalouel, 1988), die durch Mutationsereignisse (Mikrodeletionen bzw. Mikroinsertionen) entstanden sind. Die Folge davon sind Basenta-

sche, die anhand von DNA-Restriktionsanalysen nachgewiesen werden können und als genetische Marker — z.T. erfolgreich — für die Genkartierung von Chromosomen eingesetzt werden (Botstein et al., 1980; White et al., 1985). Die Erkennung eines solchen Basenaustausches kann mit einem Restriktionsenzym erfolgen, dessen Erkennungssequenz vom Basenaustausch betroffen ist. Der Basentausch kann dazu führen, dass eine Schnittstelle eines Restriktionsenzym verloren geht, oder aber, dass durch Mutation eine zusätzliche Schnittstelle entsteht. Beide Fälle können anhand der unterschiedlichen Länge von DNA-Restriktionsfragmenten erkannt werden. Man bezeichnet dieses Phänomen als Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (= RFLP). Für einige RFLPs konnte auch eine Koppelung an Krankheitsgene nachgewiesen werden, welche jetzt zur prä- und postnatalen Diagnose verwendet werden können (Gusella et al., 1983; Reeders et al., 1985; Tsui et al., 1985) und zur Lokalisation und Identifikation dieser Gene geführt hat (Monaco et al., 1985). Die meisten dieser genetischen Marker weisen jedoch nur 2 Allele auf, was heisst, dass die Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym entweder vorhanden ist oder fehlt. Somit kann die Heterozygotierate innerhalb einer Population nicht grösser sein als 50 %; sie liegt meistens sogar deutlich tiefer. Als Folge davon sind diese Marker für eine Kopplungsanalyse oft nicht informativ.

Ausserdem wurden im menschlichen Genom ganze DNA-Abschnitte gefunden, die sich sehr polymorph verhalten. Ähnlich wie beim RFLP kann die Variabilität an der veränderten Länge von DNA-Restriktionsfragmenten erkannt werden. Die Ursache für den Längenpolymorphismus liegt aber nicht im Fehlen oder Hinzukommen einer Schnittstelle für ein Restriktionsenzym, sondern wird durch die unterschiedliche Anzahl hintereinander liegender Repeat-Units an einem bestimmten Genort erzeugt. Solche Sequenzen bezeichnet man als **Minisatelliten**. Einige dieser Minisatelliten sind sehr variabel und werden deshalb auch als *VNTRs* (= Variable Number of Tandem Repeats) bezeichnet. Alle Minisatelliten enthalten innerhalb jeder «Repeat Unit» ein Stück DNA, deren Sequenz praktisch in der Repeat Unit konserviert vorkommt. Sie wird auch als Core-Sequenz bezeichnet und ist je nach Minisatellit 10 – 16 Basenpaare lang. In vielen Fällen ist diese Sequenz durch einen hohen Guanin-Cytosin Gehalt gekennzeichnet (Jeffreys et al., 1985a; Nakamura et al., 1987b). Es wurden aber auch Minisatellitensequenzen im menschlichen Genom gefunden, die im Gegenteil Adenin-Thymin reich waren (Knott et al., 1986; Stoker et al., 1985). Alle diese hochvariablen Minisatelliten wurden meist zufällig bei Genanalysen in der DNA des Menschen entdeckt (Bell et al.,

DNA FINGERPRINTING

1982; Capon et al., 1983; Proudfoot et al., 1982; Goodbourn et al., 1983; Jarman et al., 1986; Chapman et al., 1986) und bilden sogenannte *Highly Variable Regions* (HVRs), die lediglich auf einem bestimmten Chromosom anzutreffen sind. Jeffreys und Mitarbeiter haben 1985 einen Minisatelliten im menschlichen Myoglobingen entdeckt, der, im Gegensatz zu den oben erwähnten HVRs, zu einer Familie von Minisatelliten gehört, die über das ganze Genom verteilt sind (Jeffreys et al., 1985a; Chandley und Mitchell, 1988) und bevorzugt in der proterminalen Region der Chromosomen, teilweise gekoppelt mit anderen variablen Sequenzen, lokalisiert sind (Royle et al., 1988; Armour et al., 1989b). Viele dieser Minisatelliten weisen pro Genort sehr viele (10 und mehr) verschiedene Allele auf, und die daraus folgende hohe Heterozygotierate innerhalb einer Population kann weit über 90 % liegen. Das macht diese Sequenzen zu sehr informativen genetischen Markern.

Die Evolution und Funktion dieser DNA-Sequenzen sowie die Frage, wie der hohe Gehalt an Variabilität innerhalb einer Population von Menschen aufrecht erhalten wird, sind nicht klar. Die Frage, ob Minisatellitensequenzen Opfer oder aktive Antreiber des DNA-Turnover sind, scheint berechtigt zu sein (Dover, 1989). Bis heute ist nicht klar, welche Mutationsmechanismen hauptsächlich für die Variabilität von Minisatelliten in Frage kommen (Übersichtsarbeit: Jarman und Wells, 1989). Verschiedenste Hinweise deuten jedoch darauf hin, dass hypervariable Minisatellitensequenzen an DNA-Rekombinationsereignissen direkt oder indirekt beteiligt sein könnten. Sequenzähnlichkeit der menschlichen Core-Sequenz mit dem bekannten Rekombinationssignal Chi in *E. coli* (Smith und Stahl, 1985) und mit einer Rekombinations-Hot-Spot Sequenz in der Maus (Steinmetz et al., 1986) haben zur Hypothese geführt, es könnte sich bei den hypervariablen Minisatelliten um Equivalente eines Rekombinationssignales beim Säuger handeln, die ungleiches Crossing over begünstigen und dadurch zur grossen Variabilität der Minisatellitensequenzen beitragen (Jeffreys et al., 1985a). Eine neuere Arbeit zeigt auch, dass in Säugetierzelllinien eine synthetische Minisatellitensequenz die homologe Rekombination stimulieren kann (Wahls et al., 1990). Zudem konnte auch ein Protein (ca. 40 000 Dalton) im Zellkernextrakt von Mäusen, Kaninchen, *Drosophila* und *Xenopus laevis* gefunden werden, das spezifisch an Core-Sequenz enthaltende DNA Sequenzen bindet (Collick und Jeffreys, 1990) und somit ein ähnliches Modell für den Mechanismus, wie es für die Chi-Sequenz bei *E. coli* beschrieben ist, aufgestellt werden könnte. Andere Arbeiten haben aber gezeigt, dass ungleiches Crossing-over kaum der Hauptmechanismus für das Entstehen von

neuen Längenallegen während der Meiose sein kann, da kein Austausch von flankierenden Markern nachgewiesen werden konnte (Wolff et al., 1988, 1989). Zudem scheinen die mutationsantreibenden Mechanismen nicht nur auf die Keimbahn beschränkt zu sein, sondern können auch im Soma wirksam sein (Armour et al., 1989a; Kelly et al., 1989). Weitere Untersuchungen müssen zeigen, wie weit andere Mutationsmechanismen wie «Replication Slippage» oder Genkonversion am Turnover von Minisatellitensequenzen beteiligt sind (Jeffreys et al., 1990).

Die Anzahl der Genorte, die gleichzeitig analysiert werden können, ist jedoch mit der soeben beschriebenen Methode beschränkt. Die verwendete eindimensionale Gelelektrophorese erlaubt nur die Analyse der längeren DNA-Fragmente (4 000–20 000 Basenpaare). Kürzlich wurde eine alternative Methode zur verbesserten Auftrennung der DNA-Restriktionsfragmente beschrieben. Für diese sogenannte **zweidimensionale DNA-Fingerprint-Methode** (Uitterlinden et al., 1989) werden die DNA-Fragmente nicht nur anhand der Grösse (1. Dimension), sondern zusätzlich in der 2. Dimension anhand ihrer Basensequenz und Basenzusammensetzung aufgetrennt (Lerman et al., 1984). Wir haben diese Methode, die beim Menschen beschrieben wurde, für die Maus, den Hund und für das Schwein grundsätzlich eingeführt (Schelling et al., 1991). Die resultierenden zweidimensionalen DNA-Fingerprintmuster sind den zweidimensionalen Proteinmustern ähnlich und enthalten 5–10 mal mehr Informationen als die eindimensionalen DNA-Fingerprintmuster.

DNA-FINGERPRINTING-METHODE: GENERELLE BESCHREIBUNG

Wie bereits erwähnt, gehört der von Jeffreys und Mitarbeitern (1985a) beschriebene Minisatellit zu einer ganzen Familie von VNTR-Sequenzen, die über das Genom verteilt sind und die alle eine sehr ähnliche Core-Sequenz in ihren Repeat-Units enthalten. An vielen Genorten, wo solche Minisatelliten vorhanden sind, ist eine hohe Variabilität (= Längenpolymorphismus) anzutreffen. Ausserdem wird die Variabilität durch interne Sequenzunterschiede einzelner Repeat-Units innerhalb eines Minisatelliten erhöht (Jeffreys et al., 1990). Mit Hilfe einer geeigneten radioaktiven DNA-Sonde (z. B. Minisatellit des genannten Myoglobingens) kann die genomische DNA untersucht werden. Jeffreys und Mitarbeiter entwickelten eine Methode, um **viele Genorte**, wo ein solcher Minisatellit vorhanden ist, gleichzeitig bezüglich der Variabilität zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurden solche Restriktionsenzyme für die Verdauung der genomischen DNA ausgewählt, die nur 4 Basenpaare als Erkennungsse-

quenz aufwiesen und deshalb sehr oft schneiden. Somit werden die Minisatellitensequenzen möglichst von anliegenden Sequenzen befreit. Die so entstehenden DNA-Fragmente sind in der Länge praktisch identisch mit den Minisatellitensequenzen, wie sie auf der DNA vorhanden sind.

Die so verdaute DNA wird der Grösse nach in einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 2). Anschliessend erfolgt ein Transfer dieser Fragmente auf eine Membran, ein Verfahren, das man als Southern-Methode bezeichnet. Damit nun diese Minisatelliten auf der Membran erkannt werden können, nimmt man eine bereits vorher isolierte, radioaktiv markierte Minisatelliten-DNA. Auf Grund der Komplementarität der Basen (Adenin gegenüber Thymin und Guanin gegenüber Cytosin) bindet die radioaktiv markierte Minisatelliten-DNA an die komplementäre Sequenz auf der Membran. Dazu müssen allerdings vorher die beiden DNA's denaturiert, d.h. in ihre einzelsträngige Form gebracht werden. Nach Waschen der Membran kann diese auf einem Röntgenfilm exponiert werden. Am Orte der Hybridisierung entsteht nun eine Bande (Abb. 2). Um die Erkennung dieser DNA-Fragmente zu verbessern, wurden mit molekularbiologischen Methoden radioaktive Sonden hergestellt, die nur aus aneinandergereihten Core-Sequenzen des Jeffreys Minisatelliten bestehen. Es hatte sich gezeigt, dass die «Nicht-Core-Sequenzen» einer Repeat Unit die Hybridisierung an die DNA-Fragmente stören. Auf diese Weise entstehen nun sogenannte genetische Fingerabdrücke des Individuums. Ihr Aussehen ist dem Strichcode auf Verpackungen sehr ähnlich.

Die Charakteristika der Fingerprint-Muster sind:

- 1) Ein Individuum (Mensch oder Tier) kann anhand seines Fingerprint-Musters eindeutig erkannt und identifiziert werden. Ausnahmen sind eineiige Zwillinge, die ein identisches Fingerprint-Muster aufweisen.
- 2) Je näher 2 Individuen verwandt sind, desto mehr gemeinsame Banden weisen ihre Fingerprint-Muster auf.
- 3) Die längeren DNA-Fragmente (4 000 – 20 000 Basenpaare) sind vor allem individualspezifisch, während die kürzeren ($\leq 4 000$ Basenpaare) eher artspezifisch zu sein scheinen.
- 4) Diese Banden werden nach Mendelschen Regeln von den Eltern auf ihre Nachkommen vererbt, d.h. die eine Hälfte der Banden im Fingerprint-Muster eines Kindes stammt vom Vater und die andere von der Mutter.
- 5) Die Banden zeigen ein kodominantes Verhalten, d.h. Heterozygotie (2 Banden) oder Homozygotie (1 Bande) können an einem Genort festgestellt werden.

Im weiteren ermöglicht es die Polymerase-Kettenreaktion (Hübscher, 1991) auch einzelne Genorte mit lokus-spezifischen Primern zu untersuchen (Jeffreys et al., 1988b; 1990).

DIE DNA-FINGERPRINTING-METHODE: PRAKTISCHE DURCHFÜHRUNG EINER ANALYSE

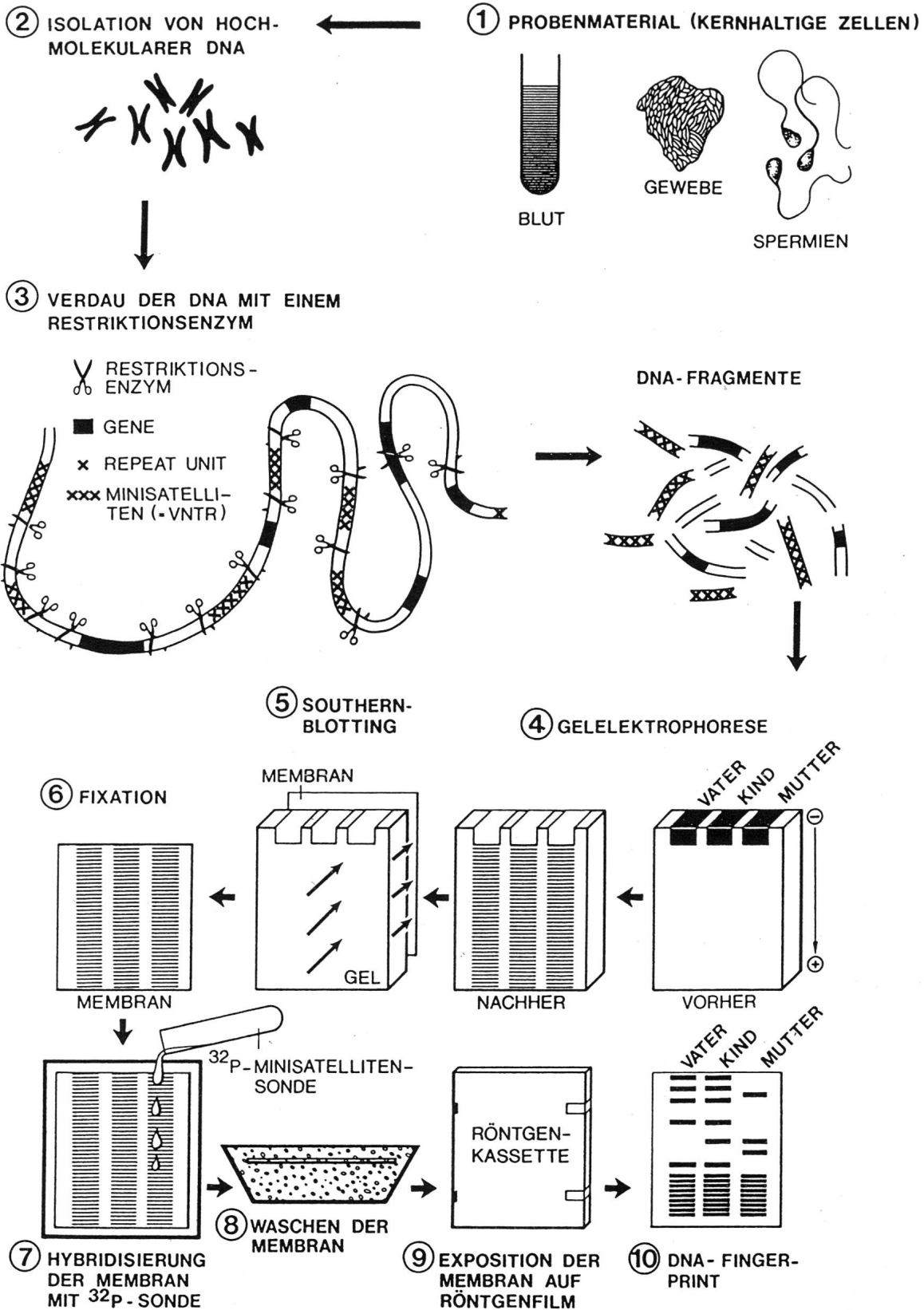
Die Abbildung 2 gibt einen schematischen Überblick über die einzelnen experimentellen Schritte, die im folgenden beschrieben werden:

In einem ersten Schritt muss von dem zu untersuchenden Individuum genügend hochmolekulare DNA aus kernhaltigen Zellen isoliert werden. Dazu können die Leukozyten des Blutes (einfachere Methode), aber prinzipiell auch kernhaltige Zellen anderer Gewebe (aufwendigere Methode) benutzt werden. Mögliche unterschiedliche Methylierungszustände der DNA (Methylierung des C5 des Cytosines) in den verschiedenen Geweben müssen dabei berücksichtigt und ausgetestet werden. Die hochmolekulare DNA ist äusserst anfällig auf Scherkräfte und muss deshalb sehr vorsichtig und schonend behandelt werden, um Strangbrüche zu minimalisieren. Nach der Isolation wird die DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten und so in eine grosse Anzahl Fragmente unterschiedlicher Länge zerlegt. Grundsätzlich können alle Restriktionsenzyme verwendet werden, wenn im Bereich der «Tandem-Repeats» keine Basensequenz vorkommt, die der Basenerkennungssequenz des verwendeten Restriktionsenzym entspricht (siehe auch oben). Im allgemeinen werden Restriktionsenzyme bevorzugt, die eine Erkennungs-Sequenz von 4 Basenpaaren aufweisen. Sie schneiden weit häufiger als Restriktionsenzyme, die 6 Basen als Erkennungssequenz haben. Man hofft damit, möglichst viele DNA-Fragmente zu erhalten, die praktisch nur aus «Tandem-Repeats» aufgebaut sind und fast keine zusätzliche DNA mehr besitzen. Eigene Experimente haben gezeigt, dass verschiedene Tierarten unterschiedliche Restriktionsenzyme für einen optimalen DNA-Fingerprint benötigen (Schelling, nicht publiziert).

Diese vielen verschiedenen langen DNA-Fragmente, die nicht alle notwendigerweise Minisatelliten-DNA enthalten, müssen in der Folge zuerst mittels einer Agarosegelelektrophorese aufgrund ihrer Länge aufgetrennt werden. Das erhaltene DNA-Fragment-Muster im Gel wird entweder elektrophoretisch, unter Vakuum, oder mittels Saugkräften auf eine Nylonmembran transferiert (Southern-Blotting-Verfahren). Vor dem Transfer werden die doppelsträngigen DNA-Fragmente durch eine Alkalibehandlung denaturiert, d.h. einzelsträngig gemacht, damit die später bei der Hybridisation verwendete einzelsträngige DNA-Sonde an die einzelsträngige DNA hybridisieren kann.

DNA FINGERPRINTING

Abb. 2: Die praktische Durchführung einer Fingerprintanalyse. Details siehe Text



Nach dem Transfer auf die Nylonmembran werden die einzelsträngigen DNA-Fragmente durch eine Hitzebehandlung oder eine UV-Bestrahlung optimal an die Membran festgeklebt. Jetzt ist die Membran bereit, um mit der radioaktiv markierten Minisatellitensonde inkubiert zu werden. Für das Aussehen der Bandenmuster spielen Faktoren, wie z.B. Temperatur, Salzstärke und Zeitdauer der Inkubation eine entscheidende Rolle. Durch Waschschrte werden die Sondenmoleküle, welche nicht oder nur unspezifisch gebunden haben, von der Nylonmembran entfernt. Auf der Nylonmembran bleiben nur diejenigen Sondenmoleküle zurück, die aufgrund der komplementären Basenpaarung an die Core-Sequenz der Minisatelliten-DNA gebunden haben.

Durch Exposition der Nylonmembran auf einem Röntgenfilm werden die DNA-Fragmente, welche Minisatelliten-DNA enthalten, als Schwärzungen auf dem Film sichtbar. Dies ergibt ein Muster von schwarzen Banden auf dem Film, das einem Strichcode ähnlich ist. Jedes Individuum sowie jeder Inzuchtstamm (z.B. Mäuse) haben ihr spezielles Bandenmuster. Die radioaktive Sonde kann wieder von der Membran entfernt und diese zur neuerlichen Hybridisierung mit einer anderen Sonde verwendet werden. Als Sonden kann man **charakterisierte sequenzierte DNA-Stücke** verwenden (z.B. Core-Sequenz von Jeffreys Minisatellit), die vorgängig in bakteriellen Vektoren leicht vermehrt werden können. Für die Untersuchung tierischer DNA kann man auch eine Sequenz aus dem Bakteriophagen M13-Wildtyp verwenden.

Tab. 1: Anwendungsbeispiele des DNA-Fingerprinting

Anwendung		Autor
1. Individuelle Identifikation	Mensch	<i>Jeffreys et al., 1985b</i>
	Tier	<i>Georges et al., 1988b</i>
	Pflanze	<i>Dallas, 1988</i>
2. Verwandtschaftsabklärungen	Mensch	<i>Gill et al., 1985; Jeffreys et al., 1985c; Wells et al., 1988</i>
	Tier	<i>Georges et al., 1988a</i>
3. Stammbaumanalysen	Mensch	<i>Jeffreys et al., 1986; Jeffreys und Morton, 1987</i>
	Tier	<i>Signer, 1989</i>
4. Prä- und postnatale Diagnose von genetischen Krankheiten	Mensch	<i>Jeffreys et al., 1986; Lewin, 1986</i>
5. Nachweis von ein- oder zweieiigen Zwillingen	Mensch	<i>Hill und Jeffreys, 1985</i>
6. Überwachung von Knochenmarkstransplantaten	Mensch	<i>Weitzel et al., 1988; Thein et al., 1986</i>
7. Erkennung von Chimären bei Mehrlingsgeburten	Mensch	<i>Farber et al., 1989</i>
8. Molekulargenetische Untersuchungen an der DNA	Mensch	<i>Nakamura et al., 1987b; Jeffreys et al., 1987, 1988; Thein et al., 1987; Amour et al., 1989</i>
9. Wildtierforschung	Vögel	<i>Wetton et al., 1987; Weiss et al., 1988</i>
	Wale	<i>Hoelzel und Amos, 1988</i>
10. Erstellen evolutionärer Stammbäume	Mensch	<i>Wainscoat et al., 1986</i>
	Tier	<i>Kuhnlein et al., 1989</i>

ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN DER DNA-FINGERPRINTING-METHODE

Die hochvariablen Minisatelliten-Sequenzen wurden zuerst im menschlichen Genom gefunden. Es zeigte sich, dass jedes Individuum durch die gleichzeitige Erfassung dieser polymorphen DNA-Abschnitte, anhand des genetischen Fingerprintmusters, eindeutig identifiziert werden konnte. Erste Anwendungsmöglichkeiten drängten sich vorerst in der Forensik auf. Anhand von kleinsten Spuren (Haarbälge, Hautfetzen, Blutropfen usw.) gelang es, Täter von Gewaltverbrechen zu überführen. Ein Gericht in England hat 1987 zum erstenmal einen Mann wegen Vergewaltigung auf Grund von DNA-Fingerprintanalysen aus Spermaspuren zu 8 Jahren Zuchthaus verurteilt (Nature, News 300, 1987).

Tabelle I gibt eine Übersicht über die verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten in Human- und Veterinärmedizin. Grundsätzlich hat sich herausgestellt, dass diese hochvariablen DNA-Abschnitte auch bei Tieren und Pflanzen vorhanden sind. Artsspezifische Sonden ermöglichen die Anwendung bei allen Tierarten.

Besonders erwähnenswert scheint der Einsatz der DNA-Fingerprinting-Methode im Zusammenhang mit neueren, z.T. noch theoretischen Methoden für die Tierzucht zu sein, die auch unter dem Namen «Reverse Genetics» (Orkin, 1986; 1989) und «Gene Introgression» (Beckmann und Soller, 1987) bekannt sind. Dabei werden mit Hilfe von genetischen Markern (z. B. DNA-Fingerprintmuster) indirekt Gene für ökonomisch wichtige Merkmale oder für Krankheiten lokalisiert und der Vererbungsmodus in Kopplungsanalysen untersucht. Die mit bestimmten Merkmalen korrelierten Marker (z. B. eine Bande im Fingerprintmuster) können dann als Selektionskriterium eingesetzt werden. Diese sogenannte Marker-Assistierte-Selektion (MAS) dürfte traditionelle züchterische Massnahmen bezüglich Effizienz und Zeitbedarf übertreffen (Soller und Beckmann, 1982; Smith und Simpson, 1987). So wurden beim Rind DNA-Fingerprintmuster als genetische Marker in Kopplungsanalysen für das Hypertrophiegen und den «roan» Locus eingesetzt (Georges et al., 1990). Auch für die Einbringung eines Gens von einer Population in eine andere («gene introgression») könnten DNA-Fingerprintmuster eine wichtige Rolle spielen (Hillel et al., 1990). Die eindeutige Lokalisation von Genen, die mit Hilfe dieser genetischen Marker durchgeführt werden kann, ist schliesslich der erste Schritt zur Isolation und Analyse ihrer Wirkungsweise. Gegenwärtig werden weltweit Anstrengungen unternommen, um eine grosse Anzahl genetischer Marker für Schwein, Rind und Hund zur Verfügung zu haben.

Wir wollen DNA-Fingerprintmuster bei der Maus als Identifikations- und Selektionsmittel brauchen. Beim Hund und Schwein dienen sie uns als genetische Marker für Kopplungsanalysen. Im folgenden werden drei Beispiele, die von uns untersucht wurden, kurz erläutert.

1. Anwendungsbeispiel:

Genetische Qualitätskontrolle bei Inzuchtmäusestämmen. Jedes Experiment liefert nur dann aussagekräftige und reproduzierbare Resultate, wenn die Bedingungen standardisiert und konstant gehalten werden können. Die qualitativen Anforderungen an die in der biomedizinischen Forschung verwendeten Versuchstiere, z. B. Ratten und Mäuse, sind sehr hoch. Neben einer standardisierten Umwelt (Futter, Klima, Soziologie) und der Gesundheit (Isolatoren, SPF-Bedingungen) müssen alle Mäuse eines Inzuchtstammes auch identisches Genmaterial aufweisen. Sie verhalten sich deshalb ähnlich wie eineiige Zwillinge und sollten folglich identische und für einen Stamm spezifische Fingerprintmuster haben. Auf diese Weise können mit dem DNA-Fingerprint auch sehr eng verwandte Stämme, wie C57 Bl/6J und C57 Bl/10 SnJ eindeutig unterschieden werden (Signer, 1989), was aufgrund von Adspektion oder Bestimmung von Serumenzym-Polymorphismen (Hartmeier, 1986) nicht möglich wäre. Daneben benutzen wir die stamm-spezifischen Fingerprintmuster als Hilfsmittel, um Tiere mit stabilem Genom für die Stammzucht zu selektionieren.

2. Anwendungsbeispiel:

Fettgehalt im Muskelfleisch bei Schweinen. Langjährige Selektion auf mageres Schweinefleisch hat zu einer teilweise extremen Abnahme des intramuskulären Fettgehaltes bei diesen Tieren geführt. Dabei tauchen innerhalb von bestimmten Würfen extreme Schwankungen im intramuskulären Fettgehalt auf. Andere Würfe wiederum zeigen uniform tiefe oder hohe intramuskuläre Fettwerte. Wir untersuchen deshalb Schweine-Linien verschiedener Rassen, um anhand von DNA-Fingerprinting-Analysen mehr über die Vererbung dieses Merkmals zu erfahren. Dabei werden die Banden in den Fingerprintmustern als genetische Marker benutzt.

3. Anwendungsbeispiel:

Berner Sennenhund. Ungefähr 300 Erkrankungen sind beim Hund bekannt, bei denen genetische Ursachen eine Hauptrolle spielen könnten (Patterson et al., 1989). Für ungefähr die Hälfte davon ist der Vererbungsmodus aufgeklärt. Im Gegensatz zum Menschen,

wo der autosomal dominante Erbgang vorherrscht (McCusick, 1986), bildet beim Hund der autosomal rezessive Erbgang den Hauptteil der aufgeklärten Erbkrankheiten (Patterson et al., 1989). Polygen bedingte Erkrankungen (z. B. Hüftgelenkdysplasie) dürften einen grossen Teil der noch nicht vollständig aufgeklärten Erkrankungen ausmachen. Am Tierhospital Zürich haben rund ein Drittel der vorgestellten Berner Sennenhunde Nierenprobleme. Davon ist die Glomerulonephritis mit 50 % die wichtigste Erkrankung (Preiss, in Vorbereitung). Die Maligne Histiozytose ist eine bei Mensch und Hund selten vorkommende proliferative Erkrankung, die beim Berner Sennenhund in den USA nachgewiesen wurde (Moore und Rosin, 1986). Verglichen mit den USA scheint in der Schweiz die Zahl der von Maligner Histiozytose betroffenen Berner Sennenhunde eher grösser zu sein und bestimmte Linien mehr als andere. Eine solche eindeutige rassenspezifische Häufung könnte ein Hinweis dafür sein, dass ein oder mehrere Gene innerhalb der Berner Sennenhunderasse vorhanden sind, vererbt werden und eventuell für eine Prädisposition oder direkt für die Erkrankungen verantwortlich sind. Die DNA-Fingerprinting-Methode ist auch für Hunde anwendbar (Jeffreys und Morton, 1987; Georges et al., 1988b; Meyer, 1990; Schelling et al., 1991). Wir wollen verschiedene Familien bzw. Linien von Berner Sennenhunden mit der DNA-Fingerprinting-Methode untersuchen. Dabei könnten mit den Erkrankungen korrelierte Banden im Fingerprintmuster diagnostisch als Marker eingesetzt und für Selektionsmassnahmen benutzt werden (MAS).

Diese drei Beispiele sollen zeigen, dass die DNA-Fingerprinting-Methode für verschiedene Gebiete der DNA-Diagnostik in der Veterinärmedizin herangezogen werden kann. Die Methodik ist grundsätzlich für sämtliche Tierarten anwendbar, muss allerdings für die jeweilige Spezies genauestens optimiert werden.

LITERATUR

- Armour S.A.L., Patel I., Thein S.L., Fey M.F., Jeffreys A.J. (1989a): Analysis of somatic mutations at human minisatellite loci in tumors and cell lines. *Genomics* 4, 328–334. — Armour S.A.L., Wong Z., Wilson V., Royle N.J., Jeffreys A.J. (1989b): Sequences flanking the repeat arrays of human minisatellites: association with tandem and dispersed repeat elements. *Nucl. Acids Res.* 17, 4925–4935. — Bell G.I., Selby M.J., Rutter W.J. (1982): The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature* 295, 31–35. — Beckmann J.S., Soller M. (1987): Molecular markers in the improvement of farm animals. *Biotechnology* 5, 573–576. — Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Amer. J. Hum. Genet.* 32, 314–331. — Capon D.J., Ellson Y.C., Levinson A.D., Seeburg P.H., Goeddel D.V. (1983): Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* 302, 33–37. — Chandley A.C., Mitchell A.R. (1988): Hypervariable minisatellite regions are sites for crossing-over at meiosis in man. *Cytogenet. Cell. Genet.* 48, 152–155. — Chapman B.S., Vincent K.A., Wilson A.C. (1986): Persistence or rapid generation of DNA length polymorphism at the zeta-globin locus of humans. *Genetics* 112, 79–92. — Collick A., Jeffreys A.J. (1990): Detection of a novel minisatellite-specific DNA-binding protein. *Nucl. Acids Res.* 18, 625–629. — Dallas J.F. (1988): Detection of DNA «fingerprints» of cultivated rice by hybridization with a human minisatellite DNA probe. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 6831–6835. — Dover G.A. (1989): DNA-Fingerprints: Victims or perpetrators of DNA turnovers? *Nature* 342, 347–348. — Farber C.M., Georges M., DeBock G., Verhest A., Simon P., Vassart G. (1989): Demonstration of spontaneous XX/XY chimerism by DNA fingerprinting. *Hum. Genet.* 82, 197–198. — Georges M., Hilbert P., Lequarré A.-S., Leclerc V., Hanset R., Vassart G. (1988a): Use of DNA bar codes to resolve a canine paternity dispute. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 577–579. — Georges M., Lequarré A.-S., Castelli M., Hanset R., Vassart G. (1988b): DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cytogenet. Cell. Genet.* 47, 127–131. — Georges M., Lathrop M., Hilbert P., Marcotte A., Schwers A., Swillens S., Vassart G., Hauset R. (1990): On the use of DNA-fingerprints for linkage studies in cattle. *Genomics* 6, 461–474. — Gill P., Jeffreys A.J., Werret D.J. (1985): Forensic application of DNA «fingerprints». *Nature* 318, 577–579. — Goodbourn S.E.Y., Higgs D.R., Clegg J.B., Weatherall D.J. (1983): Molecular basis of length polymorphism in the human zeta-globin gene complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 5022–5026. — Gusella J.F., Wexler N.S., Conneally P.M., Naylor S.L., Anderson M.A., Tanzi R.E., Watkins P.C., Ottina K., Wallace M.R., Sakaguchi A.Y., Young A.B., Shoulson I., Bonilla E., Martin J.B. (1983): A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306, 234–238. — Hartmeier G.E. (1986): Genetische Qualitätskontrolle bei Inzuchtmaüestämmen mittels biochemischer Methoden. *Vet.-med. Diss. Zürich.* — Hastie N.D. (1989): Highly repeated DNA families in the genome of *Mus musculus*. In: Genetic variants and strains of the laboratory mouse. Eds: M.F. Lyon and A.G. Serle, University Press Oxford, p.p. 559–573. — Hill A.V.S., Jeffreys A.J. (1985): Use of minisatellite DNA probes for determination of twin zygosity at birth. *Lancet* 21, 1394–1395. — Hillel J., Schaap T., Haberland A., Jeffreys A.J., Plotzky Y., Cahaner A., Lavi U. (1990): DNA-Fingerprints applied to Gene Introgression in Breeding Programs. *Genetics* 124, 783–789. — Hoelzel A.R., Amos W. (1988): DNA fingerprinting and «scientific» whaling. *Nature* 333, 305. — Houck C.M., Rinehard F.P., Schmid C.W. (1979): A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome. *J. Mol. Biol.* 132, 289–306. — Hübscher U. (1991): DNA Diagnostika in der Tiermedizin: Die Polymerase-Kettenreaktion. *Schweiz. Arch. Tierheilkunde* 133, 27–31. — Jarman A.P., Nicholls R.D., Weatherall D.J., Clegg J.B., Higgs D.R. (1986): Molecular characterization of a hypervariable region downstream of the human α -globin gene

DNA FINGERPRINTING

- cluster. *EMBO J.* 5, 1857–1863. — *Jarmann A.P., Wells R.A.* (1989): Hypervariable minisatellites recombinators or innocent bystanders? *Trends in Genetics* 5, 367–371. — *Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L.* (1985a): Hypervariable «minisatellite» regions in human DNA. *Nature* 314, 67–73. — *Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L.* (1985b): Individual-specific «fingerprints» of human DNA. *Nature* 316, 76–79. — *Jeffreys A.J., Brookfield J.F.Y., Semeonoff R.* (1985c): Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 317, 818–819. — *Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L., Weatherall D.J., Ponder B.A.J.* (1986): DNA «fingerprints» and segregation analysis of multiple markers in human pedigrees. *Am. J. Hum. Genet.* 39, 11–24. — *Jeffreys A.J., Morton D.B.* (1987): DNA fingerprints of dogs and cats. *Anim. Genet.* 18, 1–15. — *Jeffreys A.J., Wilson V., Kelly R., Taylor B.A., Bulfield G.* (1987): Mouse DNA fingerprints: analysis of chromosome localization and germ-line stability of hypervariable loci in recombinant inbred strains. *Nucl. Acids Res.* 15, 2823–2836. — *Jeffreys A.J., Royle N.J., Wilson V., Wong Z.* (1988a): Spontaneous mutation rates to new length-alleles at tandem repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature* 332, 278–281. — *Jeffreys A.J., Wilson V., Neumann R., Keyte J.* (1988b): Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucl. Acids Res.* 16, 1953–1971. — *Jeffreys A.J., Neumann R., Wilson V.* (1990): Repeat Unit Sequence Variation in Minisatellites: A Novel Source of DNA Polymorphism for Studying Variation and Mutation by Single Molecule Analysis. *Cell* 60, 473–485. — *Knott T.J., Wallis S.C., Pease R.J., Powell L.M., Scott J.* (1986): A hypervariable region 3' to the human apolipoprotein B gene. *Nucl. Acids Res.* 14, 9215–9216. — *Kuhnlein U., Dawe Y., Zadorny D., Gavora J.S.* (1989): DNA-Fingerprinting: a tool for determining genetic distances between strains of poultry. *Theor. Appl. Genet.* 77, 669–672. — *Landegren U., Kaiser R., Caskey C.T., Hood L.* (1988): DNA diagnostics – Molecular techniques and automation. *Science*, 242, 229–237. — *Lerman L.S., Fischer S.G., Hurley I., Silverstain K., Lumelsky N.* (1984): Sequence determined DNA separations. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 13, 399–423. — *Lewin R.* (1986): DNA fingerprints in health and disease. *Science* 233, 521–522. — *Litt M., Luty J.A.* (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 397–401. — *McCusick V.A.* (1986): Mendelian Inheritance in Man, 7th edn. The John Hopkins University Press Baltimore and London. — *Meyer B.* (1990): The influence of inbreeding on genetic polymorphism in Swiss Mountain Dogs. *Vet.-med. Diss. Bern.* — *Monaco A.P., Bertelson C.J., Middlesworth W., Colletti C.-A., Aldridge J., Fischbeck K.H., Bartlett R., Pericak-Vance M.A., Roses A.D., Kunkel L.M.* (1985): Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature* 316, 842–845. — *Moore P.F., Rosin A.* (1986): Malignant Histiocytosis of Bernese Mountain Dogs. *Vet. Pathol.* 23, 1–10. — *Nakamura Y., Julier C., Wolff R., Holm T., O'Connell P., Leppert M., White R.* (1987a): Characterization of a human «midisatellite» sequence. *Nucl. Acids Res.* 15, 2537–2547. — *Nakamura Y., Leppert M., Conell P., Wolff R., Hom T., Cluver M., Kumlín E., White R.* (1987b): Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235, 1616–1626. — *Nicholas F.W.* (1987): Types of DNA. In: *Veterinary Genetics*. Clarendon Press, Oxford, pp 24–27. — *Orkin S.H.* (1986): Reverse genetics and human disease. *Cell* 47, 845–850. — *Orkin S.H.* (1989): Forward and Reverse Genetics. In: *The Harvey Lectures*. A.R. Liss, New York, pp 57–76. — *Patterson D.F., Aguisse G.A., Fyfe J.C., Giger U., Green P.L., Haskins M.E., Jeziyk P.F., Meyers-Wallen V.N.* (1989): Is this a genetic disease? *J. Small Anim. Pract.* 30, 127–139. — *Preiss H.* (1991): Dissertation in Vorbereitung, Vet. med. Fakultät, Universität Zürich. — *Proudfoot N.J., Gil A., Maniatis T.* (1982): The structure of the human zeta-globin gene and a closely linked, nearly identical pseudogene. *Cell* 31, 552–563. — *Reeders S.T., Brenning M.H., Davies K.E., Nicholls R.D., Jarman A.P., Higgs D.R., Pearson P.L., Weatherall D.J.* (1985): A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. *Nature* 317, 542–544. — *Royle N.J., Clarskon R.E., Wong Z., Jeffreys A.J.* (1988): Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosomes. *Genomics* 3, 352–360. — *Schelling C.P., Clavadetscher E., Schärer E., Thomann P.E., Kuenzle C.C., Hübscher U.* (1991) in: *DNA-fingerprinting* (eds. T. Burke, A. J. Jeffreys, R. Wolff, G. Dolf), Birkhäuser Verlag, Basel. Two-dimensional DNA-fingerprinting in animals. — *Signer E.N.* (1989): DNA-Fingerprints zur Überwachung der Reinerbigkeit von Mäuse-Inzuchtstämmen, *Vet.-med. Diss. Zürich.* — *Singer M.F.* (1982a): Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int. Rev. Cytol.* 76, 67–112. — *Singer M.F.* (1982b): SINES and LINES: highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes. *Cell* 28, 433–434. — *Smith C., Simpson S.P.* (1986): The use of genetic polymorphism in livestock improvement. *J. Anim. Breed. Genet.* 103, 205–217. — *Smith G.R., Stahl F.W.* (1985): Homologous recombination promoted by Chi sites and RecBC enzyme of *E. Coli*. *Bioessays* 2, 244–249. — *Soller M., Beckmann J.S.* (1982): Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement: 2nd World Congr. Genet. Appl. Lives. Prod. (Madrid) 6, 396–404. — *Steinmetz M., Stephan D., Lindahl K.F.* (1986): Gene organization and recombinational hotspots in the murine MHC. *Cell* 44, 895–904. — *Stoker N.G., Cheah K.S.E., Griffin J.R., Pope F.M., Solomon E.* (1985): A highly polymorphic region 3' to the human Type II collagen gene. *Nucl. Acids Res.* 13, 4613–4622. — *Thein S.L., Jeffreys A.J., Blacklock H.A.* (1986): Identification of post-transplant cell population by DNA fingerprint analysis. *Lancet* 2, 37. — *Thein S.L., Jeffreys A.J., Gooi H.C., Cotter F., Flint J., O'Connor N.T.J., Weatherall D.J., Wainscoat J.S.* (1987): Detection of somatic changes in human cancer DNA by DNA fingerprint analysis. *Br. J. Cancer* 55, 353–356. — *Tsui, L.C., Buchwald M., Baker D., Braman J.C., Knowlton R., Schumm J.W., Eiberg H., Mohr J., Kennedy D., Plavsic N., Zsiga M., Markiewicz D., Akob G., Brown V., Helms C., Gravius T., Parker C., Rediker K., Donis-Keller H.* (1985): Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA-Marker. *Science* 230, 1054–1059. — *Uitterlinden A.G., Slagboom P.E., Knook D.L., Vijg J.* (1989): Two-dimensional DNA-Fingerprinting of human individuals. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 86, 2742–2746. — *Wahls P.W., Wallace L.J., Moore P.D.* (1990): Hypervariable minisatellite DNA

is a hotspot for homologous recombination in human cells. *Cell* 60, 95–103. — *Wainscoat J.S., Hill A.V.S., Boyce A.L., Flint J., Hernandez M., Thein S.L., Old J.M., Lynch J.R., Falusi A.G., Weatherall D.J., Clegg J.B.* (1986): Evolutionary relationships of human populations from an analysis of nuclear DNA polymorphisms. *Nature* 319, 491–493. — *Weiss M.L., Wilson V., Chan C., Turner T., Jeffreys A.J.* (1988): Application of DNA fingerprinting probes to old world monkeys. *Am. J. Primatol.* 16, 73–79. — *Weitzel J.N., Hows J.M., Jeffreys A.J., Min G.L., Goldman J.M.* (1988): Use of a hypervariable minisatellite DNA probe (33.15) for evaluating engraftment two or more years after bone marrow transplantation for aplastic anemia. *Br. J. Haematol.* 70, 91–97. — *Wells R.A., Wonke B., Thein S.L.* (1988): Prediction of consanguinity using human DNA fingerprints. *J. Med. Genet.* 25, 660–662. — *Wetton J.H., Carter R.E., Parkin D.T., Walters D.* (1987): Demographic study of a wild house sparrow by DNA fingerprinting. *Nature* 327, 147–149. — *White R., Leppert M., Bishop D.T., Barker D., Berkowitz J., Brown C., Callahan P., Holm T., Jerominski L.* (1985): Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes. *Nature* 313, 101–105. — *White R., Lalouel J.M.* (1988): Chromosome Mapping with DNA Markers. *Scientific American* 258, 20–28. — *Willard H.F., Wray J.S.* (1987): Hierarchical order in chromosome-specific human alpha-satellite DNA. *Trends Genet.* 3, 192–197. — *Wolff R.K., Nakamura Y., White R.* (1988): Molecular characterization of a spontaneous generated new allele at a VNTR locus: No exchange of flanking DNA sequence. *Genomics* 3, 347–351. — *Wolff R.K., Plaetke R., Jeffreys A.J., White R.* (1989): Unequal Crossingover between homologous chromosomes is not the major mechanism involved in the generation of new alleles at VNTR loci. *Genomics* 5, 382–384.

Le diagnostic à l'aide de DNA en médecine vétérinaire: I. DNA fingerprinting

Avec le développement de la technologie de ADN recombinant durant les 15 dernières années, il est devenu possible d'analyser la variabilité génétique directement au niveau de l'ADN génomique. Le polymorphisme de Longueur de Fragment de Restriction et les Régions Hyper-Variables conduisent au développement de nouveaux marqueurs génétiques, qui peuvent être utilisés pour la localisation de gènes normaux et mutés.

Certains polymorphismes sont hypervariables et peuvent de plus être utilisés pour réaliser des empreintes d'ADN (DNA-fingerprints), donc identifier des individus à partir d'hommes et d'animaux.

La diagnosi a livello del DNA: I. DNA fingerprinting

Negli ultimi quindici anni, con lo sviluppo di metodi d'ingegneria genetica, è divenuto possibile analizzare la variabilità genetica direttamente a livello dell'acido deossiribonucleico (DNA). La scoperta di polimorfismi della lunghezza di frag-

menti di restrizione (RFLP) e di regioni ad alta variabilità (HVRs) nel DNA, hanno permesso la messa a punto di indicatori genetici, i quali vengono utilizzati per localizzare geni, normali o mutati, all'interno del cromosoma.

L'alto grado di variabilità di queste sequenze polimorfe da individuo a individuo, è tale da permettere il loro uso come impronte digitali a livello del DNA, rendendo così possibile l'identificazione e il differenziamento di singoli individui, siano essi esseri umani o animali.

Adresse: Dr. C. P. Schelling
Institut für Labortierkunde
Universität Zürich-Irchel
Winterthurerstrasse 190
CH-8057 Zürich

Manuskripteingang: 15. Mai 1990

Maxutrim®

Die optimale Kombination von Sulfonamid und Trimethoprim für Hund und Katze:

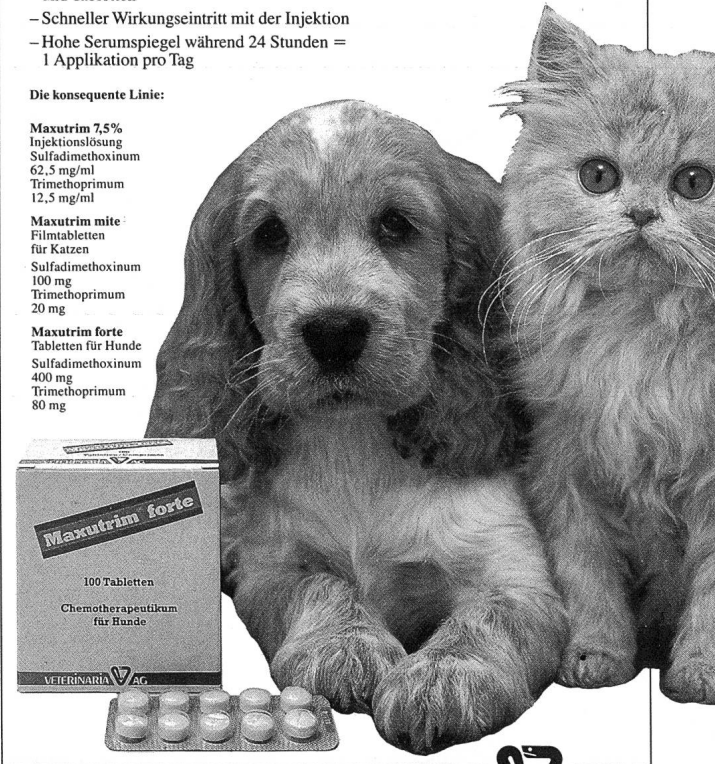
- Hervorragende Verträglichkeit von Injektionslösungen und Tabletten
- Schneller Wirkungseintritt mit der Injektion
- Hohe Serumspiegel während 24 Stunden = 1 Applikation pro Tag

Die konsequente Linie:

Maxutrim 7,5%
Injektionslösung
Sulfadimethoxinum
62,5 mg/ml
Trimethoprimum
12,5 mg/ml

Maxutrim mite
Filmtabletten
für Katzen
Sulfadimethoxinum
100 mg
Trimethoprimum
20 mg

Maxutrim forte
Tabletten für Hunde
Sulfadimethoxinum
400 mg
Trimethoprimum
80 mg



VETERINARIA AG
CH-8045 Zürich Grubenstrasse 40 Tel. 01 462 16 20