CARACTERIZACION DE UN PANEL DE CELULAS SOMATICAS HIBRIDAS BOVINO-HAMSTER MEDIANTE LA UTILIZACION DE STSs.

C. Elduque, P. Laurent, K. Saunier, H. Hayes, E.Petit, B. Weiss, A. Eggen y H. Levéziel

Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique. INRA Jouy en Josas, 78352 Jouy en Josas Cédex, FRANCE

Introducción

El desarrollo que ha experimentado la carta génica de la especie bovina, ha permitido la localización de regiones cromosómicas que afectan y regulan caracteres de interés económico en el ganado vacuno (Georges y cols., 1993, 1994). Entre los distintos métodos para la realización de un mapa génico, el uso de células híbridas entre dos especies distintas ha mostrado ser de gran eficacia para el desarrollo de los mapas físicos y para dirigir los estudios de ligamiento. Este método, unido a la utilización de marcadores tipificados mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), llamados STSs (sequence tagged sites) hace que la utilización de las células híbridas sea imprescindible para una rápida localización de un marcador nuevo en el genoma bovino y para orientar eficazmente el estudio de marcadores de regiones de interés (desarrollo de mapas de alta resolución de marcadores (~2 cM), creación de contigs de librerías de grandes insertos, detección de quimerismo de YACs...).

Un panel de células somáticas híbridas bovino-hámster realizado anteriormente (Hors-Cayla y Huertz, 1981) fue caracterizado y utilizado ampliamente por el grupo de Guérin y cols (1994) para la asignación de nuevos marcadores a grupos de sintenia bovinos. Sin embargo, la cantidad de ADN restante de este panel nos ha hecho plantear la necesidad de volver a poner en cultivo los diferentes clones de células híbridas y caracterizar en el nuevo panel los diferentes grupos de sintenia bovinos. Además en este trabajo, describimos la asignación de nuevos STSs a cromosomas bovinos, y la caracterización fina de este panel para dos cromosomas bovinos: BTA1 y BTA18.

Material y Métodos

Cultivo de clones y extracción de ADN según métodos descritos por Hors-Cayla y Huertz, (1981) y Guérin y cols (1994). Cebadores de los distintos STSs utilizados para la caracterización del panel han sido descritos por Barendse y cols. (1997), BovMap database (http://138.102.88.140/cgi-bin/bovmap/intro2.pl) o por Eggen y cols. (1996). PCRs llevados a cabo en un aparato Perkin Elmer 9600, en un

volumen final de 10 µl, conteniendo 50 ó 200 ng de ADN genómico, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 pmol de cada primer, 0.25 mM de cada dNTP, 1 U Taq DNA polimerasa en 1X tampón de Promega. Se han utilizado temperaturas de hibridación (Ta) que varían de 55°C a 68°C con alguno de los siguientes métodos: "3S": (94°C, 5'; [94°C, 30"; Ta, 30", 72°C, 20"] x 30 cycles; 72°C, 10'); "2S" (94°C, 5'; [94°C, 30"; Ta, 40"] x 35 cycles; 72°C, 10') o "Touchdown" (Don y cols., 1991). Los productos PCR han sido analizados en geles de agarosa (2 a 4%) teñidos con bromuro de etidio. Los análisis de correlación han sido realizados de acuerdo con Chevalet y Corpet (1986).

Resultados y Discusión

En el presente trabajo, 38 clones de celulas híbridas bovino-hámster han sido puestos en cultivo, y su ADN ha sido extraído en gran cantidad para asegurar que los análisis de sintenia realizados en los próximos años con este panel, tendrán el mismo contenido cromosómico, puesto que provienen de un número de pases idénticos del mismo clon. Los marcadores utilizados para la caracterización de este panel (~90 marcadores STSs), han sido elegidos entre los STSs localizados en el genoma bovino, de manera a tener una representación de todo el genoma bovino. Es decir, para cada cromosoma hemos elegido de dos a cinco marcadores separados entre ellos, con una distribución lo más homogénea posible. Los análisis han sido repetidos a dos concentraciones de ADN diferentes y los resultados discordantes han sido repetidos, para evitar en lo posible los errores debidos a confusiones del manipulador por una parte, y a la cantidad de ADN bovino presente en cada clon por otra. Los análisis de correlación han sido llevados a cabo entre cada marcador y todo el resto de marcadores analizados, y los resultados obtenidos nos llevan a concluir que nuestro panel es útil para realizar nuevas asignaciones de marcadores en los distintos cromosomas bovinos.

Asimismo, en este trabajo, hemos realizado la asignación de nuevos STSs contribuyendo al enriquecimiento del mapa físico bovino y al mapeo comparativo entre especies.

Por otra parte, hemos querido analizar si nuestro panel podría ser de utilidad para realizar asignaciones más finas, o regionales dentro de cada cromosoma. Los cromosomas bovinos en las células híbridas en muchas ocasiones no son retenidos en su integridad, sino que pueden ser segregrados porciones de la totalidad del cromosoma. Trabajos realizados en el hombre, y muy recientemente en porcino

(Lichter y cols. 1990; Yerle y cols., 1996), han combinado la utilización de la amplificación de productos PCR entre secuencias SINEs y la hibridación in situ por FISH, para la caracterización fina de las células híbridas, y su aplicación en la asignación regional en el mapa físico de nuevos marcadores. Sin embargo, en la especie bovina, ningún grupo ha tenido éxito por el momento en la utilización de este método. En este trabajo, y con el objetivo de caracterizar más finamente el contenido en este panel de, en principio, dos cromosomas bovinos (BTA1 y BTA18) sobre los que nuestro grupo trabaja en la actualidad, hemos analizado unos cincuenta STSs distribuidos a lo largo de su carta física y genética. Los resultados indican que en nuestro panel existen clones que contienen aparentemente la totalidad de uno o los dos cromosomas BTA1 o BTA18; otros clones han perdido pequeños segmentos de estos cromosomas, y detectamos otra serie de clones que contienen fragmentos más o menos grandes de dichos cromosomas. La recopilación de esta información es de un gran interés para el mayor conocimiento del contenido genómico bovino del panel de celulas híbridas, y permitirá la asignación regional de nuevos marcadores en estos cromosomas.

Bibliografía

Barendse, W., Vaiman, D., Kemp, S., Sugimoto, Y., Armitage, S., Williams, J., Sun, H., et al. (1997) A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mammal. Genome* (in press)

Chevalet, C. and Corpet, F. (1986) Statistical decision rule concerning synteny or independence beween markers. Cytogenet. Cell Genet. 43, 132-139.

Don, R.H., Cos, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K. and Mattick, J.S. (1991) "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res. 19, 14.

Eggen, A., Doud, L.K., Hayes, H., Murvke, B.T., Jurgella, G., Pfister-Genskow, M. Davis, S.K., Taylor, J.F. and Bishop, M.D. (1996) Construction of a YAC-contig in the vicinity of the polled locus in cattle. Proceedings for the XXVth International Conference on Animal Genetics. Anim. Genet. 27 (sup. 2),58-59.

Georges, M., Drinkwater, R., King, T. Mishra, A. Moore, S.S., Nielsen, D. Sargeant, L.S., Sorensen, A., Steele, M.R., Zhao, X., Womack, J; E. and Hetzel, J. (1993) Microsatellite mapping of a gene affecting horn development in Bos taurus. Nature genet. 4, 206-210.

Georges, M., Nielsen, D., Mackinnon, M., Mishra, A., Okimoto, R., Pasquino, A.T., Sargeant, L.S., Sorensen, A., Steele, M.R., Zhao, X., Womack, J. E. and Hoeschele, I. (1994) Using a complete microsatellite map and the grand-daughter design to locate polygenes controlling milk production. Anim. Biotech. 5, 219-224.

Guérin, G., Eggen, A., Vaiman, D., Nocart, M., Laurent, P., Béchet, D.and Ferrara, M. (1994) Further characterization of a somatic cell hybrid panel: ten new assignments to the bovine genome. Anim. Genet. 25, 31-35.

Heuertz, S. and Horst-Cayla, M.C.(1981) Cattle gene mapping by somatic cell hybridization study of 17 enzyme markers. Cytogenet. Cell Genet. 30, 137-145.

Lichter, P., Ledbetter, S.A., Ledbetter, D.H.and Ward, D. (1990) Fluorescent in sity hybridization with Alu and L1 polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cel lines. Proc natl Acad Sci, USA 87, 6634-6638.

Yerle, M., Echard, G., Robic, A., Mairal, A., Dubut-Fontana, C., Riquet, J., Pinton, P., Milan, D., Lahbib-Mansais, Y. and Gellin, G. (1996) A somatic cell hybrid panel for pig regional gene mapping characterized by molecular cytogenetics. Cytogenet. Cell Genet. 73, 194-202.