

ANÁLISIS DE LA SECCION 8 DEL CROMOSOMA X DE *Drosophila melanogaster* MEDIANTE EL USO DE CLONES YAC DE *Saccharomyces cerevisiae**

(Analysis of section 8 of X chromosome from *Drosophila melanogaster* by use of YAC clones in *Saccharomyces cerevisiae*)

Blanca Urzúa¹ Tito Ureta¹
Víctor Cifuentes²

1: Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular

2: Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias,
Universidad de Chile.

Las Palmeras 3425, Santiago, Chile.

Palabras clave: Cromosomas artificiales, *Saccharomyces cerevisiae*, hexoquinasa A.

Key words: Artificial chromosomes, *Saccharomyces cerevisiae*, hexokinase A.

RESUMEN

En *Drosophila melanogaster*, los genes estructurales que codifican para hexoquinasas A y B, se ubican estrechamente ligados en el cromosoma I (X). Estos loci corresponden a la región citológica 8D4-E1 en el mapa citogenético de dicho cromosoma.

Con el objetivo de determinar la ubicación exacta de los loci para hexoquinasas A y B se realizó un análisis molecular, mediante el uso de cromosomas artificiales de levadura, que contienen DNA de la sección 8 del cromosoma X. Para tal efecto, se aisló DNA cromosómico intacto de siete clones YAC de *S. cerevisiae* que cubren dicha región. El DNA fue resuelto mediante electroforesis de campo pulsado y analizado por hibridación con DNA del plásmido pBR322 y con un fragmento de DNA de 0,67 Kb de *D. melanogaster*, amplificado por PCR con partidores heterólogos específicos para hexoquinasas.

Los resultados de estos experimentos permitieron concluir que, la sonda homóloga es capaz de hibridar con el YAC II, lo cual coincide con la cobertura de este clon en la región citológica esperada.

INTRODUCCION

Los cromosomas artificiales de levadura fueron construidos, como una alternativa al empleo de cromosomas naturales, para el estudio de las relaciones entre la estructura cromosómica y el comportamiento de los mismos

SUMMARY

In *Drosophila melanogaster* the structural genes that code for hexokinases A and B are located closely together in chromosome I (X). These loci correspond to the 8D4-E1 cytological region in the genetic map of this chromosome.

A molecular DNA analysis of the section 8 of the X chromosome was carried out to determine the location of the loci for hexokinase A and B, by the use of artificial yeast chromosomes. To do this, intact chromosomal DNA of seven YAC clones of *S. cerevisiae* was isolated. The DNA was resolved by pulsed field gel electrophoresis and then, analyzed by hybridization with DNA of the pBR322 plasmid and with a 0.67 kb DNA fragment from *D. melanogaster*, amplified by PCR with heterologous primers specific to rat hexokinase. The results suggest that the homologous probe hybridized with the YAC II, which is in agreement with the cytologic region where the *Drosophila* hexokinase A-B genes are located.

durante la meiosis (Murray et al, 1983). Los cromosomas artificiales consisten de dos brazos que contienen los elementos funcionales constituyentes, esto es, los centromeros (CEN), que entregan información que actúa en cis, la cual es requerida para la separación adecuada durante los procesos de mitosis y meiosis (Burke, 1990).

* : Financiado por el proyecto Fondecyt 2920001

Los telómeros (TEL) que corresponden a secuencias necesarias para la formación y mantención de cromosomas lineales, las secuencias de replicación autónoma (ARS), que actúan como orígenes de replicación en las células de *S. cerevisiae* y dos marcadores genéticos de levadura, los cuales pueden ser el gen URA3 y TRP1, que están en lados opuestos del sitio de clonado (Burke et al., 1991). Estos vectores de clonamiento permiten la introducción de grandes fragmentos de DNA que varían entre 100 y 800 kb y se propagan en forma estable en *S. cerevisiae* (Burke et al., 1987). La introducción de los YAC como un sistema de clonamiento de DNA ha sido una de las avances más importantes en el estudio de los genomas (Burke et al., 1987), ya que entrega una herramienta para el clonamiento e identificación de fragmentos muy grandes de DNA de regiones cromosómicas de diferentes organismos, incluyendo el hombre (Burke et al., 1987). Insertos de DNA de mayor tamaño (de aproximadamente 40 kb), se lograban clonar en cósmidos, sin embargo, los YAC han aumentado el tamaño de los insertos en 10 a 20 veces, e incluso se puede considerar que no tienen límite teórico. Debido a su gran tamaño, la estimación de los insertos en los YAC se realiza mediante electroforesis de campo pulsado.

Los YAC han sido utilizados para identificar secuencias que se superponen como parte del proyecto del genoma de *Caenorhabditis elegans* (Coulson et al., 1988). En *Drosophila melanogaster*, YACs portadores de DNA genómico, extraídos de geles de electroforesis de campo pulsado, han sido utilizados en experimentos de hibridación in situ para determinar su ubicación en el mapa cromosómico (Garza et al., 1988).

En *Drosophila*, cada brazo cromosómico principal está dividido en 20 secciones numeradas. El cromosoma X acrocéntrico, comprende las secciones 1-20, el cromosoma 2 las secciones 21-40 (brazo izquierdo) y 41-60 (brazo derecho) y el cromosoma 3 las secciones 61-80 (brazo izquierdo) y 81-100 (brazo derecho). El pequeño cromosoma 4 comprende las secciones 101-102. A su vez, cada sección numerada está dividida en seis subdivisiones letradas (A-F) y cada subdivisión letrada contiene un promedio de alrededor de 9 bandas (en el rango de 2 a 28 bandas). Dentro de cada subdivisión letrada, las bandas se enumeran secuencialmente, de izquierda a derecha (Hartl, 1992., Ajioka, 1991). Así la región 8D4-E1, que señala la ubicación de los genes Hex A-B, significa que el o los genes caen en un punto no definido desde la cuarta banda de la izquierda en la subdivisión D, hasta la primera banda de la izquierda de la subdivisión E, en la sección 8 del cromosoma X de *Drosophila* (ver figura 1).

En el presente trabajo se utilizan siete clones de *S. cerevisiae* portadores de YACs, con insertos de DNA de *Drosophila* que definen la región citológica 8D4-E1, para

determinar la ubicación de un fragmento de DNA sintetizado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del DNA genómico de la cepa silvestre Oregón R de *Drosophila melanogaster*.

MATERIALES Y METODOS

Cepas.

En este estudio se utilizó la cepa AB 1380 de *Saccharomyces cerevisiae* como estándar (Carle et al., 1986). Los clones DYN04-21, DYE01-42, DYR07-36, DYN28-60, DYR16-01, DYR19-61 y DYN17-61 portadores de YAC de 370 kb, de 325 kb, de 350 kb, de 260 kb, de 210 kb, de 230 kb y de 180 kb respectivamente de *S. cerevisiae* fueron proporcionados por el Dr. Ian Duncan, Washington University. La cepa silvestre Oregón-R de la especie *Drosophila melanogaster*, obsequiada por el Dr. Danko Brncic de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, fue utilizada para extraer DNA.

Condiciones de cultivo.

Las cepas de *S. cerevisiae*, fueron cultivadas a 30 °C en medio YCD (Base de nitrógeno de levadura 0.67%, caseína hidrolizada 0.5%, glucosa 1%,) con agitación constante. Los suplementos nutricionales (aminoácidos y adenina) fueron agregados a una concentración final de 20 a 60 mg/ml.

Preparación de DNA cromosómico intacto de *Saccharomyces cerevisiae*.

El DNA cromosómico intacto fue preparado por el método del bloque de agarosa (Schwartz & Cantor, 1984) con algunas modificaciones. 5×10^9 células (en 50 ml de cultivo) de la cepa AB 1380 y los distintos clones portadores de cromosomas artificiales de *S. cerevisiae*, fueron precipitados por centrifugación a 4° C y 3.000 rpm durante 10 min. Luego fueron lavadas tres veces con EDTA 50 mM pH 7.5, resuspendidas en 500 µl de EDTA 50 mM e incubadas por 3 a 5 min a 45° C. Posteriormente, se agregó 35 µl de zymoliasa 100T a una concentración de 2 mg/ml e inmediatamente tres volúmenes de una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 1.3% en EDTA 125 mM pH 7.5. La mezcla fue agitada suavemente hasta homogeneizar la solución, depositada en moldes plásticos de 0,2 ml e incubada a 4° C por 5 a 10 min. Luego, los bloques fueron incubados en 5 ml de tampón LET (Schwartz & Cantor, 1984) durante 24 h a 37° C. Posteriormente, los bloques fueron lavados tres veces con EDTA 50 mM pH 8.0 e incubados en 2 ml de tampón NDS a 55° C por 24 horas. Finalmente, los bloques fueron lavados 3 veces con EDTA 50 mM a temperatura ambiente y fueron guardados en EDTA 50 mM pH 7.5 a 4° C por períodos cortos, o indefinidamente a -20° C en EDTA 25 mM, 50% glicerol.

Electroforesis de campo pulsado.

La electroforesis de campo pulsado fue realizada en un equipo BioRad CHEF DRII usando un electrodo hexagonal. Los geles fueron preparados con agarosa al 1,0% en tampón TBE 0,5X (Sambrook et al, 1989). Para la corrida electroforética se utilizó tampón TBE 0.5X. La temperatura del gel y del tampón de electroforesis fue mantenida a 14° C y con circulación constante. Los bloques de agarosa fueron depositados en los pocillos del gel y luego sellados con agarosa al 1% en tampón TBE. Las condiciones de electroforesis fue con pulsos de 70 seg por 24 horas y 120 seg por 11 horas a 165 volts. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ml) durante 60 min, luego desteñidos con agua destilada durante el mismo tiempo. El tamaño de los cromosomas artificiales fue determinado usando DNA de la cepa AB1380 de *S. cerevisiae* como patrón.

Hibridación de DNA.

La hibridación de DNA fue realizada mediante la técnica de Southern (Southern, E. 1975), tal como lo describe Sambrook et al, (1989). El DNA fue transferido desde los geles de agarosa a membranas de nylon (BRL) durante 10 a 12 horas, usando tampón de transferencia SSC 10X pH 7 (NaCl 1.5 M y citrato de sodio 0.15 M) y luego fijado a la membrana mediante irradiación con luz UV de 302 nm, durante 5 min. La pre-hibridación del DNA fue realizada en SSC 5X (NaCl 0.75 M y citrato de sodio 0.075 M), formamida al 45 %, Denhard 5X (ficoll al 1%, PVP al 1%, BSA al 1%), SDS al 0,5% y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón. Como sonda radiactiva se utilizó un fragmento PCR de 0.67 kb de *D. melanogaster*, clonado en pBluescript SK (+/-). La sonda de DNA fue marcada radiactivamente (a una actividad específica de 2×10^8 cpm/µg de DNA) con (alfa³²P) dCTP mediante el método de partidores al azar, descrito por Feinberg (1983). La hibridación fue realizada en la misma solución de pre-hibridación, en presencia de 50 ng de la sonda radiactiva, a 42° C con agitación suave durante 10 horas. Posteriormente, las membranas de nylon fueron lavadas en condiciones de alta estrictez y sometidas a autoradiografía a -70° C durante 24 a 48 horas y reveladas de manera rutinaria.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cobertura de los cromosomas artificiales de levadura (YAC) en el DNA genómico de la sección 8 del cromosoma X de *Drosophila*.

Los genes que codifican para hexoquinasa A y B en *D. melanogaster*, han sido localizados genéticamente a través del cruzamiento de moscas con algunas variantes

electroforéticas. A partir de este tipo de análisis, se conoce la ubicación de dichos genes en el mapa citogenético de *Drosophila*. Para realizar el análisis de la sección 8 del cromosoma X de *D. melanogaster*, se utilizaron siete clones YAC que han sido localizados a través del proyecto de secuenciación del genoma de *Drosophila* con clones YAC (Ajioka, 1991; Haini, 1994), mediante hibridación in situ, en la región citológica 8D4-E1 (Voelker et al, 1978). En esta región se ubican los genes Hex A-B. La figura 1 muestra un esquema de la organización de la región 8D4-E1 y la ubicación de los YACs. La tabla 1 resume algunas características relevantes respecto de los mismos.

Los clones DY, son cromosomas artificiales de levadura que contienen DNA genómico de embrión de *Drosophila* digerido con la enzima *NotI*, y fueron clonados en el vector pYAC5. En cambio, los clones DYR y DYE portan DNA genómico de moscas adultas parcialmente digerido con la enzima *EcoRI* y fueron clonados en el vector pYAC4.

En la figura 1, que muestra la cobertura de los diferentes clones YAC, se aprecia que sólo una pequeña parte de la sección 8 del cromosoma X (8C3-13) no queda cubierta por éstos, aún cuando, según la ubicación citológica determinada para los genes Hex A-B, la mayor parte de los YAC caen en esta región (sombreada en el esquema de la figura 1).

Ubicación de los cromosomas artificiales (clones YAC) en el genoma de la levadura.

Con el objetivo de determinar la ubicación de los clones YAC en el cariotipo electroforético de la levadura, se realizó electroforesis de campo pulsado de cada una de las cepas de *S. cerevisiae*, portadoras de los cromosomas artificiales que llevan grandes fragmentos de DNA genómico de *Drosophila* correspondiente a la sección 8 del cromosoma X. La figura 2A muestra una electroforesis de campo pulsado realizada en un gel de agarosa al 1.3 % en tampón TBE 0,5X. Este gel fue sometido a electroforesis durante 35 horas con pulsos de 70 seg por 24 horas y 120 seg por 11 horas a 165 V. Esta condición permite la visualización de los cuatro cromosomas más pequeños de *S. cerevisiae*.

En la figura 2A se indica, con una cabeza de flecha, la posición aproximada de las bandas correspondientes a cada cromosoma artificial, según su migración electroforética.

La figura 2B, muestra los resultados obtenidos en un experimento de hibridación, cuando se usa 50 ng de DNA del plásmido pBR322, utilizado como sonda radiactiva para la identificación por homología con la

Tabla 1: Características relevantes de los clones YAC, que contienen DNA genómico de la sección 8 del cromosoma X de *D. melanogaster*.

Nombre del Clon	Tamaño (kb)	Ubicación Citológica	Vector de clonado	Tipo de Librería DNA genómico de	
				embrión digerido con NotU.	moscas adultas digerido con EcoRI.
YAC I, DYN04-21	370	8B3; C1	pYAC5	+	--
YAC II, DYE01-42	325	8C13-14; D10-11	pYAC4	--	+
YAC III, DYR07-36	350	8A1; C2-3	pYCA4	--	+
YAC IV, DYN28-60	260	8D9-11; E3-4	pYCA5	+	--
YAC V, DYR16-01	210	8D10-11; E6-9	pYAC4	--	+
YAC VI, DYR19-61	230	8E1-2\ F1-2	pYAC4	--	+
YAC VII, DYN17-61	180	8E3-4; F9-10	pYAC5	+	--

Tabla 2. Hibridación del fragmento PCR de 0.67 kb con los cromosomas artificiales.

Nombre del clon	Hibridación con sonda radioactiva	
	pBR322	fragmento de 0.67 kb
AB1380 (control)	--	--
YAC I, DYN04-21	--	--
YAC II, DYE01-42	+++	+
YAC III, DYR07-36	++	--
YAC IV, DYN28-60	+++	--
YAC V, DYR16-01	+++	--
YAC VI, DYR19-61	+++	--
YAC VII, DYN17-61	+++	--

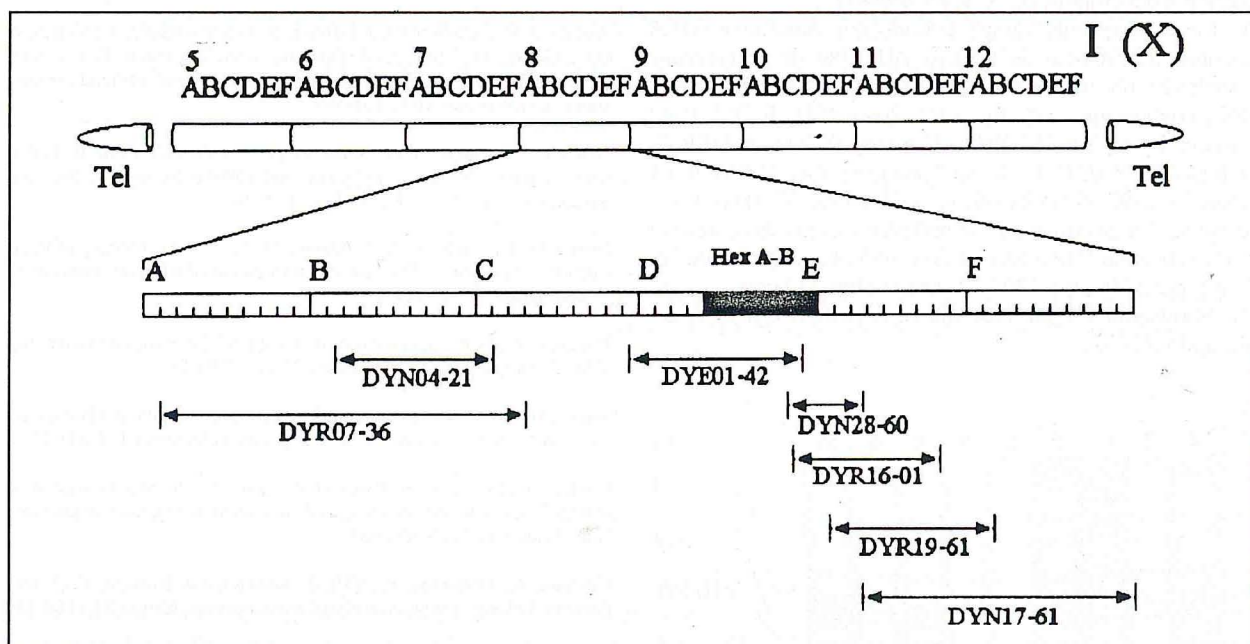
+ : señal de hibridación positiva. -- : señal de hibridación negativa.

parte plasmidial de cada YAC. Esto permite la ubicación precisa de los clones YAC en el cariotipo electroforético de la levadura. En la membrana mostrada en la figura 2 B se aprecian las señales de hibridación detectadas por pBR322, correspondientes a los clones DYN04-21 de 370 kb (canal 2), DYE01-42 de 325 kb (canal 3), DYR07-36 de 350 kb (canal 4), DYN28-60 de 260 kb (canal 5), DYR16-01 de 210 kb (canal 6), DYR19-61 de 230 kb (canal 7) y DYN17-61 de 180 kb (canal 8). En tanto que, no se observa señal de hibridación con DNA genómico de

levadura (cepa AB1380) usado como estándar de tamaño molecular (canal 1).

Análisis de hibridación de los cromosomas artificiales de levadura con un fragmento de 0,67 kb de *D. melanogaster*.

Con el fragmento de 0,67 kb de *D. melanogaster*, amplificado mediante PCR, utilizando como partidores dos oligonucleótidos correspondientes a una región conservada del gen de hexoquinasa A de rata, se realizó un

Figura 1. Ubicación de los YACs en la sección 8 del cromosoma I (X) de *Drosophila melanogaster*.

análisis de la sección 8 del cromosoma X que debiera contener el locus Hex A-B. Para ello, los siete clones que contienen cromosomas artificiales de levadura fueron resueltos mediante electroforesis de campo pulsado, en condiciones que permiten una mejor resolución de los cuatro cromosomas más pequeños de levadura y con ello de los cromosomas artificiales que tienen tamaños moleculares comprendidos entre 180 y 370 kb (ver tabla 1).

La tabla 2 muestra los resultados de una hibridación de los cromosomas de levadura con el fragmento de 0.67 kb marcado con 32 P-dCTP. La sonda detecta dos débiles señales de hibridación. Un análisis de superposición de las autoradiografías, revela que dichas señales corresponden al cromosoma artificial YAC II de levadura (clon DYE01-42), el cual se ubica en la región citológica 8C13-14; D10-11 (tabla 1). Además, no se detectan bandas de hibridación con la cepa AB 1380, usada como estándar de tamaño molecular y como control negativo del experimento. Estos resultados indican que la secuencia de 0,67 kb de *Drosophila*, que tiene similitud con hexoquinasa A de rata (demostrada por hibridación con cDNA de hexoquinasa A de rata), se ubica en alguna zona de estas 325 kb y la localización exacta en esta amplia región no puede ser determinada por este método. Sin embargo, cabe destacar que la ubicación citológica del clon YAC II coincide con la ubicación del locus Hex A-B determinada por métodos citogenéticos.

El análisis de los clones YAC usando como sonda el fragmento PCR de 0,67 kb de *Drosophila* mostró que la

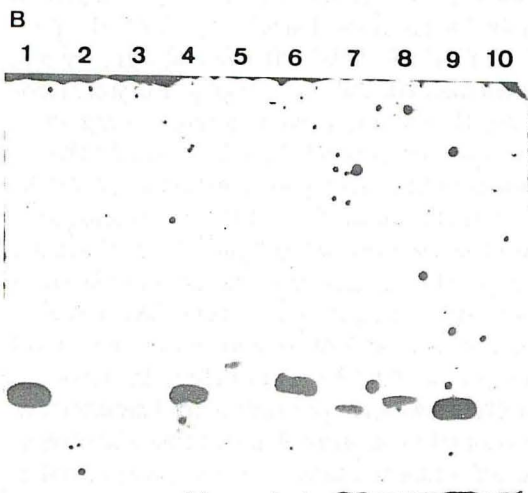
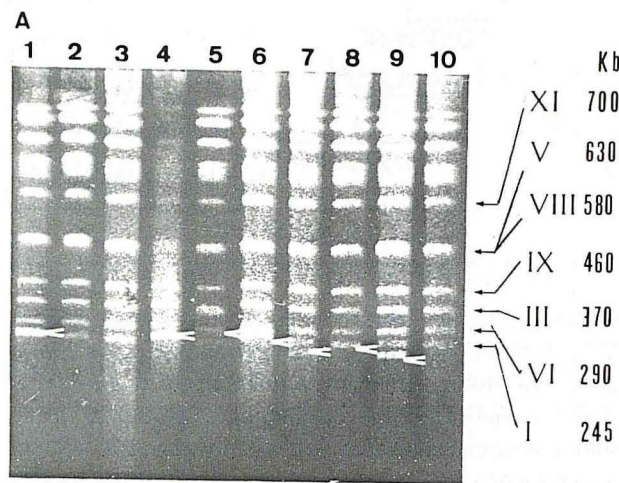
sonda detecta una débil señal de hibridación con el clon YAC II (DYE01-42 de 325 kb), lo cual coincide con la ubicación citológica dada previamente para los genes Hex A-B. La señal de hibridación obtenida es específica ya que sólo aparece en los canales, y en la banda correspondiente, que contienen DNA de este YAC (ver tabla 2) y no en todas las muestras y en bandas que pudieran indicar hibridación cruzada con los genes de levadura. La sonda no detecta señal de hibridación en los clones YAC I, YAC III, YAC IV, YAC V, YAC VI y YAC VII. Sin embargo, según la ubicación citológica de cada YAC (tabla 1 y figura 2), dos clones, YAC IV y V, presentan una pequeña región de solapamiento con el clon YAC II en la región D9-11. En conjunto estos datos permiten acotar la ubicación de los genes Hex A-B a las bandas C13-14;D8 en la sección 8 del cromosoma X de *Drosophila* (ver figura 1). Por otra parte, la débil señal de hibridación detectada por la sonda en el clon II podría deberse a que sólo una pequeña zona de las 325 kb abarcada por este YAC presentan identidad con el fragmento PCR de 0,67 kb. Para definir la región de hibridación con exactitud y precisión a nivel molecular es necesario realizar un análisis de restricción que corte el inserto de dicho clon en varios fragmentos y subclonar el fragmento positivo en un vector adecuado.

El uso de los cromosomas artificiales de levadura y la técnica de separación de DNA cromosómico intacto mediante electroforesis de campo pulsado, entrega elementos esenciales para el estudio de la organización de los genomas complejos en una amplia gama de aspectos. La ubicación de un segmento de DNA de *Drosophila*, en una

Figura 2. Análisis de hibridación de DNA genómico de la sección 8 del cromosoma X de *Drosophila*.

A) Electroforesis de campo pulsado que muestra el DNA cromosómico intacto de la cepa AB 1380 de *S. cerevisiae* (canales 2 y 10), usado como estándar de tamaño molecular, y el DNA cromosómico intacto de los clones YAC II DYE01-42 (canales 1 y 4), YAC I DYN04-21 (canal 3), YAC III DYR07-36 (canal 5), YAC IV DYN28-60 (canal 6), YAC V DYR16-01 (canal 7), YAC VI DYR19-61 (canal 8), YAC VII DYN 17-61 (canal 9). La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1,3% en tampón TBE 0,5X corrido a 165 Volts con pulsos de 70-70 seg por 24 horas y 120-120 seg por otras 11 horas.

B) Hibridación del gel mostrado en la parte A con DNA del plásmido pBR322.



región cromosómica definida es una de sus aplicaciones dentro de una gran número de ellas.

REFERENCIAS

Ajioka, J. W.; Smoller, D. A.; Jones, R. W.; Carulli, J. P.; Vellek, A. E.C., Garza, D.; Link, A. J.; Duncan, I. W. Y.; Hartl, D. L. (1991) *Drosophila* genome project: One-hit coverage in yeast artificial chromosomes. Chromosoma 100 : 495-509

Broach, J.; Pringle, J. & Jones, E. (1991). Part C. Table II: List of mapped genes. In: The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces. Vol 1. Eds C. S. H. L. Press.

Burke D. T.; Carle, G. F. & Olson, M. V. (1987). Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. Science 236:806-812

Burke, D.T. (1990). Special section: Yeast artificial chromosome cloning. YAC cloning: Options and problems. GATA 7:94-99

Burke, D. T. & Olson, M. V. (1991). Preparation of clone libraries in yeast artificial chromosome vectors. Methods in Enzymol.194:251-270

Carle, G.F.; Frank, M. & Olson, M.V. (1986). Electrophoretic separation of large DNA molecules by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. Nuc. Acids. Res. 12:5647-5664

Coulson, A.; Waterson, R.; Kiff, J.; Sulston, J. & Kohara, Y. (1988). Genome linking with yeast artificial chromosomes. Nature 335:184-186

Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132:6-13

Fothergill-Gilmore, L. A. & Michels, P. A. M. (1993). Evolution of glycolysis. Prog. Biophys. Molec. Biol. 59: 105- 235

Garza, D.; Ajioka, J.W.; Burke, D.T. & Hartl, D.L. (1988). Mapping the *Drosophila* genome with yeast artificial chromosomes. Science 246: 641-646

Haini, C.; Kiefel, P.; Yee, J. & Duncan, I. (1994). A yeast artificial chromosome clone map of the *Drosophila* genome. Genetics 136:1385-1399

Hartl, D. L.; Ajioka, J. W.; Cai, H.; Lohe, A. R.; Lozovskaya, E. R.; Smoller, D. A. & Duncan I. W. (1992). Towards a *Drosophila* genome map. TIG 8 : 70-75

Murray, A. W. & Szostak, J. W. (1983). Construction of artificial chromosomes in yeast. Nature 305:189-193

Sambrook, J.; Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory.

Schwab, D. A. & Wilson, J. E. (1989). Complete amino acid sequence of ratbrain hexokinase, deduced from the cloned cDNA, and proposed structure of a mammalian hexokinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 2563-2567

Schwartz, D. C. & Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 37:67-75

Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517

Voelker, R. A.; Langley, C. H.; Leigh-Brown, A. J. & Ohnishi, S. (1978). New data on allozyme loci in *D. melanogaster*. DIS 53:200