

DE YACs A COSMIDS: NOVA ESTRATEGIA APLICADA AL MAPATIE DE LA REGIO CENTROMERICA DEL CROMOSOMA Y HUMANA.

Mónica Bayés i Chris Tyler-Smith.

CRC Chromosome Molecular Biology Group. Department of Biochemistry. University of Oxford, U.K.

El centròmer és la part del cromosoma que interactua amb l'aparell mitòtic i garanteix la correcta segregació del cromosoma durant la divisió cel·lular. Durant els últims 10 anys s'ha analitzat en detall el DNA centromèric de molts cromosomes de *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*. Tot i així, les seqüències que funcionen com a centròmers en els cromosomes de mamífer encara no han estat identificades. En el Departament de Bioquímica de la Universitat d'Oxford s'està construint un mapa físic de la regió centromèrica del cromosoma Y humà, de gran utilitat per a realitzar després altres anàlisis de tipus funcional.

El grup disposa de diversos YACs (cromosomes artificials de llevat) amb DNA de la regió centromèrica del cromosoma Y. Però els clons de YACs poden ser difícils d'analitzar i de manipular i, per tant, la conversió d'un YAC en còsmids pot ser un pas molt útil en la caracterització de la regió clonada. Per això nosaltres hem utilitzat dos YACs d'aquesta regió (AA4 A7/11 i 13C1F), així com dues sondes convencionals (2D5 i Y190), per a escriure una genoteca en còsmids (LLOYNCO3 "M") construïda a partir d'un híbrid humà/ratolí que conté el cromosoma Y intacte. Els YACs AA4 A7/11 (290kb) i 13C1F (190kb) contenen DNA adjacent al DNA alfoïd (seqüència repetida en tàndem típica dels centròmers de primats), en el braç curt del cromosoma Y. 2D5 detecta una seqüència de còpia única present en ambdós YACs, mentre que Y190 reconeix una repetició en tàndem molt abundant en el cromosoma Y.

El principal problema en la utilització de YACs com a sondes és la presència de seqüències de DNA repetitiu en aquests. Per tal de bloquejar els llocs d'hibridació inespecífica es van prehibridar els dos YACs, un cop aïllats i marcats, amb DNA total humà (Sigma). Es van fer rèpliques de la genoteca i es van hibridar amb aquests dos YACs, així com amb les dues sondes convencionals. Es van trobar uns 500 còsmids positius que han estat classificats en els intervals definits per aquestes i altres sondes, cobrint una regió d'unes 300kb. Aquesta nova tècnica permet l'accés immediat al DNA del cromosoma Y contingut en YACs quimeres o en clons amb més d'un YAC. També simplifica l'anàlisi de YACs inestables.

Hi havia un interès particular per aïllar un còsmid que contingues un punt de ruptura fins ara només descrit en línies cel·lulars amb aberracions cromosòmiques. En el braç curt del cromosoma Y existeixen dos blocs de DNA repetitiu de diferent mida reconeguts per Y190, s'anomenen Y190 major i Y190 menor. Estudis de línies cel·lulars amb delecions en Yp revelen que hi ha un polimorfisme en quant a la localització dels dos blocs Y190, possiblement a causa d'una inversió. En l'ordenació més freqüent el bloc menor es troba en una posició proximal respecte al major. A partir dels còsmids positius per 2D5 hem realitzat un "walking" fins a trobar un còsmid que conté l'extrem proximal de Y190. La posició de les dianes de restricció en aquest còsmid indica que inclou el punt de ruptura en la inversió. Hem subclonat el còsmid en *ptz* i actualment estem tractant de trobar una sonda que permeti detectar la inversió en línies cel·lulars salvatges. Els polimorfismes fora de la regió pseudoautosòmica del cromosoma Y són força rars i, per tant, aquesta inversió polimòrfica podria ser de gran utilitat en estudis d'evolució humana (líniate patern).

Referències:

- Tyler-Smith. *Development* 101 supplement, 93-100 (1987).
- Tyler-Smith et al. *J. Mol. Biol.* 203, 837-848 (1988).
- Neil et al. *Nucleic Acids Res.* 18, 1421-1429 (1990).
- Baxendale et al. *Nucleic Acids Res.* 19, 6651 (1991).