

LOCALIZACIÓN DEL GEN DE LA SINTASA DE ACIDOS GRASOS (FASN) BOVINA EN EL CROMOSOMA BTA19 (19q22).

R. Roy,^a M. Gautier,^b H. Hayes,^b P. Laurent,^b R. Osta,^a P. Zaragoza,^a A. Eggen,^b & C. Rodellar^a

^aLaboratorio de Genética Bioquímica y Grupos Sanguíneos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

^bLaboratoire de Génétique Biochimique et de Cytogénétique, INRA-CRJ, Jouy-en-Josas, France

INTRODUCCIÓN.

La sintasa de ácidos grasos (FASN) juega un papel central en la lipogénesis de “novo” en mamíferos. Tiene 7 sitios activos codificados en la misma cadena polipeptídica. La FASN cataliza todos los pasos en la síntesis de palmitato a partir de acetil-coA y malonil-coA en presencia de NADPH. En animales, la síntesis de FASN es un proceso regulado que depende de la dieta y hormonas en todas las etapas de la vida del animal, incluso durante el desarrollo neonatal y diferenciación.

El gen de la FASN ha sido clonado y secuenciado en varias especies como la rata (M84761), pollo (J04485), ratón (X13135) y en la especie humana (NM004104). La FASN humana ha sido localizada sobre el cromosoma humano HSA17 (17q25) (Jayakumar et al. 1994). En relación a la FASN bovina, el presente trabajo supone la primera aportación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento de un fragmento de la FASN específico de la especie bovina.

Para ello se diseñaron dos primers a partir de la secuencia de rata (FASN1 y FASN2); (GenBank accession number: M84761). Con dichos primers se amplificó un fragmento de 180 pb del gen de la FASN bovina.

La reacción en cadena de la polimerasa fue llevada a cabo usando 20ng de DNA genómico. Las condiciones de amplificación fueron 94°C durante 30s, 55°C durante 30s y 72°C durante 30s. Estas condiciones se repitieron durante 30 ciclos.

El fragmento PCR obtenido fue clonado y secuenciado. La búsqueda de homología se llevo a cabo con el programa BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

Screening de una librería de BACs (Bacterial Artificial Chromosomes).

Los primers FASN1 y FASN2 se utilizaron para la búsqueda de BACs que contuvieran el fragmento aislado, perteneciente al gen de la FASN bovina (Eggen et al., in preparation). La talla de los BACs se determinó mediante FIGE (Field Inversed Gel Electroforesis): BAC 439G6, 50kb y BAC 817E11, 100kb.

FISH: Hibridación in situ fluorescente.

La hibridación in situ fluorescente se llevó a cabo sobre preparaciones de cromosomas bovinos (Hayes et al,2000). La sonda utilizada fue uno de los BACs

positivo para nuestro fragmento de 180pb. La sonda fue marcada con biotina y hibridada con una extensión de cromosomas bovinos, los cuales fueron identificados mediante bandeado RBQ.

Identificación de microsatélites en los BACs aislados.

Mediante digestión con *SauIII* y posterior ligación con un vector de clonación. Una vez ligados se transformaron bacterias y tras la hibridación con una sonda (AC)₁₀ se secuenciaron los clones positivos.

Análisis de un panel de células híbridas.

Este análisis se llevo a cabo usando un panel de 38 clones híbridos de hámster y bovino construido por Heuertz y Horst-Cayla (1981) y caracterizado por Laurent et al. (2000).

Los oligonucleótidos FASN1 y FASN2 fueron usados para detectar la presencia del fragmento de 180 pb que se había aislado previamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha aislado un fragmento de 180 pb de la FASN bovina con los primers FASN1 y FASN 2, diseñados a partir de la secuencia de FASN de rata. La secuencia bovina aislada (AF285607) ha mostrado un alto grado de similitud con el exón 32 de rata (Amy et al.,1992).

FASN1 y FASN2 se utilizaron para el screening de una librería de BACs. Se obtuvieron 8 clones positivos. De uno de ellos (439G6) se hizo una extracción del DNA procedente del BAC para realizar el FISH. Se obtuvo hibridación sobre el cromosoma bovino BTA19 y concretamente en la región 19q22 proximal. Esta señal de hibridación se observa en la Figura 1.

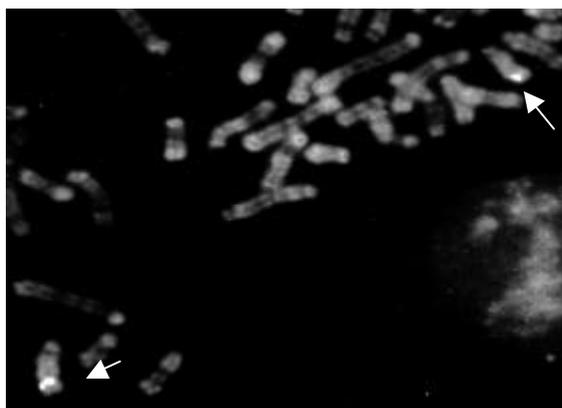


Figura1. Mapeo cromosómico de la FASN mediante FISH. Una señal específica es observada sobre los cromosomas 19q22

Los BACs positivos para el fragmento de 180pb (439G6 y 817E1) se utilizaron para la búsqueda de microsatélites.

En el BAC 439G6 no se encontró ninguna zona repetida, mientras que en el BAC 817E1 se aislaron 2 microsatélites, de los cuales uno resultó muy polimórfico. Tras testar los animales del Panel de Referencia Internacional (IBRP), analizar los datos

realizar el estudio de ligamiento el microsatélite mapeo en el cromosoma BTAX. Este hecho podría explicarse por dos razones: La existencia de una contaminación con la presencia de dos clones en el mismo pocillo o por tratarse de un BAC quimérico, es decir, que tenga parte del cromosoma BTAX además del BTA19, algo que puede darse en un porcentaje de clones de la librería (Schibler et al,1998).

Para confirmar la localización sobre el BTA19 utilizamos un panel de células híbridas somáticas. Este panel tiene 38 clones y solo en uno de ellos está presente el cromosoma 19 bovino. Tal y como se muestra en la Figura 2, solo se obtuvo un clon positivo para el fragmento de 180pb. Este resultado ha permitido la confirmación de la localización del gen de la FASN en el BTA19.

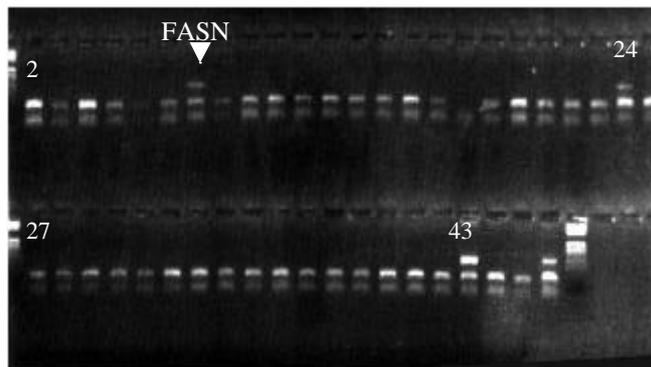


Figura 2: Resultados del análisis del panel de híbridas somáticas. El clon 8 muestra el fragmento específico. La muestra 24 y 25 son controles de bovino y hámster respectivamente. La muestra 43 es de nuevo control bovino, la 44 control de hámster, la 45 control negativo y la 46 control humana.

El análisis de los 6 BACs positivos restantes permitirá la búsqueda de microsatélites para realizar el mapeo genético y además nos servirá para estudiar una población de la que se disponen mediciones de distintos parámetros productivos y determinar si el gen de la FASN puede considerarse candidato a QTL.

BIBLIOGRAFIA.

- Amy M, Williams-Ahlf B, Naggert J, Smith S. *Intron- exon organization of the gene for the multifunctional animal fatty acid synthase*. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 89, pp 1105-1108(1992)
- Laurent P, Elduque C, Hayes H, Saunier K, Eggen A, Levéziel H. Assignment of 60 ESTs in cattle Mammalian Genome 11, 748-754 (2000)
- Hayes H, Di Meo GP, Gautier M, Laurent P, Eggen A, Ianuzzi L. Localization by FISH of 31 Texas nomenclature type I markers to both Q and R banded bovine chromosomes. Cytogenet Cell genet 90, 315-320 (2000)
- Heuertz S, Hors-Cayla MC. *Cattle gene mapping by somatic cell hybridization study of 17 enzyme markers*. Cytogenet. Cell. Genet. 30, 137-145 (1981)
- Jayakumar A, Chirala S, Chinault C, Baldini A, Abu-Elheiga L, Wakil S. *Isolation and Chromosomal Mapping of genomic Clones Encoding the Human Fatty Acid Synthase Gene*. Genomics 23, 420-424(1994)
- Schibler L, Vaiman D, Oustry A, Guinec N, Dangy-Caye, Billault A, Cribiu E. *Construction and extensive characterization of a goat Bacterial Artificial Chromosome library with threefold genome coverage*. Mamm genome 9,119-124 (1998)