

## Utilidad de los marcadores de ADN D21S1435, D21S1446, D5S1453 y D6S1006 en estudios antropológicos

J. R. LUIS\*, S. GUANGYUN\*\* & R. DEKA\*\*

\**Departamento de Antropología. Facultad de Biología. 15706 Santiago de Compostela*

\*\**Department of Environmental Health, University of Cincinnati*

(Recibido, noviembre de 1999. Aceptado, abril del 2000)

### Resumen

LUIS, J. R., GUANGYUN, S. & DEKA, R. (2000) Utilidad de los marcadores de ADN D21S1435, D21S1446, D5S1453 y D6S1006 en estudios antropológicos. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, **10**: 87-94

El objetivo del presente trabajo se ha centrado en la optimización del análisis molecular de los marcadores de ADN D21S1435, D21S1446, D5S1453 y D6S1006, mediante la utilización de la técnica de la PCR combinada con electroforesis en poliacrilamida y tinción con sales de plata. Se realizó un análisis simultáneo del D21S1446 y D21S1435 por un lado, y del D5S1453 y D6S1006 por otro, para minimizar tanto el tiempo necesario para el análisis como su coste económico. Tras el ajuste de la temperatura de hibridación ideal, la concentración de *primers*, la adición de productos como el Tritón y la calidad del ADN utilizado, parecen ser los factores más determinantes a la hora de obtener resultados satisfactorios en la amplificación. El grado de polimorfismo observado es bastante variable entre los cuatro marcadores y oscila entre el 80 y el 30%, dependiendo también del grupo poblacional analizado. Los marcadores que parecen presentar posibilidades más interesantes en el campo de la genética de poblaciones humana son el D6S1006 por su elevado grado de discriminación entre los principales grupos humanos, y el D21S1446 y el D5S1453, básicamente en función de la existencia de variantes alélicas específicas para el grupo Negroide. El escaso grado de diferenciación que para el D21S1435 presentan los diferentes grupos humanos desaconsejan su utilización en este tipo de aplicaciones, aunque su elevado grado de polimorfismo le confiere una utilidad potencial en otros estudios como pueden ser los análisis de paternidad o de Medicina Forense.

**Palabras clave:** PCR, Polimorfismos de ADN, D21S1435, D21S1446, D5S1453, D6S1006, Genética de Poblaciones.

### Abstract

LUIS, J. R., GUANGYUN, S. & DEKA, R. (2000). Usefulness of DNA markers D21S1435, D21S1446, D5S1453 and D6S1006 in anthropological studies. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, **10**: 87-94

The aim of this study was to optimise molecular analysis conditions for the DNA markers D21S1435, D21S1446, D5S1453 and D6S1006, using PCR combined with electrophoretic separation in polyacrylamide gels and silver staining. The simultaneous analysis of the markers pairs D21S1435/D21S1446 and D5S1453/D6S1006 requires the compatibility in the amplification conditions and the lack of overlapping in the molecular sizes, contributing to save time and money in the analysis process. The primer concentration, the addition of products such as Triton and DNA quality appear to be the most important factors in order to obtain good amplification results. The degree of polymorphism is very variable among the four markers, also depending on the population analysed. The degree of differentiation among the main human groups for each marker reveals variations which offer clues about their potential usefulness in genetic studies analysing the dynamics and evolution of human populations.

**Key words:** PCR, DNA polymorphism, D21S1435, D21S1446, D5S1453, D6S1006, Population Genetics.

## INTRODUCCIÓN

En la pasada década, el campo del análisis de la variabilidad genética de las poblaciones humanas, al igual que los demás ámbitos de la genética molecular, se vio revolucionado por la introducción de la técnica de amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (SAIKI *et al.*, 1985). Esta técnica ha permitido el descubrimiento y análisis de un elevado número de regiones polimórficas del genoma humano. En concreto, la mayoría de estos marcadores genéticos se localizaron en zonas de ADN repetitivo, descubriéndose en primer lugar los denominados VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) (NAKAMURA *et al.*, 1987), que son fragmentos de ADN con tamaños comprendidos entre 30 y 0.5 Kb y cuyo polimorfismo viene dado por la variación en el número de repeticiones de una secuencia base cuyo tamaño puede oscilar entre 6 y 100 pares de bases. Posteriormente fueron detectados los STRs (WEBER & MAY, 1989), zonas del genoma de menor tamaño con secuencias de repetición comprendidas entre 2 y 6 pb, y que presentan frente a los VNTRs las ventajas, entre otras, de su gran abundancia y su distribución homogénea a lo largo del genoma humano.

El estudio de los STRs representa hoy en día una de las estrategias más extendidas para el análisis de la variación genética en las poblaciones humanas y en la reconstrucción filogenética. Los trabajos realizados en este campo hasta el momento se integran básicamente en dos grupos. Por un lado se ha abordado el análisis de muestras poblacionales de diversas localizaciones geográficas, para marcadores cuya técnica de fenotipación está perfectamente estandarizada y cuya utilidad en este tipo de estudios ha sido, en mayor o menor medida, contrastada. Así se dispone de un relativamente amplio contexto comparativo para marcadores como el HUMVWA, HUMTPOX, HUMTH01 o el HUMF13B. Por otra parte, es necesaria la búsqueda y puesta a punto técnica de nuevos marcadores, al objeto de disponer de una batería de marcadores lo suficientemente amplia como para dar fiabilidad y

robustez estadística a los resultados obtenidos y a las conclusiones extraídas a partir del análisis de estos marcadores. En esta última línea de investigación es en la que se integra el presente trabajo, cuyo objetivo se centra en la optimización de las condiciones del análisis molecular de los marcadores de ADN D21S1435, D21S1446, D5S1453 y D6S1006, mediante la utilización de la técnica de la PCR combinada con separación electroforética en geles de poliacrilamida y tinción con sales de plata. La caracterización molecular para los cuatro marcadores se realizará analizando simultáneamente, por un lado el D21S1446 y D21S1435 (tetra-repeats localizados en el cromosoma 21), y por otro lado el D5S1453 y D6S1006 (tri-repeats localizados en los cromosomas 5 y 6, respectivamente), al objeto de minimizar el tiempo necesario para el análisis y su coste económico. Para la elección de los marcadores a analizar es necesario tener en cuenta dos puntos principales. En primer lugar cada pareja de marcadores destinados a ser analizados simultáneamente debe presentar unas condiciones de amplificación lo suficientemente compatibles como para hacer posible dicha coamplificación, sobre todo en lo que se refiere a la temperatura de hibridación de los *primers*. Por otro lado, el tipo de metodología utilizada en este trabajo exige que no exista solapamiento en los tamaños de los fragmentos amplificados para poder llevar a cabo el análisis.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El ADN utilizado para las diferentes pruebas de optimización del tipado de los cuatro marcadores fue obtenido a partir de sangre venosa mediante el método del Fenol-Cloroformo (MANIATIS *et al.*, 1982) y el método de las resinas quelantes (SINGER-SAM *et al.*, 1989). Las muestras poblacionales analizadas se recogieron siguiendo criterios de autoctonía y ausencia de emparentamiento biológico y fueron las siguientes: Nigeria (29 individuos), Benin (30 individuos), Negroides brasileños (30 individuos), Alemania (30 individuos), Caucasoídes brasile-

ños (25 individuos), China (30 individuos) y Japón (25 individuos).

La secuencia de los *primers* utilizados para la amplificación de cada uno de los marcadores fue la descrita por MURRAY *et al.* (1995):

D21S1435-F: 5' CCC TCT CAA TTG TTT GTC TAC C 3'

D21S4335-R: 5' GCA AGA GAT TTC AGT GCC AT 3'

D21S1446-F: 5' ATG TAC GAT ACG TAA TAC TTG ACA A 3'

D21S1446-R: 5' GTC CCA AAG GAC CTG CTC 3'

D5S1453-F: 5' GTG TTG AAG GAT GCA GCA AA 3'

D5S1453-R: 5' AAT CCA TGA GTC AGG AGC TG 3'

D6S1006-F: 5' ACC AAC CCC ACT AAG GTA CC 3'

D6S1006-R: 5' AGG TTG ATG GGT GTA GCA AA 3'

La mezcla de reacción consistió en un volumen total de 10 ml.

En el caso del duplex D21S1435/D21S1446 las concentraciones óptimas de los reactivos en la PCR fueron las siguientes:

dNTPs [200µM], Cl<sub>2</sub>Mg [3µM], D21S1435-F [1,6µM], D21S1435-R [0,8µM], D21S1446-F [1,6µM], D21S1446-R [0,8µM], Triton-100 [1%], Taq Polimerasa [0,5u], DNA [2~100ng].

La mezcla de reacción fue sometida a un paso de desnaturalización inicial de 94 °C durante 2 min, seguido de 38 ciclos del programa de amplificación (94 °C: 1 min, 54 °C: 1 min, 72 °C: 1 min) y un paso de extensión final de 72 °C durante 5min.

Para el duplex D5S1453/D6S1006 las condiciones de amplificación optimizadas son las siguientes:

dNTPs [200µM], Cl<sub>2</sub>Mg [2µM], D21S1435-F [1µM], D21S1435-R [1µM], D21S1446-F [1µM], D21S1446-R [1µM], Triton-100 [1%], Taq Polimerasa [0,5u], DNA [2~100ng].

La PCR se llevó a cabo con las siguientes condiciones de amplificación:

94 °C (2 min), 35 ciclos (94 °C: 45 s, 59 °C: 45 s, 72 °C: 45 s), 72 °C 5min.

La separación de los productos de la PCR se llevó a cabo mediante electroforesis vertical en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (4%T 5%C, 7 M Urea) y su detección mediante una tinción con sales de plata.

La estima insesgada de la frecuencia esperada de heterocigotos ( $H_E$ ) fue calculada mediante la formula propuesta por NEI & ROYCHOUDHURY (1974).

Para el análisis de diferenciación poblacional se ha aplicado un test exacto de diferenciación poblacional (RAYMOND & ROUSSET, 1995) y una  $\chi^2$  en tablas de contingencia (SOKAL & ROHLF, 1969).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mientras que la amplificación del D21S1435 resultó satisfactoria en un amplio rango de condiciones, la obtención de resultados adecuados en el caso del D21S1446 resultó más problemática por lo cual fue necesario llevar a cabo una serie de pruebas con vistas a la optimización del tipado simultaneo de ambos marcadores (Fig. 1). Además de variar las concentraciones de los reactivos estrictamente necesarios para la reacción de PCR, se han utilizado reactivos accesorios como el Triton o el DMSO (Dimethyl sulfoxide) que han demostrado mejorar la reacción de PCR bajo condiciones específicas (CHENG *et al.*, 1994) (WINSHIP *et al.*, 1989).

La amplificación con unas condiciones iniciales de concentración de 0,8 µM para los *primers forward* y 0,4 para los *primers reverse* resultó en la obtención de una cantidad adecuada de producto para el D21S1435, pero la intensidad de las bandas resultantes en el caso del D21S1446 resultaba insuficiente para una asignación alélica fiable. Mientras que la utilización de DMSO inhibe totalmente la amplificación del D21S1446, la adición de Triton al 1% origina una amplificación más específica aunque la intensidad de las bandas es ligeramente menor. Con el aumento de la concentración de *primers* al doble de su valor inicial se consigue un ligero aunque insuficiente aumento de la intensidad.

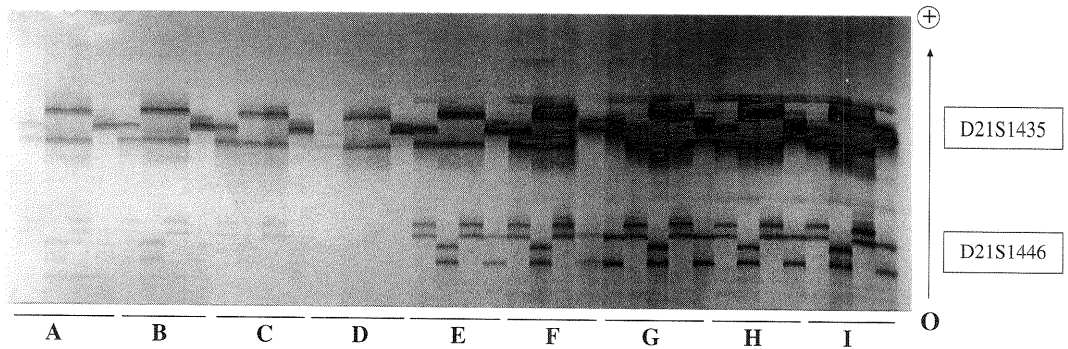


Fig. 1. Comparación de diferentes protocolos de amplificación del duplex D21S1435/D21S1446: **A:** D21S1435/D21S1446 (Pr Reverse: 0,4 mM, Pr Forward: 0,8 mM), **B:** D21S1435/D21S1446 (Pr Reverse: 0,8 mM, Pr Forward: 1,6 mM), **C:** A+Triton, **D:** A+DMSO, **E:** B+Triton, **F:** E+Predesnaturalización inicial y Extensión final, **G:** D21S1435 (Pr Reverse: 0,4 mM, Pr Forward: 0,8 mM), D21S1446 (Pr Reverse: 0,8 mM, Pr Forward: 1,6 mM), **H:** D21S1435/D21S1446 (Primers 1 mM), **I:** D21S1435 (Primers 0,5 mM), D21S1446 (Primers 1 mM).

Sin embargo, si este aumento en la cantidad de *primers* lo combinamos con la adición de Triton a la reacción, la intensidad del bandedo del D21S1446 aumenta de manera significativa. Subsiguientes pruebas consistentes en la combinación de diferentes concentraciones de *primers* o en la adición de pasos de predesnaturalización inicial y extensión final, produjeron un aumento en la intensidad del bandedo para ambos marcadores que iba, sin embargo, acompañado de una disminución de la especificidad de la reacción. Por lo tanto, decidimos establecer las condiciones de amplificación simultánea óptimas en una concentración de 1,6 mM para el *primer forward* y 0,8 mM para el *primer reverse*, con la adición de Triton al 1% a la reacción.

Otros factores que pueden afectar a la eficacia de la reacción son la cantidad y el tipo de ADN. Así, los resultados son más satisfactorios cuando se utiliza ADN extraído mediante el método del Fenol-Cloroformo que cuando el ADN se extrae por el método de las resinas quelantes. Por otro lado, cantidades de ADN mayores que las utilizadas pueden resultar contraproducentes, con una disminución importante del rendimiento de la reacción.

En el caso de la amplificación simultánea de los marcadores D5S1453 y D6S1006 el principal problema que se planteó fue el de una produc-

ción excesiva de ADN inespecífico, principalmente en el caso del D5S1453, lo que dificultaba en gran medida una asignación inequívoca de los fenotipos moleculares. La adición de DMSO no condujo a ninguna mejora en el intento de disminuir la inespecificidad de la reacción. Sin embargo, la utilización de Tritón si que resultó en una importante merma del bandedo inespecífico (Fig. 2). Por otra parte, la disminución de la concentración de *primers* 1  $\mu$ M, utilizada en las pruebas iniciales, a 0,5  $\mu$ M produjo un aumento importante en la intensidad del bandedo, tanto específico como inespecífico (Fig. 2). Nuevamente las muestras extraídas mediante Fenol-Cloroformo ofrecen mejores resultados, en general, que las extraídas con resinas quelantes (Fig. 2). Debido a esto, se ha optado por utilizar el protocolo con concentración de *primers* 1  $\mu$ M en el caso de las muestras de Fenol-Cloroformo, mientras que se utilizó el protocolo con concentración de *primers* 0,5  $\mu$ M, para asegurar, en la medida de lo posible, la amplificación de las muestras obtenidas mediante resinas quelantes.

Estudios iniciales realizados en diversas poblaciones humanas nos han proporcionado información acerca de la distribución de frecuencias alélicas y niveles de polimorfismo de cada uno de estos marcadores.

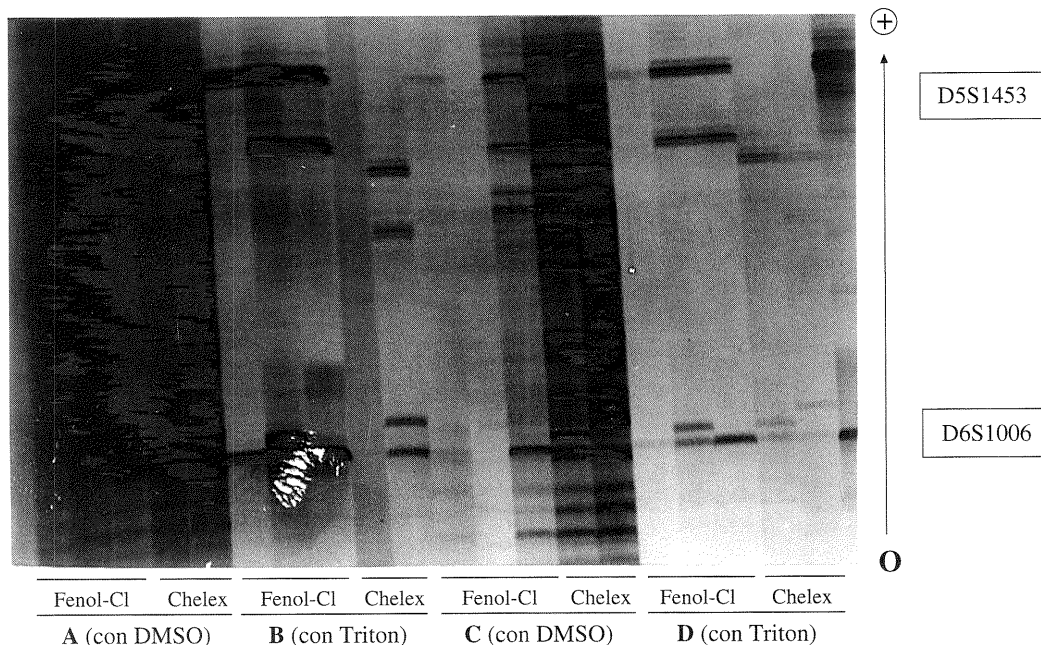


Fig. 2. Comparación de diferentes protocolos de amplificación del duplex D5S1453/D6S1006, con muestras de ADN extraídas mediante el método del Fenol Clorofórmico (Fenol-Cl) y el método de las resinas quelantes (Chelex):

A y B: D5S1453 (Pr Reverse 0,5 mM, Pr Forward 1 mM), D6S1006 (Pr Reverse 0,4 mM, Pr Forward 0,75 mM).  
C y D: D5S1453 (Pr Reverse 1 mM, Pr Forward 2 mM), D6S1006 (Pr Reverse 0,8 mM, Pr Forward 1,5 mM).

En la Fig. 3 se describen gráficamente los valores medios de las frecuencias alélicas en los principales grupos humanos.

En el caso del D21S1435 no se observan grandes diferencias cuando comparamos entre sí los principales grupos humanos. Así, los valores de diferenciación génica para este marcador solo arrojan valores significativos cuando se comparan los las poblaciones Negroides con las Mongoloides (Tabla I).

Por su parte, el D21S1446 presenta una mayor diversidad interpoblacional, básicamente con respecto al grupo Negroide, ya que los valores de frecuencia alélica en Caucosoides y Mongoloides son similares y su comparación resulta en valores de diferenciación génica no significativos (Tabla I). De especial interés resultan los elevados valores que en poblaciones Negroides pre-

senta el alelo de 201 pb frente a su ausencia generalizada en el resto de poblaciones, lo que parece indicar el carácter específico de esta variante alélica en el grupo Negroide y su utilidad en estudios de flujo génico.

Un comportamiento muy similar presenta el D5S1453, con una acusada diferenciación de los Negroides con respecto al resto de poblaciones, mientras que Caucosoides y Mongoloides presentan frecuencias alélicas similares (Fig. 3). Al igual que ocurría en el D21S1446, existe una variante alélica (145 pb) que presenta una frecuencia bastante elevada en comparación a la ausencia que se registra en el resto de grupos humanos.

Finalmente, el marcador D6S1006, con solo tres variantes alélicas polimórficas, es el que ofrece una mayor discriminación interpo-

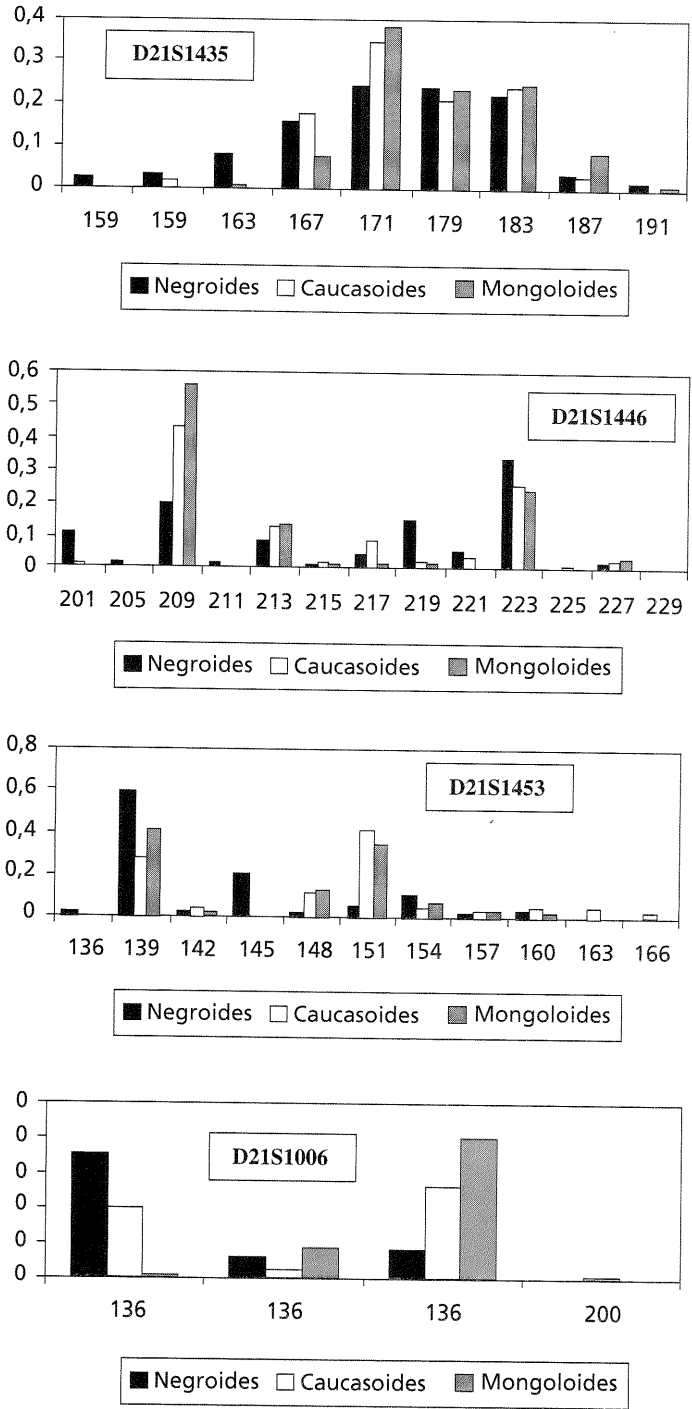


Fig. 3. Valores medios de las frecuencias alélicas en los principales grupos humanos para las cuatro marcadores analizados. La nomenclatura de los alelos se corresponde con el número de bases que presentan.

TABLA I. Resultados de los estadísticos de diferenciación génica entre los principales grupos humanos

	D21S1435				D21S1446				D5S1453				D6S1006			
	$\chi^2$	g.l	p	test exacto	$\chi^2$	g.l	p	test exacto	$\chi^2$	g.l	p	test exacto	$\chi^2$	g.l	p	test exacto
N-C	14,36	8	0,10>p>0,05	p=0,05156	32,49	11	0,0010>p>0,005	p<0,0001	80,30	10	p<0,0005	p<0,00001	30,40	3	p<0,0005	p<0,00001
N-M	21,15	8	0,010>p>0,005	p=0,00122	47,69	10	p<0,005	p<0,0001	57,90	8	p<0,0005	p<0,00001	111,10	2	p<0,0005	p<0,00001
C-M	8,61	6	0,2>p>0,1	p=0,1586	13,73	9	0,20>p>0,10	p=0,09734	12,30	8	0,2>p>0,1	p=0,1437	52,30	2	p<0,0005	p<0,00001

N = Negroides, C = Caucasoides, M = mongoloides

TABLA II. Valores medios de heterozigosidad esperada en las poblaciones de los diferentes grupos humanos

Marcadores	Negroides	Caucasoides	Mongoloides
D21S1435	80%	75%	75%
D21S1446	80%	74%	60%
D5S1453	61%	74%	70%
D6S1006	45%	55%	31%

blacional, con distribuciones alélicas claramente diferenciadas para los tres principales grupos humanos (Fig. 3) que generan valores de diferenciación génica altamente significativos (Tabla I).

El grado de polimorfismo es bastante variable entre los cuatro marcadores, dependiendo también del grupo poblacional analizado (Tabla II). Así, los marcadores del cromosoma 21 presentan una heterozigosidad muy elevada, alrededor del 80%, sobre todo en las poblaciones del tronco Negroide. El D5S1453 presenta, en general, un nivel de polimorfismo algo menor, con heterozigosidades alrededor del 70%, mientras que el D6S1006 ofrece un menor grado de variabilidad, con valores de heterozigosidad situados entre el 30 y el 55%.

En conclusión, los marcadores que parecen presentar posibilidades más interesantes en el campo de la genética de poblaciones humana son el D6S1006 por su elevado grado de discriminación entre los principales grupos humanos, y el D21S1446 y el D5S1453, básicamente en función de la existencia de variantes alélicas específicas para el grupo Negroide. El escaso grado de diferenciación que para el D21S1435 presentan

los diferentes grupos humanos desaconsejan su utilización en este tipo de aplicaciones, aunque su elevado grado de polimorfismo le confiere una utilidad potencial en otro tipo de aplicaciones como pueden ser los análisis de paternidad o la Medicina Forense.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHENG, S., FOCKLER, C., BARNES, W.M. & HIGUCHI, R. (1994). Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 5695-5699.
- 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.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. & SAMBROOK, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- MURRAY, J., SHEFFIELD, V., WEBER, J.L., DUYK, G. & BUETOW, K. (1995). CHLC Personal communication.
- NAKAMURA, Y., LEPPERT, M., O'CONNELL, P., WOLFF, R., HOLM, T., CULVER, M., MARTIN, C., FUJIMOTO, E., HOFF, M., KUMLIN, E. & WHITE, R. (1987). Variable number of tandem repeat (VNTR)

- markers for human gene mapping. *Science*, **235**:1616-1622.
- NEI, M. & ROYCHOUDHURY, A. (1974). Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, **76**: 379-390.
- RAYMOND, M. & ROUSSET, F. (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution*, **49**:1280-1283.
- SAIKI, R.K., SCHARF, F., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. & ARNHEIM, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**:1350-1354.
- SINGER-SAM, J., TANGUAY, R.L. & RIGGS, A.D. (1989). Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications: A Forum for PCR users*, **3**:11.
- SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. (1969). *Biometry*. Freeman and Company, San Francisco.
- TAUTZ, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, **17**:6463-6471.
- WEBER, J.L. & MAY, P.E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.*, **44**:388-396.
- WINSHIP, P.R. (1989). An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Res.*, **17**: 1266.