



**ZTF-FCT**  
Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología

**GRADO EN BIOLOGIA**

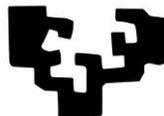
**TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**IDENTIFICACIÓN DE DOS SNPs DE LA  
REGIÓN 17q21.31 EN POBLACIONES  
HUMANAS MEDIANTE LA TÉCNICA  
HRM.**

**LORENA ZUBIZARRETA**

**Leioa, Julio 2013**

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

---

## Índice

1-Resumen .....	3
2-Introducción .....	3-5
2.1-HRM.....	3
2.2-MAPT.....	4-5
3-Materiales y Métodos.....	5-14
3.1-Optimización de cebadores.....	5-6
3.1.1-Preparación de placas.....	6-7
3.1.2-Valoración de distintas concentraciones de ADN y temperaturas de anillamiento.....	8-10
3.1.3-Valoración de distintas concentraciones de ADN y temperaturas desnaturalización .....	10-12
3.2-Obtención de genotipos .....	12-13
3.2.1- Asignación de genotipos .....	12-13
3.3-Análisis estadístico de los resultados .....	13-14
4-Resultados .....	14-17
4.1-Temperatura de anillamiento y desnaturalización y concentración de ADN .....	14-15
4.2-Frecuencias de los haplotipos y subhaplotipos de MAPT en el Norte de Navarra .....	15
4.3-Clina del haplotipo H2 en el continente europeo.....	15-16
4.4-Mapa sintético del haplotipo H1 en Europa .....	16-17
5- Discusión.....	17-18
6- Conclusión .....	18
7-Bibliografía .....	18-19

## **1-Resumen**

En este estudio se han optimizado para su análisis mediante la técnica HRM los cebadores responsables de la amplificación de dos SNPs (rs199456 y rs199457), con los cuales es posible identificar los haplotipos H1 y H2 y los subhaplotipos H2' y H2D de la región 17q21.31 del cromosoma 17. Los genes que se encuentran en esta región, especialmente MAPT, están implicados en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, ciertas variantes de retraso mental y dificultades para el aprendizaje. El haplotipo H2 muestra una distribución muy característica, puesto que sólo aparece en poblaciones del continente europeo, especialmente en el sudoeste. Una vez optimizados los cebadores, se han utilizado para identificar los haplotipos de una serie de muestras de ADN de población del norte de Navarra. Con los datos disponibles en la bibliografía, se ha analizado la distribución en Europa de los diferentes haplotipos, encontrándose para H2 una clina latitudinal.

## **2-Introducción**

### **2.1-HRM**

La técnica de PCR a tiempo real HRM (*High resolution melt*) es un método desarrollado recientemente para la detección de mutaciones, polimorfismos y variaciones epigenéticas en muestras de ADN de doble cadena. Permite analizar polimorfismos genéticos como los SNPs de forma simultánea al proceso de amplificación. Es un método óptimo por su rapidez, capacidad de resolución, reducido coste y alta eficacia. Comparada con la secuenciación es una técnica rápida y menos costosa, ya que la amplificación y la lectura se realizan en un solo paso, mientras que en la secuenciación primero hay que amplificar el fragmento a estudiar y después secuenciarlo. Además se evitan los reactivos que se utilizan en la secuenciación, lo que minimiza el coste de la técnica HRM.

### **2.2-MAPT**

La proteína asociada a los microtubulos (MAPT) es el gen más conocido del cromosoma 17 en la región 17q21.31 (Figura 1). Con este gen están asociadas algunas enfermedades neurodegenerativas como el síndrome de microdelección, algunas variantes de retraso mental, dificultades para el aprendizaje y posiblemente el Alzheimer (Zody, 2008).

En esta región se han detectado varias mutaciones, algunas de ellas polimórficas, entre las que destaca una inversión de unos 900.000 pares de bases. Este fragmento invertido distingue las

dos principales variantes, que se conocen como haplotipo H1 y haplotipo H2. A su vez, en el haplotipo H2 se distinguen 2 subhaplotipos, H2' y H2D (Boettger, 2012).

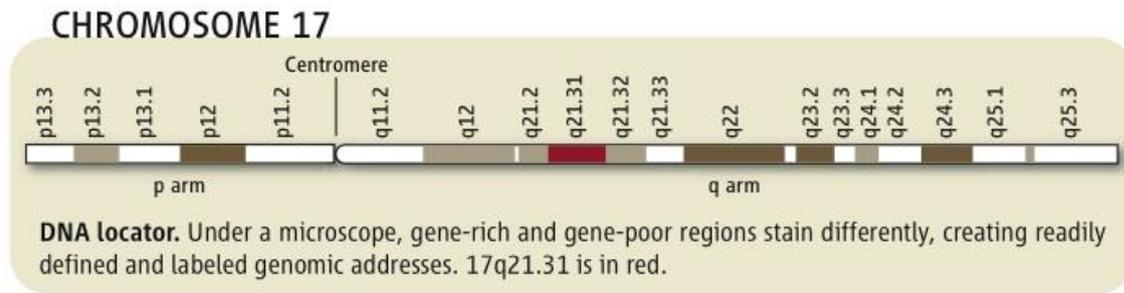


Figura 1. Ubicación de la región MAPT (en rojo).

El haplotipo H2 aparece casi exclusivamente en europeos, por lo que algunos autores han considerado que H1 sería el más antiguo, en tanto que H2 podría haber sido transmitido al hombre moderno por cruzamientos con los neandertales (Hardy, 2005) No obstante, hay análisis que muestran que tanto H1 como H2 pueden ser los haplotipos ancestrales (Boettger, 2012). Sin embargo, son cada vez más abundantes los indicios de que H2 sería el haplotipo ancestral del género *Homo*. Así, entre los SNPs que son monomórficos en H2 y polimórficos en H1, hay una coincidencia del 90% con los chimpancés, pero solo del 60% en los SNPs que son monomórficos en los haplotipos H1 y polimórficos en los haplotipos H2 (Boettger, 2012)

A pesar de su alta frecuencia en las poblaciones europeas, el haplotipo H2 muestra una extraordinaria homogeneidad. La antigua coalescencia de H1 y H2 y el exceso de polimorfismos raros en los haplotipos H2 indican un cuello de botella reciente o barrido selectivo, sobre todo en el linaje H2D Europeo, donde se ha encontrado la diversidad nucleotídica más baja<sup>4</sup>. Además, se ha encontrado una asociación entre el haplotipo H2 y unas tasas medias más elevadas de recombinación en mujeres. También se ha observado que las mujeres con mayores tasas de recombinación tienen más descendencia lo que apoya la evidencia de una ventaja selectiva para los portadores del haplotipo H2D (Fleidel-Alon, 2009).

Existe un marcador indel (rs72377086) que permite identificar ambos haplotipos (Hardy, 2005). Es un fragmento de 238 pares de bases que aparecen en el haplotipo H1, pero no en el haplotipo H2. Su análisis es muy sencillo, ya que se realiza mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa, pero no permite identificar los subhaplotipos de H2.

Además, se han identificado varios SNPs que, al menos en algunas poblaciones, permiten discriminar entre los haplotipos H1 y H2 y los subhaplotipos H2' y H2D (Steinberg, 2012)

El objetivo de este trabajo ha consistido en poner a punto la técnica HRM para el análisis de 2 SNPs que permitieran identificar las 3 variantes haplotípicas principales de esta región. Esto permitirá obtener una elevada resolución en la identificación de los haplotipos con un coste

razonable. Una vez desarrollada la técnica, se aplicará sobre una serie de muestras de ADN, con el fin de comprobar su eficacia.

### **3-Materiales y Métodos**

#### **3.1-Optimización de cebadores**

Se ha partido de los cebadores mencionados en la bibliografía para cada uno de los 2 SNPs, rs199456 y rs199457. Mediante rs199456 se distinguirá entre H1 y H2 y mediante rs199457 se distinguirá entre H2' y H2D. Sus secuencias y temperaturas de anillamiento (Tm) se muestran en la tabla 1.

Cebador	Secuencia	Tm
Forward rs199456	5' AGTTTAGGTCCACTTCCTGAG 3'	56,7
Reverse rs199456	5' GGGTGCTATCAGTAATAATCTCGT 3'	58,0
Forward rs 199457	5' CAGAGTGACACCAGTAATGCC 3'	58,6
Reverse rs199457	5' CCATTGGCTTCTCCCTCAG 3'	58,2

Tabla 1. Secuencias de los cebadores para rs199456 y rs199457.

Con este fin de desarrollar la técnica, se ha utilizado un equipo PCR-RT-HRM marca BioRad, modelo *CFX96 Real-Time PCR detection system* (Figura 2) disponible en el laboratorio del grupo BIOMICS, edificio Lascaray, Vitoria-Gasteiz. En todo momento se ha contado con el asesoramiento de un técnico de laboratorio.



Figura 2. Aparato HRM modelo *CFX96 Real-Time PCR detection system*

### 3.1.1-Preparación de las placas

El método HRM se basa en la observación de la velocidad de desnaturalización de una doble hebra de ADN, que varía en función de la composición de bases de su secuencia, y permite por tanto identificar las variaciones en dicha secuencia.

Para obtener unos resultados interpretables mediante este método es preciso primero optimizarlo para unas condiciones específicas de temperatura de los cebadores y de concentración del ADN durante la PCR. De este modo, todas las curvas de desnaturalización podrán ser comparadas y los diferentes genotipos identificados. Por ello, en primer lugar se han realizado una serie de pruebas a distintas temperaturas de amplificación y desnaturalización y a diferentes concentraciones de ADN control para ambos cebadores. Una concentración óptima de cebadores oscilará entre 0.05 y 0.1  $\mu\text{M}$ . Para ello se utiliza una placa de 96 microtubos en la cual hay 12 columnas y 8 filas. Se ha dividido la placa en dos partes, de modo que se pudiera utilizar para los dos cebadores a la vez.

Se aplica una temperatura de anillamiento diferente en cada fila. El rango de temperaturas se elige en función de la temperatura de anillamiento de los cebadores que aconseja el fabricante. Por ejemplo, si la temperatura de anillamiento del cebador es de 57°C se programa el equipo para que el rango de temperaturas sea de 53°C a 60°C (Tabla 2).

Por otro lado, hay que detectar la concentración de ADN en la que la eficiencia del cebador es máxima. Para ello, en cada columna de cada subgrupo se añade 1  $\mu\text{l}$  del stock de ADN control a una concentración conocida de 15ng/ $\mu\text{l}$ . Después se prepara una dilución seriada del ADN de manera que se diluye a la mitad en las sucesivas columnas. La última columna se reserva para el control negativo en el que no habrá muestra sino agua.

En cada pocillo además de la muestra se añaden los reactivos necesarios para que se lleve a cabo la amplificación y la lectura en el equipo HRM. Entre ellos se incluyen los propios cebadores y una solución aportada por el fabricante que incluye los componentes habituales de una PCR (nucleótidos,  $\text{MgCl}_2$ , ..) junto a una polimerasa específica y el colorante EvaGreen. Este colorante tiene unas propiedades específicas que lo hacen adecuado para un análisis de curvas de desnaturalización. Cuando se une al ADN tiene un espectro de emisión y excitación muy cercano al de la fluoresceína (FAM) y al del SYBR Green I, haciendolo compatible con instrumentos equipados con fuentes de excitación de 488 nm. Además, es extremadamente estable tanto térmicamente como hidrolíticamente, otorgándole propiedades muy convenientes para esta técnica. Es muy poco fluorescente por sí mismo, pero se vuelve altamente fluorescente cuando se une al ADN de doble cadena. EvaGreen no es mutagénico ni citotóxico ya que son completamente impermeables a él las membranas celulares

T°(C)	ng/μl	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
53	A	15	7.5	3.75	1.875	0.937	0	15	7.5	3.75	1.875	0.937	0
54	B	15	7.5	3.75	1.875	0.937	0	15	7.5	3.75	1.875	0.937	0
55	C	15	7.5	3.75	1.875	0.937	0	15	7.5	3.75	1.875	0.937	0
56	D	15	7.5	3.75	1.875	0.937	0	15	7.5	3.75	1.875	0.937	0
57	E	15	7.5	3.75	1.875	0.937	0	15	7.5	3.75	1.875	0.937	0
58	F	15	7.5	3.75	1.875	0.937	0	15	7.5	3.75	1.875	0.937	0
59	G	15	7.5	3.75	1.875	0.937	0	15	7.5	3.75	1.875	0.937	0
60	H	15	7.5	3.75	1.875	0.937	0	15	7.5	3.75	1.875	0.937	0

Tabla 2. Ejemplo de concentraciones seriadas de ADN control a distintas temperaturas de anillamiento para dos SNPs, rs199456 (filas 1 a 6) y rs199457 (filas 7 a 12.)

La placa se coloca en el aparato de HRM y tras especificar las diferentes condiciones de temperatura de anillamiento, se pone en marcha.

### 3.1.2-Valoración de distintas concentraciones de ADN y temperaturas de anillamiento

En la fase de puesta a punto se utilizaron dos placas, cada una de ellas con diferentes condiciones para los dos SNPs. Se encontraron algunos problemas de ajuste de la concentración de los ADNs en la primera placa, debido a que mostraron una gran heterogeneidad, por lo que no se alcanzó la optimización del método y hubo que utilizar una segunda placa. Para la aplicación del método en la caracterización de las muestras de Navarra, posteriormente se utilizaron otras dos placas, una para cada SNP.

El primer resultado que se obtiene es un gráfico con las curvas de amplificación para todas las muestras incluidas en la placa para una pareja de cebadores determinada (Figura 3). Las curvas de la Figura 3 corresponden a las columnas 1 a 6 de la Tabla 2. Se observa para cada caso el aumento en la intensidad de la señal fluorescente conforme se van obteniendo más cadenas de ADN en la amplificación.

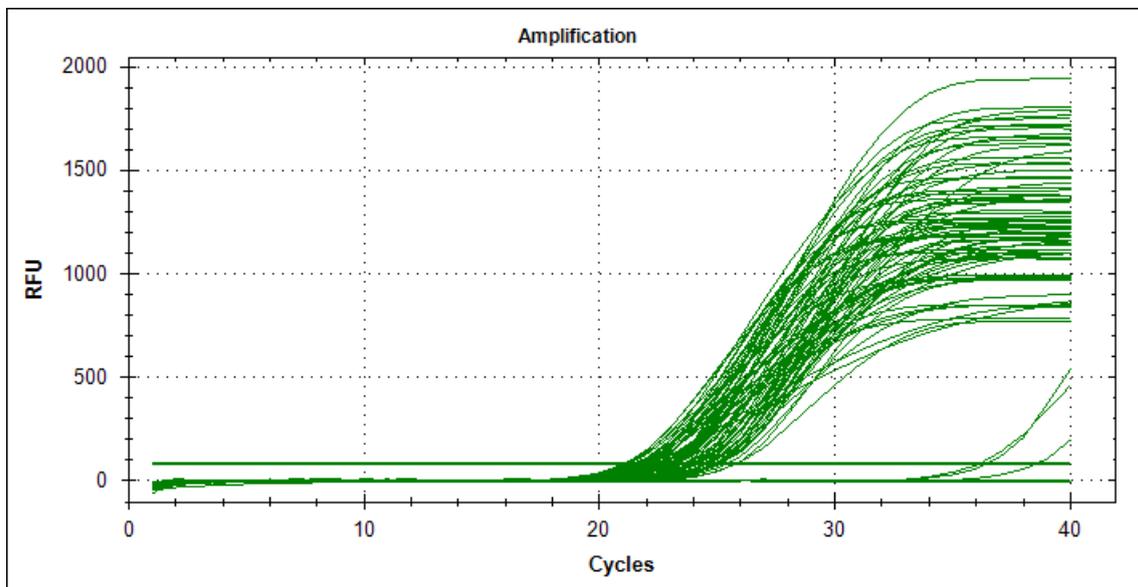


Figura 3. Curva de amplificación. Se muestra la intensidad de la señal fluorescente en los diferentes ciclos PCR. Son los resultados de todas las temperaturas de anillamiento y concentraciones de ADN que se han considerado para el primer rs199456

La técnica de HRM permite monitorizar la amplificación, lo que resulta muy útil, ya que es importante controlar el ADN amplificado en cada ciclo. Para que los resultados sean interpretables, debe haber una buena unión entre los cebadores y el ADN y esto ocurre si la emisión fluorescente comienza entre los ciclos 20 y 25. También es importante que las curvas muestren un crecimiento exponencial, síntoma de una buena unión entre el ADN y los cebadores. En la figura aparecen varias líneas horizontales con valores constantes de emisión próximas a 0. Estas líneas representan la fluorescencia basal emitida por el fluorocromo y los controles negativos. Las curvas que aparezcan antes del ciclo 20 no son válidas ni tampoco aquellas que aparezcan después de los 25 ciclos. Las amplificaciones tardías pueden ser cebadores que se han unido de forma inespecífica.

Sobre el conjunto de amplificaciones, se seleccionan aquellas que muestran unas curvas con características óptimas. Para ello, la aplicación de análisis de datos calcula algunos estadísticos que facilitan la decisión. Así, realiza para cada temperatura una regresión entre fluorescencia y concentración del ADN, mostrando el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y la eficiencia (Figura 4). La temperatura más adecuada será aquella que presente un coeficiente de determinación más próximo a 1 y una eficiencia de la amplificación más próxima al 100%.

Una vez seleccionada la temperatura óptima inicial, se realiza un análisis con mayor resolución, variando en cada caso tan sólo 0,2°C dentro de un rango más estrecho de temperaturas, de entre 2 y 3°C. En la figura 4 se muestra la temperatura seleccionada para rs199456, que fue de 60,2°C.

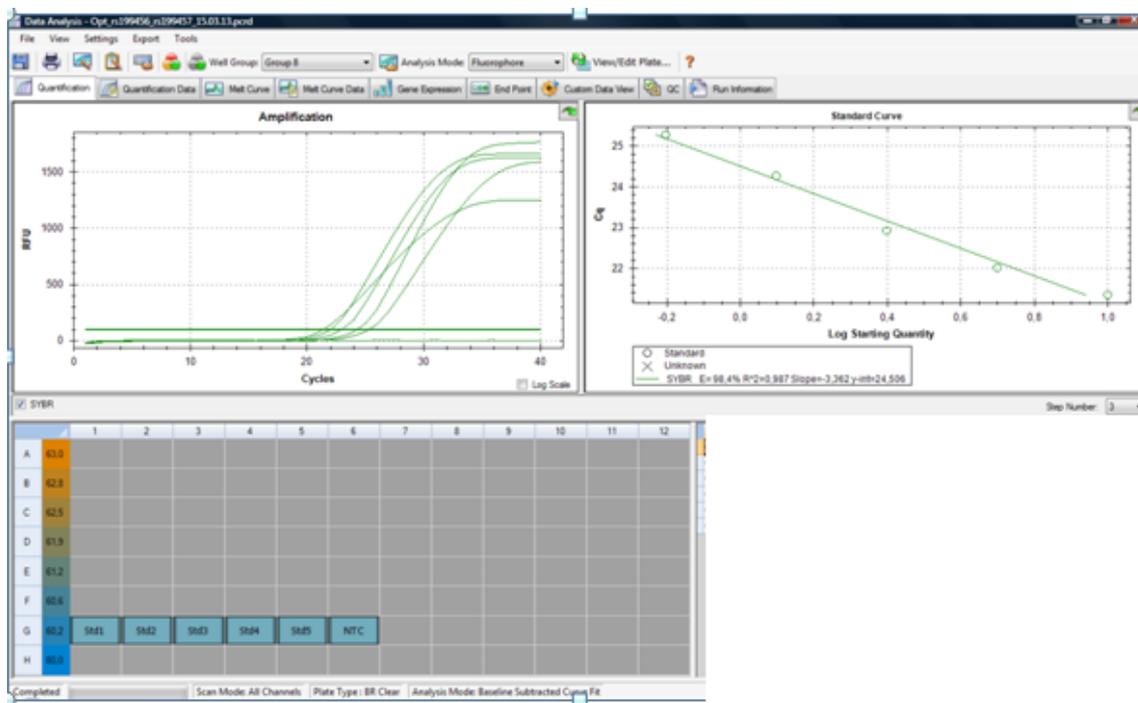


Figura 4. Curva de amplificación para seis concentraciones de ADN con la misma temperatura para el SNP rs199456 (figura superior izquierda), regresión entre la fluorescencia (Cq) y el logaritmo de la concentración de ADN inicial (figura superior derecha) y ubicación en la placa de las muestras con la temperatura seleccionada (figura inferior izquierda).

### 3.1.3-Valoración de distintas concentraciones de ADN y temperaturas de desnaturalización.

Después de terminar la PCR, en la segunda fase del proceso se mide la fluorescencia mientras se desnaturaliza gradualmente el amplicón mediante pequeños incrementos en la temperatura que varían de 0.008-0.2°C, lo que permite observar variaciones mínimas en el proceso de desnaturalización y detectar cambios en una sola base del ADN y por tanto analizar SNPs. En este paso se obtienen una serie de curvas de desnaturalización para diferentes temperaturas de anillamiento y concentraciones del ADN, en las que se representa la fluorescencia medida en RFUs (Relative Fluorescence Units) respecto a la temperatura. En la Figura 5 se muestran todas las curvas y en la Figura 6 sólo las que corresponden a la temperatura de anillamiento seleccionada.

En ambas figuras aparecen las lecturas de fluorescencia correspondientes a las fases de pre-desnaturalización, desnaturalización y post-desnaturalización. El rango de pre-desnaturalización oscila habitualmente entre 65 y 75°C, el rango de desnaturalización oscila entre 75 y 79°C y el rango de post-desnaturalización oscila entre 80 y 95°C. En la figura 5 se observa una curva con un nivel de emisión en la fase de desnaturalización de 2900RFU. Esta muestra y su correspondiente concentración de ADN fue considerada inadecuada, puesto que no entra dentro del rango aceptable de caída de la fluorescencia.

A partir de estos datos, se selecciona un rango de temperaturas de desnaturalización y un rango de concentraciones de ADN adecuadas.

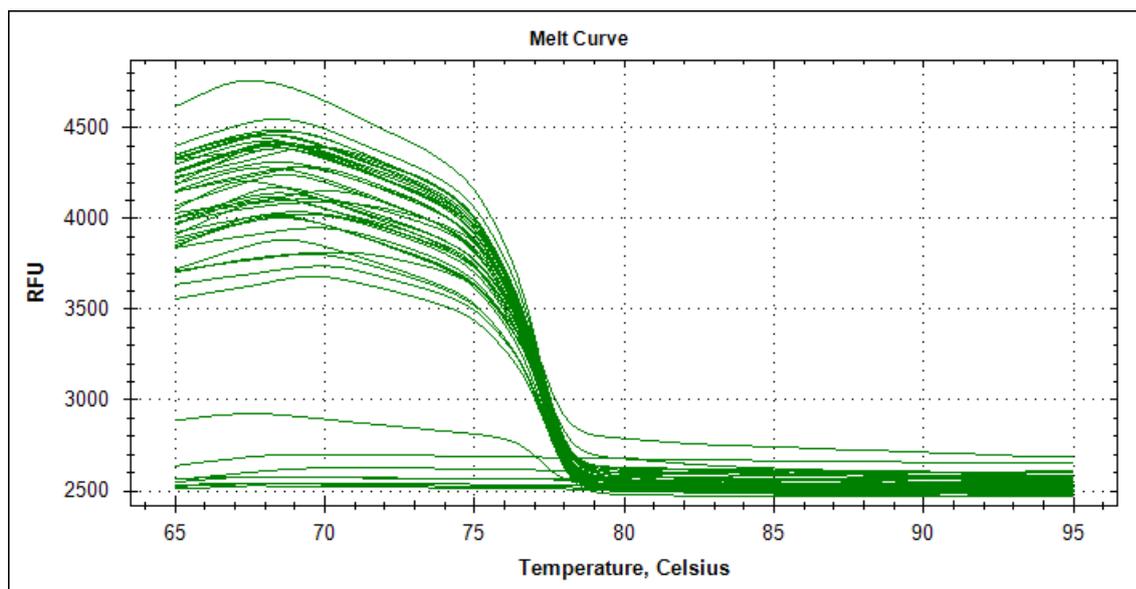


Figura 5. Curvas de desnaturalización para todas las concentraciones y temperaturas que se han considerado para el SNP rs199456. Se muestran las unidades de emisión de fluorescencia frente a la temperatura (en °C).

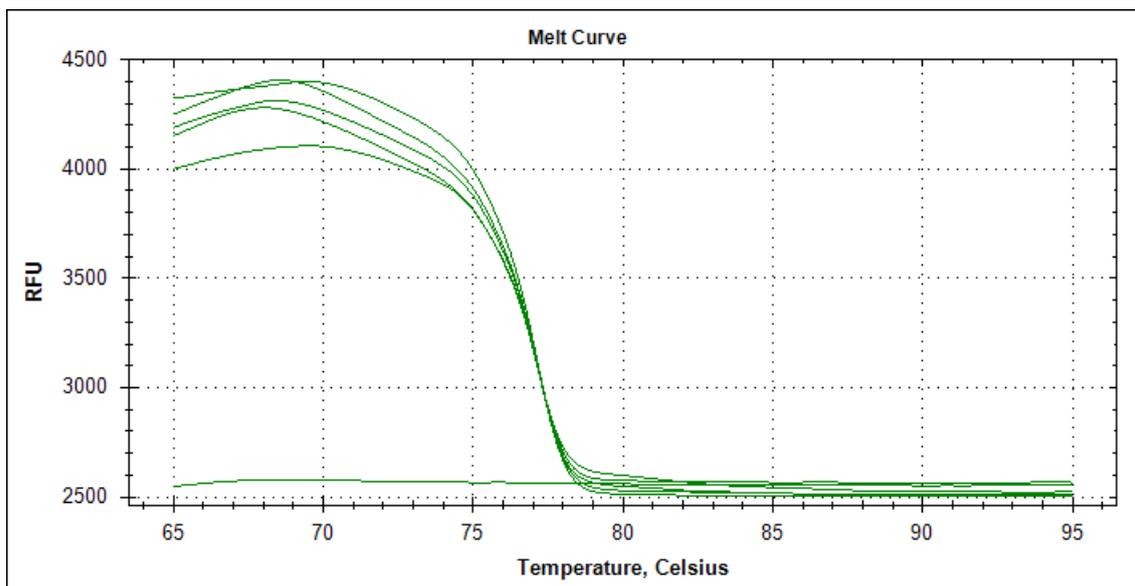


Figura 6. Curva de desnaturalización para la temperatura óptima de anillamiento y diferentes concentraciones de ADN.

Una vez seleccionado el rango de temperaturas de desnaturalización, se analiza más precisamente el punto de inflexión mediante el gráfico del pico de desnaturalización (Figura 7). En esta figura se muestra en ordenadas la derivada de la fluorescencia por unidad relativa del tiempo frente a la temperatura. Esta normalización permite un análisis con mayor

resolución de la curva de desnaturalización. Así, si en las Figuras 5 y 6 se observa que el descenso de fluorescencia ocurre entre los 75 y los 79°C, en la figura 7 se observa que el punto de inflexión en el descenso corresponde exactamente con los 77°C. Se observan también unas líneas horizontales, producto de la fluorescencia basal, del reactivo EvaGreen. También aparece una curva de menor altura que el resto, correspondiendo a una mala amplificación, debido a una escasa concentración de ADN. En todo caso, es muy importante que para las temperaturas de anillamiento seleccionadas y el rango de concentraciones de ADN admitidas, todos los picos coincidan exactamente.

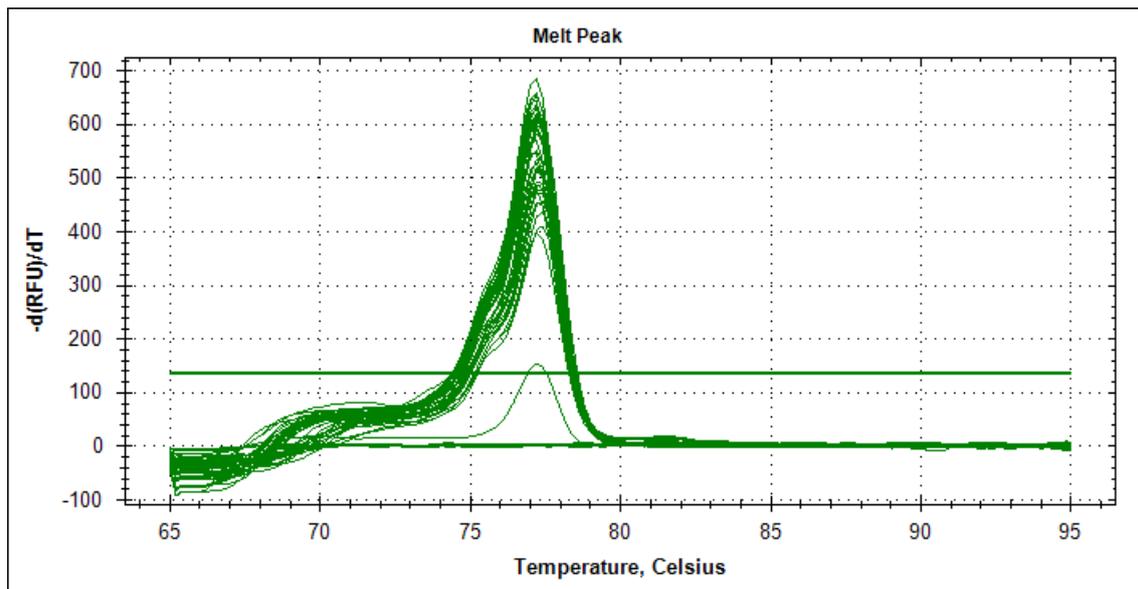


Figura 7. Pico de desnaturalización con el punto de inflexión en el descenso de fluorescencia para el SNP rs199456. Se observa que hay un cambio de tendencia a los 77°C.

### 3.2-Obtención de genotipos

Con el fin de utilizar los cebadores optimizados, se aplicaron en un análisis práctico sobre un grupo de 63 muestras de ADN correspondientes a individuos originarios del Norte de Navarra. Para diferenciar los posibles genotipos, la aplicación toma una curva de desnaturalización como referencia, a la que adjudica un valor de emisión diferencial de fluorescencia cero para todas las temperaturas y representa las desviaciones respecto a ella. Así, en la figura 8 se representan en rojo las que no difieren significativamente de la referencia y en verde y azul las que siguen los otros dos patrones diferentes.

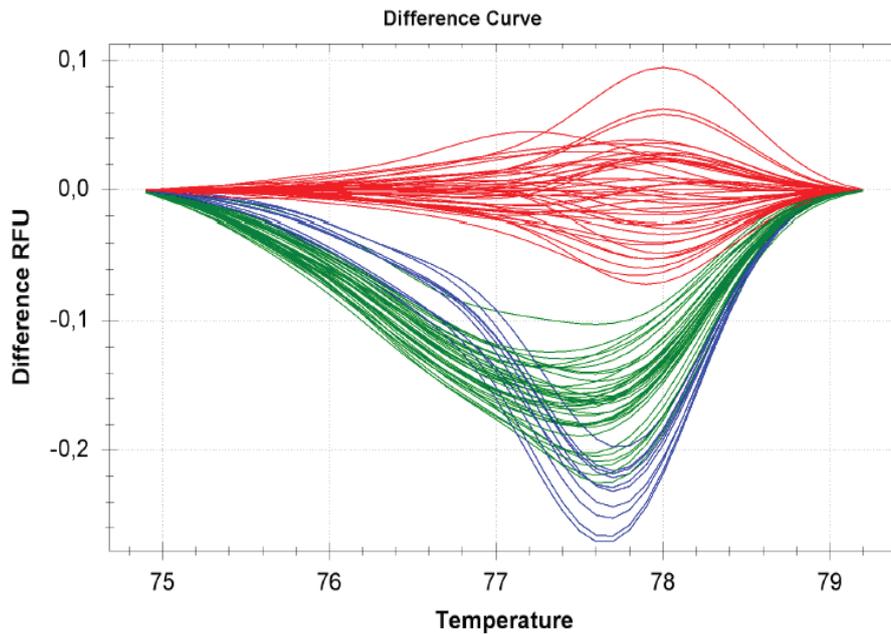


Figura 8. Diferencia de la unidad relativa de fluorescencia frente a temperatura. Se observan 3 grupos de genotipos, representados en rojo, verde y azul.

### 3.2.1-Asignación de genotipos

Un inconveniente del método HRM es que no identifica los nucleótidos que diferencian cada genotipo, de modo que es preciso partir de algún homocigoto secuenciado previamente. De esta forma, partiendo de unos controles internos analizados previamente (Tabla 3), se han podido interpretar en la figura 8 como homocigotos H1/H1 las curvas del grupo de color rojo, heterocigotos el grupo de curvas de color verde y homocigotos H2/H2 el grupo de color azul.

Muestra	Color	Genotipo
Navarra 01	Rojo	H1/H1
Navarra 03	Azul	H2/H2

Tabla 3. Controles internos secuenciados previamente para la asignación de genotipos del SNP rs72377086.

### 3.3-Análisis estadístico de los resultados

Para el estudio de la distribución geográfica del haplotipo H2 y sus subhaplotipos se han tomado de la bibliografía las frecuencias disponibles (Stefansson, 2005). Se ha evaluado la posible existencia de clinas mediante el programa GeDis, que permite conocer la orientación de la misma y su significación. Este análisis se basa en el cálculo de la regresión lineal entre las frecuencias alélicas en las poblaciones y sus coordenadas geográficas con respecto a un eje que se gira en sucesivas iteraciones. En aquellos casos en que, para el mismo alelo, se obtiene

más de una asociación significativa entre frecuencias y posición espacial, se selecciona la dirección del eje para el cual el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) obtiene su valor máximo<sup>5</sup>.

#### **4. Resultados**

En este estudio se han optimizado dos pares de primers para los SNPs rs199456 y rs199457, diagnósticos para los haplotipos MAPT H1 Y H2 y dentro de H2 los subhaplotipos H2' y H2D.

##### 4.1-Temperatura de anillamiento y de desnaturalización y concentración de ADN

Después de optimizar el método se han obtenido los resultados que se muestran en las tablas 4 y 5 para ambos SNPs. Los valores resultantes de temperaturas y concentraciones han sido muy similares, lo que ha facilitado notablemente la aplicación del método. La eficiencia en ambos casos ha sido elevada.

Concentración de ADN	15ng/ $\mu$ L
Temperatura de anillamiento	60.2°C
Temperatura de desnaturalización	77°C
Concentración de primer	1 $\mu$ M
Coefficiente de determinación de la regresión( $R^2$ )	0.987
Eficiencia de la curva (E)	98.4%

Tabla 4. Resultado de las concentraciones y temperaturas de anillamiento y desnaturalización del SNP rs199456

Concentración de ADN	15 ng/ $\mu$ L
Temperatura de anillamiento	60.1°C
Temperatura de desnaturalización	77°C
Concentración de primer	1 $\mu$ M
Coefficiente de determinación de la regresión( $R^2$ )	0.978
Eficiencia de la curva (E)	98.4%

Tabla 5. Resultado de las concentraciones y temperaturas de anillamiento y desnaturalización del SNP rs2049515

#### 4.2-Frecuencias de los haplotipos y subhaplotipos de MAPT en el norte de Navarra

El análisis de los SNPs rs199456 y rs199457 en una muestra del norte de Navarra ha dado lugar a las frecuencias de los haplotipos que se muestran en la Tabla 6, junto con las frecuencias de otras poblaciones tomadas de la bibliografía (Steinberg, 2012).

Como era previsible, la frecuencia más alta es la de H1 y como en la mayor parte de poblaciones europeas, la frecuencia más baja corresponde a H2'.

<u>Población</u>	<u>Frecuencia H1(%)</u>	<u>Frecuencia H2' (%)</u>	<u>Frecuencia H2D(%)</u>
<b>Adygei</b>	79.4	11.8	8.8
<b>Francia</b>	80.4	1.8	17.9
<b>Navarra</b>	72.5	1.7	25.8
<b>Norte de Italia</b>	68.5	4.5	27.3
<b>Orcadia</b>	73.3	0	26.7
<b>Rusia</b>	90	0	10
<b>Sardinia</b>	71.4	5.4	23.2
<b>Toscana</b>	68.8	18.8	12.5
<b>Vascofranceses</b>	72.9	2.1	25

Tabla 6. Frecuencias del haplotipo H1 y los subhaplotipos H2' y H2D en Europa

La frecuencia más alta del haplotipo H1 aparece en Rusia (90%), seguida de Francia (80.4%). La población de Navarra y los Vascofranceses tienen aproximadamente la misma frecuencia de este haplotipo (72.5% y 72.9% respectivamente), dentro del rango inferior de valores europeos. En cuanto al subhaplotipo H2D, se observa un valor máximo en el Norte de Italia (27.3%), siendo también notable en Navarra. Con respecto al subhaplotipo H2' se puede decir que las frecuencias más altas se encuentran en la Toscana 18.8%, con una muy baja frecuencia en Navarra.

#### 4.3-Clina del haplotipo H2 en el continente europeo

A los datos mostrados en la Tabla 6 se han podido añadir las frecuencias de H2 en otras poblaciones, para las que no existen datos de frecuencias de H2' y H2D (Stefansson, 2005). Con esta base de datos se ha detectado mediante GeDis una clina aproximadamente latitudinal, que aumenta desde el norte nordeste hacia el sur sudeste, en un ángulo de 197 grados respecto al norte (figura 9). Consecuentemente, los valores más altos de H2 aparecen en Valencia y la Toscana, encontrándose la población del norte de Navarra dentro del grupo de valores máximos. En el otro extremo, los valores más bajos corresponden a Finlandia, Rusia y los Chuvash. La clina ha mostrado un alto grado de significación, con un coeficiente de correlación de 0,86 y una probabilidad <0,001.

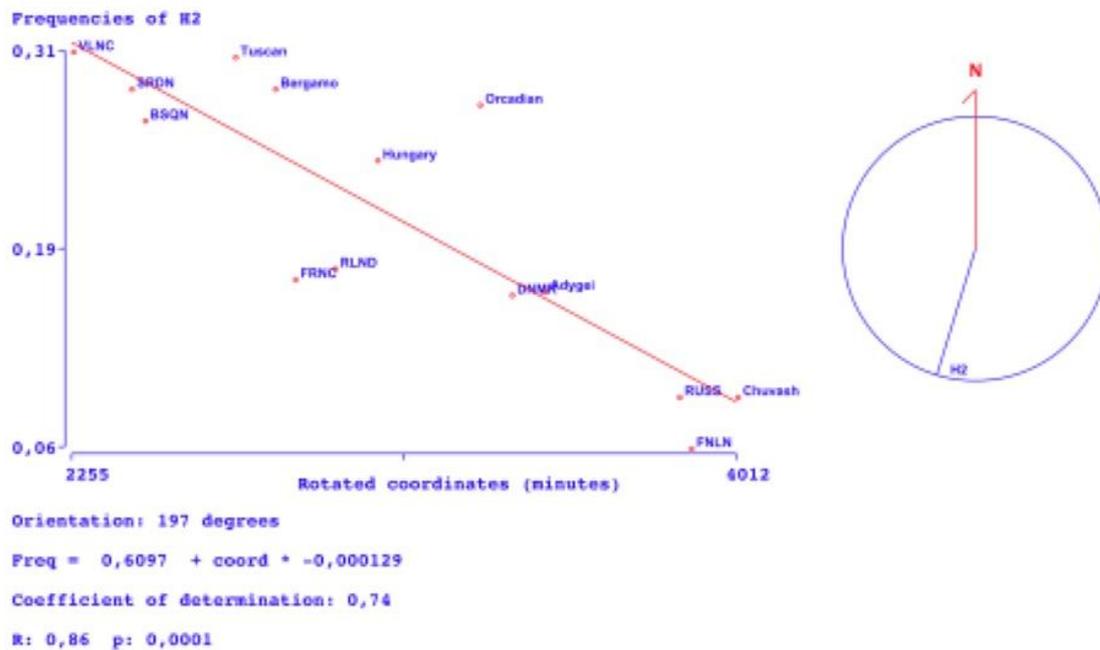


Figura 9. Gradiente de frecuencias del haplotipo H2 en el continente europeo. La línea roja representa la recta de regresión de las frecuencias respecto de las coordenadas rotadas. Se muestran también el coeficiente de determinación de la regresión ( $R^2$ ) y la significación estadística de la correlación ( $p$ ). La línea en el círculo de la derecha indica la orientación desde el norte hacia el sur del continente<sup>10</sup>.

#### 4.4-Mapa sintético del haplotipo H2 en Europa

Se han representado las frecuencias de H2 en Europa con un mapa sintético obtenido también con GeDis (Peña, 2009) (Figura 10). En él se observa claramente la tendencia desde unos valores más altos en el sudoeste del continente, particularmente en España e Italia, que disminuyen hacia el norte y el este.

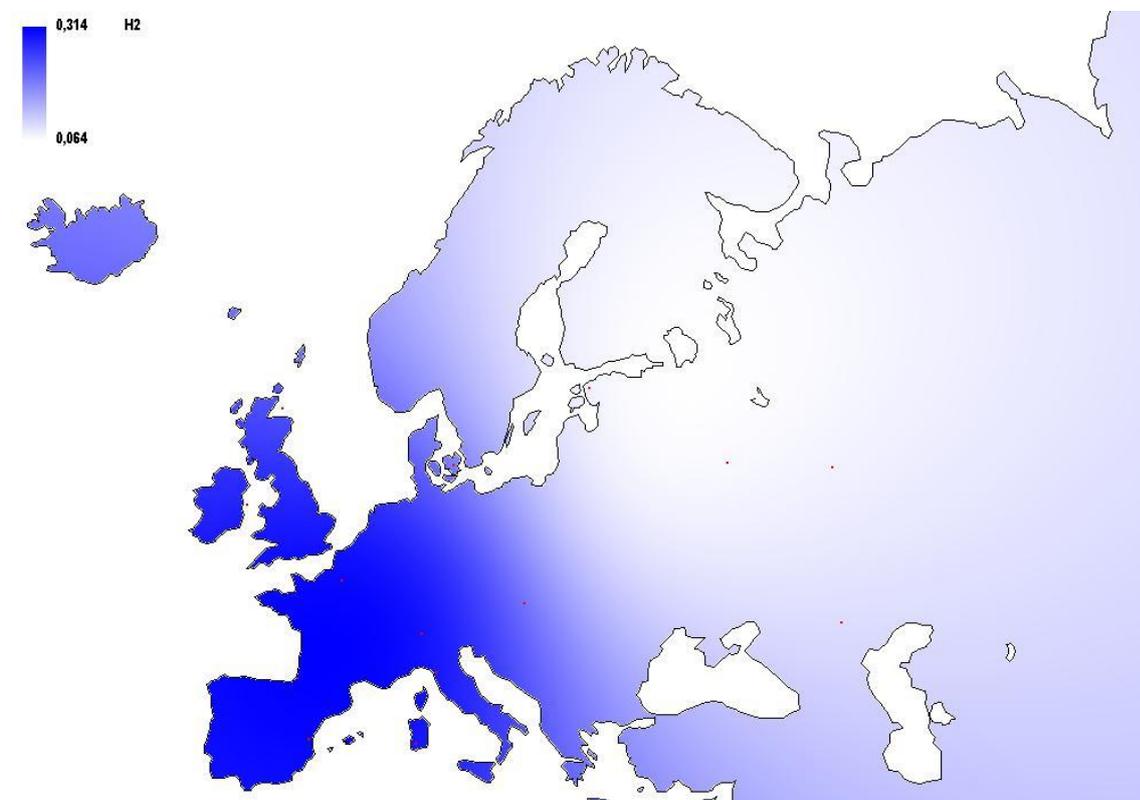


Figura 10. Mapa sintético obtenido con las frecuencias del haplotipo H2 en un grupo de poblaciones europeas.

### **5-Discusión.**

Se ha aplicado la técnica HRM para la puesta a punto del proceso de detección de los haplotipos H1 y H2 y los subhaplotipos H2' y H2D de la región MAPT, en el cromosoma 17. Se ha utilizado esta técnica por su bajo coste y rápida ejecución si se le compara con otras técnicas como la secuenciación, puesto que en esta técnica se realiza todo el proceso durante el primer paso, la amplificación del ADN. Para ello se han optimizado los cebadores de dos SNPs considerados como diagnósticos, rs194456, que permite distinguir entre H1 y H2 y rs199457, que discrimina entre H2' y H2D.

Se ha seleccionado una concentración óptima de ADN y unas temperaturas de anillamiento y desnaturalización adecuadas para los pares de cebadores de ambos SNPs que una vez aplicadas sobre unos grupos de muestras de ADN han permitido obtener una buena resolución en el análisis de los diferentes genotipos (H1/H1, H1/H2D, H1/H2', H2D/H2D, H2D/H2' y H2'/H2').

Los resultados obtenidos han permitido caracterizar a la población del norte de Navarra con unas frecuencias características de su posición geográfica. En efecto, en poblaciones del Suroeste del continente europeo se observan las frecuencias más altas del haplotipo H2. Esta distribución de frecuencias podría ser el resultado de la recolonización del continente europeo después de la última glaciación. Una vez terminada la glaciación, las poblaciones humanas,

que se encontraban restringidas al refugio francocantábrico, el refugio de los Balcanes y el refugio del Mar Negro volvieron a poblar todo el continente (Cardoso, 2011). Si en el refugio francocantábrico se hubiese acumulado por efecto de la deriva una elevada frecuencia de H2, la expansión de su población habría dado lugar a una distribución de frecuencias como la que muestra la figura 10.

No obstante, para obtener unos resultados concluyentes sería preciso analizar un mayor número de muestras de población vasca, la más próximamente emparentada con los primitivos pobladores del refugio francocantábrico.

## **6-Conclusiones**

Se ha puesto a punto la técnica HRM para el análisis de los haplotipos y subhaplotipos de la región MAPT de dos SNPs. Una vez depurada la técnica se ha obtenido una resolución adecuada para la detección de los diferentes genotipos en un grupo de muestras de ADN del norte de Navarra.

Con los resultados obtenidos y recopilando frecuencias de otras poblaciones de la bibliografía se ha analizado la distribución en Europa de los haplotipos y subhaplotipos MAPT, encontrándose un gradiente significativo para H2 con una orientación aproximadamente latitudinal.

## **7-Bibliografía**

- 1- Boettger LM, *et al.*. 2012 Structural haplotypes and recent evolution of the human 17q21.31 region. *Nat Genet.* 44(8):881-5.
- 2- Cardoso, S. *et al.* 2011 The Maternal Legacy of Basques in Northern Navarre: New Insights Into the Mitochondrial DNA Diversity of the Franco-Cantabrian Area *American Journal of Physical Anthropology* 145:480-488
- 3- Coop, G. *et al.* 2008. High -resolution mapping of crossovers reveal extensive variation in fine-scale recombination patterns among humans. *Science* 319 1395-1398
- 4- Fledel-Alon, A. *et al.* 2009. The genetic structure and history of Africans and African Americans. *Science* 324:1035-1044
- 5- Hardy, *et al.* 2005. Evidence suggesting that *Homo neanderthalensis* contributed the H2 MAPT haplotype to *Homo sapiens*. *Biochemical Society Transactions* 33:582-585
- 6- Peña, JA. *et al.* 2009. GeDis: Un programa para análisis de datos en Antropogenética. *Antropo* 20:49-59
- 7- Stefansson H. *et al.* 2005 A common inversion under selection in Europeans. *Nature Genetics* 37:129-137

- 8- Steinberg, K. *et al.* 2012. Structural diversity and African origin of the 17q21.31 inversion polymorphism. *Nature Genetics* 44(8):872-80.
- 9- Tuzun, E. *et al.* 2005. Fine –scale structural variation of the human genome. *Nature Genetics* 37:727-732
- 10- Zody, MC. *et al.* 2008. Evolutionary toggling of the MAPT 17q21.31 inversion region. *Nat Genet* 40:1076-1083
- 11- Zody, M.C *et al.* 2008. A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. *Nature Genetics* 38:999-1001