

Curso: “Descifrando tu Información Genética”

García-Chávez J. Noé, Villalobos-Escobedo José Manuel, Sélem-Mojica Nelly.

BetterLab, Agrobioteg. Av. Camino Real de Guanajuato S/N, Ejido de Juárez. 36630 Irapuato, México.



Resumen

El curso “Descifrando tu información genética” tiene como objetivo que los participantes se familiaricen con las técnicas básicas de biología molecular y genómica. Este curso comprende desde la extracción de ADN directamente de saliva humana, que donarán cada uno de los participantes, hasta el análisis de los datos obtenidos por secuenciación, para determinar el haplogrupo mitocondrial de los participantes voluntarios. Se utilizará una región del ADN mitocondrial (mtADN) conocida como asa de desplazamiento o *D-loop*, la cual es un segmento de ADN no codificante que ocupa 1122 pb. Esta región destaca por su elevada tasa de mutación, aproximadamente 100 veces mayor que en las regiones codificantes del núcleo y por su elevada variabilidad intrapoblacional. Esta secuencia se ha utilizado en estudios de genética poblacional, paleogenómica, antropología y la medicina forense. Debido a las características de herencia del mtADN, las poblaciones humanas pueden ser divididas en base a polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) dentro de esta región genética. El análisis de la distribución de los SNPs en la población permite la reconstrucción de las antiguas migraciones humanas. Por lo que, entre otras cosas, al finalizar el curso podremos ubicar las regiones continentales de donde provienen tus ancestros por vía materna.

Palabras claves: Biología Molecular, Genómica, ADN, D-loop, mtADN, SNPs, haplogrupos mitocondriales.

Introducción

El Genoma Mitocondrial

El ADN mitocondrial humano (mtADN) es una molécula de doble cadena, circular de 16,569 pares de bases (pb). Contiene 37 genes que codifican: 13 proteínas de la cadena de fosforilación oxidativa, 7 subunidades para el complejo I, 1 para la subunidad III, 3 subunidades del complejo IV y 2 subunidades del complejo V; así como 22 ARN de transferencia y dos ARN ribosomales (12S y 16S) esenciales para la

síntesis de proteínas dentro de la mitocondria (Shen *et al.* 2011) (Figura 1). Las cadenas del mtADN reciben el nombre de cadena H (pesada o *heavy*) por su alto contenido en guanina (G), y la cadena L (ligera o *light*). La cadena H contiene la mayor parte de las secuencias codificantes (28 genes). La cadena L solamente contiene la información para la subunidad 6 de la NADH deshidrogenasa y ocho tRNA (Attardi, 1988).

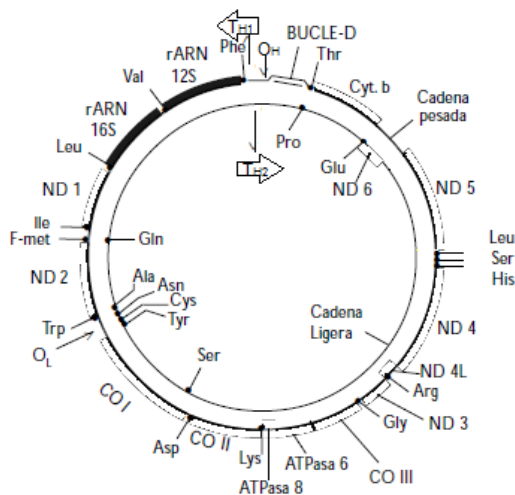


Figura 1. Genoma mitocondrial. Se muestran los genes que codifican: rRNA 12S y 16S, tRNA señalados con la abreviatura del aminoácido que transportan, y secuencias codificantes de proteínas: 3 subunidades de la Citocromo C Oxidasa (CO I, CO II, COIII), 1 para el Citocromo B (Cyt. b), 6 subunidades de la NADH Deshidrogenasa (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6) y 2 de la ATP sintasa (ATPasa 6 y ATPasa 8). Además se observan las cadenas ligera y pesada, el origen de la replicación de la cadena pesada (O_H), el origen de la replicación de la cadena ligera, y los promotores de la transcripción T_H y T_L . Así como el Bucle D.

El asa de desplazamiento o bucle-D (*D-loop*), es una estructura donde las 2 hebras de la doble cadena de la molécula de ADN están separadas por una tercera hebra de ADN. La tercera hebra tiene una secuencia que es complementaria a una de las hebras principales y se aparea con ella, desplazando a la otra cadena principal, la cual forma una estructura en forma de horquilla por complementariedad de bases (Shen *et al.*, 2011). El *D-loop* es la región mayor no codificante, ocupa 1122 pares de bases y se sitúa entre los genes que codifican para los tRNAs de prolina y el de

fenilalanina. En el *D-loop* se encuentran el origen de replicación de la cadena H (O_H), los promotores para la transcripción de la cadena pesada (P_H) y de la cadena ligera (P_L), además de dos lugares de unión a factores de transcripción (Tfam), tres bloques de secuencias conservados asociados con el inicio de la replicación (CSB I, CSB II y CSB III) y las secuencias asociadas a la terminación de cadenas (TAS) (Coskun *et al.* 2003) (Figura 2). Esta región destaca por su elevada tasa de mutación, aproximadamente 10 veces mayor que en las regiones codificantes del mtADN (Vigilant *et al.* 1991) y por su elevada variabilidad intrapoblacional, la cual se concentra en tres regiones o segmentos hipervariables (HVS): la región hipervariable I (HVS I) abarca las posiciones 16,024-16,365, la región hipervariable II (HVS II) las posiciones 73-340 y la región hipervariable III (HVS III) las posiciones 438-574. La región más polimórfica es la región HVS I, por lo que ha sido utilizada en estudios de genética, paleogenómica, antropología y la medicina forense.

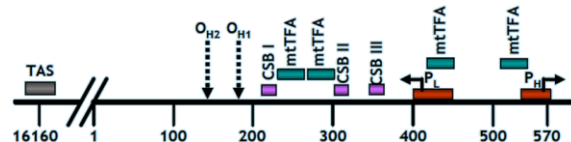


Figura 2. Esquema de la región control o asa de desplazamiento (*D-loop*) del mtADN desde la posición 16,000 a la 600. Los números designan la posición en el mtADN y las cajas de colores representan elementos reguladores. La región control incluye los promotores de las cadenas L (ligera) y H (pesada), los sitios de unión del factor A de transcripción mitocondrial (mtTFA), los bloques de secuencia conservada (CSB) I, II y III, y los orígenes de replicación 1 y 2 de la cadena H (O_{H1} y O_{H2}). TAS: Secuencia de asociación y terminación.

La secuencia completa del genoma mitocondrial de un humano se publicó por primera vez en 1981 (Anderson *et al.* 1981). Desde entonces se emplea como la secuencia de referencia (CRS) con la que se comparan las diferencias encontradas en otros genomas mitocondriales. No obstante, en 1999 se publicó una versión corregida de esta secuencia (*revised Cambridge Reference Sequence, (rCRS)*) manteniendo la numeración original (Andrews *et al.* 1999), por lo que es la que se utiliza actualmente como referencia en todos los estudios en los que se analiza mtADN humano.

Características del genoma mitocondrial humano

El genoma mitocondrial posee ciertas características especiales que lo distinguen del genoma nuclear. Entre las principales está lo compacto que es dicho genoma, casi todos sus genes se encuentran uno inmediatamente después del otro, aunque existen pequeñas secuencias intergénicas, siendo la mayor el *D-loop* (Anderson *et al.* 1981).

Herencia Materna

La herencia del mtADN no sigue las leyes mendelianas, ya que no se recombina durante la fecundación, el mtADN es esencialmente heredado vía materna lo que permite trazar su linaje (Brandon *et al.*, 2006). El ovocito es quien aporta la mayoría de mitocondrias durante la fecundación, ya que las mitocondrias paternas se encuentran en la cola del espermatozoide y ésta se pierde en el momento de la fecundación, por lo que la cantidad de mitocondrias aportadas vía paterna es muy baja. Las pocas mitocondrias paternas aportadas suelen eliminarse al ser reconocidas y ubiquitinadas para su degradación

(Sutovsky *et al.* 1999). Además, también se han descrito su eliminación mediante autofagia por degradación lisosomal (Sato & Sato 2011, Al Rawi *et al.* 2011).

Haplogrupos

Debido a las características de herencia del mtADN, las poblaciones humanas pueden ser divididas en base a la variación de secuencia en ciertas posiciones del genoma mitocondrial, conocidas como polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs). Estas mutaciones acumuladas en periodos de tiempo relativamente cortos, se agrupan secuencialmente formando linajes independientes conocidos como haplotipos (Torroni *et al.* 1996). En el proceso de la evolución y migraciones humanas, los descendientes de un haplotipo original podrían acumular posteriormente mutaciones adicionales y generar un grupo relacionado de haplotipos que es conocido como haplogrupo (Rui *et al.* 2011). El análisis de la distribución de los SNPs en la población permite la reconstrucción de las antiguas migraciones humanas. En la actualidad existen árboles filogenéticos basados en las secuencias de los distintos haplogrupos (van Oven & Kayser. 2008).

Elevada Tasa de Mutación

La tasa de mutación del mtADN, es de 5 a 10 veces mayor en comparación con el ADN nuclear (Ritcher, 1988), esto se debe principalmente a que el genoma mitocondrial se encuentra asociado por cercanía a la membrana mitocondrial interna, la cual es el sitio principal de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto hace al mtADN más susceptible a daño por ROS comparado con el ADN nuclear. Además, el *D-loop*, al no estar apareado es mucho más susceptible a daño, esto origina una tasa de

mutación 100 veces mayor que en núcleo (Ritcher, 1988). La acumulación de dichas mutaciones a lo largo de generaciones ha originado variabilidad genética en esta región del mtADN, lo que ha sido aprovechado para realizar estudios filogenéticos.

Metodología

Protocolo de extracción de ADN

Para la extracción del ADN de fluido corporal se usará el protocolo del *Quick-DNA Miniprep Plus Kit*, el diagrama de esta metodología se presenta en la Figura 3. Como se puede apreciar con este protocolo se puede obtener ADN tanto de fluidos biológicos incluyendo sangre, semen, saliva y otros, así como de tejidos sólidos.

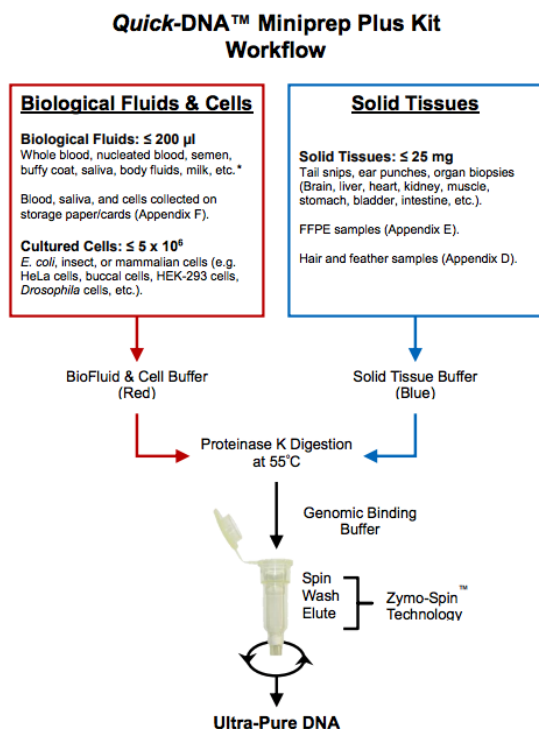


Figura 3. Diagrama de flujo del protocolo de extracción de ADN del kit producido por la empresa Zymo Research.

Pasos a seguir para la extracción:

1. Ponga en un tubo de eppendorf (1.5 ml) hasta 200 µl de muestra y agregue: -200 µl de BioFluid y Buffer Celular (Rojo) y 20 µl de proteinasa K.

Nota: Para una cantidad menor a los 200 µl de fluido biológico, disminuya proporcionalmente BioFluid & Cell Buffer (Red), Proteinasa K y Genomic Binding Buffer.

2. Mezclar bien (usar vortex leve) y luego incubar el tubo a 55°C durante 10 minutos.
3. Agregue 420 µl de *Genomic Binding Buffer* a la muestra digerida. Mezclar bien.
4. Transfiera la mezcla a una columna *Zymo-Spin™ IIC-XL* en un tubo de recolección (los que vienen en el kit). Centrifugar ($\geq 12,000 \times g$) durante 1 minuto.

Deseche el tubo de recolección junto con el fluido.

5. Agregue 400 µl de *DNA Pre-Wash Buffer* a la columna en un nuevo tubo de recolección de 1.5 ml y centrifugue durante 1 minuto. Vaciar el Tubo de recolección.

No olvide rotular correctamente el tubo.

6. Agregue 500 µl *g-DNA Wash Buffer* y centrifugue durante 1 minuto. Vaciar el tubo de recolección.
7. Agregue 200 µl de *g-DNA Wash Buffer* y centrifugue durante 1 minuto. Deseche el tubo de recolección junto con el fluido.

8. Para eluir el ADN, transferir a un tubo limpio de microcentrífuga (1.5 ml). Agregue ≥ 50 µl de tampón de elución de ADN (mínimo 35 µl), incubar durante 5

minutos a temperatura ambiente, y luego centrifugar durante 1 minuto.

Cuantificación del ADN

Equipo a usar: *Nanodrop*.

1. Haga doble clic en el icono de escritorio software NanoDrop 2000 y seleccione la aplicación de intereses.

2. Seleccione el ensayo que vaya a realizar: Nucleic Acid, Protein A280, etc. Aquí seleccione ADN.

3. Una vez realizada esta operación aparecerá el siguiente cuadro de diálogo: "Routine verification of measured wavelengths needs to be done. Make sure the arm is down and click ok to start the verification". A continuación pulsar OK.

4. Establecer un blanco con el tampón adecuado (usaremos la solución de elución del kit). Tomar 1-2 μ l del blanco y depositarla en la parte inferior del pedestal, baje el brazo y haga clic en el botón que indica Blanc. Generalmente se usa como blanco el mismo tampón donde la molécula de interés se haya suspendido o disuelto.

5. Limpie el pedestal e introduzca el ID de la muestra en el campo correspondiente. Pipetear 1 μ l de la muestra y medir. - Se recomienda siempre tomar una nueva alícuota de la muestra para cada medición. Después de una medición: - Limpie los pedestales de medición con un paño de laboratorio que no suelte pelusa. El instrumento está listo para la siguiente muestra.

6. Registren la concentración de cada muestra.

Visualización por electroforesis (tomado de Electroforesis de ADN por Francisco Fierro Fierro)

Equipo a usar:

- Cámara horizontal de electroforesis con los accesorios correspondientes (molde para hacer el gel, peine, cables para conectar a la fuente de alimentación)
- Fuente de alimentación o de poder.

Reactivos:

Agarosa, Tris base (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, Ácido acético glacial, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, Ácido bórico, NaOH (hidróxido de sodio), Glicerol, Azul de bromofenol, Xileno cianol, Bromuro de etidio.

Buffer TAE (50x) 1 L:

Tris base, 242 g; ácido acético glacial, 57.1 ml; 0.5 M EDTA pH 8, 100 ml. Ajustar hasta 1 litro con agua destilada o desionizada.

Buffer de carga tipo II (6x):

0.25% azul de bromofenol; 0.25% xileno cianol; 30% glicerol, en agua. Almacenar a 4°C.

Bomuro de etidio:

El bromuro de etidio (BrEt) es un agente intercalante (se intercala entre las bases nitrogenadas) que se usa como colorante fluorescente para la visualización de ácidos nucleicos en geles de agarosa y poliacrilamida. El BrEt absorbe luz ultravioleta de $\lambda \approx 300$ nm, y emite una luz anaranjada de 590 nm, mediante la cual podemos observar la posición y cantidad relativa del ADN en el gel tras la electroforesis. La solución stock de BrEt se prepara a una concentración de 10 mg/ml en agua, y se conserva a temperatura ambiente o a 4°C en un tubo envuelto en papel de aluminio. Debemos

tener mucho cuidado con esta sustancia, para no tener contacto con ella siempre usaremos guantes.

Pasos de la electroforesis:

1.- Preparación del gel de agarosa

1.1. Pesar la cantidad de agarosa necesaria para obtener la concentración deseada (en nuestro caso es 1 g para 100 ml quedando a una concentración del 1%) en función del volumen de gel.

1.2. Añadir la agarosa al buffer (TAE 1x) en un matraz.

1.3. Calentar la mezcla en un horno de microondas hasta que se observe que toda la agarosa se ha fundido.

1.4. Dejar enfriar la solución de agarosa hasta una temperatura de unos 50 °C (Nota: si se opta por añadir el BrEt al gel debe realizarse en este momento, a una concentración final de 0.5 µg/ml).

1.5. Mientras la solución de agarosa se enfría, preparar el molde en el que se va a hacer el gel sellando los bordes con cinta masking, o colocándolo en el dispositivo previsto para ello, y colocando el peine en la posición deseada.

1.6. Verter cuidadosamente la solución de agarosa sobre el molde nivelado y dejar que solidifique durante al menos 30 min.

2. Preparación de las muestras

2.1. Mezclar tanto las muestras de ADN como el marcador de tamaño con 0.2 volúmenes del buffer de carga 6x. El volumen total estará determinado por el tamaño de los pocillos, habitualmente 15-30 µl.

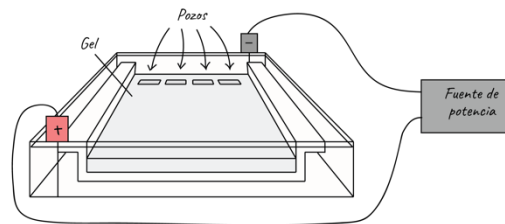


Figura 4: Esquema de una electroforesis: En la imagen se muestra la disposición de gel de agarosa horizontal y los pozos donde se cargan las muestras a visualizar.

3. Carga de las muestras y corrida del gel

3.1. Una vez que el gel ha solidificado retirar el sellado de los bordes y colocar el molde con el gel en la cámara de electroforesis (como se muestra en la figura 4).

3.2. Añadir buffer de electroforesis (TAE 1x o TBE 0.5x) hasta que cubra el gel unos 3-5 mm.

3.3. Retirar cuidadosamente el peine para que queden libres los pocillos para las muestras.

3.4. Cargar en los pocillos las muestras.

3.5. Conectar los cables a la fuente alimentación y aplicar un voltaje de 20-150 V (1-5 V/cm de acuerdo a la distancia entre los electrodos). El ajuste del voltaje es muy variable dependiendo de la cámara y de los tamaños que se pretenden separar, se recomienda voltajes no muy altos para tamaños muy grandes del ADN.

3.6. Correr el gel hasta que el colorante azul de bromofenol esté a una distancia del borde de aproximadamente un 25% de la longitud total del gel. En ese momento debe detenerse la electroforesis.

4. Tinción del gel y visualización del ADN

4.1. Si no se añadió el BrEt al gel, éste debe teñirse una vez finalizada la electroforesis.

4.2. Colocar el gel sobre un transiluminador y encender la lámpara de luz ultravioleta ($\lambda \approx 300$ nm), el ADN se visualizará como bandas de color anaranjado.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realiza en termociclador, en un volumen de 25 μ l por ensayo, con las siguientes condiciones: 18 μ l de H₂O grado PCR, 2.5 μ l de 10x PCR buffer mix, 1 μ l de MgCl₂, 0.5 μ l de dNTPs, 0.5 μ l de *primer forward* (0.1 μ M), 0.5 μ l de *primer reverse* (0.1 μ M), 1 μ l de Taq polimerasa y 1 μ l de ADN. El programa con el que se realiza el PCR es: 1 ciclo de desnaturalización durante 3 minutos a 95°C, seguido de 25 ciclos de amplificación: desnaturalización de la doble hebra de ADN a 95°C por 30 segundos, el alineamiento de los *primers* a 60°C durante 30 segundos y una extensión a 72°C por 2 minutos. Finalmente un ciclo de extensión a 72°C por 7 minutos. El tamaño esperado de fragmento es de 1,241 pb, desde la posición 15966 hasta la 638, conteniendo la totalidad del *D-loop*.

Secuenciación

Las muestras se secuencian en el Laboratorio de Servicios Genómicos del Laboratorio Nacional de Genómica Para La Biodiversidad. Se necesitan 20 μ l de

una reacción de PCR de cada muestra a una concentración mínima de ADN de 100 ng totales. Esta secuenciación es por el método de Sanger (secuenciación por capilares) y para esto es necesario hacer un PCR con los *primers* usados para amplificar la región *D-loop*.

Análisis de resultados de la secuenciación

La calidad de las secuencias, la extracción de las mismas y los electroferogramas se analizan con la ayuda del software *Finch TV* (versión 1.4.0) (Geospiza Inc. 2006).

Identificación de haplogrupos mitocondriales

La determinación de haplogrupo (figura 6) se realiza utilizando los resultados obtenidos por secuenciación y se analiza con la ayuda de mitomap en el sitio web <https://www.mitomap.org>.

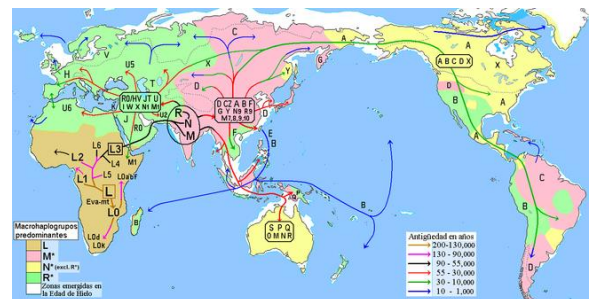


Figura 5.- En este mapa se muestran los haplogrupos identificados por letras y las regiones de donde provienen.

Referencias

- Al Rawi, *et al.* (2011). Postfertilization Autophagy of Sperm Organelles Prevents Paternal Mitochondrial DNA Transmission. *Science*. 334(6059): 1144-1147.
- Anderson, *et al.* (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290(5806): 457-465.
- Andrews, *et al.* (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23(2): 147-147.
- Attardi y Schatz (1988). Biogenesis of Mitochondria. *Annual Review of Cell Biology* 4(1): 289-331.
- Brandon, *et al.* (2006). Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*. 25(34): 4647-4662.
- Coskun, *et al.* (2003). Control region mtDNA variants: longevity, climatic adaptation, and a forensic conundrum. *Proc Natl Acad Sci*. 100(5):2174-6.
- Richter, C. (1995). Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology* .27(7): 647-653.
- Rui, *et al.* (2011). Rapid identification of mtDNA somatic mutations in gastric cancer tissues based on the mtDNA phylogeny. *Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 709-710(0): 15-20.
- Sato y Sato (2011). Degradation of Paternal Mitochondria by Fertilization-Triggered Autophagy in *C. elegans* Embryos. *Science*. 334(6059): 1141-1144.
- Shen, *et al.* (2010). Evaluating mitochondrial DNA in cancer occurrence and development. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1201(1): 26-33.
- Sutovsky, P., R. D. Moreno, *et al.* (1999). Development: Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*. 402(6760): 371-372.
- Torroni, *et al.* (1996). Classification of European mtDNAs From an Analysis of Three European Populations. *Genetics*. 144(4): 1835-1850.
- van Oven y Kayser (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human Mutation*. 30(2): E386-E394.
- Vigilant, *et al.* (1991). African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*. 253(5027): 1503-1507.