

Renata Jacewicz, Ewa Gloc, Stefan Szram, Piotr Gałęcki\*

## Przypadek mutacji w *locus* TH01 – analiza sekwencji<sup>1</sup>

### A case of mutation at locus TH01 – sequence analysis

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik: prof. zw. dr hab. med. S. Szram

\* Z Katedry i Kliniki Psychiatrii i Zaburzeń Nerwicowych z Oddziałem Interwencji Kryzysowych UM w Łodzi

Kierownik: prof. dr hab. med. A. Florkowski

W toku badań spornego ojcostwa w zakresie 21 *loci* typu STR odnotowano izolowane wyłączenie w *locus* TH01. Ojcostwo i macierzyństwo w sprawie zostało potwierdzone z prawdopodobieństwem przekraczającym 99,999%. Analiza sekwencji wskazuje na wyłączenie delecyjny charakter mutacji bez zmian w sekwencji konserwatywnej.

In a paternity test with 21 short tandem repeats (STRs) an isolated exclusion for the TH01 locus was observed. The probability of paternity or maternity in this case turned out greater than 99,999%. The analysis of sequence indicates only the deletion character of the observed mutation event without any changes in the conservative sequence.

Słowa kluczowe: mutacja, TH01, ojcostwo  
Key words: mutation event, TH01, paternity

#### WPROWADZENIE

*Locus* HUMTH01 zlokalizowany w miejscu chromosomalnym 11p15.5 w obrębie pierwszego intronu genu hydroksylazy tyrozynowej, należy do mikrosatelitarnych sekwencji o zmiennej ilości czteronukleotydowego motywu, tzw. STRs [1, 2]. Motyw ten w zależności od orientacji nici DNA, w ślad za Gene Bank oznaczany jest jako TCAT [5'→3'] lub GTAA

[3'→5'] [3]. Powtarza się on w obrębie *locus* od 5 do 14 razy warunkując polimorfizm osobniczy. HUMTH01 to jedno z najmniej mutacyjnych miejsc genomu typu STR. Analizując ponad trzydzieści populacji świata odnotowano w tym *locus* w zaledwie dwu przypadkach jednostopniową mutację (jedną pochodzenia odmatczywego i jedną pochodzenia odojcowskiego), co daje znikomą wartość współczynnika mutacji 0,00005 [4].

W tej pracy dla odnotowanego w populacji Polski Centralnej przypadku mutacji w *locus* TH01 przeprowadzono analizę sekwencji DNA, celem ustalenia jej charakteru i pochodzenia.

#### MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiła krew pochodząca od domniemanego ojca, matki i dziecka w sprawie o ustalenie ojcostwa. Genomowe DNA izolowano stosując metodę solną [5] bądź membrany jonowymienne (A&A Biotechnology). Amplifikację DNA przeprowadzano w termocyklerze UNO II (Biometra) z wykorzystaniem zestawu Amp/STR (Applied Biosystems) wg przepisu firmy (User's Manual). Detekcję produktów amplifikacji przeprowadzano w sekwenatorze ABI Prism 377 wobec standardu wielkości GeneScan-500 stosując oprogramowanie GeneScan 3.7 NT (Applied Biosystems). Do reakcji sekwencjonowania wykorzystano produkt amplifikacji regionu TH01 z wykorzystaniem następujących starterów:

<sup>1</sup> Temat opracowany w ramach prac własnych uczelni nr 502-11-107.

5'-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3';  
5'-ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG-3'.

Analizę sekwencji przeprowadzono z zastosowaniem zestawu ABI Prism BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), zgodnie z zaleceniami producenta. Produkty sekwencjonowania rozdzielano na sekwenatorze ABI Prism 377. Analizę wyników przeprowadzono przy użyciu programu Chromas 1.45 [6].

## WYNIKI I OMÓWIENIE

W przeprowadzonej analizie ojcostwa w zakresie 21 markerów typu STR odnotowano pojedynczą niezgodność w układzie TH01. Z uwagi na uzyskaną wartość prawdopodobieństwa ojcostwa, jak i macierzyństwa w tej sprawie przekraczającą 99,999%, niezgodność zaklasyfikowano jako mutację (tabela I).

Tabela I. Rozkład genotypów w zakresie 21 *loci* STR w sprawie o ustalenie ojcostwa.

Table I. Genotype distribution within the 21 STR *loci* in the paternity analysis case.

Lokus STR STR locus	Matka Mother		Dziecko Child		Domn. ojciec Putative father	
D8S1179	12	12	12	13	13	14
D21S11	28	31	27	31	27	31
D7S820	9	12	9	12	9	9
CSF1PO	10	11	10	11	11	12
D3S1358	15	16	16	18	17	18
<b>TH01</b>	<b>9</b>	<b>9.3</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9.3</b>
D13S317	11	12	11	12	10	12
D16S539	12	12	12	12	12	14
D2S1338	15	26	24	26	17	24
D19S433	14	16	14	16	13	14
VWA	16	18	16	17	15	17
TPOX	8	11	11	11	8	11
D18S51	15	15	14	15	14	14
D5S818	11	11	11	15	12	15
FGA	22	24.2	22.2	24.2	22.2	23
LPL	9	11	9	10	10	11
F13B	8	10	8	8	8	9
FESFPS	11	12	11	12	11	12
F13A01	5	13	5	7	7	7
Penta E	13	15	11	15	10	11
Penta D	10	12	9	10	9	14

Jak wskazują dane Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej (IFSGH) [4], jak i Amerykańskiego Towarzystwa Banków Krwi (AABB) [7] w *locus* TH01 zjawiska mutacji występują spora-

dycznie. Z uwagi na ten fakt przeprowadziliśmy analizę sekwencji dla obserwowanego przypadku mutacji, a wyniki przedstawiliśmy na rycinie 1 i w tabeli II.

Ryc. 1. Sekwencje alleli [5'→3'] badanego dziecka zawierające 8 (A) i 9 (B) powtórzeń 'TCAT' w *locus* HUMTH01.

Fig. 1. Sequences of alleles [5'→3'] present in the investigated child with 8 (A) and 9 (B) «TCAT» repetitive motifs within HUMTH01 *locus*.

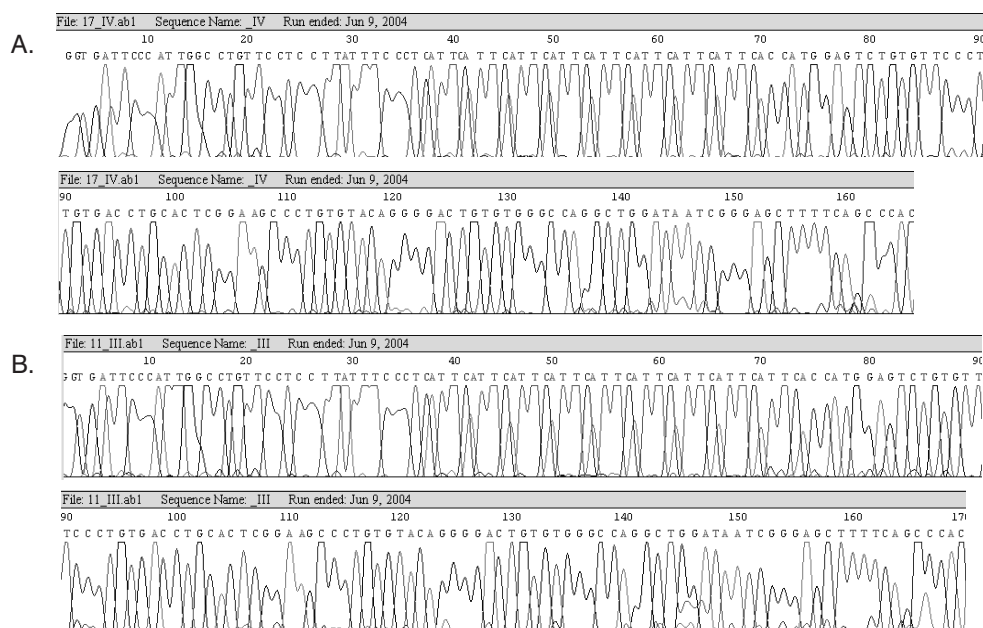


Tabela II. Sekwencje alleli [5'→3'] w *locus* HUMTH01 u badanych osób.Table II. Sequences of alleles [5'→3'] within HUMTH01/*locus* present in the investigated subjects.

DOMN. OJCIEC PUTATIVE FATHER	ALLEL
GGTGATTCCCATTGGCCTGTTCCCTCCCTTATTTCCC <b>TCAT TCAT TCAT TCAT CAT TCAT TCAT TCAT TCAT</b> TCACCATGGAGTCTGTGTTCCCTGTGACCTGCACTCGGAAGCCCTGTGTACAGGGGACTGTGTGGG- -CCAGGCTGGATAATCGGGAGCTTTTCAGCCCACA	9.3
GGTGATTCCCATTGGCCTGTTCCCTCCCTTATTTCCC <b>TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT</b> TCACCATGGAGTCTGTGTTCCCTGTGACCTGCACTCGGAAGCCCTGTGTACAGGGGACTGTGTGGGCC- -AGGCTGGATAATCGGGAGCTTTTCAGCCCACA	9
DZIECKO CHILD	ALLEL
GGTGATTCCCATTGGCCTGTTCCCTCCCTTATTTCCC <b>TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT</b> TCACCATGGAGTCTGTGTTCCCTGTGACCTGCACTCGGAAGCCCTGTGTACAGGGGACTGTGTGGGCC- -AGGCTGGATAATCGGGAGCTTTTCAGCCCACA	9
GGTGATTCCCATTGGCCTGTTCCCTCCCTTATTTCCC <b>TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT</b> TCACCATGGAGTCTGTGTTCCCTGTGACCTGCACTCGGAAGCCCTGTGTACAGGGGACTGTGTGGGCC- -AGGCTGGATAATCGGGAGCTTTTCAGCCCACA	8
MATKA MOTHER	ALLEL
GGTGATTCCCATTGGCCTGTTCCCTCCCTTATTTCCC <b>TCAT TCAT TCAT TCAT CAT TCAT TCAT TCAT TCAT</b> TCACCATGGAGTCTGTGTTCCCTGTGACCTGCACTCGGAAGCCCTGTGTACAGGGGACTGTGTGGGCC- -AGGCTGGATAATCGGGAGCTTTTCAGCCCACA	9.3
GGTGATTCCCATTGGCCTGTTCCCTCCCTTATTTCCC <b>TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT</b> TCACCATGGAGTCTGTGTTCCCTGTGACCTGCACTCGGAAGCCCTGTGTACAGGGGACTGTGTGGGCC- -AGGCTGGATAATCGGGAGCTTTTCAGCCCACA	9

## PODSUMOWANIE

Zastosowanie techniki sekwencjonowania do oceny mechanizmu – źródła niezgodności dziecko-rodzic w *locus* TH01 w analizowanej sprawie wskazuje na delecję nukleotydów w regionie tandemowych powtórzeń, z najbardziej prawdopodobnym przejściem allela 9 w allel 8, które stanowi 33,3% wszystkich mutacji odcjcowskich i 44,0% wszystkich mutacji odmatczyńskich w lokus TH01 pochodzenia delecyjnego [7]. W danych Amerykańskiego Towarzystwa Banków Krwi nie odnotowano natomiast przypadku przejścia allela 9.3 w allel 9 [7]. Inna dopuszczalna transformacja 9.3 → 8 jest tym bardziej znacznie mniej prawdopodobna [8, 9]. Podczas analizy sekwencji konserwatywnej w *locus* TH01 u badanych osób nie wykazano różnic, co w kontekście dotychczasowej wiedzy na temat mechanizmów mutacji wskazuje na zaistnienie zjawie-

ska „poślizgu” polimerazy podczas replikacji, jako najbardziej prawdopodobnego źródła analizowanej mutacji [9, 10]. W świetle uzyskanych wyników pochodzenie ujawnionej mutacji pozostaje nierozstrzygnięte.

## PIŚMIENNICTWO

1. Edwards A., Civitello A., Hammond H. A., Caskey C. T.: DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, 49, 746-756.
2. Polymeropoulos M. H., Rath D. S., Xiao H., Merrill C. R.: Tetranucleotide repeat polymorphism at the human coagulation factor XIII A subunit gene (F13A1). *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 4306.
3. <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase>.

4. 2003 Paternity testing workshop of the English Speaking Working Group of the ISFG – final report, 63.
5. Lahiri D. K., Nurnberger Jr. J. I.: A rapid non enzymatic method for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 5444.
6. <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>.
7. Annual report summary for testing in 2003, American association of Blood Banks (AABB), 15.
8. Sajantila A., Lukka M., Syvanen A.: Experimentally observed germline mutations at human micro- and minisatellite loci. *Eur. J. Hum. Genet.*, 1999, 7, 263-266.
9. Brinkmann B., Klitschar M., Neuhuber F., Huhne J., Rolf B.: Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am. J. Hum. Genet.*, 1998, 62, 1408-1415.
10. Schlötterer C., Tautz D.: Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20, 211-215.

Adres do korespondencji:  
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
ul. Sędziowska 18 a  
91-304 Łódź  
e-mail: r.jacewicz@post.pl