

BABALIK TESTİNDE FGA LOKUSUNDA İKİ TEKRAR AZALMASI: BİR MUTASYON OLGUSU

Kemal Murat Cantürk¹, Ramazan Emre¹, Ömer Müslümanoğlu¹,
Muhammed Doğan¹, Umut Kara¹, Fatih Yağmur²

¹ Adli Tıp Kurumu, Biyoloji İhtisas Dairesi, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Adli Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Alındı: 26.02.2014 / Kabul: 12.05.2014

Sorumlu Yazar: Kemal Murat Cantürk

Adli Tıp Kurumu, Ankara Grup Başkanlığı, Biyoloji İhtisas Dairesi - Ankara - Türkiye, e-posta: drmuratcanturk@yahoo.com

ÖZET

Babalığın tespitinde tüm genom boyunca dağılmış kısa tekrar dizileri (Short Tandem Repeats) yaygın olarak kullanılmaktadır. Her STR lokusunda değişen sıklıkta görülen mutasyonlara genellikle bir tekrar artışı veya azalışı şeklinde rastlanmaktadır. Olgumuzda babalık testi için gönderilen anne, olası baba, çocuk üçlüsünden çocuğun FGA lokusunda iki kısa tekrar dizisi azalması şeklinde mutasyon görülmüş olup, olgu bu durumun nadir rastlanması nedeni ile sunulmuştur. DNA analizi için ESSplex kiti kullanılmıştır. FGA lokusu dışında kalan 14 otozomal STR loku-

sunda anne, olası baba ve çocuk arasında uyumlu allel kalıtımı tespit edilmiştir. Hem anne hem babanın FGA lokusunda “25-25” (homozigot) alelleri amplifiye edilmişken çocuğun bu lokus için heterozigot “23-25” olduğu tespit edilmiştir. FGA lokusuna ait farklı primerler kullanan ID-Plex kiti kullanılarak mutasyon teyit edilmiştir. Anne ve babanın bu lokus için homozigot olması nedeni ile çocukta tespit edilen iki tekrar azalması şeklindeki mutasyonun hangi atasından kaynaklandığının STR yöntemiyle tespiti mümkün olmamıştır. Mutasyon dikkate alınarak yapılan hesaplamada babalık %99,99 üzerindeki olasılıkla teyit edilmiştir. Çok basamaklı STR mutasyon-

ları babalık testlerindeki DNA profillerini yorumlarken yanlış dışlamalara neden olabilmektedir. Bu yüzden babalık testleri bu gibi iki basamaklı FGA mutasyonları açısından dikkatli değerlendirilmelidir.

Anahtar Kelimeler: STR mutasyonu, babalık testi, FGA, mutasyon sıklığı

TWO REPEAT DECREASE AT FGA LOCUS IN A PATERNITY TEST: A CASE OF MUTATION

Kemal Murat Cantürk¹, Ramazan Emre¹, Ömer Müslümanoğlu¹,
Muhammed Doğan¹, Umut Kara¹, Fatih Yağmur²

¹ Department of Biology, Council of Forensic Medicine, Istanbul, Türkiye

² Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Istanbul Medeniyet University, Istanbul, Türkiye

Received: February 26, 2014 / Accepted: May 12, 2014

Correspondence to: Kemal Murat Cantürk

Adli Tıp Kurumu, Ankara Grup Başkanlığı, Biyoloji İhtisas Dairesi - Ankara - Türkiye, e-posta: drmuratcanturk@yahoo.com

ABSTRACT

Paternity tests are performed through detecting Short Tandem Repeats (STRs) which are distributed throughout the genome. Mutations are seen with different frequencies at each STR loci and usually encountered as one repeat increase or decrease. In this study, we present a trio paternity case – mother, alleged father and child- of rarely seen two repeat decrease mutation of FGA locus which detected in child. Blood samples from mother, alleged father and child were analyzed using ESSplex kit. In FGA locus of both mother and father “25-25” (homozygous)

alleles were amplified but the child was heterozygote “23-25” at FGA locus. The “23” FGA mutation, two step less than the parents “25”, was detected in the child in which the inheritance could be identified neither from mother nor from father using STRs. This mutation was confirmed using ID-Plex kit which has different primers for FGA locus. Concurrent allelic inheritance of 14 STR loci except FGA was detected among mother, alleged father and child. Paternity was confirmed with higher probability of 99.99 %. Multi step STR mutations might cause false exclusions when interpreting DNA profiles in

paternity tests. Therefore paternity tests should be evaluated carefully considering this type of two step FGA mutations.

Key words: STR mutation, paternity test, FGA, mutation frequency

GİRİŞ

Mikrosatellit kısa tekrar dizileri (STR) 2-7 nükleotid baz uzunluğundadır ve tüm genomun yaklaşık %3'nü oluştururlar (1). İnsan genomunda bir milyondan fazla STR olduğu tahmin edilmektedir ve genomdaki değişken (polimorfik) DNA dizileridir (2). STR lokuslarındaki tekrar sayılarının karşılaştırılması, adli kimliklendirme ve nesep (annelik-babalık) tayininde yaygın olarak kullanılır (3). STR lokuslarındaki tekrar sayısının çocuğa aktarılırken eksilmesi veya artması şeklinde olan STR mutasyonları, her hücre bölünmesinde yaklaşık 103-105 nükleotitte bir görülür (4,5). STR mutasyonların %90'ı tekrar sayısının bir eksiği veya bir fazlası şeklindedir ve nadir olarak tekrar

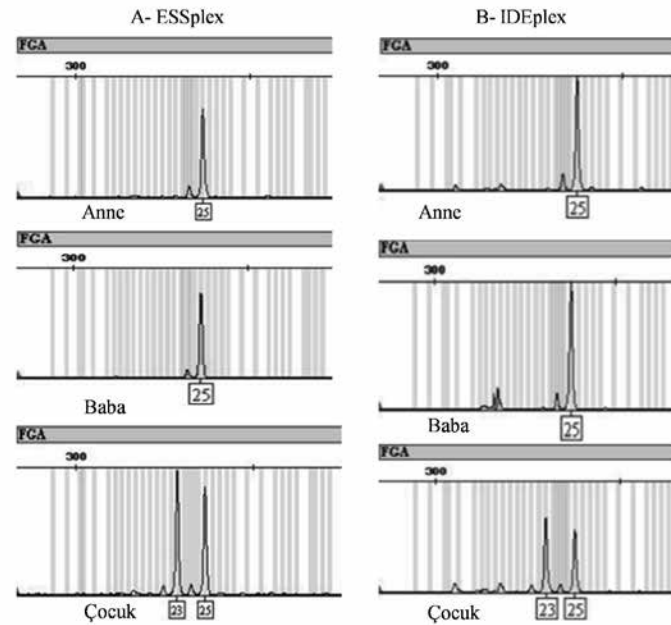
sayısının iki veya üç fazlasının eksikliği ya da fazlalığı şeklinde mutasyonlar bildirilmektedir (6). STR mutasyonları, mayoz sırasında erkek germ hücrelerinde dişi germ hücrelerine göre daha fazla sıklıkta görülür ve başlıca nedeni DNA polimeraz enziminin DNA replikasyonu aşamasındaki kalıp DNA üzerindeki kaymalardır (7-9). Adli genetik açıdan STR mutasyonlarını fark etmek önemlidir. Çünkü paternal ve/veya maternal STR allelinin çocuğa geçişinde meydana gelen bir uyumsuzluk babalığın ve/veya anneliğin yanlışlıkla dışlanmasıyla sonuçlanabilir. Adli genetikçiler, anne, baba ve çocuk arasındaki STR uyumsuzluklarını çözmek için çalışılan STR lokus sayısını artırmakta ve/veya farklı DNA markırları kullanmaktadır. Mitokondrial

DNA üzerinde polimorfik olan HV1 ve HV2 lokuslarının nükleotid dizisinin incelenmesi biyolojik anne ve çocuk arasındaki uyumsuzluğu çözmeye yardımcı olabilir (10). Y STR ve X STR gibi gonozomal lokusların incelenmesi, ebeveynler ve çocuk arasındaki STR uyumsuzluklarını açıklamada yardımcı olabilir (11,12).

Olgumuzda babalık testi için gönderilen anne, olası baba, çocuk üçlüsünden çocuğun FGA lokusunda iki kısa tekrar dizisi azalması şeklinde mutasyon görülmüş olup, olgu bu durumun nadir rastlanması nedeni ile sunulmuştur.

OLGU

Babalık tayini için Nisan 2013 tarihinde mahkeme tarafından Biyoloji İhtisas Dairesine gönderilen anne, baba aday ve kız çocuğa ait olduğu bildirilen kan örneklerinin DNA izolasyonu kolon filtrasyon tekniğini kullanan biorobot universal otomatik DNA izolasyon robotu (Qiagen, Hilden, Germany) ile yapılmıştır. DNA miktar tayini Quantifiler Duo PCR Reaksiyon kiti ve Quantifiler Duo Male primer kullanılarak 7500 Real Time PCR cihazı (Applied Biosystems, California, USA) ile yapılmıştır. Biyoloji İhtisas Dairesinde nesep testlerinde kullanılan otozomal AmpFI investigator ESSplex kiti (Qiagen), IDplex STR kiti (Applied Biosystems) ve Argus X-12 kiti (Qiagen) ile örnekler, polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Daha sonra ABI 3130 genetic



Şekil 1: Anne, baba ve çocuğa ait FGA lokuslarının elektroforeogram görüntüleri

analyser ve GeneMapper v3.5 (Applied Biosystems) yazılımı ile DNA profillerinin data analizleri yapılmıştır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

ESSplex kiti (Qiagen) ile yapılan babalık testinde 15 STR lokusunun 14'ü uyumlu iken çocuğun FGA lokusunda uyumsuzluk tespit edilmiştir. Analiz sonucunda baba adayının ve annenin FGA lokusu homozigot "25-25", çocuğun FGA lokusu heterozigot "23-25" tespit edilmiştir (Şekil 1). Babalığı kesinleştirmek ve mutasyon varlığını doğrulamak için örneklerle FGA lokusuyla birlikte ve ESSplex kitinden (Qiagen) farklı 5 lokus daha içeren ve primer bağlama bölgeleri farklı olan IDplex STR kit (Applied Biosystems) analizi yapılmıştır. Hem ESSplex (Qiagen) hem de IDplex STR kit (Applied Biosystems) ile yapılan çalışmalar sonucunda FGA lokusunun anne veya babanın herhangi birinin normal allelinin (normal allel 25) iki eksiğinin (mutant allel 23) çocuğa geçtiği tespit edilmiştir. FGA lokusu dışındaki 19 farklı STR lokusunda anne, olası baba ve çocuk arasında uyumlu allel kalıtımı tespit edilmiştir. Babalık %99,99 üzerindeki olasılıkla konfirme edilmiştir (Tablo 1). Ayrıca babalık tayininin doğruluğunu daha da arttırmak için anne, baba aday ve çocuğa Argus X-12 kiti (Qiagen) ile gonozomal X STR analizi yapılmış ve babadan çocuğa X STR lokuslarından geçişlerin uyumlu

olduğu görülmüştür. STR lokuslarında mutasyon görülme sıklığı birbirinden farklıdır. Vakamızda mutasyon görülen FGA lokusu-

nun mutasyon oranı STRbase veri bankasında %0,28 olarak bildirilmektedir (13). Ayrıca cinsiyetler arasında da mutasyon

Tablo 1: Anne, baba ve çocuğun otozomal STR lokusları*

	Baba	Anne	Çocuk
AM	XY	XX	XX
TH01	8-8	8-9.3	8-8
D3S1358	16-17	17-18	17-18
vWA	16-18	15-18	18-18
D21S11	28-33.2	30-30	28-30
D16S539	12-13	12-12	12-13
D1S1656	16-16	15-16	15-16
D19S433	13-13	13-14.2	13-14.2
D8S1179	12-14	14-14	14-14
D2S1338	24-24	17-24	24-24
D10S1248	14-15	15-16	15-16
D22S1045	16-17	14-14	14-17
D12S391	18-19	19-19	18-19
FGA	25-25	25-25	23-25
D2S441	11-14	11-14	14-14
D18S51	13-14	14-16	14-14
TPOX	10-10	8-8	8-10
D7S820	8-11	8-9	9-11
D5S818	12-12	9-12	9-12
CSF1PO	12-12	10-11	10-12
D13S317	11-13	11-13	11-11

*FGA lokusundaki alleler bold olarak gösterildi.

görülme sıklıkları farklılık göstermektedir; FGA lokusu için babanın mayozunda mutasyon görülme oranı %0,32 iken anenin mayozunda %0,05 olarak bildirilmektedir [13]. Vakamızda FGA lokusundaki tekrar sayısının eksikliğinin kaynağının maternal mi yoksa paternal mi olduğu ebeveynlerin aynı tekrar sayısına sahip olmalarından dolayı tespit edilememektedir. STR mutasyonların %90'ı tek tekrar değişimi olmakla birlikte nadir olarak çoklu (iki veya daha fazla) mutasyonlar bildirilmektedir [6]. Dauber E. M. ve ark. 23 STR lokusundaki 50796 allelik geçişi inceledikleri çalışmalarında toplam 65 mutasyondan, 10 tane FGA tek tekrar değişimi mutasyonu, bir tane FGA iki tekrar değişimi mutasyonu tespit etmişlerdir ve FGA mutasyon sıklığını %0,22 olarak bildirmişleridir [14]. Lu D. ve ark 6441 ebeveyn-çocuk mayoz geçişini mutasyon açısından incelemişler ve 24 STR lokusunun 22'sinde toplam 195 mutasyon tespit etmişlerdir [15]. Mutasyonların 189'u (%96,92) tek tekrar değişimi, 5 tanesi (%2,56) iki tekrar değişimi ve bir tanesinin (%0,51) üç tekrar değişimi olduğunu bildirmişlerdir [15]. Ülkemizde 13 STR lokusu içeren 59-159 ebeveyn çocuk allel transferinin incelendiği çalışmada 7 lokusta mutasyon tespit edilmiştir ve mutasyonlar tekrar sayısının bir eksiği veya bir fazlası şeklinde bulunmuştur [16]. Literatür ve rilerinde de görüldüğü gibi birden fazla tekrar artışı veya azalışı şeklindeki STR mutasyonları oldukça nadir rastlanan genetik

değişimlerdir. Bu nedenle deneyimsiz uzmanlar tarafından yanlış dışlamaya yol açabilmektedir.

Sonuç olarak, babalık testlerinde az sayıda STR lokuslarında uyumsuzlukların olduğu vakalarda, allel geçişleri incelenirken dikkatli olunmalıdır. Nesep testinin doğruluğunu artırmak ve/veya STR mutasyonlarını konfirme etmek için daha farklı lokuslar içeren farklı otozomal veya gonozomal STR kitlerle sonuçlar desteklenmelidir.

KAYNAKLAR

1. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409(6822):860-921.
2. Weber JL. Informativeness of human (dC-dA) n. (dG-dT) n polymorphism. *Genomics* 1990;7(4):524-30.
3. Jin L, Zhong Y, Chakraborty R. The exact numbers of possible microsatellite motifs. *Am J Hum Genet* 1994;55(3):582-3.
4. Huang, Q.Y, Xu FH, Shen H, Deng HY, Liu YJ, Liu YZ, Li JL, Recker RR, Deng HW. Mutation patterns at di-nucleotide microsatellite loci in humans. *Am J Hum Genet* 2002;70(3):625-34.
5. Kayser M, Roewer L, Hedman M, Henke L, Henke J, Brauer S, Krüger C, Krawczak M, Nagy M, Dobosz T, Szibor R, de Knijff P, Stoneking M, Sajantila A. Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. *Am J Hum Genet* 2000;66(5):1580-8.
6. Levinson G, Gutman GA. Slipped strand mispriming: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 1997;4:203-21.
7. Schlotterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res* 1992;20(2):211-5.
8. Brinkmann B, Klintschar M, Neuhuber F, Hühne J, Burkhard R. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet* 1998;62(6):1408-15.
9. Shimmin, L.C, Chang BH, Li WH. Male-driven evolution of DNA sequences. *Nature* 1993;362:745-7.
10. Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evert I, Hagelberg E, Sullivan K. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genet* 1994;6(2):130-4.
11. Jobling MA, Pandya A, Tyler-Smith C. The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int J Legal Med* 1997;110(3):118-24.
12. Kayser M, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, Heidorn F, Herrmann S, Herzog B, Hidding M, Honda K, Jobling MA, Krawczak M, Leim K, Meuser S, Meyer E, Oesterreich W, Pandya A, Parson W, Penacino G, Perez-Lezaun A, Piccinini A, Prinz M, Schmitt C, Roewer L. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int J Legal Med* 1997;110(3):125-33, 141-9.
13. <http://www.cstl.nist.gov/strbase/mutation.htm> Erişim tarihi: 20.02.2014.
14. Dauber EM, Kratzer A, Neuhuber F, Parson W, Klintschar M, Bär W, et. al. Germline mutations of STR-alleles include multi-step mutations as defined by sequencing of repeat and flanking regions. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6(3):381-6.
15. Lu D, Liu Q, Wu W, Zhao H. Mutation analysis of 24 short tandem repeats in Chinese Han population. *Int J Legal Med* 2012;126(2):331-5.
16. Aşicioglu F, Oguz-Sarvan F, Ozbek U. Mutation rate at commonly used forensic STR loci: paternity testing experience. *Dis. Markers* 2004;20(6):313-5.