



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Kısa Ardışık Tekrar Bölgelerinin (“*short tandem repeats*” - STR) Analizi Doku Karışıklığına Çözüm Olabilir mi ve Aynı Hastada Non-neoplastik ve Neoplastik Bölgeler Arası STR Profilinin Karşılaştırılması? – Ön Çalışma

Dr. Akbar Hajiyev

ANKARA

2018

TC
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Kısa Ardışık Tekrar Bölgelerinin (“*short tandem repeats*” - STR) Analizi Doku Karışıklığına Çözüm Olabilir mi ve Aynı Hastada Non-neoplastik ve Neoplastik Bölgeler Arası STR Profilinin Karşılaştırılması? – Ön Çalışma

Dr. Akbar Hajiyev

Uzmanlık Tezi
olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yeşim Gaye Güler Tezel

ANKARA

2018

TEŐEKKÖR

Bu araştırma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2018-17279 numaralı bilimsel araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

ÖZET

Hajiyev A, Kısa ardışık tekrar bölgelerinin (“short tandem repeats” - STR) analizi doku karışıklığına çözüm olabilir mi ve aynı hastada non-neoplastik ve neoplastik bölgeler arası STR profilinin karşılaştırılması? – Ön çalışma, Hacettepe Üniversitesi, Tıbbi Patoloji tezi, Ankara, 2018. Bazen patolog, “floater” (bulaş) olarak bilinen, preparat üzerinde morfolojik olarak mevcut dokuya uymayan doku fragmanlarının yorumlanmasında zorluklarla yüzleşebilir. Bu bulaşlar Patoloji laboratuvarında spesmenin makroskopik incelenmesi sırasında ve rutin teknik sürecinde doku kalıntılarının çapraz taşınması ile oluşabilir. Ayrıca hastaların doku karışıklığı dokuların kanser veya başka önemli lezyon içerdiği durumlarda belirgin medikal ve yasal güçlük yaratabilir. Patoloji laboratuvarlarında formalinle fikse dokuların STR (“short tandem repeats”) analizi bu doku karışımları ve bulaşlarını çözmek için bir metod olarak ortaya çıkmaktadır.

STR veya mikrosatellitler genom boyunca rastgele dağılmış, çoklu tekrarlanan 2-7 bazlık DNA dizileridir. Bu dizilerin tekrarlanma sayısının farklı olduğu allel sayısı toplumda fazla olduğundan STR lokusları polimorfik niteliktedir. Çoklu STR lokusu bir arada incelenerek gerçekleştirilen STR analizinin iki farklı DNA örneğini ayırım gücü yüksektir.

Yapılan çalışmalarla tümör dokularında yaygın genetik instabilite ve formaldehidin sebep olduğu DNA hasarı ortaya konmuştur. Bundan dolayı doku karışımında çözüm için kullanılacak STR lokuslarında da genetik alterasyonlar mümkündür. Ayrıca bazen patolojik spesmenler başka materyalin bulunmadığı durumlarda adli kimlik tespitinde ve babalık testinde başvuru kaynağı olabilmektedir.

Bu çalışmada tümör dokularında genetik instabilite ve formalinin sebep olduğu DNA hasarının STR analizini nasıl etkilediğini değerlendirilmek için 10 tümör hastası seçilmiştir. Formalinin sebep olduğu etkileri değerlendirmek için hastaların formalinle fikse olmuş normal dokuları kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Tümör dokularındaki genetik instabilitenin STR lokuslarında sebep olabilecek etkilerini incelemek için ise her vakanın normal ve neoplastik alanları kendi içinde karşılaştırılmıştır.

Seçilmiş olan tüm vakaların STR profilleri birbirinden farklı saptandı. Neoplastik ve non-neoplastik dokular arasında *bir alelin kısmi kaybı, mevcut alellere ek bir alelin ortaya çıkması ve mevcut alelin yerine yeni bir alelin ortaya çıkması* şeklinde 3 çeşit değişiklik saptadık. 4 vakada neoplastik dokunun STR lokuslarında bir alelin kısmi kaybı görülmesine karşın tam kayıp izlenmemiştir. 9 vakanın neoplastik dokusunda yeni alel görülmesi yanısıra bunlardan ikisinde yeni aleller normal dokuda bulunan alellerle yer değiştirmiştir.

Bu STR değişiklikleri STR analizinin yorumlanmasında zaman zaman güçlük oluşturabilse de alelik paternlerin dikkatli incelenmesi ile STR temelli doku kimlik testi formalinle fikse normal dokular ve tümörlü dokulara karışıklıklarının çözümü için uygulanabilir. Bu test kendine Patoloji laboratuvarlarında kalite kontrol iyileştirmelerinde önemli uygulama alanı bulabilir.

Anahtar kelimeler: Doku karışıklığı, doku kimlik tespiti, STR analizi, kalite kontrol.

ABSTRACT

Hajiyev A, Could Short Tandem Repeats (STR) analysis resolve specimen source contamination and identity problems, and comparing STR analysis of non-neoplastic and neoplastic tissues of the same patient? – A preliminary study, Hacettepe University, Pathology Thesis, Ankara, 2018.

Not uncommonly, a surgical pathologist faces challenges regarding interpretation of tissue fragments that morphologically do not fit to the specimen at hand, known as ‘floaters’. This occurs as a result of carrying over tissue pieces from one case to another during specimen grossing and routine technical process in a pathology laboratory. Also tissue mix-up may pose significant medical and legal difficulties when mixed tissue contains a significant lesion or tumor. STR analysis has emerged as the method of choice for testing to resolve tissue contamination and mix-up that arise in a pathology laboratory.

STRs are repetitive DNA sequences of 2–7 nucleotides, which are highly polymorphic regions of the human genome. By analysing multiple STR loci together, it has high discriminative power to distinguish two DNA sample.

However, a growing number of studies have found the somatic instability of tumour tissue and the tissue DNA damages caused by formaldehyde. Therefore, alterations of STR loci used in forensic practice are also possible. Also archival pathology specimens sometimes are a source in forensic identification or paternity testing, if no other material is available.

In order to evaluate the genetic alterations caused by somatic instability of tumour tissue and the DNA damages caused by formalyn on STR loci, we studied specimens of 10 patients who have been operated for neoplasia. We compared STR analyses of formalyn-fixed normal tissues of 10 patients to each other. Also for each patient, we compared the STR analyses of formalyn-fixed normal tissue to a formalyn-fixed tumour tissue of the same patient.

We found that all 10 cases can be differentiated from each other based on their results of STR analyses. We detected three kinds of STR changes between normal and tumor tissue: *partial loss of one allele*, *occurrence of an additional allele* and *occurrence of a new allele* instead of that found in normal tissue. The tumor lesion of 4 cases displayed *partial loss of one allele*, but in none of them one allele was completely lost. New alleles could be demonstrated in tumor lesions of 9 patients and in 2 of them the new alleles in the tumor tissue replaced the one found in normal tissue.

These STR changes caused by genetic instability of tumor tissue and formaldehyde may occasionally complicate the interpretation of STR analysing results. However, our results demonstrate that by the careful examination of the allelic pattern, the STR-based tissue identity testing can be applied to formalyn-fixed normal and tumor tissues to detect diagnostic errors relating to contamination or misidentification in pathology laboratories. This finding could give rise to important implications for patient safety in current laboratory protocols.

Key words: Tissue contamination, tissue identity, STR analyses, quality control.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| TEŞEKKÜR | iii |
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | iv |
| İÇİNDEKİLER | vi |
| ŞEKİLLER | vii |
| TABLolar | viii |
| | |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. Kısa Ardışık Tekrar Dizileri (“Short Tandem Repeats” - STR) | 4 |
| 2.2. STR analizi ve değerlendirilmesi | 7 |
| 2.3. STR elektroferogram karakteristikleri | 11 |
| 2.3.1. <i>Heterozigot pik dengesi</i> | 11 |
| 2.3.2. <i>Stokastik eşik değeri</i> | 12 |
| 2.3.3. <i>“Stutter” pikleri</i> | 13 |
| 2.3.4. <i>Diğer artefaktlar</i> | 14 |
| 2.4. STR analizinin kullanım alanları | 15 |
| 2.4.1. <i>Hücre hatlarının doğrulanması</i> | 15 |
| 2.4.2. <i>Kimerizm testi</i> | 15 |
| 2.4.3. <i>Popülasyon genetiği</i> | 15 |
| 2.4.4. <i>Diagnostik Patoloji</i> | 15 |
| 3. MATERYAL METOD | 17 |
| 4. BULGULAR | 20 |
| 5. TARTIŞMA | 25 |
| 6. SONUÇLAR | 28 |
| | |
| KAYNAKLAR: | 29 |

ŞEKİLLER

| | |
|---|----|
| Şekil 1. STR analiz basamakları | 6 |
| Şekil 2. Kısa ardışık tekrar dizi örneği | 7 |
| Şekil 3. Örnek STR analiz elektroferogramı | 8 |
| Şekil 4. Genotip frekansı hesaplama örneği | 9 |
| Şekil 5. STR analizi veri işleme süreci | 10 |
| Şekil 6. Alelik merdiven | 11 |
| Şekil 7. Heterozigot dengesi | 12 |
| Şekil 8. DNA replikasyonu esnasındaki kayma mekanizması | 13 |
| Şekil 9. Stutter | 14 |
| Şekil 10. Taq polimerazın yeni sentezlenen DNA'ya tek nükleotid ekleme etkisi | 14 |
| Şekil 11. DNA degradasyon etkisini gösteren elektroferogram | 20 |
| Şekil 12. Amplifiye olmuş DNA miktarı etkisi | 21 |
| Şekil 12. Bir alelin kısmi kaybı | 23 |
| Şekil 13. Mevcut alellere ek bir alel ortaya çıkması | 23 |
| Şekil 14. Mevcut alellin yerine yeni alelin ortaya çıkması | 24 |

TABLULAR

| | |
|---|----|
| Tablo 1. Örnek STR lokusları | 4 |
| Tablo 2. Tekrarlanan dizinin yapısına göre STR sınıflaması. | 5 |
| Tablo 3. Seçilen vakaların listesi | 17 |
| Tablo 4. DNA izolasyonu (QIAamp DNA kiti ile) | 18 |
| Tablo 5. Mentype® Chimera® STR lokus bilgisi | 18 |
| Tablo 6. PCR reaksiyon karışımı içeriği | 19 |
| Tablo 7. PCR amplifikasyon süreci | 19 |
| Tablo 8. Elektroforez karışımı | 19 |
| Tablo 9. Neoplastik dokularda ortaya çıkan STR değişiklikleri | 22 |
| Tablo 10. STR değişikliklerinin lokuslara göre dağılımı | 22 |

1. GİRİŞ

Genotipleme DNA sekansını kullanarak canlı türlerin üyeleri arasında genetik varyasyonun ölçümünü sağlayan bir moleküler araç olarak ortaya çıkmıştır. İlk uygulamasının bir uzantısı olarak genotipleme Adli Tıp'ta kimlik tespiti ve akrabalık tayininde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Daha sonra bu yöntem kendisine diagnostik patolojide doku aidiyet testinde, kemik iliği transplantasyonu kimerizm değerlendirmesinde ve hidatiform mollerin tanısında ve alt tiplendirmesinde önemli kullanım alanı bulmuştur^{1, 4}. Patolojik değerlendirme için alınan biyopsilerin yanlış etiketlenmesi, karışması ve çapraz kontaminasyonu patoloji laboratuvarının günlük rutininde sık olmamakla birlikte karşımıza çıkan sorunlar arasındadır.

Biyopsi örnekleri ve ameliyat spesmenlerinin *preanalitik* (örnekleme öncesi) süreçte karışması aşağıdaki kalite kontrolü kriterleri uygulanarak engellenmektedir²;

- a) işlem uygulanacak hastanın kimlik kontrolü,
- b) örneklerin konulduğu kutulara patoloji istem kağıdı ile eşleşen ve gerekli bilgileri içeren etiket yapıştırılması,
- c) örnek patoloji laboratuvarına kabul edilirken barkod sistemi uygulanması,
- d) kabul edildikten sonra örnekleme öncesi biyopsi numarası ve kimlik bilgilerinin kontrolü.

Ayrıca *analitik* (örnekleme sırasında) ve *postanalitik* (örnekleme sonrası) önlemlerle doku karışıklığı ve dokuların birbirine bulaş olasılığı minimuma indirilmektedir²;

- a) patoloji laboratuvarında doku örneklenirken örnekleme zemininin ve kullanılan malzemelerin düzgün temizlenmesi,
- b) örnekleme zamanı ve doku gömme sürecinde parçaların doğru biyopsi numarasını içeren kasetlere konulması,
- c) bloklardan kesit hazırlanırken doğru biyopsi numarası içeren lamlara alınması,
- d) kesit hazırlanırken su banyosunun her biyopsiden sonra temizlenmesi.

Ancak biyopsi spesmenlerinin, yukarıda sıralanan tüm basamaklarda karışıklıkları çok sıkı kalite kontrolü kriterleri uygulanan merkezlerde bile olabilmektedir. Biyopsilerin muayene odasında veya ameliyathanede alınma sırasında karışması, konulduğu kutuların yanlış etiketlenmesi, biyopsi kabulü sırasında kutulara yanlış barkod yapıştırılması da görülebilmektedir. Özellikle "floater" (bulaş) olarak bilinen preparat üzerinde morfolojik olarak esas dokuya uymayan doku fragmanlarının yorumlanması çetrefilli durum oluşturabilir. Bu patoloji laboratuvarında bir numunenin makroskopik incelenmesi ve diseksiyonu zamanı kullanılan bıçağın ve zeminin iyi temizlenmemesi sonucu esas dokunun konulduğu kasete önceki incelenen örneğe ait doku kalıntılarının taşınması ile oluşabilir. Ayrıca bu sorun dokuların kasetlere konulup tespit sürecini geçtikten sonra parafine doku gömme sırasında çapraz bulaş yolu ile, mikrotom ile kesit alırken su banyosundan çapraz bulaş yolu ile ve hatta rutin boyama sırasında bile ortaya çıkabilir. Mikroskopik kesitlerde dış kaynaklı dokuların görülme oranı ile ilgili 275 patoloji laboratuvarının katıldığı geniş çaplı bir çalışmada retrospektif

olarak kesitlerin yaklaşık %3'ünde (1653/57083) dış kaynaklı bulaş görülmüştür. Bulaşların yaklaşık %63'ünün farklı bir vakadan kontamine olduğu düşünülmüştür. Bulaş olan kesitlerin %13'ünde dış kaynaklı dokunun neoplastik olduğu görülmüştür. Kontaminasyonların yaklaşık %60'ının kesit alma sırasında olduğu, %40'ının ise parafin bloğun içinde olduğu saptanmıştır³.

Doku karışıklığını ve kontaminasyonunu düşündürecek senaryolardan bazıları şu şekildedir:

1. Hastanın klinik ve histopatolojik bulguları uyumsuz olduğu zaman klinisyen veya patolog o vakaya ait örneğin preanalitik, analitik ve postanalitik süreçteki herhangi bir basamakta karışmış olabileceğini düşünebilir.
2. Biyopsi kesitinde diğer fragmanlarla uyumsuz ve hastanın tedavisini etkileyebilecek tanı değişikliği oluşturan doku bulunduğu zaman patolog analitik veya postanalitik süreçte çapraz bulaş olasılığını düşünebilir.
3. İğne biyopsi, küretaj veya endoskopik biyopsi gibi küçük örneklerle neoplazm tanısı alan hastanın eksizyon materyalinde tümör saptanmaması durumunda küçük biyopsi ve eksizyon materyalinin aynı hastaya ait olup olmama şüphesi ortaya çıkabilir.

Çoğu karışıklık konvansiyonel yöntemlerle kolayca çözülebilir. Bir grup karışıklık bulaş ile esas örneğin doku tiplerinin farklı olduğunun görülmesi ve diğer histolojik bulguları karşılaştırılarak çözülebilir. Ayrıca su banyosundan gelen çapraz bulaşlar dokunun gömüldüğü parafin blokta olmadığı için yeniden kesit yapma gibi rutin laboratuvar tetkikleri ile kolayca halledilebilir. Ancak doku karışıklığı karışan doku ile esas dokunun aynı doku tipine ait olduğu, kanser veya başka önemli lezyon içerdiği durumlarda patoloğu, klinisyeni ve hastayı bazen zor durumda bırakabilir. Patoloğun yaşayabileceği en zor durumlardan biri bulaş olduğu düşünülen dokunun ne tamamen gözardı edilebildiği, ne de emin şekilde hastaya ait olduğunun söylenebildiği malign tanı verilmesi gibi önemli tıbbi kararın alınacağı zamandır. Bu zor durumda patolog klinisyenle iletişim kurup durumu açıkladıktan sonra yeniden biyopsi önerebilir. Doku karışıklıklarının çözümü, parafin bloklarda ve preparatlarda kontamine doku fragmanlarının kaynağının belirlenmesi, Adli Tıp'ta kimlik tespiti için eskiden beri geliştirilmiş ve sıklıkla kullanılan insan genomundaki *kısa ardışık tekrar dizilerin* ("short tandem repeats" - STR) profilinin ortaya konması ile de mümkün olabilir.

İnsan genomunun çok büyük bir kısmı her kişide aynıdır. Kişiden kişiye farklılık gösteren alanlar (<%1) polimorfizm olarak isimlendirilmektedir. Mikrosatellitler veya STR olarak isimlendirilen DNA farklılıkları bu grup altında değerlendirilebilir. Mikrosatellitler veya STR genom boyunca rastgele dağılmış, çoklu tekrarlanan 2-7 bazlık DNA dizileridir. Bu dizilerin polimorfik olması tekrarlanan dizi aynı olsa da toplumda farklı sayıda tekrar içeren alel sayısının fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Adli Tıp'ta kimlik tespiti 12-16 farklı STR lokusu birarada incelenerek belirlenmektedir. Bu amaç için bu güne kadar binlerce STR lokusu belirlenmiştir. Örnek olarak 15 farklı STR lokusu birarada analiz edilince iki farklı DNA örneğinin aynı olma ihtimali 1.42×10^{-18} çıkmaktadır (PowerPlex® 16 HS System).

Literatürde biyopsi spesmenlerinde doku karışıklığı ve kontaminasyonunun Tıbbi Patoloji Laboratuvarlarında STR analizi ile çözümü vaka bildirimleri şeklinde mevcuttur. Bu

bildirimlerin bir tanesinde aynı hastaya ait non-neoplastik endometrium dokusu ve endometrium adenokarsinomu içeren dokunun STR profillerinde farklılık saptanmıştır⁵. Ancak formaldehit ile fikse olmuş dokularda DNA degradasyonları olduğu da bilinmektedir. Literatürde formalin ile fikse parafine gömülmüş dokularda farklı vakalara ait dokuların ve aynı vakaya ait tümöral ve non-tümöral alanların STR profilleri açısından karşılaştırıldığı çalışmalar sınırlıdır.

Bu çalışmada, seçilen 10 farklı hastaya ait dokular STR profilleri açısından analiz edilmiştir. Ayrıca iki farklı hastaya ait doku kesit alma aşamasında aynı tüpe alma suretiyle karıştırılarak STR analizi yapılmıştır. Son olarak tüm hastaların neoplastik ve non-neoplastik dokuları kendi içinde STR profilleri açısından karşılaştırılmıştır. Planlanan bu çalışma bir ön çalışma niteliğinde olup, bir çok farklı organ ve tümör tipi çalışmaya dahil edilmiştir. Alınacak sonuca göre daha spesifik yönde genişletilmiş ayrı bir çalışma planlanabilecektir. STR analizinin yaygın kullanıldığı alanlarda DNA elde etme amacıyla alınan örnek genellikle formaldehite maruz kalmamaktadır ve neoplastik doku içermemektedir. Bunları göz önüne alarak mevcut çalışma ile Tıbbi Patoloji laboratuvarlarında gerçekleşen olası doku karışıklıklarının çözümü için STR analizinin kullanılabilirliği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kısa Ardışık Tekrar Dizileri (“Short Tandem Repeats” - STR)

Mikrosatellit olarak da bilinen *kısa ardışık tekrar dizileri* (“short tandem repeats” – STR), yaklaşık 150 nükleotid uzunluğuna ulaşacak kadar kısa ard arda tekrarlanan 1-7 bazlık DNA dizileridir. Bu dizilerin tekrarlanma sayısının farklı olduğu alellerin toplumda fazla olması canlıların DNA’sını polimorfik yapan özelliklerden biridir. STR’lar prokaryotlarda ve ökaryotlarda yaygın şekilde bulunmaktadır. Bu diziler insan genomu boyunca tüm genomun yaklaşık %3’ünü oluşturacak şekilde tüm kromozomlara dağılmışlardır. Ancak kromozomlar arasındaki yoğunluğu değişkendir; insanlarda 19. kromozomda en yüksek sıklıkta dağılmıştır. Kromozomların içindeki dağılımı da üniform değildir ve subtelomerik bölgelerde daha az gözükmetedirler. İnsan genomunda STR lokusu ortalama olarak her 2000 baz çiftinde bir görülmektedir. Çoğu STR lokusu genomun kodlanmayan bölgelerinde yerleşmesine karşın sadece %8’i kodlanan alanlarda bulunmaktadır. İnsanlarda en sık görülen STR’lar A (adenin)’den zengin birimlerdir: A, AC(T), AAC(T), AAAC(T,G). Örnek olarak D3S1266 olarak adlandırılan STR lokusunda D harfi DNA’yı, 3 rakamı STR lokusunun yerleştiği 3. kromozom, S harfi STR’ı, 1266 ise özgün lokalizasyonunu temsil etmektedir⁶. Aşağıda örnek olarak iki STR lokusuna ait özellikler verilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Örnek STR lokusları⁷.

| | | | |
|----------------|---------------------|-----------------------------------|---------|
| 1. STR lokusu: | D5S818 | Anonim | 5q21-31 |
| STR dizisi: | (AGAT) _n | | |
| 2. STR lokusu: | TH01 | Tirozin hidroksilaz geni intron 1 | 5q21-31 |
| STR dizisi: | (AGAT) _n | | |

Tekrarlanan birimlerin özelliklerine göre STR’lar farklı tiplere sınıflandırılabilir; Bunlar tekrarlanan dizinin uzunluğuna göre veya tekrarlanan dizinin yapısına göre olabilmektedir.

Tekrarlanan dizinin uzunluğuna göre STR’lar mono-, di-, tri-, tetra-, penta- ve hexanükleotid tekrarları şeklinde sınıflandırılmaktadır. Tekrarlanan dizinin uzunluğu arttıkça bu sınıflamadaki her tipe ait lokus sayısı azalmaktadır. İnsan genomundaki en sık STR’lar dinükleotid tekrarlarıdır.

Tekrarlanan dizinin yapısına göre ise; basit, bileşik veya karmaşık tekrarlar şeklinde sınıflandırılmaktadır. Basit tekrarlar aynı uzunlukta ve aynı sırada tekrarlanan dizileri içermektedir; örneğin AATG tekrar motifi içeren TH01 adlı STR lokusu. Bileşik tekrarlar iki veya daha fazla birbirine komşu ve sıralı basit tekrarlardan oluşmaktadır; örneğin TCTA ve TCTG komşu tetranükleotidlerin tekrarından oluşan vWA adlı STR lokusu. Kompleks tekrarlar değişken uzunlukta ve değişken sırada tekrarlanan birimlerden oluşması yanısıra araya giren farklı dizileri de içerebilir⁷ (Tablo 2).

Tablo 2. Tekrarlanan dizinin yapısına göre STR sınıflaması⁷.

| STR sınıfı | Örnek |
|-------------------|--|
| Basit tekrarlı | TH01: [AATG] ₇ = alel 7 |
| Bileşik tekrarlı | vWA: [TCTA][TCTG] ₄ [TCTA] ₁₃ = alel 18 |
| Karmaşık tekrarlı | D21S11: [TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA[TCTA] ₃ TCA[TCTA] ₂ TCCATA[TCTA] ₉ = alel 27 |

STR'lar keşfedildiğinden beri hücre ve organizmadaki fonksiyonlarına ilgi duyulmuştur. Bu diziler organizmalarda yaygınca bulunmasına rağmen ilk başta biyolojik fonksiyona sahip olmadığı düşünölmüştür. Ancak STR'ların önemli rolleri olduğu tedricen ortaya çıkmaktadır. Bir çok hastalık yapan bakteride bazı patojenik genlerde STR dizileri bulunmuştur; bu genlerdeki STR bölgeleri çerçeve kayma ("*frameshift*") mutasyonu yaratarak bazı proteinlerin ekspresyonunu değıştirip bakterinin konakçı immün sisteminden kaçışını sağlamaktadır. Bazı STR'lar gen transkripsiyonunun regölasyonu, kromatinin uzaysal organizasyonun düzenlenmesi ve proteinlerin fonksiyonlarında önemli rol almaktadır. İnsan genlerinin yaklaşık %17'si açık okunan dizilerinde STR içermektedir. Zaman içinde STR'ların biyolojik fonksiyonları daha fazla keşfedilmesine rağmen çoğunun ne işe yaradığı hala bilinmemektedir^{8, 12}.

Biyolojik fonksiyonlarının ötesinde, bir toplumun bireylerinde STR lokuslarında dizilerin tekrarlanma sayılarının farklı olduğu alellerin fazla olması insan genomunu polimorfik yapan özelliklerdendir. Bireylerin STR lokuslarındaki bu uzunluk varyasyonlarından faydalanılarak DNA örneklerinden kimlik tespiti ve akrabalık tayini gibi adli uygulamalar 1990'lardan beri yapılmaktadır. Bu işlem çoklu STR lokusunu multipleks PCR ile amplifiye ederek elde edilen amplikonları kapiller elektroforez ile büyüklüklerine göre analiz edilmesi ile yapılmaktadır. Her lokusun tekrar sayısı amplikonun büyüklüğünden çıkarım yolu ile elde edilen her ticari kitin kendine uygun alelik merdiven ("*allelic ladder*") ile karşılaştırılması ile saptanmaktadır (Şekil 1). Bir çok STR lokusu (12-27 lokus) bir arada analiz edilirse bir kişiye ait DNA örneğinin özgülüğü analiz edilen STR lokuslarının alel frekanslarının çarpımı ile hesaplanabilmektedir⁹.

Şekil 1. STR analiz basamakları.

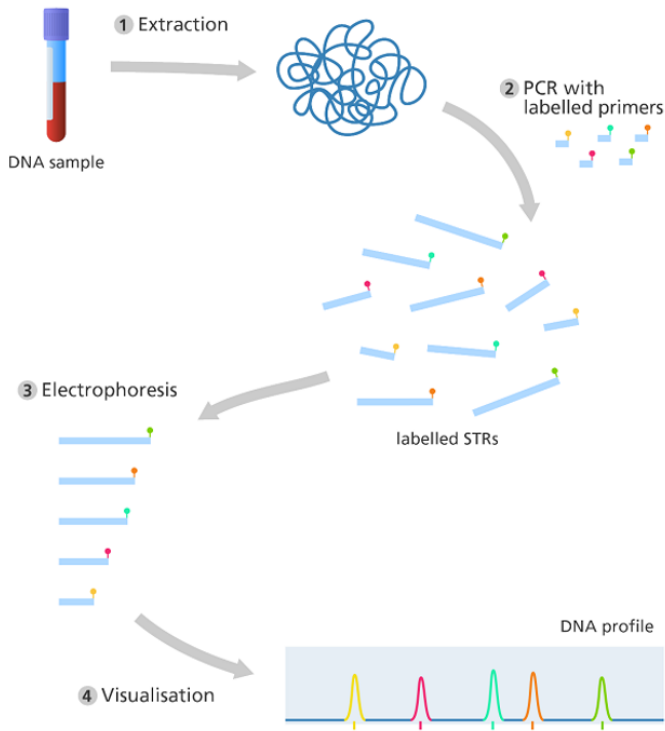


Illustration showing the steps in DNA fingerprinting.
Image credit: Genome Research Limited

Genomdaki herhangi bir DNA sekansı çok düşük mutasyon oranı sergilemektedir. Bu yaklaşık her nesilde belirgin bir gen için 10^{-9} oranında nokta mutasyonu ile o genin tek nükleotid varyantını oluşturmaktadır. Bu sayede toplumda tek nükleotid polimorfizmi ("*single nucleotide polymorphism*" - SNP) ortaya çıkmaktadır. Buna karşın STR sekanslarında bu oran her nesilde her lokus için 10^{-6} ile 10^{-3} 'lere yükselmektedir. STR mutasyonu en sık DNA replikasyon esnasındaki iplik kayması mekanizması ("*strand-slippage replication*") ile olduğu düşünülmektedir (Şekil 8). Bu sayede STR lokusları toplumda polimorfik özellik kazanmıştır. STR tipleri arasında mutasyon oranı belirgin şekilde değişmektedir; non-patojenik STR lokuslarında dinükleotid tekrarları en yüksek mutasyon oranına sahipken tetranükleotid tekrarları düşük oran göstermektedir. Tekrar sayısı arttıkça mutasyon oranı da artmaktadır^{10, 12}.

STR'lar bir grup insan genetik hastalıkları ile ilişkilidir. Hastalık-ilişkili trinükleotid tekrarlarının mutasyon oranı ilişkisiz olanlardan yaklaşık 5-7 kat daha fazladır. Direkt hastalık ilişkisi yanısıra STR bölgelerinin polimorfizmi bazı kanserlere yatkınlık oluşturmaktadır. Huntington hastalığı ve spinoserebellar ataksi gibi nörodejeneratif hastalıklar protein kodlayan bölgelerde trinükleotid STR tekrarlarının artması ile oluşmaktadır. Ayrıca protein kodlamayan bölgelerde bulunan ve gen ekspresyon regülasyonunda rol oynayan STR'ların tekrar artışları myotonik distrofi, Friedreich ataksi ve frajil X sendromu gibi hastalıklara yol açmaktadır. Protein kodlayan genlerde ve protein kodlamayan bölgelerde bulunup gen ekspresyonu düzenlemesi yapan STR'lar kognitif fonksiyonlarda ve otoimmün cevaplarda iştirak eden genlerle ilişkilidir¹³.

CODIS (Combined DNA Index System) ABD’de FBI tarafından oluşturulmuş DNA veritabanıdır. Bu sistemin DNA veri tabanının çekirdek STR lokuslarının belirlenme kriterleri arasında seçilen STR lokusunun hastalıklarla ilişkisiz olması, mutasyon oranının düşük olması, alel sayısı dağılımına göre yüksek ayırım gücüne sahip olması, diğer STR alellerinden bağımsız olması, tetranükleotid tekrar içermesi ve rasgele eşleşme olasılıkları göz önüne alınmaktadır¹¹.

2.2. STR analizi ve değerlendirilmesi

STR analizi, bireyler arasında STR lokuslarının tekrar sayısının varyasyonuna dayanır. İnsan genomunda her STR lokusuna ait iki alel mevcuttur. Bunlardan biri anneden, diğeri babadan gelir. Örnek olarak 7. kromozomda bulunan D7S820 olarak bilinen STR lokusu GATA tetramerinin 5 ile 16 arasındaki tekrarını içermektedir; bu da toplumda 12 farklı muhtemel alelin olduğunu göstermektedir. D7S820 STR lokusuna ait 8 ve 10 tekrar sayısı içeren alellere sahip bir birey 8 tekrarlı lokus içeren aleli bir ebeveyninden, 10 tekrarlı lokus içeren diğeri aleli diğeri ebeveyninden almıştır (Şekil 2).

Şekil 2. Kısa ardışık tekrar dizi örneği.

8 tekrar

ALEL 1 : CTAGAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATACTAGACTAGACTAG

ALEL 2 : CTAGAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATACTAGACTAGACTAG

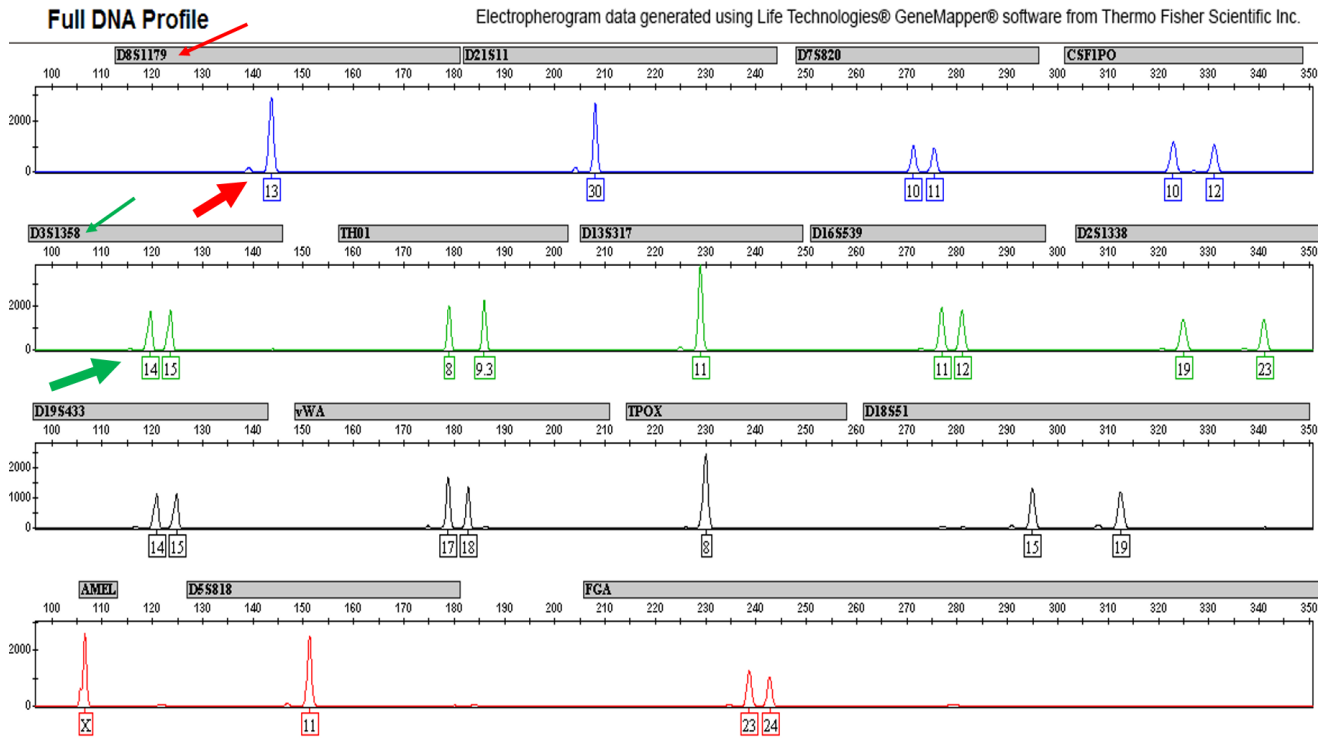
10 tekrar

Bu lokusa ait toplamda 12 farklı alel mevcut olduğundan aşağıdaki denklem¹³ yardımı ile muhtemel genotip veya alel çifti sayısı hesaplanabilir.

$$\text{Genotip} = n(n+1)/2 = 12(12+1)/2 = 78$$

Sonucun 78 çıkması muhtemel 78 genotip veya alel çifti olabilir demektir; bunlardan 12’si homozigot (her ebeveyninden aynı aleli alınmış), 66 heterozigot (ebeveynlerden farklı alelleri almış) olacaktır. Her birey için STR profil özgünlüğünü artırmak için çoklu STR bölgesi bir arada analiz edilmektedir.

Şekil 3. Örnek STR analiz elektroferogramı¹⁴.



Şekilde 3’de 15 farklı STR bölgesini ve cinseyete özgü amelogenin lokusunu (yukarıdaki gri kutular) içeren STR profiline ait elektroferogramı görülmektedir. Bu elektroferogramda en üstteki gri kutularda farklı STR lokusları boyutlarına göre horizontal olarak sıralanmıştır. Vertikal çizgi ise ampikonun miktarını temsil etmektedir. STR bölgelerinde her pikin altında kutu içinde yazılan sayılar tekrar sayılarını temsil etmektedir. D8S1179 bölgesinde (ince kırmızı ok) tek pik mevcuttur ve 13 tekrar içermektedir (kalın kırmızı ok); bu lokusun homozigot olduğunu gösterir, yani her ebeveyinden 13 tekrar içeren aleli almıştır. D3S1358 bölgesinde (ince yeşil ok) 14 ve 15 tekrar (kalın yeşil ok) içeren iki pik mevcuttur; yani bu STR bölgesi heterozigot olup 14 tekrarlık aleli bir ebeveyinden, 15 tekrarlık aleli ise diğerinden almıştır. Ayrıca homozigot bölgeye ait pik uzunluğu heterozigot olan lokustaki her iki alelin uzunluklarının toplamı kadardır, bu da her homozigot olan iki alelin aynı tekrarı içerdiğini gösterir. Şekilde toplam 5 homozigot, 10 heterozigot STR lokusu izlenmektedir¹⁴.

ABD’de devlet temelli DNA veritabanı olan CODIS’in (Combined DNA Index System) belirlemiş olduğu çoklu STR lokusları bir arada analiz edilerek Adli Tıp’ta kimlik tespiti ve akrabalık tayini yapılmaktadır. 13 lokusu içeren CODIS STR markerları şunlardır: D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, ve vWA. Bu lokuslar Kafkas, Afrikan, Hispanik ve Asya gibi birçok etnik grubun DNA’larından elde edilen verilerle belirlenmiştir. Bu verilerle, belirlenen tüm STR lokuslarının alel frekansları saptanmıştır. 2017’de STR lokus spektrumu daha da genişletilmiştir^{14, 15}.

Dünyanın farklı bölgelerinde toplumu daha iyi tanımlayan STR lokusları, alel sayısı ve alel frekansları belirlenmiştir. Bir bireydeki her STR alelinin toplumda görülme frekansını bilirse o bireyin STR genotipinin o toplumda görülme olasılığını hesaplayabiliriz; bunun için her alel çiftinin bir arada bulunma frekansını *Hardy-Weinberg denklemi* ile ayrı ayrı

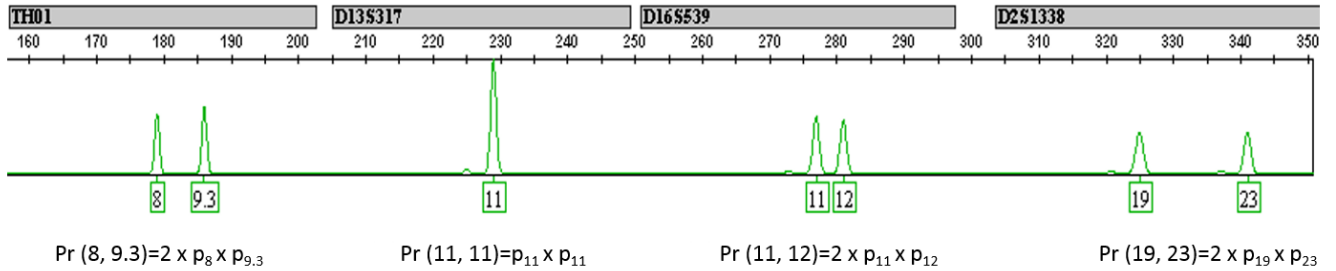
hesapladıktan sonra çıkan tüm sonuçları çarpmak gerekir (Şekil 4). *Hardy-Weinberg denklemi* ile bir STR lokusunun frekansı şu şekilde hesaplanır:

eğer p =alel 1'in frekansı ve q =alel 2'nin frekansı ise

homozigot bireylerin o STR lokusuna ait frekansı p^2 ve q^2 'dir,

heterozigot bireye ait frekans ise $2pq$ 'dur.

Şekil 4. Genotip frekansı hesaplama örneği¹⁴.



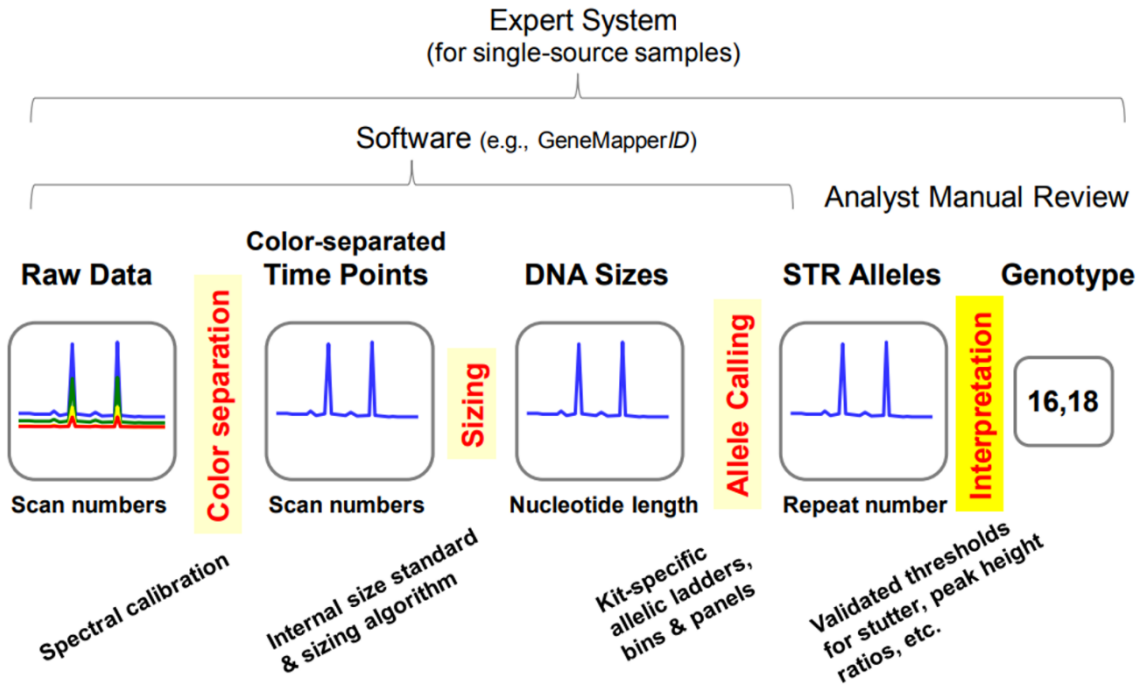
Örnek olarak Şekil 4'te 4 farklı STR lokusunun elektroferogramı verilmiştir. Her lokusun altında o lokusa ait alel çiftinin bir arada bulunma frekansının hesaplanacağı formül yazılmıştır. Bireyin bu elektroferogramdaki genotipe sahip olma olasılığı şu şekilde hesaplanmaktadır¹⁴:

$$Pr(8, 9.3) \times Pr(11, 11) \times Pr(11, 12) \times Pr(19, 23) = 0.025 \times 0.022 \times 0.046 \times 0.130 = 3.3 \times 10^{-6}$$

Kimlik tespiti söz konusu ise bundan sonra geriye olay yerinde bulunan DNA örneğinin STR profili ile şüphelinin STR profilini karşılaştırmak ve rasgele eşleşme olasılığını (*random match probability*) hesaplamak kalır^{14, 15}.

Akrabalık tayininde ise her iki ebeveynin ve çocuğun STR profilini karşılaştırarak ve her nesilde STR mutasyon oranını göz önüne alarak çocuğun tüm STR alellerinin anne ve babadan geldiğine emin olmak gerekir^{14, 15}.

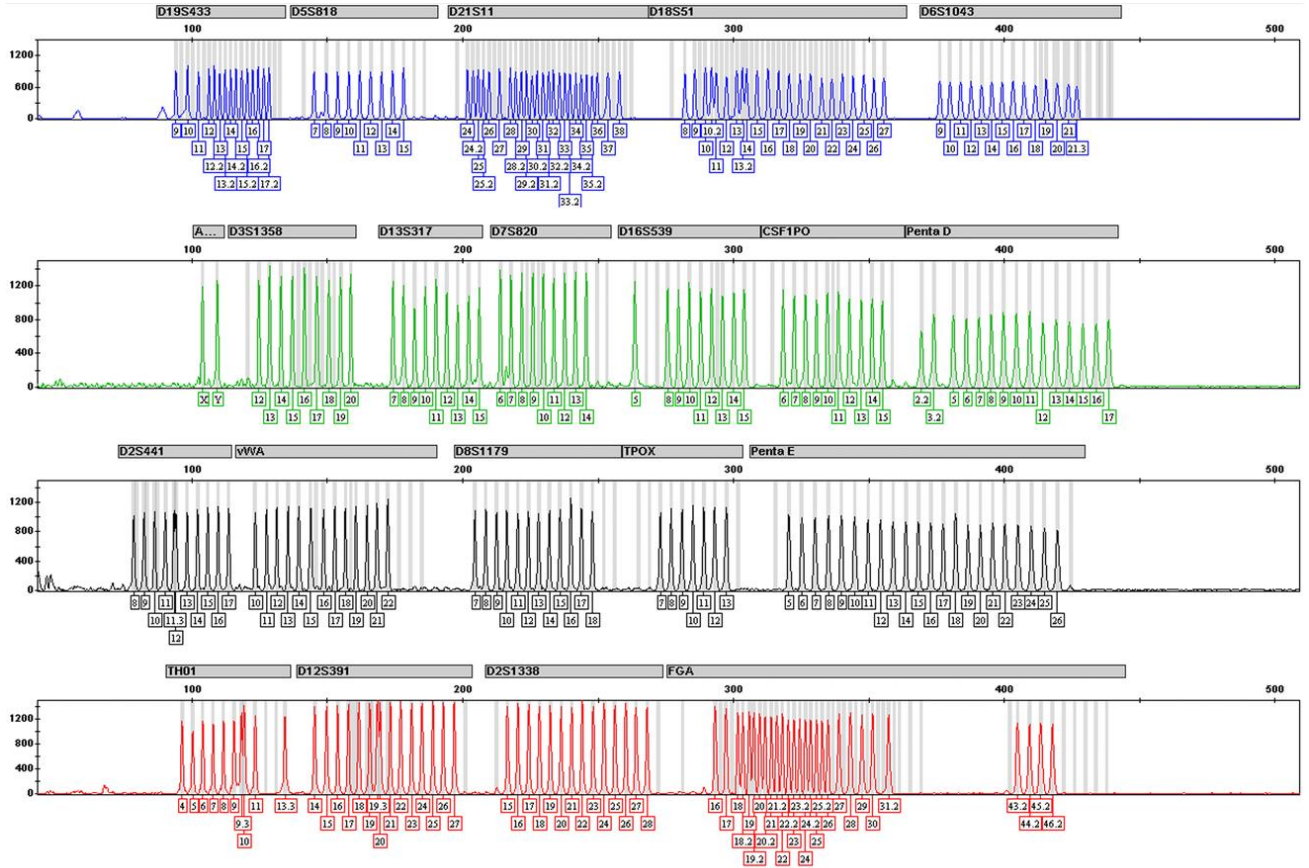
Eğer olay yerinden alınan örnekte birden fazla DNA karışımı bulunuyorsa çıkan STR analizi sonucundan kaç farklı DNA olduğu ve hangi alelleri içerdiği ihtimalini bazı istatistiksel yöntemlerle ortaya koymak mümkündür¹⁴.

Şekil 5. STR analizi veri işleme süreci¹⁴.

J.M. Butler (2015) *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*, Figure 1.4, p. 9

STR genotipini ortaya koymak için örnekten DNA izolasyonu yapmak gerekir. Sadece 1 nanogram DNA genellikle iyi bir sonuç elde etmek için yeterlidir. DNA izolasyonundan sonra belirlenen STR lokuslarını farklı flöresan boya ile işaretli primerler kullanarak multipleks PCR ile aynı reaksiyonda amplifiye edilir. Böylelikle farklı renkli flöresan boya ile işaretli ampliconlar elde edilir. Daha sonra bu ampliconların kapiller elektroforez ile büyüklüklerine göre çözümlenmesi gerekmektedir. Çözümleme sürecinde her STR bölgesinden elde edilen ampliconlar yazılım programları ile işaretli flöresan boyasına uygun farklı renge sahip pikler şeklinde okunabilir düzeye getirilmektedir. STR'lar 100-300 bazlık uzunlukta değişiklik göstermektedir. Ampliconları elektroforez ile çözümlmek için her STR lokusu için toplumda saptanan tüm aleleri temsil eden alelik merdiven ("allelic ladder") ve internal boyut standardı ("internal size standard") gerekmektedir. Ticari olarak çoklu flöresan boya ile işaretli multipleks STR primeri içeren kitler mevcuttur. Bunların kendine özgü alelik merdiven ve internal boyut standardı beraberinde verilmektedir. Şekil 5'de elektroforez ve yazılım programları ile çözümleme sürecinin basamakları gösterilmiştir. Şekil 6'da gri renkli pikler ampliconların büyüklüğünden çıkarım yoluyla belirlenmiş her tekrar sayısına uygun internal boyut standardı temsil etmektedir. Renkli pikler ise toplumdaki her STR bölgesine ait alel sayısını göstermektedir¹⁶.

Şekil 6. Alelik merdiveni.



Bu yöntemdeki majör kısıtlama STR lokuslarının nükleotid sekanslarını saptayamamaktır. Nükleotid sekansını saptamak için her bölgeye ayrı ayrı Sanger sekansı uygulamak gerekmektedir. Toplumdaki STR mutasyon oranını saptamak için lokusların nükleotid sekansını bilmek gerekir. Konvansiyonel PCR ile STR lokuslarının tekrar sayılarını rutin belirlemek dışında STR lokuslarının Sanger sekanslama ve son dekatta kullanımı hızla artan yeni nesil sekanslama ("*next generation sequencing*" – NGS) ile lokusların tüm sekans çeşitliliğini saptama çabası gündemdedir. Artık bunun için de ticari kitler mevcuttur. Doğal olarak, STR lokuslarının uzunluğu yanısıra sekansını da ortaya çıkaran Sanger sekans veya NGS verileri konvansiyonel yöntemle elde edilen ve sadece ampikonun boyutuna dayalı verilere göre daha kesin ve kapsamlı olmasına karşın STR lokusunda nükleotid sekansını ve lokustaki mutasyonu belirlemeyi gerektirecek zor durumlar dışında rutin kullanımda değildir¹⁷.

2.3. STR elektroferogram karakteristikleri

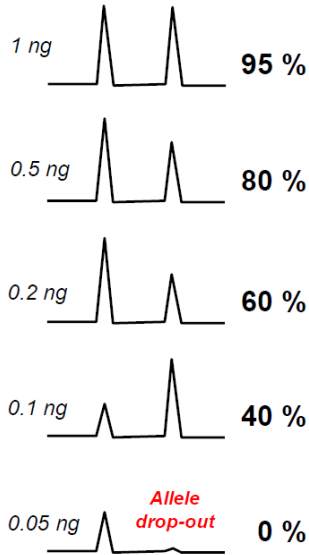
Adli Tıp kurumları STR multipleks sisteminin davranışının detaylarını ortaya koymuştur¹⁸. Sonuçları yorumlamak için STR lokusunu temel hatları ile karakterize etmek gerekir; stokastik eşik değer, "*stutter*" oranı, heterozigot pik dengesi gibi tanımlamalar açıklanmalıdır.

2.3.1. Heterozigot pik dengesi

Heterozigot dengesi iki alelin pik yüksekliklerinin birbirine oranıdır. In vivo şartlarda, heterozigot bir lokusta her iki alelden amplifiye olan DNA moleküllerinin miktarının aynı olması gerekir. Ancak DNA izolasyonu sırasında bu denge bozulabilir. Bu dengesizlik bir lokusa

ait iki alelin gelişigüzel (stokastik) örnekleme sonucu oluşur. DNA izolasyonu sırasında hücre ve nükleus membranı çözülür ve lokuslara ait aleller karışım içinde gelişigüzel dağılır. Pipetle bu karışımdan alındığı zaman aleller dengeli gelmeyebilir ve sonuçta PCR ile amplifikasyon miktarı eşit olmayabilir. Eğer DNA miktarı düşükse bu dengesizlik daha da artar (Şekil 7). Ayrıca daha kısa DNA segmentleri daha öncelikli amplifiye olduğu için DNA fragmanının uzunluğu arttıkça daha düşük pik yüksekliği etkisi görülecektir ("*preferential amplification*"). Reaksiyon inhibisyonu ve elde edilen DNA'nın degradasyonu (özellikle formalin fikse dokularda) sık olduğundan amplifiye olacak DNA fragmanı uzunsa o alelde kayıp görülebilir ("*drop-out*"). Heterozigot dengesi daha kısa pik sergileyen alelin daha uzun pik sergileyen alele oranı ile hesaplanır; oran %60'dan fazla ise iyi kalitede alel kombinasyonu olduğu söylenebilir. Bazen primer bağlanma bölgesindeki mutasyon primer bağlanmasını engelleyerek alelin amplifikasyona engel olabilir ve o alel elektroforegramda çıkmayabilir veya zayıf bağlanıp düşük sinyal ile sonuçlanabilir. Bu durumlarda iki ayrı PCR primer seti aynı DNA örneğinde farklı sonuçlar verebilir¹⁹.

Şekil 7. Heterozigot dengesi¹⁴.



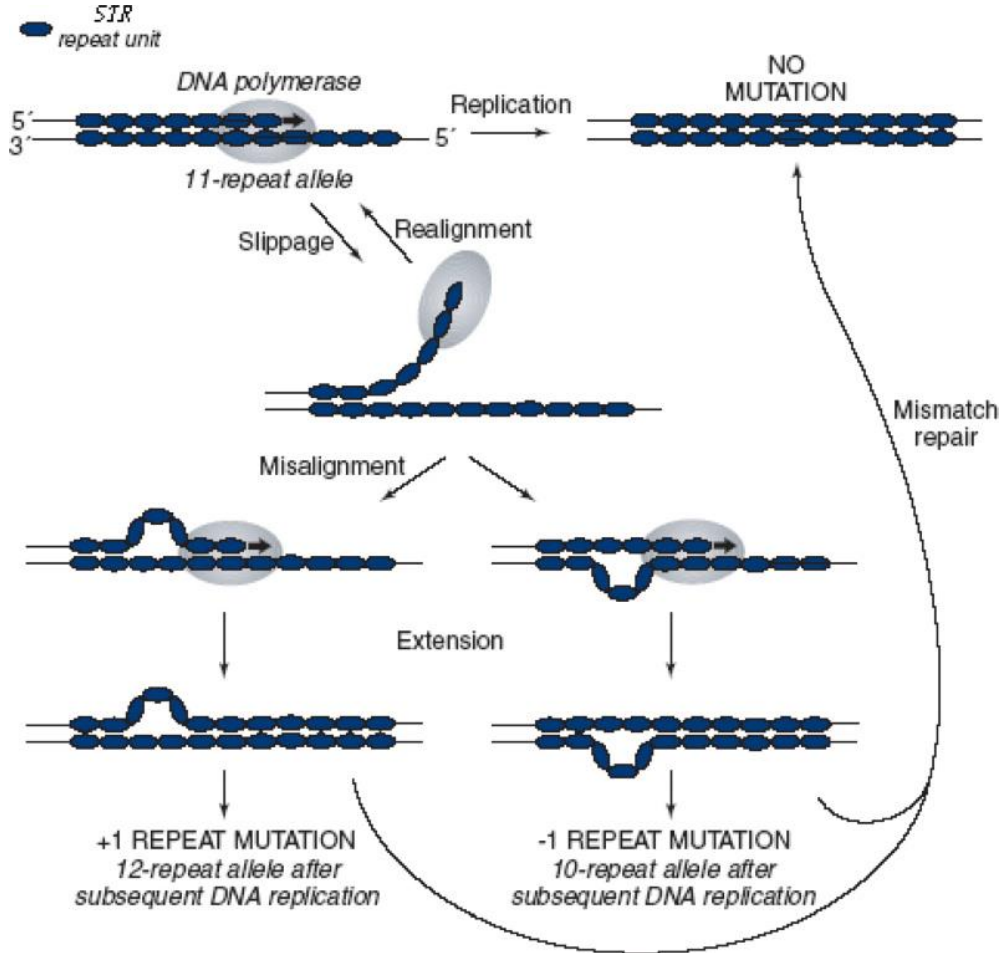
2.3.2. Stokastik eşik değer

Alel kaybı heterozigot dengesizliğinin uç formudur; primer bağlanma bölgesinde mutasyon olduğu zaman, çok düşük miktarda DNA içeren örneklerde, DNA degradasyonu ve reaksiyon inhibisyonu olduğu zaman görülebilir. Bu alelik sinyalin zemin gürültüsünden ("*background noise*") ayırımının yapılamadığı seviye olan *analitik eşik değerin* altına düştüğü zaman olur. Alel kaybı STR tekrar uzunluğu, kapiller elektroforez malzemeleri ve PCR döngülerinin sayısı ile de ilişkili bulunmaktadır. Bundan dolayı alel kaybı ihtimalinin olmadığı en az DNA miktarı ile alınan sinyali stokastik eşik değer olarak belirlemek gerekir. Stokastik eşik değeri belirlemenin farklı yöntemleri vardır ve her laboratuvar kullandığı kitlere, amplifikasyon sistemine, donanım ve yazılıma göre kendine uygun bir eşik değeri belirler²⁰.

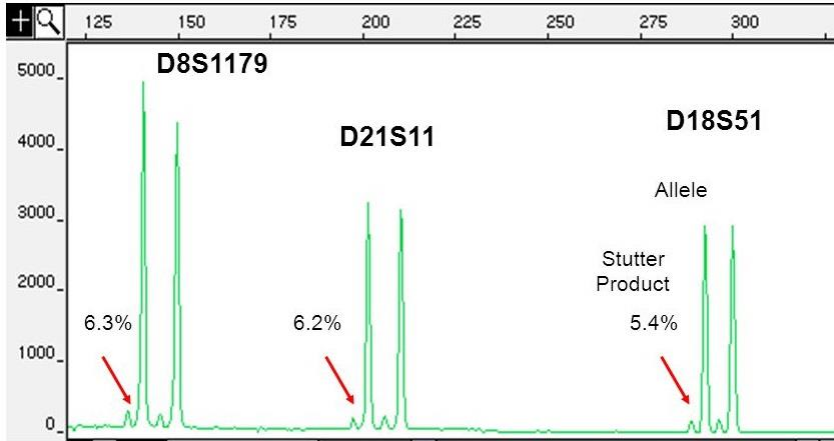
2.3.3. "Stutter" pikleri

"Stutter", PCR sırasında DNA replikasyon esnasındaki kayma mekanizması ("strand-slippage replication") ile gerçekleşen yanlış eşleşme sonucu oluşan artefaktır. Aletin tekrar sayısı arttıkça *stutter*'lar daha belirginleşir. Bu model DNA sekans evriminde de rol oynayan doğal bir mekanizmadır⁸ (Şekil 8). Bu amplifikasyonun in-vitro sistemde doğal bir sonucudur ve Taq polimerazın STR alelini kopyalarken kayması sonucu yanlış eşleşme ile oluşur

Şekil 8. DNA replikasyon esnasındaki kayma mekanizması⁸.



Stutter'lar *stutter oranı* ile karakterize edilir: *stutter* pik yüksekliğinin alelik pik yüksekliğine oranı şeklinde ifade edilmektedir. En sık karşımıza çıkan *stutter* alelik pikten bir tekrar birimi kadar kısadır. Daha düşük olasılıkla bir tekrar birimi kadar fazla veya iki tekrar birimi kadar kısa da gözükabilir, bu kompleks *stutter*'lar genellikle örneğin aşırı amplifiye olduğu zamanlarda daha sık ortaya çıkar (Şekil 9). *Stutter* oranı %15'den düşük olmalıdır. Stokastik etkiler ve somatik mutasyonlar bu oranın artmasına sebep olabilir²⁰.

Şekil 9. Stutter¹⁴

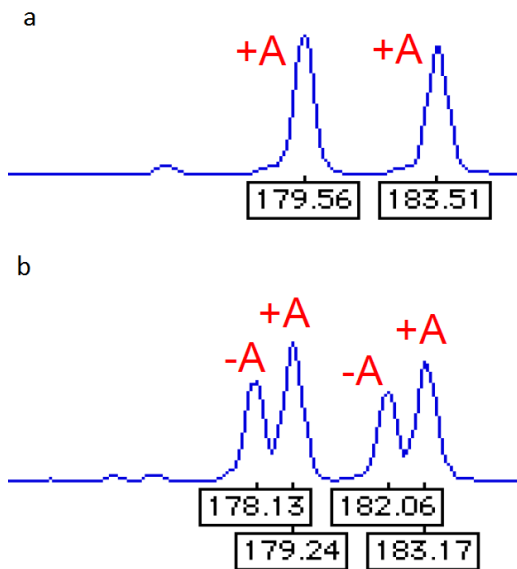
2.3.4. Diğer artefaktlar

Multiplex sistemde primerlerin non-spesifik bağlanması sonucu artefaktlar oluşabilir. Ko-amplifiye edilecek lokus sayısı arttıkça veya DNA degradasyonu ne kadar fazlaysa bu non-spesifik artefaktların görülme ihtimali artar. Bu non-spesifik artefaktlar genellikle kısa pikli ve lokusun alelik kapsamına düşmez²⁰.

Kromozomal translokasyon, somatik mutasyon ve trizomiler gibi kromozal anomalilerde ekstra pikler görülebilir. Ancak bu genellikle tek lokusta olur²⁰.

Amplifikasyon zamanı Taq polimerazın yeni sentezlenen DNA molekülünün sonuna tek nükleotid (genellikle adenozin) ekleme gibi ek bir görevi daha vardır (Şekil 10a). Eğer kopya edilen ampliconlar ortamda aşırı fazla ise Taq polimeraz tüm kopyaların sonuna bu nükleotidi ekleyemez. Bu da amplifikasyonun sonunda ortamda aynı kaynaktan sentezlenen uzunluk olarak tek nükleotid farkı bulunan iki çeşit DNA molekülü ile sonuçlanır¹⁴ (Şekil 10b)

Şekil 10. Taq polimerazın yeni sentezlenen DNA molekülünün sonuna tek nükleotid ekleme etkisi¹⁴.



Amplifiye DNA fragmanlarını etiketlemek için kullanılan flöresan boyalar farklı dalga boylarında ışırlar. Ancak ışıkların makinenin emisyon spektrumunda örtüştüğü alanlar olur. Yazılım programları minör örtüşmeleri saf dışı bırakarak daha rafine sonuç çıkarır. Ancak aşırı amplifiye örnek emisyon matriksinde satürasyon yaratıp non-spesifik artefakt piklerine (“pull-up” pikleri) sebep olabilir¹⁸.

2.4. STR analizinin kullanım alanları

STR analizi Adli Tıp'ta kimlik tespiti ve akrabalık tayini gibi uygulamalar dışında diğer dallarda kendine önemli kullanım alanı bulmuştur.

2.4.1. Hücre hatlarının doğrulanması

Hücre hatları bilimsel araştırmada önemli bir araçtır. Bilim adamları hücre kültürlerini manipüle ederek amaçladıkları deneysel sorulara yanıt ararlar. Elde edilen bilgi daha ileri bir bilimsel ilerlemenin temelini oluşturabilir. Bundan dolayı hücre hatlarının yanlış tanımlanması ve kontaminasyonu önemli bir sorundur. 2007'de *Science* dergisinde yayımlanan bir makale birçok hücre kültürü araştırması yapan önemli laboratuvarın hücre hatlarının yanlış identifikasyonunu açığa çıkarmıştır²¹. Bu ve bunun gibi yayınlardan sonra dünya genelinde laboratuvarlarda hücre hatlarının STR analizi ile doğrulanması kararı alınmış ve standartlar oluşturulmuştur²².

2.4.2. Kimerizm testi

Allogenik kemik iliği transplantasyonu çeşitli hematolojik maligniteleri tedavi etmek için kullanılmaktadır. Amaç alıcının kemik iliğini kurutarak tümüyle donörünki ile yeniden yapılandırmaktır (engrafman). Transplantasyon sonrası hastalık nüks edebilir veya nakil olmuş kök hücreler rejeksiyona maruz kalabilir. Bundan dolayı alıcının periferik kanından ve kemik iliğinden alınan örneklerde STR analizi ile alıcı ve vericinin hücre kompozisyonu devamlı izlenir. STR analizinde sadece donöre ait aleller izlenirse bu tam engrafman olduğunu gösterir. Buna karşın sonucun kimerik olması tedavinin başarısız olduğunu gösterir. STR profili karaciğer transplantasyonu sonrası kimerizm analizinde de yararlıdır; donöre ait lenfositler 3 haftadan sonra hala varlığını sürdürüyorsa graft-versus-host hastalığına (GVHH) sebep olabilir²³.

2.4.3. Popülasyon genetiği

STR'larda mutasyon oranı daha fazla olduğundan daha dinamiktir; bundan dolayı genetik haritaların, türlerin evriminin ve migrasyon tarihinin inşasında da yararlı bir araçtır. Farklı STR alelleri arasındaki uzunluk farkı bilgi vericidir; fark ne kadar fazlaysa mutasyon sayısı daha fazla olmuştur. Böylece geçmiş mutasyonlar bir “hafıza” oluşturur ve filogenetik bilgi içermektedir. STR mutasyonuna göre bazı modeller oluşturularak STR'ların farklı bölgelerdeki insanlar arasındaki bağı, insanların tarih boyunca migrasyonunun yönü ve insan evrimi tarihi hakkında fikirler edinilebilmektedir⁸.

2.4.4. Diagnostik Patoloji

STR analizinin Patolojide doku aidiyet testi dışında başka alanlarda da kullanımı mevcuttur. Hidatiform moller (komplet ve parsiyel) gebelik materyalinin histopatolojik incelemesi sırasında sık karşılaşılan gestasyonel hastalıklardandır. Komplet mol, parsiyel mol ve non-molar hidropik abortus'un histopatolojik görünümü örtüşebilir, bu da tanı zorluğu oluşturabilir. İmmünohistokimyasal olarak p57 ile komplet molün tanısı teyit edilebilse de

bazen yanlış negatiflik veya boyanın değerlendirilmesi güç olabilir. Akım sitometri ile triploid karyotip saptanması parsiyel moller için uyumlu olmasına rağmen triploid gebeliklerin yaklaşık %30 kadarı non-molar triploid abortusları temsil eder. Komplet mollerin diploid diandrik genoma, parsiyel moller triploid diandrik monognik genoma sahiptir; bu sayede STR alel kompozisyonuna bakarak mollerin kesin tanısı konulabilir⁴.

Kanser gelişimi sırasında neoplastik hücreler kromozomal plöidi, translokasyon, insersiyon, delesyon, nokta mutasyonu ve mikrosatellit instabilitesi (MSI) gibi çok sayıda genetik değişiklik kazanabilir. Mikrosatellitler DNA hatalı eşleşme tamir genlerinde bozukluk olduğu zaman mutasyona duyarlı STR dizileridir. Bunun için belirlenmiş MSI markerları mevcuttur: D5S346, D17S250, D2S123, Bat25, Bat26. Mikrosatellit hatalı eşleşme tamir (MMR) genlerinin hipermetilasyonla inaktivasyonu sporadik kolorektal ve endometrial kanserlerle ilişkili olmasına karşın germline mutasyonları Lynch sendromunda görülmektedir²⁴.

3. MATERYAL METOD

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'na onaylanmıştır. Çalışmamızda Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda Ekim 2015-Haziran 2018 yılları arasında değerlendirilmiş olgular arasından seçilmiş vakaların neoplastik ve non-neoplastik dokularını içeren formalinle fikse olmuş, parafine gömülmüş birer doku bloğu çalışmaya dahil edilmiştir. Seçilmiş vakalar tanı almış, tedavisi yapılmış ve kontrolde olan olguları içermektedir. Ayrıca vakaların H&E kesitleri incelenerek yeterli dokusu olan ve çalışmamız için kesit yapıldıktan sonra geride yeterli tümörlü dokusu kalacak olgular seçilmiştir. 10 farklı vakadan 21 parafin blok çalışmaya dahil edilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Seçilen vakaların listesi şu şekildedir:

| Vakalar | Spesmen | Tanı | Seçilen bloklar |
|---------------|--------------------------------|--|---|
| 1 | Tiroidektomi | Tiroid papiller karsinom, solid varyant | 1 adet tümör içeren 1 adet tümör içermeyen |
| 2 | Pankreatektomi | Nöroendokrin tümör, grade 3 | 1 adet tümör içeren 1 adet tümör içermeyen |
| 3 | Nefrektomi | Renal hücreli karsinom, konvansiyonel şeffaf hücreli tip, grade 4 | 1 adet tümör içeren 1 adet tümör içermeyen |
| 4 | Kolektomi | Adenokarsinom, iyi diferansiye | 1 adet tümör içeren 1 adet tümör içermeyen |
| 5 | Kolektomi | Adenokarsinom, iyi diferansiye | 1 adet tümör içeren 1 adet tümör içermeyen |
| | Larinks punch biyopsi | Skvamöz hücreli karsinom | 1 adet tümör içeren |
| 6 | Histerektomi | Endometrium adenokarsinomu, endometrioid tip, grade 3 | 1 adet tümör içeren 1 adet tümör içermeyen |
| 7 | Parotidektomi | Mukoepidermoid karsinom, düşük dereceli | 1 adet tümör içeren 1 adet tümör içermeyen |
| 8 | Auriküler bölgeden eksizyon | Adenoid kistik karsinom, grade 1 | 1 adet tümör içeren 1 adet tümör içermeyen |
| 9 | Alt dudak eksizyon | Skvamöz hücreli karsinom, orta derecede diferansiye | 1 adet tümör içeren 1 adet tümör içermeyen |
| 10 | Akciğer lobektomi | Adenokarsinom, solid baskın tip | 1 adet tümör içeren 1 adet tümör içermeyen |
| Toplam | | | 21 adet parafin blok |

Seçilen vakalara ait parafin bloklardan 8 µm kalınlığında 5'er kesit hazırlanmıştır. Hazırlanan kesitler deparafinize edildikten sonra neoplastik ve non-neoplastik alanlar iyi sınırla disseke edilerek uygun tüplere alınmıştır. Tüm örneklerden formalinle fikse parafine gömülü dokulara uygun QIAamp DNA kiti ile firma talimatlarına uygun ayrı ayrı DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. DNA izolasyonu (QIAamp DNA kiti ile).

| İşlemler | Not |
|-------------------|---|
| Kesit alma | 8 µm kalınlığında 5'er kesit. |
| Deparafinizasyon | Ksilen ve etanol (%96) kullanarak. |
| Doku lizisi | Proteinaz K ve tampon lizis karışımı (ATL) ile 56°C'de bir gece inkübasyon. |
| Isıtma | 90°C'de 1 saat ısıtarak formaldehidin sebep olduğu çapraz bağları kısmi olarak bozmak. Daha sonra tampon lizis karışımı (AL) ve etanol (%96) eklemek. |
| DNA pürifikasyonu | DNA'nın membrana bağlanarak diğer bileşenlerin tampon yıkama karışımları (AW1 ve AW2) ile uzaklaştırmak. Daha sonra tampon bir karışım (ATE) ile DNA'nın membrandan ayrıştırmak. |

Genotipleme AmpFISTR Identifiler PCR Amplification system (Applied Biosystems) ile yapılmıştır. PCR öncesi DNA miktarı Eppendorf Biophotometer ile optimize edilmiştir. Reaksiyon aynı anda 12 farklı tetranükleotid STR lokusunu amplifiye ederek 60 ile 550 pb arasında ampikonlar üretebilen multipleks PCR uygulamasını içermektedir (Tablo 6, Tablo 7). Bu reaksiyonda ticari olarak dizayn edilmiş 12 farklı primer (Mentype® Chimera®) kullanılmıştır: D2S1360, D3S1744, D4S2366, D5S2500, D6S474, D7S1517, D8S1132, D10S2325, D12S391, D18S51, D21S2055, SE33 (ACTBP2) ve cinsiyete özgü Amelogenin lokusu (Tablo 5). Primerler 5 farklı flöresan etiketi (6-FAM, BTG, BTY, BTR ve BT0) ile işaretlidir. Seçilen STR lokusları 12 farklı kromozomda yerleşmiştir. Bu STR lokusları düşük stutter oranına, dengeli alelik dağılıma sahiptir ve yüksek oranda heterozigotluk göstermektedir. Bu özellikler sayesinde yüksek diskriminatif özellik sergilemektedir²⁵.

Tablo 5. Mentype® Chimera® STR lokus bilgisi²⁵.

| Lokus | Kromozomal lokalizasyonu | Tekrar motifi | Alel sayısı | Alel aralığı |
|---------------|--------------------------|--|-------------|--------------|
| D2S1360 | 2p24-p22 | [TATC]9 [TGTC]9 [TATC]5 | 23 | 19-32 |
| D3S1744 | 3p24 | [TCTA]2 TA[TCTA]12 TCA [TCTA]2 | 16 | 13-22 |
| D4S2366 | 4p16-15.2 | [ATAG]9 ATTG [ATAG]2 | 12 | 9-15 |
| D5S2500 | 5q11.2 | [ATAG]12 | 12 | 9-18 |
| D6S474 | 6q21-22 | [TAGA]5 TGA [TAGA]12 | 17 | 11-20 |
| D7S1517 | 7q31.33 | [GAAA]11 CAAA [GAAA]2 CAAA [GAAA]2 | 17 | 14-31 |
| D8S1132 | 8q23.1 | [TCTA]9 TCA [TCTA]9 TCTGTCTA | 20 | 12.1-27 |
| D10S2325 | 10p12 | [TCTTA]12 | 12 | 6-23 |
| D12S391 | 12p13.2 | [AGAT]5 GAT [AGAT]7 [AGAC]6 AGAT | 19.3 | 13-28 |
| D18S51 | 18q21.3 | [AGAA]13 | 13 | 5.3-42 |
| D21S2055 | 21q22 | [CTAT]2 CTAA [CTAT]9 CTA [CTAT]3 TAT [CTAT]3 TAT [CTAT]4 CAT[CTAT]2 | 24 | 16.1-39 |
| SE33 (ACTBP2) | 6q14.2 | [AAAG]9 AA [AAAG]16 | 25.2 | 3-50 |

Tablo 6. PCR reaksiyon karışımı içeriği.

| Bileşenler | Hacim |
|----------------------------|--------------|
| Saf su | 16.1 µl |
| Reaksiyon karışımı (mix A) | 5.0 µl |
| Primer karışımı | 2.5 µl |
| Multi Taq2 DNA polimeraz | 0.4 µl |
| DNA (1 ng/1 µl) | 1 µl |
| Toplam | 25 µl |

Tablo 7. PCR amplifikasyon süreci.

| Sıcaklık | Süre | |
|----------|------------|---|
| 94°C | 4 dakika | Multi Taq2 DNA polimeraz aktivasyonu için |
| 94°C | 30 saniye | |
| 60°C | 120 saniye | 30 döngü |
| 72°C | 75 saniye | |
| 68°C | 60 dakika | |

Tablo 8. Elektroforez karışımı.

| Bileşenler | Hacim |
|-----------------------------|--------|
| Hi-Di™ Formamide | 12 µl |
| DNA Size Standard 550 (BTO) | 0,5 µl |
| PCR ürünü | 1 µl |

Hazırlanan karışım 95°C'de 3 dakika denatürasyona uğradıktan sonra 4°C'ye kadar soğutulup makineye yerleştirilmektedir.

PCR sonunda üretilen ampikonlar BTO 550 DNA internal boyut standardı ve alelik merdiven kullanarak kapiller elektroforez (ABI3500 platform) ile çözümlenmiştir (Tablo 8). Kapiller elektroforez uygulanarak elde edilen verilerin toplanması ve analizi GeneMapper software 5 (Applied Biosystems) ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

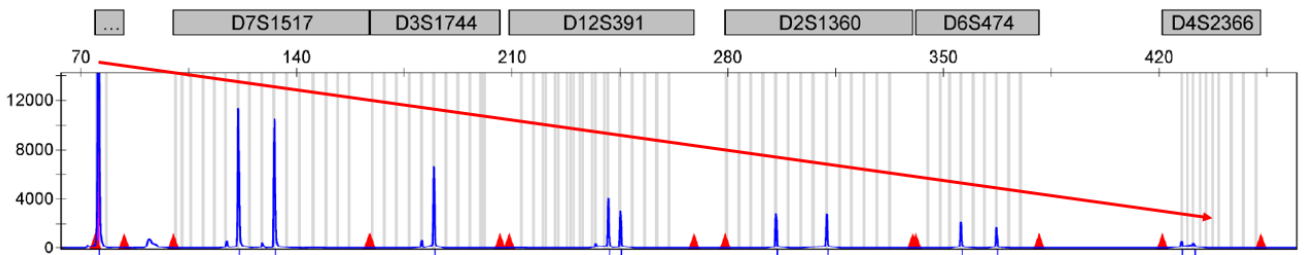
Biz bu çalışmada formalinle fikse olmuş parafine gömülü örneklerden formaldehidin DNA'da degradasyon oluşturduğunu göz önüne alarak STR analizi ile doku kimlik tespiti yapılmasının güvenilirliğini test ettik. Ayrıca tümörlerin genetik instabilite oluşturduğunu göz önüne alarak aynı vakaya ait neoplastik ve non-neoplastik dokuların STR profilini karşılaştırdık.

Seçilmiş olan tüm vakaların STR profilleri birbirinden farklı saptandı.

Aynı vakada neoplastik ve non-neoplastik alanlarının STR profillerinde ise kısmen farklılık bulundu. Tablo 9'da aynı vakaya ait tümörlü ve tümörsüz alanların STR profilinde farklılık gösterenler ve göstermeyenler detaylı olarak verilmiştir.

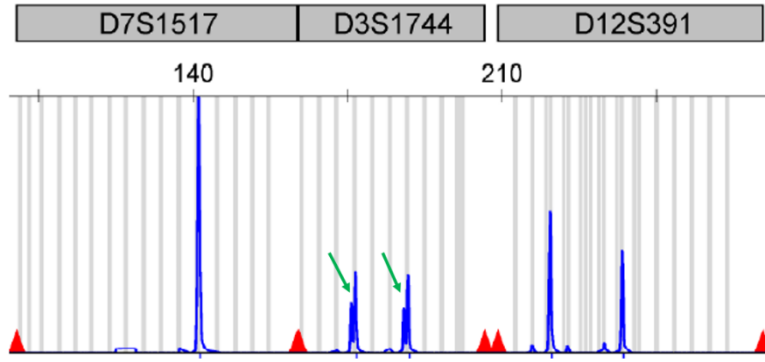
Patolojik spesmenin formaldehid ile fiksasyonu sonrası dokuda DNA degradasyonu oluşmaktadır, dokunun formaldehidde kalma süresi arttıkça degradasyon oranı da artmaktadır. Ayrıca STR lokuslarının boyutu arttıkça degradasyona uğrama ihtimali de artmaktadır²⁷. Bizim seçtiğimiz vakaların tümü formaldehid ile fikse olmuş parafine gömülü dokular olduğu için tüm sonuçlarda formaldehidin degradasyon etkisini gördük. Şekil 11'de seçtiğimiz vakaların birinde örnek olsun diye DNA degradasyonunun etkisi gösterilmiştir. Bu elektroferogramda en üstteki gri kutularda 6 farklı STR lokusu, boyutlarına göre horizontal olarak sıralanmıştır. Vertikal çizgi ise ampikonun miktarını temsil etmektedir. STR lokuslarının boyutu arttıkça degradasyonu da artmaktadır ve sonuç olarak amplifiye olamadığından pik yüksekliği azalmaktadır (kırmızı çizgi); en az boyuta sahip D7S1517 adlı STR lokusundaki alellerin pik yüksekliği (ampikonun miktarı) ideal sonuç vermesine karşın en fazla boyuta sahip D4S2366 adlı STR bölgesindeki alellerin pik yüksekliği degradasyondan dolayı analitik eşik değeri güçlükle geçmiştir. Yani bir alelin boyutu arttıkça degradasyona daha fazla maruz kalmaktadır.

Şekil 11. DNA degradasyon etkisini gösteren elektroferogram.



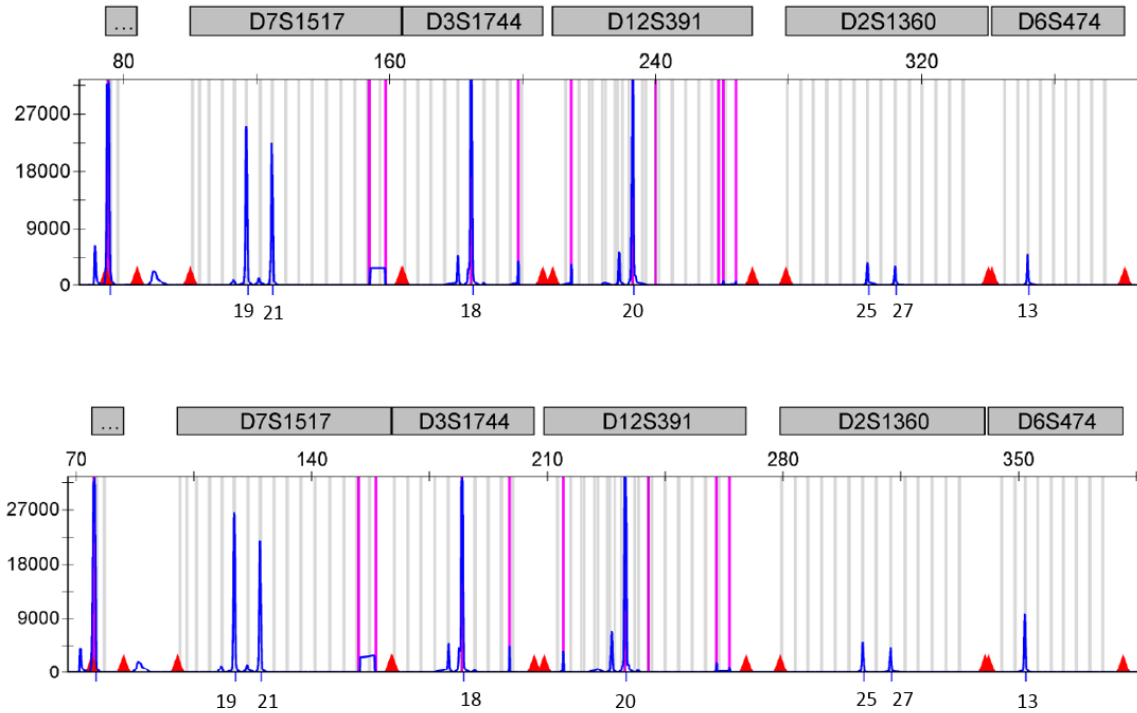
PCR sürecinde amplifikasyon sırasında Taq polimerazın yeni sentezlenen her DNA molekülünün sonuna adenozin ekleme gibi ek bir görevi daha vardır (Şekil 10). Eğer kopya edilen ampikonlar ortamda aşırı fazla ise Taq polimeraz tüm kopyaların sonuna bu nükleotidi ekleyemez. Eğer ortamda fazla ampikon varsa uzunluk olarak tek nükleotid farkı bulunan iki çeşit DNA molekülü ile sonuçlanır¹⁴. Bu da elektroferogramda kırık pik şeklinde kendini gösterir (Şekil 12). Bizim vakaların da bir kısmında bu etki görülmüştür.

Şekil 12. Amplifiye olmuş DNA miktarı etkisi (yeşil ok).



Çalışmamızda aynı vakaya ait non-neoplastik ve neoplastik alanların STR profilleri karşılaştırıldığında vakaların bir kısmında farklılık gözlenmemiştir (Şekil 13).

Şekil 13. Non-neoplastik ve neoplastik alanları arasında STR değişikliği saptanmayan tiroid papiller karsinomu vakası. Yukarıdaki grafik non-neoplastik tiroid dokusunu, aşağıdaki grafik ise aynı vakanın papiller karsinomunu temsil etmektedir.



Vakaların bir kısmında ise aynı vakaya ait non-neoplastik ve neoplastik alanların STR profilleri karşılaştırıldığında neoplastik dokularda STR lokusları mikrosatellit instabilite (MSI) ve heterozigotluk kaybı (LOH) göstermiştir. STR lokusunda “wild-type” alellere ek olarak anormal yeni pikin ortaya çıkması mikrosatellit instabilite olarak belirlenmiştir²⁶. Heterozigotluk kaybı ise alellerden birinin sinyal gücünde >%50 azalma olarak tarif edilmiştir²⁶. Sonuç olarak biz neoplastik ve non-neoplastik dokular arasında 3 çeşit değişiklik saptadık: *bir alelin kısmi kaybı, mevcut alellere ek bir alelin ortaya çıkması ve mevcut alelin yerine yeni bir alelin ortaya çıkması*. Bu değişikliklerin vakalara göre (Tablo 9) ve seçtiğimiz STR lokuslarına göre (Tablo 10) dağılımı aşağıda tablo şeklinde gösterilmektedir. D2S1360 lokusu dışında tüm lokuslarda en az bir değişiklik saptanmıştır (Tablo 10). 4 vakada neoplastik dokunun STR lokuslarının en az

ikisinde, en fazla dördünde bir alelin kısmi kaybı görülmüştür (Şekil 14). 7 vakanın neoplastik dokusunda en az bir, en fazla altı STR lokusunda normal dokusunda mevcut olan alellere ek bir alel görülmüştür (Şekil 15). MSI içeren kolon adenokarsinomunda D18S51 ve D21S2055 lokuslarında, adenoid kistik karsinomda ise D5S2500, D12S391 ve SE33 lokuslarında mevcut alellere ek olarak yeni iki alel eklenmiştir. Bunlar dışında mevcut alellere ek alelin ortaya çıktığı vakalarda sadece bir alelik değişiklik kaydedilmiştir. Mevcut alellere ek bir alelin ortaya çıktığı tüm vakalarda yeni alel tek tekrar birimi kadar farklılık göstermektedir. 2 vakanın neoplastik dokusunda ise, normal dokusunda olan alelin yerine yeni bir alel ortaya çıkmıştır (Şekil 16). Larinksin skuamöz hücreli karsinomunda SE33 lokusunda normal dokuda bulunan alellerin birinin yerine yeni iki alel ortaya çıkmıştır; yeni aleller kaybolan alelleden bir ve iki tekrar uzunluğu kadar uzundur. Adenoid kistik karsinomda ise D3S1744 ve D18S51 homozigot lokuslarında kaybolan alelin yerine iki farklı alel ortaya çıkmıştır. D3S1744 lokusunda ortaya çıkan yeni aleller kaybolan alelden bir tekrar birimi kadar kısa ve iki tekrar birimi kadar uzundur. D18S51 lokusunda ise yeni aleller kaybolan alelden bir ve dört tekrar birimi kadar kısadır.

Tablo 9. Neoplastik dokularda ortaya çıkan STR değişiklikleri.

| Vakalar | Kısmi alel kaybı | Ek alel ortaya çıkması | Yeni alel ortaya çıkması |
|--|------------------|------------------------|--------------------------|
| 1. Tiroid papiller karsinom, solid varyant | | | |
| 2. Pankreas nöroendokrin tümör, grade 3 | | 1 | |
| 3. Renal hücreli karsinom, şeffaf hücreli tip, grade 4 | | | |
| 4. Kolon adenokarsinomu, iyi diferansiye (MSI içeren) | | 6 | |
| 5. Kolon adenokarsinomu, iyi diferansiye (MSI içermeyen) | 3 | 2 | |
| Larinks skuamöz hücreli karsinom | | 3 | 1 |
| 6. Endometrium adenokarsinomu, endometrioid tip, grade 3 | 4 | 1 | |
| 7. Parotis mukoepidermoid karsinom, düşük dereceli | | | |
| 8. Parotis adenoid kistik karsinom, grade 1 | 2 | 5 | 2 |
| 9. Dudak skuamöz hücreli karsinom, orta derecede diferansiye | | | |
| 10. Akciğer adenokarsinomu, solid baskın tip | 4 | 1 | |

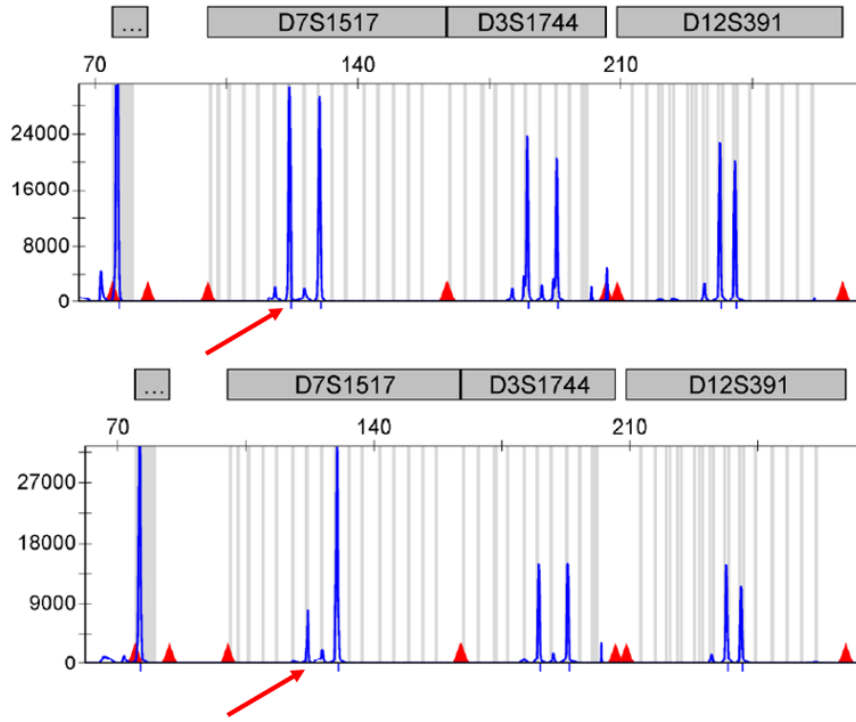
Sayılar değişikliğin görüldüğü STR lokus sayısını temsil etmektedir.

Tablo 10. STR değişikliklerinin lokuslara göre dağılımı.

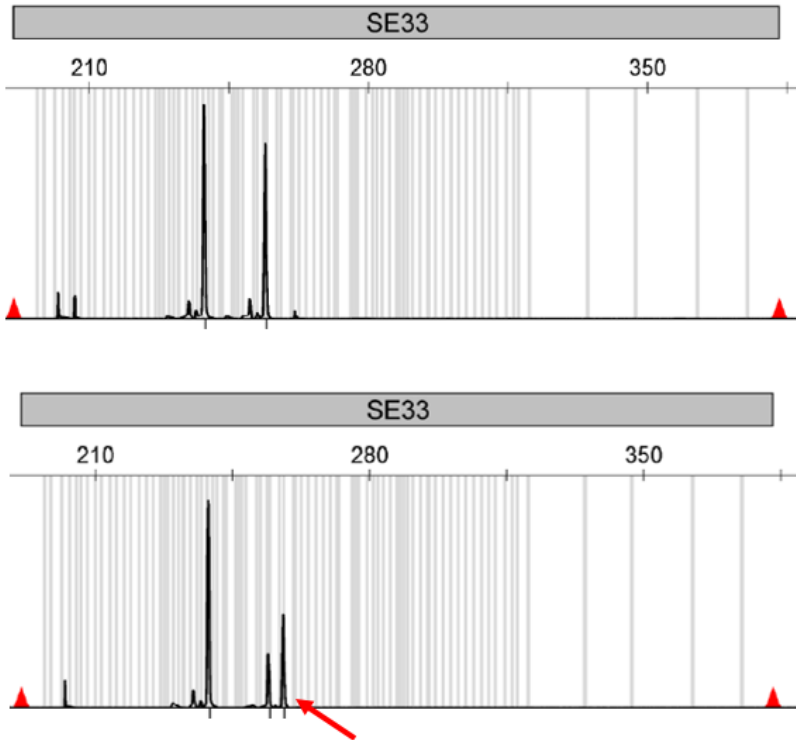
| | D2S1360 | D3S1744 | D4S2366 | D5S2500 | D6S474 | D7S1517 | D8S1132 | D10S2325 | D12S391 | D18S51 | D21S2055 | SE33 (ACTBP2) |
|-------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|----------|---------|--------|----------|---------------|
| KAK* | | | 2 | 1 | | 2 | 1 | | 2 | 1 | 2 | 2 |
| EA** | | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 |
| YA*** | | 1 | | | | | | | | 1 | | 1 |

*Kısmi alel kaybı. **Mevcut alellere ek alel ortaya çıkması. ***Mevcut alellerin yerine yeni alel ortaya çıkması.

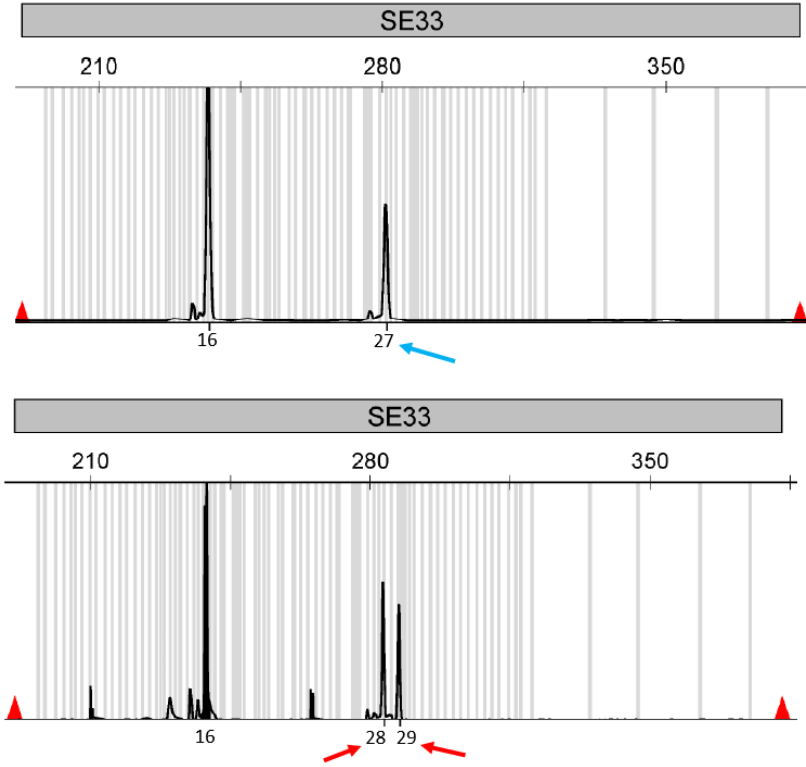
Şekil 14. Endometrium adenokarsinomu vakasında D7S1517 lokusunda bir alelin kısmi kaybı (kırmızı ok). Yukarıdaki grafik non-neoplastik endometrium dokusunu, aşağıdaki grafik ise aynı vakanın endometrium adenokarsinomunu temsil etmektedir.



Şekil 15. Kolon adenokarsinomu vakasında SE33 lokusunda mevcut alellere ek bir alel ortaya çıkması (kırmızı ok). Yukarıdaki grafik non-neoplastik kolon dokusunu, aşağıdaki grafik ise aynı vakanın kolon adenokarsinomunu temsil etmektedir.



Şekil 16. Larinks skuamöz hücreli karsinom vakasında SE33 lokusunda mevcut alellin (mavi ok) yerine farklı iki alelin ortaya çıkması (kırmızı oklar). Yukarıdaki grafik vakanın non-neoplastik dokusunu, aşağıdaki grafik ise aynı vakanın skuamöz hücreli karsinomunu temsil etmektedir.



5. TARTIŞMA

Bu çalışmada tüm hastaların STR profili birbirinden farklı bulunmuş olup, bu sonuç doku kimliği tespitinde yardımcıdır.

Ayrıca vakaların bir kısmında non-neoplastik ve neoplastik alanların STR profili karşılaştırıldığında neoplastik dokularda mikrosatellit instabilite (MSI) ve heterozigotluk kaybı (LOH) gözlenmiştir. MSI ve LOH bir çok tümör tipinde tanımlanmış genetik aberasyonlardır^{39, 40}. STR lokusunda “wild-type” alellere ek olarak anormal yeni pikin ortaya çıkması mikrosatellit instabilite, heterozigotluk kaybı ise alellerden birinin sinyal gücünde >%50 azalma olarak tarif edilmiştir²⁶. Buna göre *mevcut alellere ek bir alelin ortaya çıkması ve mevcut alelin yerine yeni bir alelin ortaya çıkması* mikrosatellit instabilite, *bir alelin kısmi kaybı* ise heterozigotluk kaybı olarak tanımlanabilir. Bizim çalışmamızda 7 vakada *mevcut alellere ek bir alelin ortaya çıkması*, 4 vakada *bir alelin kısmi kaybı* ve 2 vakada *mevcut alelin yerine yeni bir alelin ortaya çıkması* şeklinde STR değişiklikleri saptanmıştır (Tablo 9). Poetsch ve ark. yaptığı, 4 farklı solid tümör içeren, her vakanın normal ve neoplastik dokusunun STR profilinin karşılaştırıldığı 118 vakalık bir çalışmada neoplastik dokularda bizim saptadığımız değişikliklerine ek olarak *bir alelin tamamen kaybı* da izlenmiştir. O çalışmada vakaların %22’sinde bir alelin kısmi kaybı, %14’ünde tam kaybı, %18’inde ek bir alelin ortaya çıkması, %8’inde ise mevcut alelin yerine yeni bir alelin ortaya çıkması saptanmıştır²⁸. Benzer bulgular Margiotta ve ark. yaptığı 5 farklı tümör tipini içeren 25 vakalık başka bir çalışmada³⁸ ve birçok tümör tipini içeren başka bir çalışmada³⁹ da gözlenmiştir.

Bizim çalışmamızda en sık değişiklik sırasıyla SE33, D18S51, D21S2055 ve D12S391 lokuslarındadır (Tablo 10). Bu lokuslarda izlenen en sık STR değişikliği ise yeni alelin ortaya çıkması şeklindedir. Bu lokuslar toplumda daha fazla alel içeren, daha fazla tekrar içeren alellere sahip ve bu tekrarların kompleks olduğu lokuslardır (Tablo 5); SE33 en fazla alel sayısına ve en çok tekrar içeren alellere sahiptir. Poetsch ve ark. yaptığı çalışmada²⁸ en sık değişiklik sırasıyla FGA, D3S1558, D18S51 ve D21S11, Ceccardi ve ark. yaptığı çalışmada³⁹ VWA, FGA ve D18S51, Margiotta ve ark. yaptığı çalışmada³⁸ ise D5S818 and D18S51 lokuslarında olmuştur²⁸. Bu çalışmalar ile bizim çalışmamız için seçilen lokuslardan sadece D18S51 ortaktır ve tüm çalışmalarda da en sık değişikliğin izlendiği lokuslardan biri olarak saptanmıştır. Ayrıca D18S51 lokusu 18. kromozomda yerleşen ve kolorektal kanserlerde sıklıkla delesyona uğrayan DCC genin bulunduğu aynı kümede bulunmaktadır³⁸. Tümör dokusu ile normal dokunun STR profilinin karşılaştırıldığı diğer çalışmalarda da alel sayısı, tekrar sayısı ve tekrarların kompleksliği fazla olan STR lokusları en sık değişikliğe maruz kalmıştır^{28, 29, 30, 31, 33, 38, 39}.

Kullandığımız STR lokuslarından mutasyon oranı en yüksek olan SE33 lokusudur (%0,52)³². En fazla STR değişikliği saptadığımız lokus da SE33’dür. Bizim kullandığımız diğer STR lokuslarından literatürde mutasyon oranı bildirilenler şu şekildedir: D8S1132 %0,45³⁴, D12S391 %0,3³⁴, D18S51 %0,3³⁵ ve D10S2325³⁶ %0,25. Mutasyon oranı arttıkça normal doku ile tümör dokusu arasında STR değişikliği frekansı da artmaktadır. Buna karşın daha homojen ve daha az tekrar birimleri içeren STR lokuslarında bu oran daha düşüktür^{33, 38, 39}.

Seçtiğimiz vakalar az olduğundan tümör tipine göre STR değişikliğinin görülme oranının anlamlı istatistik sonuç vermesi mümkün değildir. Ancak Poetsch ve ark. yaptığı ve 4 farklı tümör (baş boyun skuamöz hücreli karsinomu, kolon karsinomu, renal hücreli karsinom ve melanom) içeren 116 vakalık çalışmada neoplastik dokularda yeni alelin ortaya çıkması primer kolon karsinomlarında ve baş boyun skuamöz hücreli karsinomların metastazlarında daha sık olmasına karşın, melanomlarda sadece heterozigotluk kaybı gözlenmiştir²⁸. Daha ileri yorum için genişletilmiş tümör serilerinde çalışma yapılması gerekmektedir.

Seçtiğimiz vakalardan sadece birinin neoplastik dokusunda DNA hatalı eşleşme tamir genlerinde bozukluk olduğu rutin çalışma sırasında immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir (Tablo 5). Ancak DNA hatalı eşleşme tamir genlerinde bozukluk içermeyen kolon karsinomunda ve diğer tümörlerde de STR lokuslarında aynı veya daha fazla şiddette instabilite görülmüştür. Poetsch ve ark. yaptığı çalışmada ise vakaların %38'i MSI içermektedir ve MSI içeren vakalarda toplam olarak STR alelik değişimler daha yüksek frekansta izlenmiştir. Ayrıca MSI içeren vakalar yeni alelin ortaya çıkması ile giden STR değişikliği ile korelasyon göstermesine ($p < 0.001$) karşın alel kaybı ile korelasyon saptanmamıştır²⁸. MSI içeren ve içermeyen kolon ve endometrium karsinomlarının STR profilini karşılaştıran başka bir çalışmada da benzer bulgular saptanmıştır²⁶.

Bu çalışmada neoplastik alanlarında kısmi alel kaybı olan olgularda iki alelden daha kısa pike sahip olanda kayıp izlenmiştir. Neoplastik dokularda mevcut alellere ek olarak ortaya çıkan aleller bir tekrar birimi kadar fazla veya bir tekrar birimi kadar az saptanmıştır. Buna karşın vakalarımızın ikisinde saptadığımız mevcut alelin yerine ortaya çıkan aleller kaybolan alellerden bir, iki ve dört tekrar birimi kadar farklıdır. Bu sonuçlar diğer çalışmalarda saptanan bulgularla benzerdir^{28, 29, 38, 39}.

Patolojik spesmenin formaldehid ile fiksasyonu sonrası dokuda DNA degradasyonu oluşmakta ve dokunun formaldehidde kalma süresi arttıkça degradasyon oranı da artmaktadır^{20, 27}. Bizim çalışmamızda normal ve neoplastik dokuların hemen tümünde formaldehidin DNA'ya bu etkisi gözlenmiştir (Şekil 11). Margiotta ve ark. yaptığı 25 vakalık bir çalışmada taze ve formalinle fikse olmuş normal dokuların STR profili karşılaştırıldığında vakaların %20'sinde yukarıda tarif edilen STR değişiklikleri (%50'si kısmi alel kaybı, %25'i tam alel kaybı ve %25'i ek bir alelin ortaya çıkması şeklinde) saptanmıştır. Ayrıca taze tümör dokularının %64'ü STR değişikliği göstermesine karşın formaldehidle fikse tümör dokularının %72'si STR instabilitesi göstermiştir³⁸.

Heterozigotluğun kısmi kaybında (Şekil 14) alellerden birinin sinyal gücünde >%50 düşüklük olur, ancak hala normal ve neoplastik dokuda aynı aleller izlenir; bir alelin sinyal gücündeki bu kısmi düşüş neoplastik hücrelerin bir kısmında o alelin korunması yanısıra bir kısmında ise delesyonu anlamına gelmektedir. *Mevcut alellere ek bir alelin ortaya çıkmasında* (Şekil 15) ise neoplastik doku içinde normal dokuda izlenen alellere ek olarak bir tekrar dizisi kadar fazla veya az tekrar içeren alel meydana çıkmaktadır; bu da tümör dokusunun hem normal dokuda izlenen alelleri içeren hücrelerden, hem de bir tekrar birimi kadar farklı bir alel içeren mutasyona uğramış hücrelerin karışımından oluştuğunu gösterir²⁶. Bu nedenlerden dolayı güncel Adli Tıp uygulamalarında ve patoloji laboratuvarlarında doku kimlik tespitinde *heterozigotluğun kısmi kaybı* ve *mevcut alellere ek bir alelin ortaya çıkması* şeklinde giden STR

değişiklikleri yorumlama zamanı belirgin zorluk yaratmamaktadır. Çünkü hem normal dokuda hem de tümörlü dokuda “*germline*” aleller izlenebilmektedir. Ayrıca düşük miktarda DNA içeren ve DNA degradasyonun fazla olduğu örneklerde yüksek pik oluşturması beklenen alel düşük pikler şeklinde ortaya çıkabilir veya bir alelin tamamen kaybı olabilir²⁰. DNA çapraz bağlarının olduğu ve DNA degradasyonun fazla olduğu formaldehidle fikse olmuş dokularda bu daha da belirgin olmaktadır²⁷.

Ancak mevcut alellerin yerine yeni bir allelin ortaya çıkması şeklinde saptadığımız değişiklik STR değişikliklerinden en şiddetlisidir. STR analiz pratiğinde mevcut alelin yerine yeni bir alelin ortaya çıkması yanlış sonuç çıkarımına sebep olabilir ve eğer bu STR değişikliği birçok STR lokusunda gözlenmişse sonucun yorumlanması tartışmalı olabilir²⁸. Çünkü (Şekil 16’da görüldüğü gibi) normal dokuda bulunan alel mutasyona uğrayarak tümörlü dokuda tamamen farklı tekrar sayısı içeren farklı iki forma dönüşmüştür. Bu STR değişikliğini vakalarımız arasından baş boyun tümörleri olan larinksin skuamöz hücreli karsinomunda ve parotisin adenoid kistik karsinomunda saptadık. Larinksin skuamöz hücreli karsinomunda bir STR lokusunda, parotisin adenoid kistik karsinomunda ise iki STR lokusunda bu değişiklik görülmüştür. Ayrıca adenoid kistik karsinom STR değişikliklerinin toplam olarak en fazla olduğu vakamızdır. İkinci sırada ise MSI içeren kolon adenokarsinomu tanısı almış vaka gelmektedir. Baş boyun tümörleri ve gastrointestinal tümörler MSI instabilitesinin en fazla olduğu tümörlerdendir^{24,28,37}.

Bu bulgular ışığında, eğer Tıbbi Patoloji Laboratuvarlarında doku kimlik tespiti yapılacaksa karşılaştırmak için seçilen dokuların non-neoplastik olması tercih edilmelidir. Aynı hastanın normal ve tümörlü alanlarında STR profili farklılıklar gösterebilmektedir. Buna karşın tecrübeli moleküler patoloğun bu ayırımı kolaylıkla yapması mümkündür. Ayrıca tümörün mikrosatellit instabilite gösterip göstermediği, seçilen STR lokuslarının mutasyon oranları, tekrar birimlerinin tipi ve tekrar uzunlukları gibi özellikleri dikkate alınarak doku kimlik tespiti için seçilecek STR lokuslarının genetik olarak daha stabil olması daha kolay bir ayırım için önemli unsurlardır.

6. SONUÇLAR

1. Seçtiğimiz tüm vakaların STR profili birbirinden farklı bulunmuştur. Bu farklılık doku kimliği tespitinde yardımcı olmaktadır.
2. Bazı vakaların neoplastik ve normal alanlarının STR profili aynı olmakla birlikte bazı vakalarda tümör ve tümörsüz alanlar arasında STR profili açısından farklılık saptanmıştır.
3. Neoplastik ve normal alanlarının STR profilinde farklılık saptanan vakaların neoplastik alanlarında mikrosatellit instabilite (MSI) ve heterozigotluk kaybı (LOH) şeklinde genetik değişiklikler gözlenmiştir.
4. Bu genetik değişiklikler gözlenme sıklığı sırası ile *mevcut alellere ek alelin ortaya çıkması, bir alelin kısmi kaybı ve mevcut alellerin yerine yeni alelin belirmesi* şeklindedir.
5. Neoplastik dokusunda *bir alelin kısmi kaybı ve mevcut alellere ek alelin ortaya çıkması* şeklinde giden STR değişiklikleri STR analiz pratiğinde belirgin zorluk oluşturmamaktadır. Çünkü hem normal dokuda, hem de neoplastik dokuda “*germline*” aleller izlenebilmektedir.
6. Neoplastik dokusunda *mevcut alellerin yerine yeni alelin belirmesi* şeklinde giden STR değişikliğinde “*germline*” aleller kaybolup yerine yeni aleller ortaya çıktığı için STR analizi yorumlanması daha zorlu bir süreç olarak karşımıza çıkmaktadır.
7. Aynı vakanın tümörlü alanı ile normal alanının STR profili karşılaştırıldığında alel sayısı, tekrar sayısı ve tekrarların kompleksliği fazla olan STR lokusları en sık değişikliğe maruz kalmasına karşın daha homojen ve daha az tekrar birimleri içeren STR lokuslarında bu oran daha düşüktür.
8. Bu çalışma ile MSI içeren ve içermeyen tümörlerde STR instabilitesinin görülme oranının istatistik sonucu verilememiştir. Ancak MSI içeren vakalar yeni alelin ortaya çıkması ile giden STR değişikliği ile korelasyon göstermesine ($p < 0.001$) karşın alel kaybı ile korelasyon göstermediği literatürde bildirilmiştir.
9. Seçtiğimiz vakalar az olduğundan tümör tipine göre STR değişikliğinin görülme oranının istatistik sonucu verilememiştir. Daha ileri yorum için genişletilmiş tümör serilerinde çalışma yapılması gerekmektedir.
10. Formaldehidin degradasyon etkisi tüm vakaların hem normal, hem de neoplastik alanlarında belirgindir.
11. Son olarak STR analizi yüksek ayırım gücüne sahip olduğu için kendine Patoloji laboratuvarlarında kalite kontrol iyileştirmelerinde önemli uygulama alanı bulabilir.

KAYNAKLAR

1. Hunt JL. Identifying cross contaminants and specimen mix-ups in surgical pathology. *Adv Anat Pathol*. 2008 Jul;15(4):211-7. doi: 10.1097/PAP.0b013e31817bf596. Review.
2. Alp Usubütün, Patoloji ve Laboratuvarını Anlama Klavuzu, Bölüm 7, Patolojide Kalite Kontrol: Temel Yöntemler ve Prensipler (2017). ISBN: 978-605-9215-19-0.
3. Extraneous tissue in surgical pathology: a College of American Pathologists Q-Probes study of 275 laboratories. Gephardt GN, Zarbo RJ. *Arch Pathol Lab Med*. 1996 Nov;120(11):1009-14.
4. Precise DNA genotyping diagnosis of hydatidiform mole. Lipata F, Parkash V, Talmor M, Bell S, Chen S, Maric V, Hui P. *Obstet Gynecol*. 2010 Apr;115(4):784-94. doi: 10.1097/AOG.0b013e3181d489ec.
5. Cancerous 'floater': a lesson learned about tissue identity testing, endometrial cancer and microsatellite instability. Bossuyt V, Buza N, Ngo NT, Much MA, Asis MC, Schwartz PE, Hui P. *Mod Pathol*. 2013 Sep;26(9):1264-9. doi: 10.1038/modpathol.2013.63. Epub 2013 Apr 5.
6. Initial sequencing and analysis of the human genome. International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921.
7. Gettings KB, Aponte RA, Vallone PM, Butler JM. STR allele sequence variation: Current knowledge and future issues. *Forensic Sci Int Genet*. 2015 Sep;18:118-30. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.06.005. Epub 2015 Jul 6. Review.
8. Fan H, Chu JY. A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2007 Feb;5(1):7-14. Review.
9. Hammond HA, Jin L, Zhong Y, Caskey CT, Chakraborty R. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. *Am J Hum Genet*. 1994 Jul;55(1):175-89.
10. Ellegren H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nat Genet*. 2000 Apr;24(4):400-2.
11. Developing criteria and data to determine best options for expanding the core CODIS loci. Jianye Ge, Arthur Eisenberg, Bruce Budowle. *Investig Genet*. 2012; 3: 1. Published online 2012 Jan 6. doi: 10.1186/2041-2223-3-1.
12. Fungtammasan A, Ananda G, Hile SE, Su MS, Sun C, Harris R, Medvedev P, Eckert K, Makova KD. Accurate typing of short tandem repeats from genome-wide sequencing data and its applications. *Genome Res*. 2015 May;25(5):736-49. doi: 10.1101/gr.185892.114. Epub 2015 Mar 30.
13. Tang H, Kirkness EF, Lippert C, Biggs WH, Fabani M, Guzman E, Ramakrishnan S, Lavrenko V, Kakaradov B, Hou C, Hicks B, Heckerman D, Och FJ, Caskey CT, Venter JC, Telenti A. Profiling of Short-Tandem-Repeat Disease Alleles in 12,632 Human Whole Genomes. *Am J Hum Genet*. 2017 Nov 2;101(5):700-715. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.09.013.
14. John M. Butler, *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*, 10.1016/B978-0-12-405213-0.00003-8 (2015).
15. Yong T. Kim, Hyun Y. Heo and Tae S. Seo, *Advanced Short Tandem Repeat Genotyping for Forensic Human Identification, Emerging Areas in Bioengineering*, (509-529), (2018).
16. Lazaruk K, Walsh PS, Oaks F, Gilbert D, Rosenblum BB, Menchen S, Scheibler D, Wenz HM, Holt C, Wallin J. Genotyping of forensic short tandem repeat (STR) systems based on sizing precision in a capillary electrophoresis instrument. *Electrophoresis*. 1998 Jan;19(1):86-93.
17. Characterization of human short tandem repeats (STRs) for individual identification using the Ion Torrent. Lim, S., Youn, J.P., Moon, S.O. et al. *BioChip J* (2015) 9: 164. doi: 10.1007/s13206-015-9210-7.
18. SWGDAM Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories, 2017.
19. Clayton TM, Whitaker JP, Sparkes R, Gill P. Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling. *Forensic Sci Int*. 1998 Jan 9;91(1):55-70. Review.
20. Gill P, Haned H, Bleka O, Hansson O, Dørum G, Egeland T. Genotyping and interpretation of STR-DNA: Low-template, mixtures and database matches-Twenty years of research and development. *Forensic Sci Int Genet*. 2015 Sep;18:100-17. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.03.014. Epub 2015 Mar 27. Review.
21. Chatterjee R. Cell biology. Cases of mistaken identity. *Science*. 2007 Feb 16;315(5814):928-31.

22. Barallon, R. et al. Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010 Oct;46(9):727-32. doi: 10.1007/s11626-010-9333-z. Epub 2010 Jul 8.
23. Thiede C, Bornhäuser M, Ehninger G. Evaluation of STR informativity for chimerism testing-- comparative analysis of 27 STR systems in 203 matched related donor recipient pairs. *Leukemia.* 2004 Feb;18(2):248-54.
24. Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat Rev Cancer.* 2015 Mar;15(3):181-94. doi: 10.1038/nrc3878. Epub 2015 Feb 12. Review.
25. Bodner M. Et al. Recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG) on quality control of autosomal Short Tandem Repeat allele frequency databasing (STRidER). *Forensic Sci Int Genet.* 2016 Sep;24:97-102. doi: 10.1016/j.fsigen.2016.06.008. Epub 2016 Jun 14.
26. Much M, Buza N, Hui P. Tissue identity testing of cancer by short tandem repeat polymorphism: pitfalls of interpretation in the presence of microsatellite instability. *Hum Pathol.* 2014 Mar;45(3):549-55. doi: 10.1016/j.humpath.2013.10.022.
27. Bruce McCord, Kerry Opel, Maribel Funes, Silvia Zoppis, and Lee Meadows Jantz. *An Investigation of the Effect of DNA Degradation and Inhibition on PCR Amplification of Single Source and Mixed Forensic Samples, 2011.*
28. Poetsch M, Petersmann A, Woenckhaus C, Protzel C, Dittberner T, Lignitz E, Kleist B. Evaluation of allelic alterations in short tandem repeats in different kinds of solid tumors--possible pitfalls in forensic casework. *Forensic Sci Int.* 2004 Oct 4;145(1):1-6. PubMed PMID: 15374588.
29. P. Hoff-Olsen, G.I. Meling, B. Allison, Variation in mutations rate and direction between tetra-nucleotide STR loci in human colorectal carcinomas, *Ann. Hum. Genet.* 62 (1998).
30. H. Vauhkonen, M. Hedman, M. Vauhkonen, M. Kataja, P. Sipponen, A. Sajantila, Evaluation of gastrointestinal cancer tissues as a source of genetic information for forensic investigations by using STRs, *Forensic Sci. Int.* 139 (2004).
31. C.Y. Pai, L.L. Hsieh, C.W. Tsai, F.S. Chiou, C.H. Yang, B.D. Hsu, Allelic alterations at the STR markers in the buccal tissue cells of oral cancer patients and the oral epithelial cells of healthy betel quid-chewers: an evaluation of forensic applicability, *Forensic Sci. Int.* 129 (2002).
32. E.M. Dauber, W. Bar , M. Klintschar, F. Neuhuber, W. Parson, B. Glock, W.R. Mayr. Mutation rates at 23 different short tandem repeat loci. *International Congress Series* 1239 (2003).
33. B. Brinkmann, M. Klintschar, F. Neuhuber, J. Huehne, B. Rolf, Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat, *Am. J. Hum. Genet.* 62 (1998).
34. Hering S, Müller E. New alleles and mutational events in D12S391 and D8S1132: sequence data from an eastern German population. *Forensic Sci Int.* 2001 Dec 27;124(2-3):187-91. PubMed PMID: 11792510.
35. U. Ricci, N. Cerri, I. Sani, M. Franchi, S. Mascadri, F. De Ferrari, M.L. Giovannucci Uzielli. De novo mutations at D3S1358, D8S1179 and D18S51 loci emerged during paternity testing: confirmation of biological paternal lineage by using a panel of Y-chromosome STRs. *International Congress Series, January 2003.*
36. Hou YP, Tang JP, Dong JG, Ji Q, Li YB, Wu J, Zhang SZ, Zhang J, Yan J, Walter H, Prinz M. Further characterization and population data for the pentanucleotide STR polymorphism D10S2325. *Forensic Sci Int.* 2001 Dec 1;123(2-3):107-10. PubMed PMID: 11728734.
37. Demokan S, Suoglu Y, Demir D, Gozeler M, Dalay N. Microsatellite instability and methylation of the DNA mismatch repair genes in head and neck cancer. *Ann Oncol.* 2006 Jun;17(6):995-9. Epub 2006 Mar 28. PubMed PMID: 16569647.
38. G. Margiotta, A. Coletti, M. Lancia, L. Lottanti, E. Carnevali, M. Bacci. Evaluation of allelic alterations in STR in different kinds of tumors and formalyn fixed tissues—possible pitfalls in forensic casework. *International Congress Series* 1288 (2006). doi:10.1016/j.ics.2005.09.018.
39. S. Ceccardi, M. Alu, F. Lugaresi, G. Ferri, C. Bini, T. Balbi, F. Ingravallo, S. Pelotti. Evaluation of reliability of STR typing in different types of cancerous tissues used for identification purpose. *International Congress Series* 1288 (2006). doi:10.1016/j.ics.2005.11.044.
40. Page K, Graham EA. Cancer and forensic microsatellites. *Forensic Sci Med Pathol.* 2008;4(1):60-6. doi: 10.1007/s12024-008-9027-y. Epub 2008 Feb 2. Review. PubMed PMID: 19291472.