

Nesep Testinde D19S433 Lokusunda STR Mutasyonlu ve Klinefelter Sendromlu Olgu

Case with STR Mutation at D19S433 Locus in Paternity Test and Klinefelter Syndrome

Ramazan EMRE,^a
K. Murat CANTÜRK,^a
Ömer H. A. MÜSLÜMANOĞLU,^a
Kubilay KINOĞLU,^a
Mustafa ÖZEN,^b
C. Haluk İNCE,^c
Ferruh BAKLACIOĞLU,^d
Esat ŞAHİN^d

^aAdli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas Dairesi,

^bTıbbi Genetik AD,

İstanbul Üniversitesi

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,

^cAdli Tıp AD,

İstanbul Üniversitesi

İstanbul Tıp Fakültesi

^dAdli Tıp Kurumu Fizik İhtisas Dairesi,

İstanbul

Geliş Tarihi/Received: 19.11.2013

Kabul Tarihi/Accepted: 14.05.2014

Bu olgu sunumu, 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi (20-23 Aralık 2012, Bursa)'nde poster olarak sunulmuştur.

Yazışma Adresi/Correspondence:

Ramazan EMRE

Adli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas Dairesi,

İstanbul,

TÜRKİYE/TURKEY

dremreramazan@yahoo.com

ÖZET Nesep tayini, polimorfik (değişken) kısa tekrar dizilerinin [short tandem repeat (STR)] anne, baba ve çocuk arasında karşılaştırılmasıyla yapılır. Seks kromozom anoploidileri ile rutin nesep tayininde karşılaşılabilmektedir. Çalışmamızda, D19S433 lokusunda tek tekrar mutasyonu otozomal STR analiziyle tespit edilen aynı zamanda Klinefelter sendromu tanısı X kromozom STR analiziyle konulan olgu sunuldu. Otozomal STR analizinde çocuk ve ebeveyn adaylarının D19S433 lokusundaki alleller sırasıyla "13-15" ve "13-14" olarak tespit edildi. Çocukta, anne veya babadaki "14" allellerinin herhangi birinin tekrar sayısının bir fazlası şeklinde "15" allel mutasyonu tespit edildi. On dokuz bölgele otozomal STR analiziyle >%99,99 olasılıkla annelik ve babalık doğrulandı. Dahası X STR analizinde; çocukta iki X kromozomu olduğunu doğrulayan birden fazla heterozigot alleller tespit edildi. Böylece çocuğa Klinefelter sendromu tanısı konuldu. D19S433 lokus mutasyonu ve Klinefelter sendromu olan olgumuz literatürde ilk defa bildirilmektedir. Adli genetik uzmanları böyle nadir anomalilerin farkında olmalı ve nesep testlerinin sonuçlarını yanlış yorumlamamak için dikkatli olmalıdırlar.

Anahtar Kelimeler: Klinefelter sendromu; mutasyon; DNA parmak izi

ABSTRACT Paternity identification is succeeded by comparing the polymorphic short tandem repeats (STR) of parents and child. Sex chromosomal anuploidies were also encountered in rutin paternity tests. Here, we are presenting a child with Klinefelter syndrome diagnosed using X chromosome STR analysis at the same time in whom a single repeat mutation was detected in D19S433 locus in autosomal STR analysis. "13-15" alleles and "13-14" alleles were detected at D19S433 locus in child and alleged parents in autosomal STR analysis, respectively. The child was shown to have a mutation that was causing repeat extension of '14' allele of mother or probable father to '15' allele. Paternity and maternity were confirmed with >99.99% probability using 19 loci autosomal STR analysis. Moreover, the child had more than one heterozygote alleles in X chromosome STR analysis. So, the child diagnosed as Klinefelter syndrome. To the best of our knowledge, this is the first report a child with Klinefelter syndrome at the same time had D19S433 locus STR mutation. Forensic genetics specialists should be aware of these rare abnormalities and be careful to misinterpretation of STR results of paternity tests.

Key Words: Klinefelter syndrome; mutation; DNA fingerprinting

Türkiye Klinikleri J Foren Med 2014;11(2):97-100

Nesep testi, uzun zamandan beri otozomal kısa tekrar dizileri [short tandem repeat (STR)] DNA analizi ile yapılmaktadır. STR insan genomunun tamamına dağılır ve 1 ile 6 nükleotid arasında değişen tekrar dizilerinden oluşur.¹ STR tekrar ünitesindeki nükleotit sayısına göre dinükleotit (AA), trinükleotit (GAG) ve tetranükleotit (D19S433-AAGG)

olarak isimlendirilir.² STR analizlerini yorumlarken STR lokuslarında görülen mutasyonlar gibi problemlerle karşılaşılabilir. Mutasyonlarının görülme sıklığı her hücre bölünmesinde 10^3 - 10^5 nükleotide birdir.^{3,4} STR mutasyonların %90'ı tekrar sayısının bir eksiği veya bir fazlası şeklindedir. Daha da nadir olarak tekrar sayısının iki veya üç fazlasının eksikliği ya da fazlalığı şeklinde görülebilmektedir.⁵ STR mutasyonları, erkek germ hücrelerinde dişi germ hücrelerine göre daha sık görülür.⁶

STR analizlerinde mutasyonlar yanında sayısal kromozom anomalilerinin tespiti de yapılabilir. Özellikle prenatal tanıda sayısal kromozom anomalilere karyotip analizi yapmadan Quantitatif flouresan polymerase chain reaction (PCR) tekniğiyle STR lokusları incelenerek tanı konulabilir. Adli genetik laboratuvarlarının çoğu sayısal kromozom anomalilerini tespit edecek karyotip analizi yapmamaktadır, ancak güncel STR metotları ile Klinefelter ve Turner sendromu gibi seks kromozom anomalileri tespit edilebilmektedir.⁷

OLGU SUNUMU

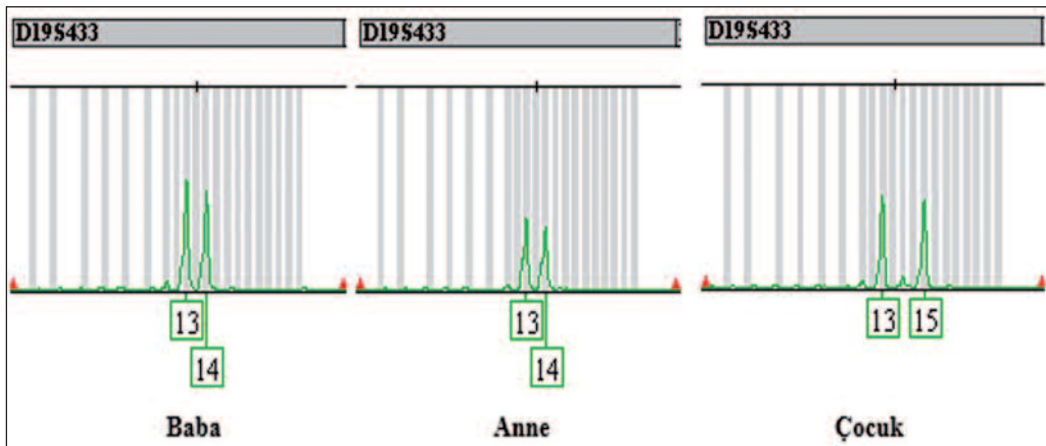
Mahkeme kararı ile nüfus adının düzeltilmesi için annelik ve babalık tayini istenen anne adayından, baba adayından ve 12 yaşındaki çocuktan alınan kan ve yanak içi sürüntü örnekleri Adli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas Dairesine gönderildi.

Kan ve yanak içi sürüntü örneklerinin DNA izolasyonu kolon filtrasyon tekniğini kullanan biyrobot üniversal otomatik DNA izolasyon robotu

(Qiagen) kullanılarak yapıldı. Örneklerin DNA miktarının tayini DNA'ya spesifik Quantifiler Duo PCR Reaksiyon kiti kullanılarak 7500 Gerçek Zamanlı PCR cihazı (Applied Biosystems) ile yapıldı. Miktar tayini yapılan örnekler öncelikle otozomal "AmpFI investigator" ESSplex (Qiagen) kiti kullanılarak amplifiye edildi. Ardından "ABI 3130 genetic analyser" (Applied Biosystems) kullanılarak analizi ve "GeneMapper v3.5" programı kullanılarak data analizi yapıldı. ESSplex kitiyle yapılan STR analizinde 14 lokusta anne adayını, baba adayını ve çocuk arasında uyumlu allel kalıtımını saptanırken, baba adayının D19S433 lokusu "13-14" anne adayının D19S433 lokusu "13-14" çocuğun D19S433 lokusu ise "13-15" olarak tespit edildi (Şekil 1).

D19S433 lokusundaki uyumsuzluğun sebebini belirlemek için beş farklı lokus daha içeren "Identifiler STR" (Applied Biosystems) analizi yapıldı. On dokuz lokusta anne ve babalık yönünden uyumlu allel kalıtımını saptanırken, hem "ESSplex" hem de "Identifiler STR" analizinde çocuğun D19S433 lokusunun heterozigot "13-15" olduğu tespit edildi. Çocukta anne veya baba adaylarının herhangi birinden tekrar sayısının bir fazlası şeklinde (14→15) geçtiği anlaşılan mutasyon tespit edildi. Böylece mahkeme tarafından gönderilen şahısların %99,99 oranında çocuğun anne ve babası olabileceği tespit edildi.

"ESSplex" ve "Identifiler STR" analizlerinde çocuğun erkek cinsiyetli olduğu tespit edildi. Amelogenin STR lokusundaki X ve Y piklerinin boylarının erkek cinsiyetinde birbirlerine yakın olması



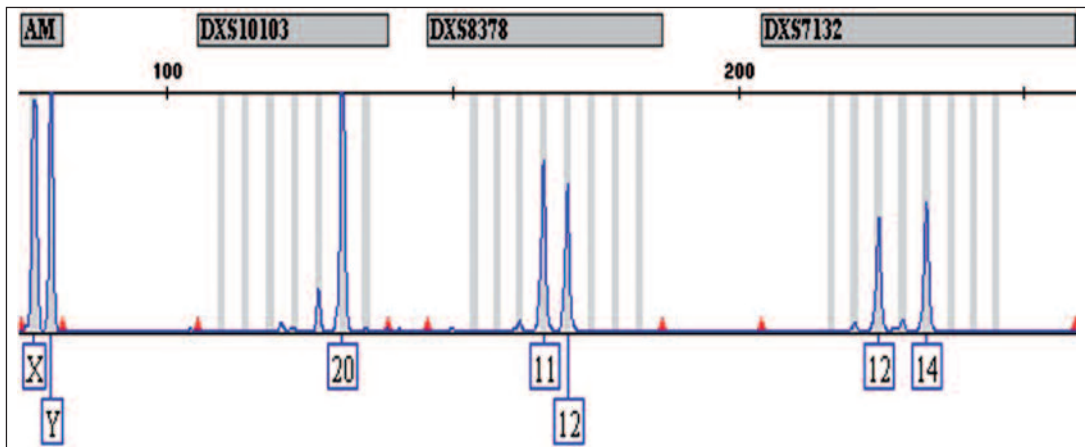
ŞEKİL 1: Baba, anne ve çocuğa ait D19S433 lokuslarında görülen alleller.

gerekirken, X pikinin Y pikinden çok daha yüksek olması nedeniyle Klinefelter sendromundan şüphelenildi. Tanıyı kesinleştirmek için X STR analizi yapıldı. X STR analizinde; normalde tek X kromozomu varlığında homozigot olması gerekirken, iki adet X kromozomu olduğunu gösteren birçok heterozigot (diallelik) bölge tespit edildi (Şekil 2). Çocuğa Klinefelter sendromu tanısı konuldu. Mahkeme tarafından şahısların sadece biyolojik materyali gönderildiği için çocuğun fizik muayenesi yapılamadı. Nesep testinin sonucu mahkeme için yeterli idi ve laboratuvarımızda da rutinde karotip analizi yapılmadığı için Klinefelter sendromu tanısı desteklenemedi.

TARTIŞMA

Nesep testi analizlerinde herhangi bir STR lokusunda mutasyonlarla karşılaşılabilir. Dauber ve ark., 23 STR lokusundaki 50796 allelik geçişi inceledikleri çalışmalarında biri D19S433 lokusunda olmak üzere toplam 65 mutasyon bulmuşlardır.⁸ Olgumuzda mutasyon tespit ettiğimiz D19S433 lokusu 19. kromozomda yer alan tetranükleotit (AAGG) diziden oluşur. Allel uzunluğu 5,2 ile 20 tekrar dizisi arasında değişmektedir.⁹ Olgumuzda D19S433 STR lokusunda anne veya baba adayının hangisinden geçtiği tespit edilemeyen (15) alleli görülmüştür (Şekil 1). Mutasyon varlığında allel geçişleri incelenirken dikkatli olunmalı ve nesep testinin doğruluğunu arttırmak için daha farklı lo-

kuslar içeren "Identifiler" gibi kitlerle çalışmalar yapılarak desteklenmelidir. D19S433 lokusunda gözlemlenen mutasyonun yanında çocuğun X STR analizinde de birçok lokusta diallelik bölge tespit edildi. Klinefelter sendromu tanısı konuldu. Klinefelter sendromu; bir fazla X kromozomunun olduğu kromozomal bir hastalıktır.¹⁰ Jinekomasti, azospermi, küçük testisler, gibi başlıca klinik bulgulara sahiptir.¹¹ Klinefelter sendromu 500 canlı doğumda bir görülen ve en sık rastlanan seks kromozomal hastalıktır.¹² Hastaneye başvuru nedenleri arasında en sık görüleni infertilitedir. Puberte döneminde 12 yaş civarında hormon replasman tedavisine başlanması sekonder seks karakterleri ve normal boy gelişimi için önemlidir.¹³ Klinefelter sendromu olan hastalara erken yaşta tanı konulup tedaviye başlanması önemlidir. Olgumuz, Klinefelter sendromu tanısı olan ve D19S433 lokusunda mutasyon tespit edilen literatürdeki ilk olgudur. Adli genetik laboratuvarlarında STR mutasyonları ve Down ve Turner sendromu gibi sayısal kromozom anomalileri ile karşılaşılabilir. Allel sayılarına ve allellerin pik boylarına bakılarak sayısal kromozom anomalilerine ön tanı veya tanı konulabilir.⁷ Nesep tayini için başvuran şahıslarda sayısal kromozom anomalilerini kaçırmamak ve STR lokuslarındaki mutasyon varlığında anne veya babayı yanlışlıkla dışlamamak için dikkatli olunmalıdır. Ayrıca nesep testi için başvuran bireylere kısa da olsa bir genetik sorgulama ve fizik muayene yapılması önemlidir.



ŞEKİL 2: Çocuğa iki X kromozomu olduğunu gösteren diallelik bölgeler.

KAYNAKLAR

1. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 2004;5(6):435-45.
2. Jin L, Zhong Y, Chakraborty R. The exact numbers of possible microsatellite motifs. *Am J Hum Genet* 1994;55(3):582-3.
3. Huang QY, Xu FH, Shen H, Deng HY, Liu YJ, Liu YZ, et al. Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. *Am J Hum Genet* 2002;70(3):625-34.
4. Kayser M, Roewer L, Hedman M, Henke L, Henke J, Brauer S, et al. 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.
5. Brinkmann B, Klitschar M, Neuhuber F, Hühne J, Rolf B. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet* 1998;62(6):1408-15.
6. Shimmin LC, Chang BH, Li WH. Male-driven evolution of DNA sequences. *Nature* 1993; 362(6422):745-7.
7. Young DR, Tun Z, Honda K, Matoba R. Identifying sex chromosome abnormalities in forensic DNA testing using amelogenin and sex chromosome short tandem repeats. *J Forensic Sci* 2001;46(2):346-8.
8. Dauber EM, Kratzer A, Neuhuber F, Parson W, Klitschar 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.
9. Heinrich M, Felske-Zech H, Brinkmann B, Hohoff C. Characterisation of variant alleles in the STR systems D2S1338, D3S1358 and D19S433. *Int J Legal Med* 2005;119(5):310-3.
10. Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 1959;183(4657): 302-3.
11. Klinefelter HF, Reifenstein EC, Albright F. Syndrome characterized by gynecomastia aspermatogenesis without A-Leydigism and increased excretion of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1942; 2(11):615-27.
12. Nielsen J, Wohler M. Sex chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. In: Evans JA, Hamerton JL, eds. *Children and Young Adults with Sex Chromosome Aneuploidy. Birth Defects: Original Article Series Volume 26*. New York: Wiley-Liss, for the March of Dimes Birth Defects Foundation; 1991. p.209-23.
13. Nielsen J, Pelsen B, Sørensen K. Follow-up of 30 Klinefelter males treated with testosterone. *Clin Genet* 1988;33(4):262-9.