

Συμβολή της ανάλυσης πολυμορφικών συστημάτων DNA στη διαλεύκανση πατρότητας

Π. Κατσέα,¹ Α. Χατζάκη,² Ν. Πολίτη,¹
Ε. Τσιτσόπουλος,² Α. Αντωνάκη,²
Α. Σταυροπούλου-Γκιάκα,³ Γ. Νασιούλας²

¹Γ' Περιφερειακό Κέντρο Αιμοδοσίας, ΠΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς»

²Τμήμα Μοριακής Βιολογίας, Ερευνητικό και Διαγνωστικό
Εργαστήριο, ΔΘΚΑ «Υγεία»

³Εθνικό Κέντρο Ιστοσυμβατότητας, ΠΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς»,
Αθήνα

The contribution of DNA polymorphisms analysis
in disputed paternity testing

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου: Έλεγχος πατρότητας, Μικροδορυφόροι,
Ποικίλου αριθμού διαδοχικές επαναλήψεις,
Πολυμορφισμοί DNA

Η προσωπική ταυτοποίηση, όπως εφαρμόζεται στην Ιατροδικαστική και τον έλεγχο πατρότητας, βασίζεται στην ανίχνευση διαφορών στα υπό εξέταση άτομα, στο επίπεδο του γενετικού τους υλικού (DNA) ή στο επίπεδο της έκφρασής του (πρωτεΐνες). Η αξιολόγηση των διαφορών αυτών και η ποσοτική της έκφραση βασίζεται στις αρχές της Πληθυσμιακής Γενετικής. Με τα δεδομένα των αντιγονικών πολυμορφισμών, η πιθανότητα ταύτισης μεταξύ δύο ατόμων Ευρωπαϊκής καταγωγής, που φέρουν τα πιο συχνά αλληλόμορφα σε 15 επιλεγμένα συστήματα ομάδων αίματος, ερυθροκυτταρικών ενζύμων και πρωτεϊνών ορού, είναι περίπου 1/20.000.¹⁻³

Η χρήση των υπερπολυμορφικών περιοχών DNA σε τομείς όπως η Ιατροδικαστική και η Ιατρική Γενετική ξεκίνησε ήδη από το 1985,⁴⁻⁶ όταν χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του αποτυπώματος DNA (multi locus DNA fingerprint) ως αποδεικτικό μέσο σε δίκη που αφορούσε μετανάστευση συγγενούς στη Μεγάλη Βρετανία. Οι υπερπολυμορφικές περιοχές DNA που χρησιμοποιούνται συνήθεστερα στον έλεγχο πατρότητας προκύπτουν από διαδοχικές επαναλήψεις μιας μικρής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, που εντοπίζεται σε μία μόνο γενετική θέση μέσα στο ανθρώπινο γονιδίωμα, και καλούνται variable number tandem repeats (VNTRs, ποικίλου αριθμού διαδοχικές επαναλήψεις) ή single locus minisatellites (μικροδορυφόροι μοναδικής θέσης). Η αρχή της μεθόδου είναι απλή. Όταν κατά την ανάλυση των πολυμορφικών συστημάτων διαπιστωθεί ότι το παιδί εμφανίζει αλληλόμορφα που αποδίδονται στον ένα γονέα και αλληλόμορφα που δεν μπορούν να αποδοθούν στον άλλον, τότε ο τελευταίος αποκλείεται με πιθανότητα 100%. Όταν όμως ο υπό εξέταση γονέας δεν μπορεί να αποκλειστεί, τότε καλούμαστε να υπολογίσουμε την πιθανότητα ο πραγματικός γονέας να είναι οποιοδήποτε άλλο άτομο του συγκεκριμένου πληθυσμού. Το μέγεθος αυτό, που συνήθως καλείται δείκτης πατρότητας (paternity index), εκφράζεται ως λόγος πιθανοτήτων, στον οποίο συγκρίνονται οι πιθανότητες πατρότητας του φερομένου πατέρα και ενός τυχαίου ατόμου του ίδιου πληθυσμού.

Σήμερα, ο συνδυασμός της διακριτικής που δίνει η ανάλυση του γενετικού πολυμορφισμού, μαζί με την τελειοποίηση των βιοχημικών και ανοσολογικών τεχνικών, που οδηγούν σε λεπτομερέστερη ανάλυση του πρωτεϊνικού πολυμορφισμού, δίνουν θεωρητικά τη δυνατότητα ταυτοποίησης όλων των ατόμων κάθε είδους πάνω στη γη.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Δείγματα

Στο Γ' Περιφερειακό Κέντρο Αιμοδοσίας του ΠΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς» παρουσιάστηκε μια ιδιαίτερη περίπτωση διερεύνησης πατρότητας με εκλιπούσα μητέρα (M), δύο φερόμενους πατέρες

(ΦΠ1 και ΦΠ2), οι οποίοι ήταν πρώτα εξαδέλφια εκ μητρός, και ένα παιδί (C2). Προκειμένου να προσδιοριστεί ο γονότυπος της εκλιπούσας, εξετάστηκαν οι γονείς της (GM και GF) και το άλλο (C1), μη αμφισβητούμενο παιδί της (εικ. 1). Στοιχεία της θανούσας, που περιήλθαν σε γνώση μας, ήταν τα εξής:

- Ομάδα αίματος ABO, από το νοσοκομείο όπου απεβίωσε νοσηλευόμενη
- Βεβαίωση HLA-τυποποίησης, που είχε χρησιμεύσει κατά το παρελθόν για θεραπευτική αντιμετώπιση (μεσογειακή αναιμία) του μη αμφισβητούμενου παιδιού της.

Τα υπόλοιπα στοιχεία της μητέρας, που απαιτούνταν για την επίλυση της πατρότητας, εξήχθησαν από τη μελέτη του γονότυπου των γονέων της και του άλλου, μη αμφισβητούμενου παιδιού της. Η εξέταση έγινε κατόπιν εισαγγελικής εντολής.

Ομάδες αίματος

ερυθροκυτταρικών αντιγόνων

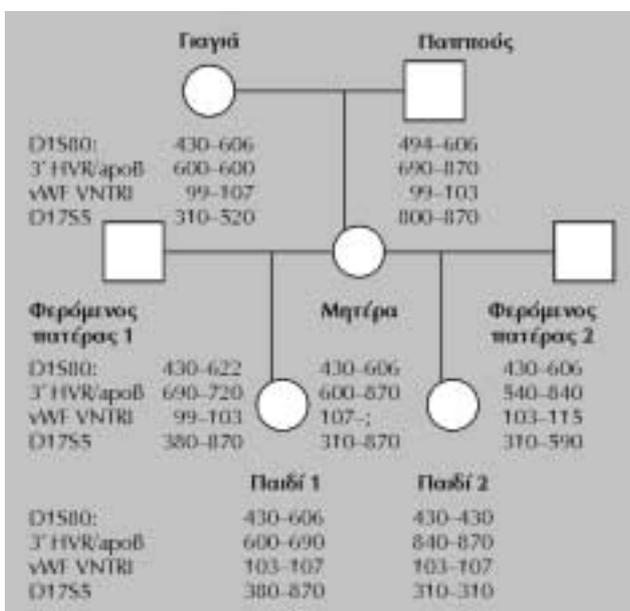
Από όλους τους παραπάνω ελήφθησαν δείγματα αίματος, τα οποία υποβλήθηκαν σε έλεγχο με τη μέθοδο καθορισμού των αντιγόνων των ερυθροκυτταρικών συστημάτων ABO, Rhesus, MNSs, Kell-Cellano, Duffy και Kidd.

Συστήματα ιστοσυμβατότητας HLA

Στα παραπάνω δείγματα έγινε έλεγχος των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας HLA-A και HLA-B από το Εργαστήριο Ιστοσυμβατότητας του ΠΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς».

Ανάλυση DNA

Δεδομένου ότι δεν υπήρχε γενετικό υλικό (DNA) της θανούσας για τη συγκεκριμένη εξέταση, αποφασίστηκε να προσδιοριστεί ο γονότυπος της με βάση τους γονότυπους των γονέων



Εικόνα 1. Αποτελέσματα των πολυμορφικών συστημάτων στους ενδιαφερομένους που αναλύθηκαν με PCR

της και του παιδιού C1, του οποίου η πατρότητα δεν αμφισβητείται και κατόπιν να διαλευκανθεί η πατρότητα του δεύτερου παιδιού έναντι των δύο φερομένων πατέρων.

Εκκύλιση γονιδιακού DNA των 6 δειγμάτων έγινε από λευκοκύτταρα ολικού περιφερικού αίματος με τη μέθοδο πρωτεϊνάσης K/SDS και φαινόλης/φαινόλης-χλωροφορμίου. Το απομονωθέν DNA ελέγχθηκε ποιοτικά και ποσοτικά με φασματοφωτομετρική μέθοδο. Κατόπιν, έγινε εκλεκτική ενίσχυση γενετικού υλικού (DNA) σε 4 επιλεγμένες διαλληλικές υπερπολυμορφικές θέσεις (D1S80, 3'-HVR/apoB, D17S5 και vWF VNTRI) με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (PCR). Οι συνθήκες των αντιδράσεων, οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι μέθοδοι ανάλυσης των γονοτύπων σε κάθε περιοχή ήταν σύμφωνες με τα αναφερόμενα στη σχετική βιβλιογραφία.⁷⁻¹² Στατιστικά στοιχεία για το κάθε πολυμορφικό σύστημα, τον αριθμό και τη συχνότητα των εμφανιζομένων αλληλομόρφων και γονοτύπων, καθώς και πλήρης πληθυσμιακή μελέτη στον Ελληνικό πληθυσμό είναι διαθέσιμα από προηγούμενη δημοσίευση.^{13,14} Με βάση τη στατιστική ανάλυση,^{11,13} το ποσό πολυμορφικής πληροφορίας που λαμβάνουμε από τη μελέτη των παραπάνω συστημάτων στον Ελληνικό πληθυσμό (PIC: polymorphic information content) κυμαίνεται από 0,680-0,835.

Ο δείκτης πατρότητας υπολογίστηκε με τον παρακάτω τύπο: $PI = (1/1 + g) \times 100$, όπου g το γινόμενο των ποσοτήτων $q_i^2 + 2p_i q_i$ σε καθένα από τα VNTR που εξετάζονται και q_i η συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου i μεταξύ του φερομένου πατέρα και του παιδιού σε κάθε VNTR σύστημα. Η ποσότητα g είναι το γινόμενο των συχνοτήτων των γονοτύπων που περιλαμβάνουν τα αλληλομόρφα q_{ia} έως q_{id} στο συγκεκριμένο πληθυσμό και εκφράζει την πιθανότητα ένα τυχαίο άτομο που ανήκει στον πληθυσμό αυτό να έχει τον ίδιο γονότυπο και στα 4 συστήματα με τον υπό αμφισβήτηση γονέα. Το g είναι πολύ μικρότερο της μονάδας, οπότε η ποσότητα $(1/1 + g) \times 100$ εκφράζει το λόγο των πιθανοτήτων ποσοστιαία.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΟ

Ομάδες αίματος ερυθροκυτταρικών αντιγόνων

Όπως φαίνεται στον πίνακα 1, στο σύστημα ABO το «παιδί 2» (C2) εμφανίζει γονότυπο AB. Το αντιγόνο A έχει κληρονομηθεί από τη μητέρα του, ενώ το αντιγόνο B δεν μπορεί να το έχει κληρονομήσει από τον πιθανό πατέρα 1 (ΦΠ1), στον οποίο δεν ανιχνεύεται. Αντιθέτως, το αντιγόνο B ανιχνεύεται στο δείγμα πιθανού πατέρα 2 (ΦΠ2). Στο σύστημα Kidd, το εξεταζόμενο παιδί (C2) εμφανίζει γονότυπο Jk^a/Jk^a . Από τα δύο Jk^a αντιγόνα, το ένα το έχει κληρονομήσει από τη μητέρα του, ενώ το άλλο δεν μπορεί να το έχει κληρονομήσει από τον πιθανό πατέρα 1 (ΦΠ1), στον οποίο δεν υπάρχει, αλλά ανιχνεύεται στο δείγμα του πιθανού πατέρα 2 (ΦΠ2). Από τα άλλα αντιγονικά συστήματα (Rhesus, MNSs, Kell-Cellano και Kidd) δεν λαμβάνουμε καμιά πληροφορία ικανή να

Πίνακας 1. Φαινότυποι (Φ) και γονότυποι (Γ) των 6 εξεταζομένων ατόμων και πιθανός γονότυπος της θανούσας μητέρας σε 6 συστήματα ερυθροκυτταρικών αντιγόνων.

Συστήματα ομάδων	(GM)		(C1)		(GF)		(M)	(C2)*		(ΦΠ1)		(ΦΠ2)	
	Φ	Γ	Φ	Γ	Φ	Γ	Πιθανός γονότυπος	Φ	Γ	Φ	Γ	Φ	Γ
<i>ABO</i>	A	AA, AO	A	AA, AO	AB	AB	AA, AO	AB	<u>AB</u>	A	AA, AO	B	<u>BB, BO</u>
<i>Rhesus</i>	DCCee	DCe/DCe Dce/dCe	DCCee	DCe/DCe Dce/dCe	DCëee	DCe/Dëe Dce/dëe dCe/Dëe	DCe/DCe Dce/dCe DCe/Dëe Dce/dëe	DCCee	DCe/DCe Dce/dCe	DCEëe	DCE/Dëe Dce/dëe Dëe/dCe Dëe/DCe	DCEëe	DCE/Dëe Dce/dëe Dëe/dCe Dëe/DCe
<i>Kell Cellano</i>	\bar{K}	$\bar{K}\bar{K}$	\bar{K}	$\bar{K}\bar{K}$	\bar{K}	$\bar{K}\bar{K}$	$\bar{K}\bar{K}$	\bar{K}	$\bar{K}\bar{K}$	\bar{K}	$\bar{K}\bar{K}$	\bar{K}	$\bar{K}\bar{K}$
<i>MNSs</i>		MNSs		MNSs		MNSs	MNSS MNSs MNSss		MNSs		MNSs		MNSs
<i>Duffy</i>		Fy ^a Fy ^b		Fy ^a Fy ^b		Fy ^a Fy ^b	Fy ^a Fy ^b Fy ^a Fy ^b Fy ^a Fy ^b		Fy ^a Fy ^b		Fy ^a Fy ^b		Fy ^a Fy ^b
<i>Kidd</i>		Jk ^a Jk ^b		Jk ^a Jk ^b		Jk ^b Jk ^b	Jk ^a Jk ^b		<u>Jk^aJk^a</u>		Jk ^b Jk ^b		<u>Jk^aJk^b</u>

* Η υπογράμμιση δηλώνει πληροφοριακό για την πατρότητα σύστημα

διαχωρίσει τους δύο φερόμενους πατέρες. Από τα παραπάνω συνάγεται ότι ο πιθανός πατέρας 1 (ΦΠ1) αποκλείεται από την πατρότητα του παιδιού 2 από τα αντιγονικά συστήματα ABO και Kidd, ενώ δεν αποκλείεται ο πιθανός πατέρας 2 (ΦΠ2). Δεδομένου όμως ότι ο αποκλεισμός πατρότητας θεωρείται επαρκής όταν ο εξεταζόμενος γονέας αποκλείεται από 3 τουλάχιστον πολυμορφικά συστήματα, κρίθηκε απαραίτητο να επεκταθεί ο εργαστηριακός έλεγχος με ανάλυση DNA.

Συστήματα ιστοσυμβατότητας HLA

Στον πίνακα 2 αναγράφονται τα αποτελέσματα της εξέτασης των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας HLA-A και HLA-B και οι προκύπτοντες φαινότυποι των εξεταζομένων ατόμων. Όπως φαίνεται στον πίνακα 2, τα αντιγόνα που έχει κληρονομήσει το παιδί 2 από το «βιολογικό» του πατέρα υπάρχουν και στους εξεταζόμενους ΦΠ1 και ΦΠ2. Επομένως, η πληροφορία δεν είναι ικανή να διαχωρίσει τους ΦΠ1 και ΦΠ2, οι οποίοι άλλωστε είναι και πρώτα εζαδέλφια.

Ανάλυση DNA

Από προηγούμενη ερευνητική μελέτη έχουν συγκεκριμένα δεδομένα για τις αλληλικές και γονοτυπικές κατανομές των χρησιμοποιούμενων VNTR περιοχών στον Ελληνικό πληθυσμό.^{13,14} Με βάση αυτά τα δεδομένα έχει υπολογιστεί ότι η πιθανότητα ταυτότητας του γονοτύπου και

Πίνακας 2. Φαινότυποι των 6 εξεταζομένων ατόμων και πιθανός φαινότυπος της θανούσας μητέρας στα αντιγόνα του συστήματος ιστοσυμβατότητας HLA-A και HLA-B.

Εξεταζόμενο άτομο	Φαινότυπος
Μητέρα μητέρας (GM)	A2, A26(10)-B51(5), B7
Παιδί 1 (C1)	A2, A32-B49(21), B35
Πατέρας μητέρας (GF)	A31, A32-B18, B35
Μητέρα (M)	A2, A32(19)-B35, B51(5)
Παιδί 2 (C2)	A24(9), A32-B35, Bx
Πιθανός πατέρας 1 (ΦΠ1)	A2, A24(9)-B49(21), B35
Πιθανός πατέρας 1 (ΦΠ2)	A24(9), A26(10)-B7, B35

στις 4 εξεταζόμενες VNTR περιοχές δύο τυχαίων ατόμων του Ελληνικού πληθυσμού ανέρχεται σε 2×10^{-7} . Η πιθανότητα αυτή έχει υπολογιστεί με βάση τη συχνότητα του συνηθέστερου γονοτύπου σε κάθε πολυμορφικό σύστημα που απαντάται σε ένα αρκετά μεγάλο δείγμα Ελληνικού πληθυσμού.¹³ Βέβαια, η τιμή αυτή αυξάνεται στις περιπτώσεις ελέγχου πατρότητας, όπου το ζητούμενο μέγεθος δεν είναι η πιθανότητα πλήρους γονοτυπικής ταυτότητας αλλά η πιθανότητα πατρότητας, η οποία κυμαίνεται από 10^{-2} έως 10^{-6} . Με τη χρήση και άλλων πολυμορφικών συστημάτων, τα οποία έχουν ήδη μελετηθεί και τυποποιηθεί στον Ελληνικό πληθυσμό, η διακριτική ισχύς της μεθόδου αυξάνεται και πλησιάζει την τιμή 10^{-10} . Με βάση το μέγεθος του Ελληνικού πληθυσμού, αυτό δείχνει θεωρητικά ότι δεν

Πίνακας 3. Γονότυποι των 6 εξεταζομένων ατόμων και πιθανός γονότυπος της θανούσας μητέρας σε 4 υπερπολυμορφικά συστήματα.

Πολυμορφικό σύστημα	D1S80	3'-HVR/αροB	vWF VNTRI	D17S5
Γονότυπος				
Παπούς	494-606	690-870	99-103	800-870
Γιαγιά	430-606	600-600	99-107	310-520
Φερόμενος πατέρας 1	430-622	690-720	99-103	380-870
Φερόμενος πατέρας 2	430-606	540-840	103-115	310-590
Πιθανός γονότυπος μητέρας	430-606	600-870	107-;	310-870
Παιδί 1	430-606	600-690	103-107	310-870
Παιδί 2	430-430	840-870	103-107	310-310

Με υπογράμμιση σημειώνονται τα αλληλόμορφα που το παιδί 2 εμφανίζει κοινά με τη μητέρα του (πιθανός γονότυπος) και το φερόμενο πατέρα 2

υπάρχει πιθανότητα να βρεθούν δύο άτομα με τον ίδιο γονότυπο σε όλες τις μελετούμενες περιοχές.

Ο προσδιορισμός του γονοτύπου της εκλιπούσας μητέρας σε 3 από τα 4 πολυμορφικά συστήματα έγινε δυνατός με βάση τους γονότυπους των γονέων της (GM και GF) και του 1ου παιδιού της (C1). Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της ανάλυσης DNA παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Ο αποκλεισμός της πατρότητας του φερομένου πατέρα 1 (ΦΠ1) για το παιδί 2 έγινε δυνατός με βάση την πληροφορία που ελήφθη από την ανάλυση των πολυμορφικών συστημάτων 3'-HVR/αροB και D17S5. Ειδικότερα, στην 3'-HVR/αροB VNTR περιοχή το παιδί 2 δεν έφερε κανένα αλληλόμορφο κοινό με το φερόμενο πατέρα 1, ενώ, αντίθετα, είχε κοινό με το φερόμενο πατέρα 2 (ΦΠ2) το αλληλόμορφο 840. Το αλληλόμορφο αυτό απαντάται σε συχνότητα $q=0,0387$ σε δείγμα 181 ατόμων του Ελληνικού πληθυσμού.¹³

Στο πολυμορφικό σύστημα D17S5, το παιδί 2 δεν έφερε κανένα αλληλόμορφο κοινό με το ΦΠ1, ενώ, αντίθετα, είχε κοινό με το ΦΠ2 το αλληλόμορφο 310. Το αλληλόμορφο αυτό απαντάται σε συχνότητα $q=0,19$ σε δείγμα 180 ατόμων του Ελληνικού πληθυσμού.¹³

Από τα δύο παραπάνω συστήματα λαμβάνουμε πληροφορία για τον αποκλεισμό του ΦΠ1 και το μη αποκλεισμό του ΦΠ2. Ο υπολογισμός όμως του δείκτη πατρότητας για το ΦΠ2 έγινε με βάση την πληροφορία που λαμβάνουμε από τη μελέτη και των 4 συστημάτων. Έτσι, από όλα τα συστήματα έχουμε:

$$g=0,0039, 1/g=300 \text{ και } PI=99,7\%$$

Τα παραπάνω αποτελέσματα ήταν σε συμφωνία με αυτά από τη μελέτη του συστήματος HLA και από τις ομάδες αίματος ερυθροκυτταρικών αντιγόνων. Η συνεκτίμηση όλων των αποτελεσμάτων συνέτεινε στον αποκλεισμό του

ΦΠ1 ως πατέρα του παιδιού 2, ενώ, αντίθετα, ενίσχυσε την πιθανότητα μη αποκλεισμού του ΦΠ2 σε 99,97%.

Συμπερασματικά, η εφαρμογή όλων των παραπάνω μεθόδων στην περίπτωση αυτή καταδεικνύει τη χρησιμότητα, τη διακριτική ισχύ και την αναγκαιότητα χρησιμοποίησης των νέων προσεγγίσεων στο πεδίο της αμφισβητούμενης πατρότητας και της προσωπικής ταυτοποίησης και στα Ελληνικά εργαστήρια.¹⁵

ABSTRACT

The contribution of DNA polymorphisms analysis in disputed paternity testing

P. KATSEA,¹ A. HATZAKI,² N. POLITI,¹
E. TSITSOPOULOS,² A. ANTONAKI,²

E. STAVROPOULOU-GIOKA,³ G. NASIOULAS²

¹3rd Blood Bank Center, "G. Gennimatas" Peripheral General Hospital, ²Department of Molecular Biology,

Diagnostic and Research

Laboratory, Diagnostic and Therapeutic Center of Athens "Hygeia", ³National Histocompatibility

Center, "G. Gennimatas" Peripheral General Hospital, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2001, 18(4):389-393

This study illustrates the application of hypervariable DNA region analysis as a confirmative and often decisive method in paternity testing. The case is presented of disputed paternity where the mother was deceased and her second child was claimed by two putative fathers. Analysis was performed of 6 erythrocyte antigen systems, with HLA typing and DNA analysis at 4 hypervariable loci. Putative genotypes of the mother were deduced from her parents and her first child whose paternity was

not disputed. Her ABO blood grouping and HLA typing were available from the medical records. The HLA typing was informative. From red blood cell testing, exclusion of paternity was possible for one of the two putative fathers. DNA polymorphism analysis was informative for both exclusion and confirmation of the disputed paternity. The results of both tests were in agreement and the combined discriminating power of the two methods resulted in assigning paternity with a paternity index of 99.97% to one of the two putative fathers, while excluding the other with 100% probability. The above results underline the usefulness and power of the new DNA-based methods and approaches in the field of disputed paternity and personal identification and the need for their use also in Greece.

Key words: DNA polymorphism, Minisatellites, Paternity testing, Variable number tandem repeats (VNTRs)

Βιβλιογραφία

1. WALKER RH. Probability in the analysis of paternity test results. American Association of Blood Banks, Paternity Testing Seminar, New Orleans, 1978
2. DAVEY FR, HUBELL CA, LAUENSTEIN KJ, TINNESZ C, HENRY BJ. Analysis of paternity: the use of HLA and red cell antigens. *Transfusion* 1984, 224:340-342
3. WEND RE, CHIAFARI FA, BROOKS MA, HOUTZ TD. Technical progress in parentage analysis. *Clin Lab Med* 1992, 12:621-642
4. JEFFREYS AJ, WILSON V, THEIN SL. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Science* 1985, 416:67-73
5. JEFFREYS AJ, WILSON V, THEIN SL. Individual specific fingerprints of human DNA. *Nature* 1985, 316:79-82
6. JEFFREYS AJ, BROOKFIELD JF, SEMEONOFF R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 1985, 317:818-819
7. NAKAMURA Y, LEPPERT M, O'CONNEL P, WOLFF R, HOLM T, CULVER M ET AL. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 1987, 235:1616-1622
8. WEBER JL, MAY PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989, 44:388-396
9. BUDOWLE B, CHAKRABORTY R, GIUSTI AM, EISENBERG AJ, ALLEN RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991, 48:137-144
10. BOERWINKLE E, XIONG WJ, FOUREST E, CHAN L. Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: application to the apolipoprotein B 3'-hypervariable region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:212-216
11. CHAKRABORTY R, JIN LI. Heterozygote deficiency, population sub-structure and their implications in DNA fingerprint. *Hum Genet* 1992, 88:267-272
12. HORN GT, RICHARDS B, KLINGER KW. Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *NAR* 1989, 17:2140
13. HATZAKI A, LOUKOPOULOS D, SPILIOPOULOU H, KOUTSELINIS A. A study of five variable number tandem repeat (VNTR) loci in the Greek population. *Mol Cell Probes* 1995, 92:129-133
14. KONDOPOULOU H, LOFTUS R, KOUVATSI A, TRIANTAPHYLIDIS C. Genetic studies in 5 Greek population samples using 12 highly polymorphic DNA loci. *Hum Biol* 1999, 71:27-42
15. ΜΑΝΔΑΛΛΑΚΗ-ΓΙΑΝΝΙΤΣΙΩΤΗ Τ, ΓΙΑΛΕΡΑΚΗ Α, ΤΣΟΥΚΑΛΑ Α. Γενικές αρχές πραγματογνωμοσύνης πατρότητας. *Αρχ Ελλ Ιατρ* 1999, 16:239-242

Corresponding author:

G. Nasioulas, 4 Erythrou Stavrou & Kifissias Ave., GR-151 23 Maroussi, Athens, Greece