

## Εκτίμηση της αδελφικής σχέσης ανάμεσα σε δύο άτομα με ανάλυση DNA στον Ελληνικό πληθυσμό

**ΣΚΟΠΟΣ** Με την ανάλυση DNA μπορεί να προσδιοριστεί αν δύο άτομα είναι αδέρφια, ακόμη και αν δεν είναι διαθέσιμο δείγμα των γονέων. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να προσδιοριστεί η αξιοπιστία της ανάλυσης συγγένειας στον Ελληνικό πληθυσμό με τη χρησιμοποίηση αρκετών ανεξάρτητων αυτοσωματικών μικροδορυφορικών δεικτών (STRs), που χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό πολυμορφισμού και ετεροζυγωτίας. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Αναλύθηκε η γενετική σύσταση με 10 μικροδορυφορικούς δείκτες σε 14 γνωστά ζευγάρια αδελφών, καθώς επίσης και σε 54 ζευγάρια τυχαίων ατόμων που προέρχονταν από όλη την Ελλάδα. Κατόπιν, υπολογίστηκε η τιμή του συνολικού δείκτη συγγένειας (GSI) από τα αποτελέσματα της ανάλυσης. Τέλος, διερευνήθηκε η πιθανή αδελφική σχέση σε τέσσερις περιπτώσεις. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Η τιμή του GSI για τα βιολογικά αδέρφια κυμαινόταν από 0,6 μέχρι 474.376, ενώ για τα 54 τυχαία ζευγάρια ατόμων ήταν μικρότερη από 1. Θεωρείται ότι τιμή δείκτη μεγαλύτερη του 30 παρέχει αρκετές ενδείξεις ότι τα δύο εξεταζόμενα άτομα είναι αδέρφια. Επίσης, η παρουσία δύο κοινών, και όχι μόνο ενός κοινού αλληλομόρφου, εκ καταγωγής, σε κάθε δείκτη παρέχει ισχυρές ενδείξεις ότι τα εξεταζόμενα άτομα είναι αδέρφια. Η αδελφική σχέση διαπιστώθηκε στις τρεις από τις τέσσερις περιπτώσεις. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας μπορεί να αποτελέσουν οδηγό σε ιατροδικαστικά εργαστήρια, τα οποία αντιμετωπίζουν περιπτώσεις ταυτοποίησης άγνωστων δειγμάτων DNA ή προσδιορισμού του βαθμού συγγένειας ανάμεσα σε δύο δείγματα. Προτείνεται η εξέταση 16 τουλάχιστον ανεξάρτητων αυτοσωματικών μικροδορυφορικών δεικτών για μεγαλύτερη αξιοπιστία. Παρόλα αυτά, σε μερικές περιπτώσεις, επιπρόσθετα της ανάλυσης των αυτοσωματικών μικροδορυφορικών δεικτών, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί η ανάλυση της πρωτοδιάταξης περιοχών του μιτοχονδριακού γονιδιώματος ή η ανάλυση DNA δεικτών του χρωμοσώματος Y.

Η σύγχρονη τεχνολογία της μοριακής γενετικής αποτελεί πλέον πολύτιμο εργαλείο στην αξιόπιστη διαπίστωση της γενετικής (DNA) ταυτότητας ενός ατόμου. Η συχνότερη, μάλιστα, εφαρμογή της μεθόδολογίας με ανάλυση DNA είναι η διερεύνηση ιατροδικαστικών υποθέσεων για τη διαπίστωση πατρότητας ή μητρότητας, όπου το εργαστήριο προβαίνει στην άμεση σύγκριση του DNA των διαδίκων. Όπως έχει διαπιστωθεί, εάν στην εξέταση περιλαμβάνονται τουλάχιστον 10 ανεξάρτητοι αυτοσωματικοί μικροδορυφορικοί δείκτες, στην περίπτωση που υπάρχει αποκλεισμός σε δύο τουλάχιστον γενετικούς δείκτες η αξιοπιστία του αποτελέσματος είναι 100%, ενώ σε περίπτωση μη αποκλεισμού η πιθανότητα ασφαλούς

συμπεράσματος υπερβαίνει το 99,9% για τον Ελληνικό πληθυσμό.<sup>1</sup>

Σε υποθέσεις όπου ζητείται η διαπίστωση της ταυτότητας σκελετικών ευρημάτων και η συνεργασία των ιατροδικαστών με την αστυνομία δεν καταλήγει σε ταυτοποίηση του ατόμου με τις κλασικές μεθόδολογίες των δακτυλικών αποτυπωμάτων και των ακτινογραφημάτων των δοντιών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνολογία του DNA για τη γενετική ταυτοποίηση του ατόμου.<sup>2</sup> Συγκεκριμένα, το DNA που απομονώνεται από το εύρημα συγκρίνεται με αυτό που απομονώνεται από προϋπάρχουσες τρίχες ή βιοψίες του ατόμου. Εναλλακτικά, η σύγκριση γίνεται ανάμεσα στο DNA από το εύρημα και

A. Κουβάτσου,<sup>1</sup>  
Π. Δεληγιαννίδου,<sup>1</sup>  
Λ. Φλωρεντίν,<sup>2</sup>  
Α. Τριανταφυλλίδου,<sup>1</sup>  
Α. Χατζηκυριακίδου,<sup>1</sup>  
Χ. Μπίλη,<sup>2</sup>  
Μ. Πέιου-Τσοποζίδου,<sup>1</sup>  
Κ. Τριανταφυλλίδου<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΑΠΘ

<sup>2</sup>Άλφα Lab, Κέντρο Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρογενετικής, Ιατρικό Ινστιτούτο Έρευνας και Διάγνωσης ΑΕ, Αθήνα

### Determination of sibship by DNA analysis in Greeks

*Abstract at the end of the article*

Λέξεις ευρετηρίου

Αδέρφια  
Ανάλυση DNA  
Συγγενική σχέση

Υποβλήθηκε 25.11.2002  
Εγκρίθηκε 22.5.2003

είτε τα τυχόν υπάρχοντα δεδομένα της ανάλυσης του γενετικού υλικού του ατόμου σε μια τράπεζα δεδομένων, είτε το DNA από ένα άλλο μέλος της οικογένειας ή και τα δύο.

Επιπλέον, πολλές φορές ζητούνται γενετικές αποδείξεις για το αν δύο άτομα είναι αδέρφια, όπως σε περιπτώσεις διερεύνησης συγγένειας όταν έχουν πεθάνει και οι δύο γονείς ή διεκδίκησης κληρονομιάς ή μεταμοσχεύσεων ανάμεσα σε πραγματικά αδέρφια, στα οποία ταυτόχρονα γίνεται έλεγχος HLA ή, τέλος, ενοποίησης οικογενειών λόγω θανάτου, πολέμου, υιοθεσιών, μεταναστεύσεων ή και ατυχημάτων.<sup>1-3</sup> Θα πρέπει όμως να τονιστεί ότι σε περιπτώσεις όπου απουσιάζουν οι γονείς, το συμπέρασμα που προκύπτει από τις εργαστηριακές αναλύσεις δεν είναι τόσο απόλυτο, γιατί υπάρχουν μερικοί περιορισμοί. Ειδικότερα, σε ένα ζευγάρι αληθινών αδελφών, σύμφωνα με τους νόμους του Mendel, 50% των αλληλόμορφων γονιδίων που εξετάζονται θα πρέπει να είναι ίδια (για τα ετεροθαλή αδέρφια, η πιθανότητα αυτή είναι 25%). Η πιθανότητα όμως δύο αδέρφια να κληρονομήσουν σε ένα γονιδιακό τόπο τα ίδια αλληλόμορφα λόγω καταγωγής ή να μην τα κληρονομήσουν είναι ίση με 25% και στις δύο περιπτώσεις. Ως εκ τούτου, ακόμη και αν στην ανάλυση για ένα γενετικό δείκτη διαπιστωθεί ότι δύο άτομα δεν έχουν κοινό αλληλόμορφο, δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι τα άτομα είναι πραγματικά αδέρφια. Και αυτό γιατί η κληρονομία των αλληλόμορφων γονιδίων από τους γονείς στα παιδιά γίνεται τυχαία.<sup>2,3</sup>

Για να διερευνηθούν τέτοιες περιπτώσεις, συνήθως προτείνεται η εξέταση αρκετών ανεξάρτητων αυτοσωματικών μικροδορυφορικών δεικτών.<sup>2-5</sup> Κατάλληλοι είναι εκείνοι οι πολυμορφικοί δείκτες που χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό ετεροζυγωτίας, γιατί τότε η πιθανότητα τυχαίας ύπαρξης κοινών αλληλομόρφων είναι ελάχιστη. Κατά τη διαδικασία ελέγχου συγγένειας, αναλύεται ο αριθμός των κοινών αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο ανάμεσα στα άτομα και υπολογίζεται ένας δείκτης συγγένειας (Sibship Index, SI).<sup>3</sup> Ο δείκτης SI αντιπροσωπεύει την πιθανότητα ένα τυχαίο άτομο στον πληθυσμό να έχει τα ζητούμενα κοινά αλληλόμορφα γονίδια. Η παρουσία ενός μόνο κοινού αλληλομόρφου κάποιου πολυμορφικού δείκτη στα δύο άτομα παρέχει περιορισμένες πληροφορίες υπέρ ή κατά της αδελφικής συγγένειας.<sup>3</sup> Αντίθετα, η παρουσία δύο κοινών αλληλομόρφων εκ καταγωγής, ανά γενετικό δείκτη, παρέχει ισχυρές ενδείξεις ότι τα εξεταζόμενα άτομα είναι αδέρφια.<sup>2,3</sup> Όπως προαναφέρθηκε, το μειονέκτημα της ανάλυσης συγγένειας βρίσκεται στο γεγονός ότι δεν υπάρχουν αλληλόμορφα γονίδια εκ καταγωγής, που θα κληροδο-

τηθούν υποχρεωτικά από τους γονείς και στα δύο αδέρφια. Σε ακραίες περιπτώσεις, μπορεί δύο άτομα να μην έχουν κανένα κοινό αλληλόμορφο και όμως να είναι αδέρφια. Ως εκ τούτου, με την ανάλυση συγγένειας μπορεί να δοθεί γνωμάτευση μόνο ότι δύο άτομα είναι συγγενικά. Για να ενισχυθεί η αξιοπιστία του συμπεράσματος προς την κατεύθυνση της αδελφικής συγγένειας, όπου είναι δυνατό, πρέπει να εξετάζονται συγγενείς του πατέρα (π.χ. παππούδες, θείοι) ή να γίνονται περαιτέρω αναλύσεις, όπως η πρωτοδιάταξη του μιτοχονδριακού DNA ή η ανάλυση κατάλληλων μικροδορυφορικών δεικτών του χρωμοσώματος Υ.

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε, μετά από ανάλυση του γενετικού υλικού των ατόμων, η πιθανή αδελφική σχέση σε τέσσερις περιπτώσεις. Προκειμένου όμως να υπάρχει σύστημα αναφοράς, αναλύθηκε προηγουμένως και η γενετική σύσταση σε 14 γνωστά ζευγάρια αδελφών, καθώς επίσης και σε 54 ζευγάρια τυχαίων ατόμων, που προέρχονταν από όλη την Ελλάδα. Με αυτόν τον τρόπο αξιολογήθηκε η αξιοπιστία της ανάλυσης συγγένειας στον Ελληνικό πληθυσμό, χρησιμοποιώντας μικροδορυφορικούς δείκτες.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### Ανάλυση DNA

DNA απομονώθηκε από περιφερικό αίμα από 14 γνωστά ζευγάρια αδελφών, 54 ζευγάρια μη συγγενικών ατόμων, που προέρχονταν από διάφορες περιοχές της χώρας, και από τα άτομα που προσήλθαν σε τέσσερις περιπτώσεις διερεύνησης συγγένειας. Στο DNA όλων των ατόμων αναλύθηκαν αρχικά 10 αυτοσωματικοί πολυμορφικοί μικροδορυφορικοί δείκτες (D2S1328, D3S1358, D9S926, D11S2010, D16S310, D18S848, FES, vWF, THO1, hTPO). Αναλυτικά στοιχεία για τους μικροδορυφορικούς δείκτες, το χρωμόσωμα στο οποίο εντοπίζονται, αλλά και τους εκκινητές για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) υπάρχουν σε προηγούμενη εργασία.<sup>6</sup> Όπου κρίθηκε απαραίτητο, έγινε περαιτέρω ανάλυση μικρο- ή μινι-δορυφορικών αυτοσωματικών DNA δεικτών ή δεικτών του DNA του μιτοχονδρίου ή δεικτών του χρωμοσώματος Υ. Στην περίπτωση του μιτοχονδριακού DNA αναλύθηκε η πρωτοδιάταξη<sup>7</sup> δύο υπερμεταβλητών περιοχών (HVRI και HVRII), ενώ στην περίπτωση των δεικτών του χρωμοσώματος Υ αναλύθηκαν 7 μικροδορυφορικοί δείκτες.<sup>8</sup>

### Περιγραφή περιπτώσεων

Δύο ζευγάρια ατόμων είχαν προσέλθει οικιοθελώς στο εργαστήριο (περιπτώσεις Α και Β), ένα ζευγάρι προσήλθε ύστερα από δικαστική απόφαση, προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή συγγενική σχέση μεταξύ τους (Γ), και στην τετάρτη (Δ) περί-

πτωση (ύστερα από τροχαίο) προσήλθε άτομο, προκειμένου να διερευνηθεί αν το δείγμα αίματος του νεκρού οδηγού του αυτοκινήτου ήταν πράγματι του αδελφού του. Ως θετικοί μάρτυρες πλήρους συγγένειας χρησιμοποιήθηκαν 14 ζευγάρια πραγματικών αδελφών. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν 108 τυχαία, ξένα μεταξύ τους άτομα (54 ζευγάρια) από τον Ελληνικό πληθυσμό.

## ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ

Για την ανάλυση συγγένειας, με βάση τα γενετικά δεδομένα τόσο των πραγματικών αδελφών όσο και των μη συγγενικών ζευγαριών, χρησιμοποιήθηκαν οι μαθηματικοί τύποι που αναπτύχθηκαν από άλλους ερευνητές.<sup>2-5,9</sup> Αρχικά, υπολογίστηκε για κάθε ζευγάρι (S1 και S2) ατόμων και κάθε γενετικό τόπο ο δείκτης συγγένειας (SI). Συνοπτικά, ο δείκτης αυτός υπολογίζεται ως ο λόγος της πιθανότητας να βρεθούν οι συγκεκριμένοι γενότυποι αν τα δύο άτομα είναι αδέρφια προς την πιθανότητα να βρεθούν οι γενότυποι αν τα δύο άτομα δεν είχαν συγγένεια.<sup>2,3</sup>

Ο παρονομαστής δίνει την πιθανότητα να βρεθεί στον πληθυσμό ο γενότυπος του ατόμου S2, υποθέτοντας ότι τα δύο άτομα (S1 και S2) δεν είναι συγγενικά μεταξύ τους. Η πιθανότητα αυτή είναι ίση με τη συχνότητα του αντίστοιχου γενότυπου στον πληθυσμό, π.χ. αν ο γενότυπος του ατόμου S2 είναι AB, τότε η πιθανότητα είναι ίση με 2ab (όπου a και b η συχνότητα των αλληλομόρφων A και B, αντίστοιχα).

Ο αριθμητής δείχνει την πιθανότητα να βρεθεί ο γενότυπος του ατόμου S2, δεδομένου του γενότυπου του ατόμου S1 και της παραδοχής ότι τα άτομα είναι αδέρφια. Με άλλα λόγια, η τιμή του αριθμητή προσδιορίζεται ως η συνδυασμένη πιθανότητα να συμβούν δύο ανεξάρτητα γεγονότα. Το πρώτο ότι τα αλληλόμορφα του ατόμου S2 είναι ή δεν είναι ίδια εκ καταγωγής με τα αλληλόμορφα του ατόμου S1 και το δεύτερο ότι το άτομο S2 έχει το συγκεκριμένο γενότυπο, δεχόμενοι ότι η κληρονομία συνέβη λόγω καταγωγής.

Στη συνέχεια, ο συνολικός δείκτης συγγένειας (GSI) υπολογίζεται ως το προϊόν του γινομένου των μεμονωμένων τιμών του δείκτη συγγένειας κάθε γενετικού τόπου.<sup>2,3</sup> Ως συχνότητες των αλληλομόρφων των γενετικών δεικτών που χαρακτηρίζουν τον Ελληνικό πληθυσμό χρησιμοποιήθηκαν αυτές από προηγούμενες εργασίες.<sup>6,7,10</sup> Η ισχύς της αποδεικτικής αξίας του δείκτη GSI (πίν. 1) έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες άλλων συγγραφέων.<sup>2,11,12</sup>

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον πίνακα 2 φαίνονται τα αποτελέσματα της παρούσας δύο, ενός ή κανενός κοινού αλληλομόρφου, σε κάθε γενετικό δείκτη, σε τυχαία ζευγάρια ατόμων και σε αδέρφια. Ανάμεσα στις 140 συνολικές παρατηρήσεις (10 τόποι × 14 αδελφικά ζευγάρια), δύο κοινά αλληλό-

μορφα ανά γενετικό δείκτη βρέθηκαν σε 46 περιπτώσεις, δηλαδή ποσοστό 32,86% (μέσος όρος 3,29 τόποι, με εύρος 1-6), ενώ μόνο 58 φορές στις 540 περιπτώσεις (ποσοστό 10,74%) στην ομάδα με τα μη συγγενικά μεταξύ τους άτομα (μέσος όρος 1,07 τόποι, με εύρος 0-4). Οι τιμές αυτές διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ( $\chi^2=27,86$ ,  $P<0,05$ ). Ένα κοινό αλληλόμορφο ανά γενετικό δείκτη βρέθηκε σε ποσοστό 59,29% (83/140) στην ομάδα των αδελφών, ενώ το ποσοστό στην άλλη ομάδα ήταν 57,96% (313/540). Οι τιμές αυτές δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ( $\chi^2=0,02$ ,  $P>0,5$ ). Τέλος, δεν υπήρχε κοινό αλληλόμορφο σε σύνολο 11 περιπτώσεων (ποσοστό 7,85%) ανάμεσα στα αδέρφια, ενώ το ποσοστό ανάμεσα στα μη συγγενικά άτομα ήταν 31,30%.

Οι τιμές του συνολικού δείκτη αδελφικής συγγένειας (GSI) για τα 14 ζευγάρια πραγματικών αδελφών που εξετάστηκαν ήταν 0,6, 1, 5, 14, 50, 93, 190, 305, 3.282, 9.684, 19.550, 65.203, 145.415 και 474.376. Αυτές, δηλαδή, κυμαίνονται από τη χαμηλή τιμή 0,6 μέχρι την πολύ υψηλή 474.376 (πίν. 1). Αντίστοιχα υπολογίστηκαν οι τιμές GSI και για τα τυχαία ζευγάρια ατόμων. Οι τιμές αυτές συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Από τα αποτελέσματα (πίν. 1) προκύπτει ότι όλα τα τυχαία ζευγάρια ατόμων (ποσοστό 100%) που εξετάστηκαν δίνουν τιμή συνολικού δείκτη GSI για τους 10 μικροδορυφορικούς

**Πίνακας 1.** Κατανομή των τιμών του συνολικού δείκτη αδελφικής συγγένειας (GSI) στα τυχαία και στα ζευγάρια αδελφών μετά την ανάλυση 10 μικροδορυφορικών γενετικών δεικτών.\*

Τιμές GSI	10 γενετικοί δείκτες		Ισχύς της αποδεικτικής αξίας της τιμής του δείκτη GSI
	Τυχαία ζευγάρια	Αδέρφια	
<0,001	7	0	
0,001-0,01	12	0	
0,01-0,1	21	0	
0,1-1	14	2	
1-10	0	1	Ασθενής
10-30	0	1	Ασθενής
30-100	0	2	Αρκετή
100-330	0	2	Καλή
<b>330-1000</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>Ισχυρή</b>
1000-10.000	0	2	Πολύ ισχυρή
10.000-100.000	0	2	Πολύ ισχυρή
100.000-1.000.000	0	2	Πολύ ισχυρή

\* Ο βαθμός αξιοπιστίας των αναλύσεων υπολογίστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες άλλων ερευνητών.<sup>2,11,12</sup> Μετά την ανάλυση 10 δεικτών, μόνο τιμή GSI μεγαλύτερη του 30 παρέχει αρκετές ενδείξεις ότι τα δύο εξεταζόμενα άτομα είναι αδέρφια

**Πίνακας 2.** Κατανομή του αριθμού των κοινών αλληλομόρφων ανάμεσα σε τυχαία ζευγάρια ατόμων και ζευγάρια αδελφών.

Αριθμός γενετικών δεικτών	54 τυχαία ζευγάρια ατόμων Αλληλόμορφα ανά δείκτη			14 ζευγάρια αδελφών Αλληλόμορφα ανά δείκτη		
	2 κοινά	1 κοινό	Κανένα	2 κοινά	1 κοινό	Κανένα
0	17	0	0	0	0	6
1	21	0	4	2	0	6
2	12	0	21	3	0	1
3	3	3	8	3	1	1
4	1	10	12	3	1	0
5	0	9	3	1	3	0
6	0	13	6	2	4	0
7	0	13	0	0	3	0
8	0	4	0	0	2	0
9	0	2	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
Σύνολο περιπτώσεων	58	313	169	46	83	11
Ποσοστό (%)	10,74	57,96	31,30	32,86	59,29	7,85

δείκτες μικρότερη του 1. Αντίθετα, στα ζευγάρια των αδελφών, τιμές GSI μεγαλύτερες του 100 διαπιστώθηκαν σε ποσοστό 57,14% (8/14), τιμές μεταξύ 10–100 σε 3 περιπτώσεις, μία περίπτωση έδωσε τιμή GSI 1–10 και 2 περιπτώσεις τιμές GSI 0,1–1. Μπορεί, επομένως, να προταθεί ως όριο τιμής του δείκτη για τη διάκριση των πραγματικών αδελφών η τιμή GSI 1. Για λόγους ασφάλειας όμως, και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία,<sup>3</sup> ως όριο για 10 μικροδορυφορικούς δείκτες θα πρέπει να θεωρηθεί τιμή GSI ίση με 30.

#### Περίπτωση Α

Τα δύο ενήλικα άτομα (άνδρας και γυναίκα) γνώριζαν ότι έχουν κοινή μητέρα. Ζητούσαν να διερευνηθεί μήπως ήταν και πραγματικά αδέρφια. Για να δοθεί απάντηση στο ερώτημά τους, αρχικά αναλύθηκε η γενετική τους σύσταση για 10 γενετικούς δείκτες. Σε κανένα γενετικό δείκτη δεν έφεραν δύο κοινά αλληλόμορφα. Ένα κοινό αλληλόμορφο έφεραν στο 90% των εξετασθέντων γενετικών δεικτών. Η τιμή του δείκτη GSI υπολογίστηκε σε 6,93. Επειδή τα αποτελέσματα αυτά δεν επέτρεπαν την εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος για το βαθμό συγγένειας των εξεταζόμενων ατόμων, αναλύθηκε η γενετική τους σύσταση σε άλλους 2 μικροδορυφορικούς δείκτες, CSF1PO και F13A01. Στους 12 πλέον γενετικούς δείκτες, ένα κοινό αλληλόμορφο ανά γονίδιο διαπιστώθηκε στο 91,7% των εξετασθέντων δεικτών, ενώ δύο κοινά αλληλόμορφα ανά γονιδιακό δείκτη δεν ανευρέθηκαν και πάλι σε κανένα δείκτη. Το

μηδενικό ποσοστό δύο κοινών αλληλομόρφων είναι πολύ μικρότερο από ό,τι διαπιστώθηκε (32,86%) για πραγματικά αδέρφια (πίν. 2). Ο δείκτης GSI υπολογίστηκε σε 7,7. Τα αποτελέσματα αυτά δεν οδηγούν στην εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος, αν και προβληματίζει η απουσία δύο κοινών αλληλομόρφων.

Ύστερα από αυτό, αναλύθηκε η γενετική σύσταση ενός στενού συγγενούς (άνδρα) του υποτιθέμενου κοινού πατέρα. Το DNA του άνδρα αυτής της περίπτωσης και το DNA του συγγενή αναλύθηκαν για δείκτες στο χρωμόσωμα Υ. Από την ανάλυση 5 συνδεδεμένων με το χρωμόσωμα Υ δεικτών (DYS 390, DYS 391, DYS 393, DYS 389I, 389II) προέκυψε ότι σε δύο από αυτούς (DYS 390 και DYS 393) τα άτομα είχαν διαφορετική γενετική σύσταση, ενώ στα άλλα τρία αμφότεροι είχαν την ίδια γενετική σύσταση. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι οι δύο άνδρες δεν ανήκουν στην ίδια γενεαλογική σειρά, οπότε συμπεραίνεται ότι ο άνδρας της περίπτωσης δεν είναι γιος του υποτιθέμενου κοινού πατέρα. Άρα, τα δύο άτομα που προσήλθαν για ανάλυση δεν είχαν κοινό πατέρα. Ο αποκλεισμός της αδελφικής σχέσης βασίζεται σε ασυμβατότητα σε δύο DNA δείκτες του χρωμοσώματος Υ. Κατά συνέπεια, η αξιοπιστία της ανάλυσης φθάνει τη βεβαιότητα (το 100%).

#### Περίπτωση Β

Αναλύθηκε η γενετική σύσταση των δύο ατόμων για 14 αυτοσωματικούς πολυμορφικούς δείκτες (D2S1328, D16S310, FES, D3S1358, D18S848, vWF, THO1,

hTPO, D1S80, CSF1PO, F13AO1, D13S634, D18S535, D21S1414). Από τους 14 γενετικούς δείκτες που αναλύθηκαν, σε 8 οι εξετασθέντες μοιράζονταν ένα ή και δύο αλληλόμορφα. Ένα κοινό αλληλόμορφο ανιχνεύτηκε στο 28,57% των εξετασθέντων αυτοσωμικών γενετικών δεικτών. Δύο κοινά αλληλόμορφα υπήρχαν επίσης στο 28,57% των εξετασθέντων γενετικών δεικτών. Το ποσοστό αυτό είναι λίγο μικρότερο από εκείνο που διαπιστώθηκε για αδέρφια (πίν. 2). Η τιμή GSI υπολογίστηκε σε 2,48. Τα παραπάνω αποτελέσματα παρέχουν ασθενείς μόνο ενδείξεις ότι τα άτομα είναι αδέρφια.

### Περίπτωση Γ

Δύο ενήλικες γυναίκες επιθυμούσαν να διαπιστώσουν αν είναι αδελφές. Η εξέταση 10 μικροδορυφορικών δεικτών έδειξε δύο κοινά αλληλόμορφα σε ποσοστό 20% και ένα κοινό αλληλόμορφο σε ποσοστό 50% των εξετασθέντων γενετικών δεικτών. Η τιμή του δείκτη GSI υπολογίστηκε σε 0,99, δηλαδή μικρότερη ακόμη και από τη μονάδα. Τα αποτελέσματα αυτά δεν επέτρεπαν με βεβαιότητα να διατυπωθεί η άποψη ότι πρόκειται πραγματικά για αδελφές (βλ. πίνακες 1 και 2). Γνωρίζοντας ότι οι Έλληνες σε ποσοστό 96% έχουν μοναδική γενετική σύσταση στις περιοχές HVRI και HVRII του μιτοχονδριακού γονιδιώματός τους,<sup>7</sup> το οποίο κληρονομούν μόνο από τη μητέρα τους, προσδιορίστηκε η πρωτοδιάταξη σε 740 βάσεις του μιτοχονδριακού τους DNA. Οι δύο γυναίκες είχαν ακριβώς την ίδια σειρά νουκλεοτιδίων. Το γεγονός αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι είναι αδελφές.

### Περίπτωση Δ

Τα αδέρφια ενός άρρενος ατόμου που σκοτώθηκε σε τροχαίο δυστύχημα επιθυμούσαν να διαπιστώσουν αν οι ιατροδικαστικές εξετάσεις αφορούσαν πράγματι στον αδελφό τους. Το DNA που απομονώθηκε από το αίμα του νεκρού, καθώς και το DNA του πιθανού αδελφού, αναλύθηκαν με δύο διαφορετικές μεθοδολογίες. Η πρώτη μεθοδολογία αφορούσε στην ανάλυση του DNA της περιοχής του βρόχου εκτόπισης του μιτοχονδρίου με ένζυμα περιορισμού και η άλλη το DNA του χρωμοσώματος Y. Ο λόγος γι' αυτή την επιλογή είναι προφανής: οι δείκτες DNA που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα Y του άνδρα κληροδοτούνται από τον πατέρα μόνο στους γιους, ενώ οι μιτοχονδριακοί δείκτες κληροδοτούνται μόνο από τη μητέρα στα παιδιά της. Στο χρωμόσωμα Y, αποτελέσματα προέκυψαν για τους γενετικούς δείκτες DYS390 και DYS391, ενώ στην περιοχή του βρόχου εκτόπισης του μιτοχονδριακού DNA έγιναν πέψεις με τέσσερα

ένζυμα περιορισμού, τα *RsaI*, *HinfI*, *MboI* και *KpnI*. Από την ανάγνωση των αποτελεσμάτων όλων των παραπάνω γενετικών δεικτών προέκυψε ότι τα δύο άτομα είχαν ακριβώς την ίδια γενετική σύσταση, γεγονός που παρέχει μάλλον ισχυρή ένδειξη ότι ο ιατροδικαστής είχε αναλύσει από το ατύχημα το αίμα του αδελφού του ατόμου που προσήλθε για διερεύνηση.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην εργασία αυτή παρουσιάστηκαν τα αποτελέσματα διερεύνησης της αδελφικής συγγένειας ανάμεσα σε τέσσερα ζευγάρια ατόμων με τη χρησιμοποίηση τριών διαφορετικών μεθοδολογιών ανάλυσης της γενετικής τους σύστασης και, συγκεκριμένα, ανάλυσης 10 ή περισσότερων αυτοσωματικών μικροδορυφορικών δεικτών, 7 συνδεδεμένων στο χρωμόσωμα Y μικροδορυφορικών δεικτών και ανάλυσης της πρωτοδιάταξης περιοχών του βρόχου εκτόπισης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Πλήρης ταυτοποίηση επιτεύχθηκε στις τρεις περιπτώσεις, ενώ στη μία παρουσιάστηκαν απλώς ασθενείς ενδείξεις για το βαθμό συγγένειας των ατόμων. Προκειμένου όμως να υπάρχουν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, προσδιορίστηκε προηγουμένως ο δείκτης συγγένειας και ο αριθμός των κοινών αλληλομόρφων σε 14 ζευγάρια πραγματικών αδελφών και σε 54 τυχαία ζευγάρια ατόμων για 10 STR δείκτες.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το ποσοστό των περιπτώσεων με δύο κοινά αλληλόμορφα ανά γενετικό δείκτη ανάμεσα στα αδέρφια ήταν 32,86%, ενώ ανάμεσα στα τυχαία ζευγάρια ατόμων ήταν 10,74% (πίν. 2). Αντίστοιχα, το ποσοστό των περιπτώσεων με ένα κοινό αλληλόμορφο ανά γενετικό δείκτη ανάμεσα στα αδέρφια ήταν 59,29%, ενώ ανάμεσα στα τυχαία ζευγάρια ατόμων ήταν 57,96%. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν τη θέση που είχε εκφραστεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες,<sup>3,5</sup> ότι δηλαδή η παρουσία υψηλού ποσοστού δύο κοινών αλληλομόρφων ανά γενετικό δείκτη, παρά ενός κοινού αλληλομόρφου, είναι περισσότερο πληροφοριακό στοιχείο για την εκτίμηση της αδελφικής συγγένειας ανάμεσα σε δύο άτομα.

Τα αποτελέσματα δείχνουν επίσης ότι η ερμηνεία των εργαστηριακών ευρημάτων και των μαθηματικών υπολογισμών του δείκτη συγγένειας θα πρέπει να προσεγγίζονται με ιδιαίτερη προσοχή. Από την ανάλυση έως τώρα των 10 μικροδορυφορικών αυτοσωματικών δεικτών επιτρέπεται να προταθεί ότι για ασφαλή συμπεράσματα θα πρέπει ο αριθμός των αυτοσωματικών γενετικών δεικτών να υπερβαίνει τα 16 και να πλησιάζει τα

20, όπως και προηγουμένως είχε διατυπωθεί.<sup>2,4</sup> Σε καμιά περίπτωση δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν τρεις μόνο δείκτες,<sup>2</sup> όπως αρχικά έπραξαν οι Wenk et al.<sup>3</sup> Σε περιπτώσεις όμως όπου το εξεταζόμενο γενετικό υλικό δεν είναι καλής ποιότητας και η ανάλυση μπορεί να γίνει μόνο για λίγους, π.χ. 6, μικροδορυφορικούς δείκτες, τότε θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η ανάλυση, σε μεγάλο ποσοστό, μπορεί να δώσει στοιχεία ότι δύο άτομα είναι αδέρφια και όχι ότι δεν είναι.<sup>2</sup> Το βασικό συμπέρασμα

είναι ότι όσο περισσότεροι ανεξάρτητοι αυτοσωματικοί δείκτες εξετάζονται, τόσο ισχυρότερο θα είναι το στατιστικό αποτέλεσμα.

Τέλος, αξίζει να τονιστεί ότι σε τέτοιες περιπτώσεις είναι προτιμότερο να αναλύονται εκείνοι οι γενετικοί δείκτες που έχουν μεγαλύτερη διακριτική αξία και, όπου αυτό είναι δυνατό, να αναλύεται η πρωτοδιάταξη της υπερμεταβλητής περιοχής του μιτοχονδριακού DNA ή αρκετοί μικροδορυφορικοί δείκτες του χρωμοσώματος Υ.

## ABSTRACT

### Determination of sibship by DNA analysis in Greeks

A. KOUVATSI,<sup>1</sup> P. DELIGIANNIDIS,<sup>1</sup> L. FLORENTIN,<sup>2</sup> A. TRIANTAFYLLIDIS,<sup>1</sup> A. CHATZIKYRIAKIDOU,<sup>1</sup> C. BILI,<sup>2</sup> M. PEIOU-TSOPOZIDOU,<sup>1</sup> C. TRIANTAPHYLLIDIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, <sup>2</sup>Alfa Laboratory, Center for Molecular Biology and Cytogenetics, Medical Institution for Research and Diagnostics, Athens, Greece

*Archives of Hellenic Medicine 2003, 20(5):519-525*

**OBJECTIVE** In cases where there is no parental DNA sample, a sibship determination is possible via specific DNA analysis. The aim of this study was to validate the efficiency of kinship analysis in the Greek population using several unlinked autosomal STRs, which are characterized by high degree of polymorphism and heterozygosity values. **METHOD** 14 couples of true full-siblings and 54 couples of random Greek individuals were analyzed for 10 STRs. The combined sibship index (GSI) was estimated from the results obtained. Finally, a sibship analysis was performed in four cases. **RESULTS** The GSI value ranged from 0.6 to 474,376 for the full-sibling couples and it was not greater than 1 for the 54 random population couples. A GSI value of over 30 is considered to be a strong indication in favor of sibship. Another strong indication is the fact that the two individuals share both alleles (and not only one of them) in a STR marker. A sibship relationship was certified in three out of the four cases. **CONCLUSIONS** The results of this research may prove useful in forensic laboratories where missing identity cases and kinship analyses are performed. The analysis of at least 16 unlinked autosomal STRs is recommended for trustworthy results. In some cases sequencing analysis of the mitochondrial DNA or Y-STR analysis is required.

**Key words:** DNA analysis, Kinship, Siblings

## Βιβλιογραφία

1. ΚΟΥΒΑΤΣΗ Α, ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΔΗΣ Κ. Η δικαστική αξία των αναλύσεων του DNA. *Αρμενόπουλος*, 2001, 22:267-275
2. GAYTMENN R, HILDEBRAND DP, SWEET D, PRETTY IA. Determination of the sensitivity and specificity of sibship calculations using AmpF/STR profiler plus. *Int J Legal Med* 2002, 116:161-164
3. WENK RE, TRAVER M, CHIAFARI FA. Determination of sibship in any two persons. *Transfusion* 1996, 36:259-262
4. EHM MG, WAGNER M. A test statistic to detect errors in sib-pair relationships. *Am J Hum Genet* 1998, 62:181-188
5. TZENG CH, LYU JY, CHEN YR, HU HY, LIN JS, WANG SY ET AL. Determination of sibship by PCR-amplified short tandem repeats analysis in Taiwan. *Transfusion* 2000, 40:840-845
6. KONDOPOULOU E, LOFTUS R, KOUVATSI A, TRIANTAPHYLLIDIS C. Genetic studies in 5 Greek population samples using 12 highly polymorphic DNA loci. *Hum Biol* 1999, 71:27-42
7. ΚΟΥΒΑΤΣΗ Α, ΚΑΡΑΪΣΚΟΥ Ν, ΑΠΟΣΤΟΛΙΔΗΣ Α, ΚΙΡΜΙΖΙΔΗΣ Γ. Mitochondrial DNA sequence variation in Greeks. *Hum Biol* 2001, 73:855-869

8. KAYSER M, GAGLIA D, CORACH D, FRETWELL N, CEHRIG C, GRAZIOSI G ET AL. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int J Legal Med* 1997, 110:125–133
9. THOMSON JA, AYRES KL, PILLIOTI V, BARRET MN, WALKER JIH, DEBENHAM PG. Analysis of disputed single-parent/child and sibling relationships using 16 STR loci. *Int J Legal Med* 2001, 115:128–134
10. KONDOPOULOU H, KOUVATSI A, TRIANTAPHYLIDIS C. Forensic evaluation of 12 variable number of tandem repeat (VNTR) loci in the Greek population. *Forensic Sci Int* 2001, 124:228–230
11. EVETT IW, WEIR BS. *Interpreting DNA evidence: statistical genetics for forensic scientists*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1998
12. EVETT IW. *Strength of evidence in likelihood ratios. The use of statistics in forensic science*. Ellis Horwood, New York, 1991

*Corresponding author:*

A. Kouvatsi, Department of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, GR-541 24 Thessaloniki, Greece