



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ STRs ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ
ΑΜΦΙΣΒΗΤΟΥΜΕΝΗΣ ΠΑΤΡΟΤΗΤΑΣ / ΜΗΤΡΟΤΗΤΑΣ»**

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΑΡΟΥΓΚΑΣ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2020



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ STRs ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ
ΑΜΦΙΣΒΗΤΟΥΜΕΝΗΣ ΠΑΤΡΟΤΗΤΑΣ / ΜΗΤΡΟΤΗΤΑΣ»**

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΑΡΟΥΓΚΑΣ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2020



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΚΑΙ

Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»

ΤΜΗΜΑ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

**«ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ STRs ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ
ΑΜΦΙΣΒΗΤΟΥΜΕΝΗΣ ΠΑΤΡΟΤΗΤΑΣ / ΜΗΤΡΟΤΗΤΑΣ»**

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΑΡΟΥΓΚΑΣ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Ε. Λιανίδου, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας - Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ: Ψαρρά Κατερίνα, Χημικός MSc-PhD, Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός».

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Ε. Λιανίδου, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας - Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Σκορίλας Ανδρέας, Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Κρούπης Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας και Μοριακής Διαγνωστικής, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΑΘΗΝΑ 2020

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας ιδρύθηκε στον Ευαγγελισμό το 1978 και είναι το πρώτο Εργαστήριο που λειτούργησε στον Ελλαδικό χώρο με αποκλειστικό αντικείμενο την Ανοσολογία.

Το 1985 εντάχθηκε στο ΕΣΥ και σήμερα βρίσκονται σε πλήρη ανάπτυξη, τα υποτμήματα ανοσοχημείας, ανοσοκυτταρολογίας, αυτοανοσίας, ιστοσυμβατότητας, ραδιοϊσοτόπων, μοριακής βιολογίας και το ιατρείο καταγραφής και εργαστηριακής παρακολούθησης ασθενών με πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες.

Το Τμήμα ορίσθηκε το 1985, από το Υπουργείο Υγείας και Πρόνοιας ως κέντρο Αναφοράς κυτταρικής ανοσίας περιπτώσεων Συνδρόμου Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (AIDS) και το 1991 ορίσθηκε ως Κέντρο Αναφοράς Ανοσογενετικής Μελέτης Νοσημάτων.

Από το 1999 (με απόφαση του ΚΕΣΥ) και το 2007 (ΦΕΚ 877/2007), ορίσθηκε ως Ειδικό Κέντρο καταγραφής και παρακολούθησης Πρωτοπαθών Ανοσοανεπαρκειών Ενηλίκων.

Από το 1990, το Εργαστήριο Ιστοσυμβατότητας ανέλαβε την ευθύνη προμεταμοσχευτικού και μεταμοσχευτικού ελέγχου στα πλαίσια του προγράμματος μεταμοσχεύσεων μυελού των οστών, νεφρού, καρδιάς, ήπατος και παγκρέατος των μεταμοσχευτικών μονάδων του Νοσοκομείου «Ο Ευαγγελισμός», αλλά και άλλων Νοσοκομείων. Επίσης, το 1998 έλαβε διαπίστευση καλής λειτουργίας (accreditation) από την EFI (European Federation of Immunogenetics), η οποία και ανανεώνεται κάθε χρόνο (μετά από έλεγχο).

Το Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας εκπαιδεύει ιατρούς και άλλους επιστήμονες. Καλύπτει την εκπαίδευση στην Ανοσολογία στα πλαίσια της ειδικότητας της Ιατρικής Βιοπαθολογίας, της Ρευματολογίας, της Αιματολογίας και της Αλλεργιολογίας. Επίσης δέχεται ως μετεκπαιδευόμενους, σε εξειδικευμένα θέματα, επιστήμονες από άλλα Νοσηλευτικά Ιδρύματα της Χώρας και του εξωτερικού.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με θέμα «Αξιολόγηση των STRs μεταλλάξεων στον έλεγχο αμφισβητούμενης πατρότητας/μητρότητας» πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης του Τμήματος Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός».

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Λιανίδου Εύη, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας - Κλινικής Χημείας, η οποία μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Ακόμη, την ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τις ευκαιρίες που μου πρόσφερε και τις γνώσεις τις οποίες με βοήθησε να αποκτήσω, καθώς και για τις ουσιαστικές διορθώσεις κατά τη συγγραφή της παρούσας μελέτης.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Ψαρρά Κατερίνα, Χημικό MSc-PhD του Τμήματος Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός», η οποία δέχθηκε να είναι συνεπιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και για τη συνεργασία μας στα πλαίσια πραγματοποίησής της.

Θέλω επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της Εξεταστικής μου Επιτροπής, κύριο Σκορίλα Ανδρέα και κύριο Κρούπη Χρήστο για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην εξέτασή μου και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στην κυρία Κουνιάκη Διαμάντω, Βιολόγο PhD στο Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός», η οποία στάθηκε σημαντικός αρωγός στην προσπάθειά μου και με καθοδήγησε στην εκπόνηση των πειραμάτων της παρούσας εργασίας. Η άψογη συνεργασία μαζί της και η βοήθειά της ήταν καθοριστικά για τη διεκπεραίωση της διπλωματικής μου εργασίας. Την ευχαριστώ για τις γνώσεις, τις συμβουλές, τις πειραματικές ιδέες και γενικότερα τις προτροπές που μου προσέφερε καθ' όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Τσιρογιάννη Αλεξάνδρα MD PhD, Συντονίστρια Διευθύντρια του Τμήματος Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός», που δέχθηκε να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία στο Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός». Την ευχαριστώ για την

ευγενική της προσφορά και τη στήριξή της, καθοριστική για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου τα οποία αποτέλεσαν πολύτιμους συνεργάτες και ο καθένας βοήθησε τόσο σε πειραματικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο, κατά το χρονικό διάστημα που βρισκόμουν στο εργαστήριο. Όλοι τους συνέβαλαν στο να νιώσω άνετα και οικεία από τις πρώτες κιόλας μέρες που βρέθηκα στο εργαστήριο.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου και τις αδερφές μου, οι οποίοι είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	4
ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ – ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	7
SHORT TANDEM REPEATS (STRs)	7
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
2.2 STRs ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΤΟΠΟΙ	8
2.2.1 Γενικά.....	8
2.2.2 Εξέλιξη και μοντέλα μετάλλαξης	9
2.2.3 Μηχανισμοί μετάλλαξης και επιδιόρθωσης του DNA	11
2.2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν το ποσοστό των μεταλλάξεων	14
2.2.5 Βάσεις δεδομένων γενετικών δεικτών STRs	15
2.2.6 STRs γενετικοί δείκτες και ασθένειες.....	16
2.2.7 Εφαρμογές των STRs γενετικών τόπων	19
2.2.8 Ανάλυση των STRs γενετικών τόπων	20
2.2.9 Περιορισμοί ανάλυσης των STRs γενετικών τόπων.....	20
2.3 ΑΛΛΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	25
ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	25
3.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΜΟΝΑΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΑΠΟΤΥΠΩΜΑΤΟΣ.....	25
3.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΜΦΙΣΒΗΤΟΥΜΕΝΗΣ ΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ	26
3.2.1 Αποκλεισμός γονικότητας	27
3.2.2 Μη αποκλεισμός γονικότητας.....	28
3.2.2.1 Απουσία γενετικού προφίλ του βιολογικού πατέρα ή της βιολογικής μητέρας	31
3.2.2.2 Πιθανή μετάλλαξη	31
3.2.2.3 Πιθανά σιωπηλά ή μη λειτουργικά αλλήλια (<i>silent ή null αλλήλια</i>) ...	32
3.2.2.4 Ύπαρξη συγγένειας μεταξύ των εμπλεκόμενων ατόμων.....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	35
ΣΚΟΠΟΣ	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	36
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	36
5.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ	36
5.2 Εργαστηριακοί παράμετροι – Μέθοδοι που μελετήθηκαν	36

5.3 Στατιστική ανάλυση.....	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	39
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ.....	39
(Γενικές αρχές τεχνικών – Περιγραφή - Αντιδραστήρια)	39
6.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	40
6.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA (GENOMIC-DNA, G-DNA)	42
6.2.1 Απομόνωση g-DNA περιφερικού αίματος με τη χρήση Maxwell® 16 Blood DNA Purification kit	42
6.2.1.1 Maxwell® 16 MDx Instrument (Cat. # AS3000)	42
6.2.1.2 Αρχή της μεθόδου	43
6.2.1.3 Τεχνική.....	44
6.2.2 Απομόνωση g-DNA παρειικού επιχρίσματος (buccal swabs) με τη χρήση του Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA kit	47
6.2.2.1 Αρχή μεθόδου	47
6.2.2.2 Τεχνική.....	50
6.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ g-DNA	51
6.4 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ g-DNA ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR).....	51
6.4.1 Ιστορική ανασκόπηση.....	51
6.4.2 Multiplex-PCR (Edwards και Gibbs 1994)	53
6.4.2.1 Βασικές αρχές multiplex-PCR.....	53
6.4.3 Ενίσχυση των γενετικών τύπων STRs μέσω του AmpFlSTR® NGM SSelect™ PCR kit	54
6.4.3.1 Εισαγωγή.....	54
6.4.3.2 Καθορισμός φύλου	56
6.4.4.3 Πρωτόκολλο εργασίας	57
6.5 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΓΡΑΜΜΙΚΩΝ ΘΡΑΥΣΜΑΤΩΝ DNA ΜΕΣΩ ΤΡΙΧΟΕΙΔΙΚΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ (CE) ΣΤΟΝ ABI 3130 ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΑΝΑΛΥΤΗ ΤΗΣ APPLIED BIOSYSTEMS.....	61
6.5.1 Αρχή μεθόδου	62
6.5.2 Πρωτόκολλο εργασίας	64
6.5.3 Ανάλυση των πρωτογενών δεδομένων	64
6.5.4 Αξιολόγηση των δειγμάτων	65
6.5.4.1 Λογισμικά προγράμματα STR γονοτύπησης.....	65
6.5.5 Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	68
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	68
7.1 ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ	70

7.2 ΜΗ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	72
7.3 ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΙΚΩΝ ΑΝΟΜΟΙΟΤΗΤΩΝ ΛΟΓΩ aSTR ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΕ ΔΕΚΑΠΕΝΤΕ (15) ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΜΗ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ.....	73
7.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ 15 ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΑΝ ΑΛΛΗΛΙΚΕΣ ΑΝΟΜΟΙΟΤΗΤΕΣ ΣΕ DUO MOTHERLESS	78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	86
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	86
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	96
ABSTRACT	97
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	98

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AABB (American Association of Blood Banks)	Αμερικάνικος Σύνδεσμος Τραπεζών Αίματος
AL (Allelic Ladder)	Πρότυπες κλίμακες μεγέθους - Τεχνητό μείγμα των κοινών αλληλίων που υπάρχουν στον ανθρώπινο πληθυσμό για ένα συγκεκριμένο δείκτη STR
AF (Alleged Father)	«Φερόμενος» ως πατέρας (ΦΠ)
AM (Alleged Mother)	«Φερόμενη» ως μητέρα (ΦΜ)
AP (Alleged Parent)	«Φερόμενος» ως γονέας (ΦΓ)
CPI (Combined Parentage Index)	Συνδυασμένος δείκτης γονικότητας
DL (Linkage disequilibrium)	Ανισορροπία γενετικής σύνδεσης
FSS (Forensic Science Service)	Ιατροδικαστική Υπηρεσία Ηνωμένου Βασιλείου
HLA (Human Leukocyte Antigens)	Ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα HLA
IAM (Infinite Alleles Model)	Μοντέλο των άπειρων αλληλίων
ISFG (International Society for Forensic Genetics)	Διεθνής Εταιρεία Ιατροδικαστικής Γενετικής
LR (Likelihood Ratio)	Λόγος των πιθανοτήτων
MEC (Mean Exclusion Chance)	Μέση πιθανότητα αποκλεισμού
MMM (Multistep Mutation Model)	Μοντέλο πολλαπλών μεταλλάξεων
MMR (Mismatch Repair)	Επιδιορθωτικός μηχανισμός αταίριαστων ζευγών βάσεων
mtDNA (mitochondrial DNA)	Μιτοχονδριακό DNA
NIST (National Institute of Standards and Technology)	Εθνικό Ινστιτούτο Προτύπων και Τεχνολογίας
PCR (Polymerase Chain Reaction)	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PE (Power of Exclusion)	Δείκτης αποκλεισμού
PI (Parentage Index)	Δείκτης γονικότητας
POA (Paternal Obligate Allele)	Υποχρεωτικής Πατρικής Προέλευσης Αλλήλιο (ΥΠΠΑ)
PPE (Probability of Paternity Exclusion)	Πιθανότητα αποκλεισμού πατρότητας
PTC (Paternity Testing Commission)	Επιτροπή πατρότητας
RMNE (Random Man Not Excluded)	Μη αποκλεισμός ενός τυχαία επιλεγμένου άσχετου άνδρα
SMM (Stepwise Mutation Model)	Μοντέλο σταδιακής μετάλλαξης

SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)	Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί
STRs (Short Tandem Repeats)	Μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες
aSTRs (autosomal Short Tandem Repeats)	Διαδοχικά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες αυτοσωμικού DNA
TPM (Two-Phase Mutation model)	Μοντέλο δύο σταδίων
VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats)	Διαδοχικά διατεταγμένες επαναλαμβανόμενες DNA αλληλουχίες
W (Probability/Plausibility of Parentage)	Πιθανότητα ή αληθοφάνεια πατρότητας

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ – ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η σύγχρονη επιστήμη αρχίζοντας από την Αιμοδοσία (ομάδες αίματος) και φτάνοντας στη μοριακή βιολογία (DNA), έχει προσφέρει πολλά στην επίλυση προβλημάτων αμφισβητούμενης πατρότητας (paternity test) ή αμφισβητούμενης μητρότητας (maternity testing), τα οποία αποφαινόμενοι για τη γενετική σχέση ενός άνδρα ή μιας γυναίκας με ένα άλλο άτομο αντίστοιχα. Τα γενετικά συστήματα και οι εργαστηριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι οι ίδιες σε όλες τις περιπτώσεις. Στο παρελθόν, οι εφαρμοζόμενες τεχνικές αφορούσαν κυρίως ανοσοαιματολογικές τεχνικές καθορισμού αντιγονικών συστημάτων τόσο των έμμορφων στοιχείων του αίματος, ερυθρών αιμοσφαιρίων (ομάδες αίματος και λοιπά ερυθροκυτταρικά αντιγόνα), όσο και των πρωτεϊνών του ορού [1,2,3,4]. Όμως, ακόμα και με το συνδυασμό όλων αυτών των γενετικών συστημάτων ο αποκλεισμός ενός πιθανού γονέα δεν ξεπερνούσε το 40-50%, ενώ επί μη αποκλεισμού η πιθανότητα γονικότητας με βάση τη συχνότητα των παραπάνω αντιγόνων στην Καυκάσια φυλή ανέρχονταν σε 70-75%.

Αργότερα η ανακάλυψη των HLA αντιγόνων στην επιφάνεια των λευκών αιμοσφαιρίων συνέβαλε σημαντικά στον έλεγχο αμφισβητούμενης γονικότητας. Κληρονομούνται σύμφωνα με τους νόμους του Mendel. Η απουσία στο παιδί π.χ. ενός αντιγόνου που δεν υπάρχει στον «υπό έλεγχο γονέα» υποδηλώνει αποκλεισμό γονικότητας. Με τα HLA αντιγόνα το ποσοστό αποκλεισμού του φερόμενου ως γονέα ανήλθε στο 80%, αλλά και η πιθανολόγηση γονικότητας (επί μη αποκλεισμού) άγγιζε το 99,99% σε κάποιες εκ των περιπτώσεων.

Τέλος, η ανακάλυψη και εφαρμογή των μοριακών τεχνικών ή τεχνικών ανασυνδυασμένου DNA άνοιξε νέους ορίζοντες στον έλεγχο γονικότητας και στην Ιατροδικαστική γενικότερα. Για πρώτη φορά εισάγεται ο όρος DNA αποτύπωμα (DNA fingerprinting) ή DNA γενετικός τύπος (DNA profiling) ή DNA testing [5]. Σήμερα, για την ανάλυση του προφίλ του γενωμικού DNA (g-DNA) χρησιμοποιούνται πολύμορφοι γενετικοί τόποι. Οι πολυμορφισμοί, οι οποίοι προσφέρουν τις

περισσότερες πληροφορίες και είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι στην ιατροδικαστική, εντοπίζονται στους υπερ-μεταβλητούς γενετικούς τόπους (*hyper variable loci*).

Το πρώτο DNA αποτύπωμα περιγράφηκε από τον Alec Jeffreys et al., το 1985 στο Πανεπιστήμιο του Leicester στην Αγγλία. Παρατήρησαν ότι ορισμένες περιοχές του ανθρωπίνου γονιδιώματος περιέχουν διαδοχικά διατεταγμένες επαναλαμβανόμενες DNA αλληλουχίες που ονομάζονται **VNTRs** (*Variable Number of Tandem Repeats*) ή **minisatellites** [6]. Αρχικά οι Jeffreys et al., στην ανάλυση των VNTRs γενετικών τόπων εφάρμοσαν τη γνωστή μέθοδο **RFLPs** (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), κάνοντας χρήση περιοριστικών ενζύμων (*restriction enzymes*). Το συνολικό μήκος τους κυμαίνεται από μερικές εκατοντάδες έως μερικές χιλιάδες ζεύγη βάσεων (*base pairs-bp*), ενώ ο αριθμός των αλληλομόρφων ενός γενετικού τόπου στον ανθρώπινο πληθυσμό ποικίλλει (συνήθως από 15 έως 70). Η ανάλυση του ανθρωπίνου g-DNA ως προς τα αλληλόμορφα των γενετικών τόπων VNTRs ονομάστηκε με τον όρο «**γενετικό αποτύπωμα**». Η μέθοδος αυτή, αν και επιτυχής, απαιτούσε μία σχετικά μεγάλη ποσότητα DNA και τα αποτελέσματα ήταν περισσότερο αξιόπιστα, εφόσον τα συγκρινόμενα δείγματα έτρεχαν παράλληλα στο ίδιο πήκτωμα αγαρόζης. Επομένως, δεν ήταν δυνατόν να εφαρμοστεί σε δείγματα DNA από τρίχες ή κηλίδες αίματος, λόγω ανεπαρκούς ποσότητας γενετικού υλικού. Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για την ταυτοποίηση ενός υπόπτου για εγκληματική ενέργεια το 1986 στην Αγγλία, αλλά πληρούσε ταυτόχρονα και όλες τις προϋποθέσεις προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις ελέγχου αμφισβητούμενης πατρότητας/μητρότητας.

Η ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (**Polymerase Chain Reaction, PCR**) και η ευρεία εφαρμογή της στα Εργαστήρια Μοριακής Βιολογίας λίγα χρόνια αργότερα, προσέφερε μία εναλλακτική μέθοδο για την μελέτη του DNA αποτυπώματος, ακόμα και όταν η διαθέσιμη ποσότητα DNA ήταν ελάχιστη ή μερικώς αποδομημένη. Η σύγχρονη προσέγγιση του DNA αποτυπώματος γίνεται χρησιμοποιώντας επαναλαμβανόμενες DNA αλληλουχίες μεγέθους 2-6 bp που ονομάζονται **STRs** (*Short Tandem Repeats*) ή **microsatellites** και περιγράφηκαν για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1990. Λόγω του μικρότερου μεγέθους τους, η γονοτύπησή τους είναι εφικτή με εφαρμογή της PCR τεχνικής και θεωρούνται καλύτεροι γενετικοί δείκτες από τα VNTRs. Είναι αυτοί που χρησιμοποιούνται κυρίως σήμερα στον έλεγχο αμφισβητούμενης πατρότητας/μητρότητας [7]. Η ανάλυση στηρίζεται στη βιολογική μοναδικότητα των ατόμων (εξάιρεση αποτελούν οι ομοζυγωτικοί δίδυμοι) και στην πολυμορφικότητα των υπό εξέταση γενετικών

περιοχών. Η πολυμορφικότητά τους οφείλεται στον διαφορετικό αριθμό επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων που παρουσιάζουν οι συγκεκριμένες ακολουθίες STRs στα διάφορα άτομα. Δεδομένου ότι ο πολυμορφισμός των STRs είναι σχετικά μικρός, η «ισχύς» της STR ανάλυσης προκύπτει από την ταυτόχρονη μελέτη πολλαπλών STRs γενετικών τόπων.

Την τελευταία δεκαετία έχει αρχίσει να εφαρμόζεται σε ερευνητικό επίπεδο η χρήση των γενετικών δεικτών **SNPs** (*Single Nucleotide Polymorphisms*) στον έλεγχο αμφισβητούμενης γονικότητας [8]. Οι SNPs πολυμορφισμοί είναι οι συνηθέστερες παραλλαγές που συναντώνται στο ανθρώπινο γονιδίωμα και πρακτικά αποτελούν ανεξάντλητη πηγή γενετικών δεικτών. Η δυνατότητα εφαρμογής τους σε περιπτώσεις αποδομημένου DNA, αλλά και το μικρό ποσοστό μεταλλάξεων που εμφανίζεται σε αυτούς τους γενετικούς δείκτες, σε σχέση με τους STRs, τους καθιστά ένα πολύτιμο εργαλείο στον έλεγχο γονικότητας [9].

Παράλληλα, πολυάριθμες είναι οι μελέτες στις οποίες εξετάζεται το **μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)** ως γενετικό υλικό στον έλεγχο αμφισβητούμενης μητρότητας, δεδομένου ότι στον άνθρωπο το mtDNA κληρονομείται μόνο από τη μητέρα στα παιδιά [10]. Το μιτοχονδριακό χρωμόσωμα συμπεριφέρεται όπως μία ομάδα σύνδεσης, δηλαδή όλοι οι γενετικοί του τύποι κληρονομούνται ως μια μονάδα. Ο προσδιορισμός του γίνεται με ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (*sequencing*) μίας ή περισσότερων υπερμεταβλητών περιοχών του (HVR1 ή HVR2), μέθοδος χρονοβόρα και ιδιαίτερα πολύπλοκη. Ως γνωστό, το mtDNA μπορεί να επιβιώσει πολύ περισσότερο σε σύγκριση με το αυτοσωμικό γι' αυτό και χρησιμοποιείται ευρέως σε μελέτες αρχαϊκού DNA σε εξειδικευμένα πάντα εργαστήρια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

SHORT TANDEM REPEATS (STRs)

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αποτύπωση δακτυλικών αποτυπωμάτων DNA ή η τυποποίηση του γενετικού προφίλ DNA ενός ατόμου περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Jeffreys et al. [11], οι οποίοι διαπίστωσαν ότι ορισμένες περιοχές του DNA περιείχαν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA. Αυτές οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες απαντώνται σε όλους τους τύπους μεγεθών και στο σύνολό τους αναφέρονται ως ένας μεταβλητός αριθμός διαδοχικά διατεταγμένων επαναλαμβανόμενων DNA αλληλουχιών (VNTRs). Συνήθως, χαρακτηρίζονται από το μήκος της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας τους και τον αριθμό των συνεχόμενων επαναλήψεων της [12].

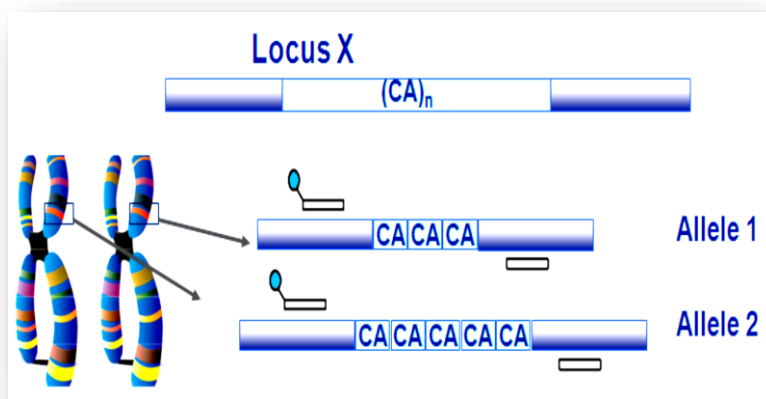
Τα τελευταία χρόνια η ανάγκη για μεγαλύτερη πιθανολόγηση γονικότητας οδήγησε στην μελέτη των υπερμεταβλητών γενετικών τόπων **Short Tandem Repeats (STRs)**, γνωστοί και ως **microsatellites** ή **Simple Sequence Repeats (SSRs)**. Είναι διάσπαρτοι σε όλο το γονιδίωμα [13,14] και το μικρό μέγεθος των αλληλομόρφων τους σε σύγκριση με τους VNTRs που χρησιμοποιήθηκαν από τους Jeffreys et al. [15], τους καθιστά καλύτερους σε ελέγχους εγκληματολογικών υποθέσεων και ελέγχου γονικότητας [16]. Εντοπίστηκαν για πρώτη φορά στα ευκαρυωτικά γονιδιώματα σχεδόν τριάντα χρόνια πριν. Πρόκειται για διαδοχικά επαναλαμβανόμενα μοτίβα αλληλουχιών μεταβλητού μήκους που κατανέμονται σε όλο το πυρηνικό ευκαρυωτικό γονιδίωμα [17] και έχουν παραμείνει σχετικά ανέπαφες σε όλη την διάρκεια της εξέλιξης του ανθρωπίνου είδους. Η αρχική άποψη ότι αποτελούν απομεινάρια της εξέλιξης και δεν έχει καμία βιολογική χρησιμότητα, αλλά συμβάλει στην διατήρηση της δομής και της σταθερότητας των χρωμοσωμάτων αφενός και αφετέρου αποτελούν ένα πιθανό εξελικτικό *back up* με σκοπό την επιβίωση του είδους, μάλλον δεν φαίνεται πλέον να ευσταθεί. Νέες μελέτες δείχνουν ότι παίζει ένα σημαντικό ρόλο στον έλεγχο, στην ανάπτυξη αλλά και στη διαφοροποίηση των διαφόρων ατόμων.

2.2 STRs ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΤΟΠΟΙ

2.2.1 Γενικά

Οι STRs γενετικοί τόποι, είναι μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα ζεύγη 1-6 βάσεων (bp) και συνθέτουν περίπου το 3% του ανθρώπινου γονιδιώματος [18], διαμορφώνοντας γραμμικά θραύσματα μήκους μέχρι 300 νουκλεοτίδια (nt) (Εικόνα 2.1). Έχουν ευρέως βρεθεί τόσο στα προκαρυωτικά, όσο και τα ευκαρυωτικά γονιδιώματα, ενώ η κατανομή τους μέσα στα χρωμοσώματα δεν είναι εξίσου κατανομημένη και εμφανίζονται λιγότερο συχνά στις υποτελομερείς περιοχές.

Τα περισσότερα βρίσκονται μέσα σε μη κωδικοποιούσες περιοχές (*noncoding regions*), ενώ μόνο το 8% αυτών περίπου εντοπίζεται σε κωδικοποιούσες (*coding regions*) [19]. Η πυκνότητά τους ποικίλει ελαφρώς μεταξύ των χρωμοσωμάτων και στους ανθρώπους το χρωμόσωμα 19 διαθέτει την υψηλότερη πυκνότητα σε STRs, με τα ανθρώπινα χρωμοσώματα 21 και 22 να είναι πλούσια σε μονο- και τετρανουκλεοτιδικές επαναλήψεις. Τα περισσότερα κοινά STRs στον άνθρωπο είναι οι σε A πλούσιες επαναλαμβανόμενες μονάδες: A, AC, AAAN, AAN, AG. Κατά μέσο όρο ένα STR συμβαίνει ανά 2000 bp στο ανθρώπινο γονιδίωμα [20].



Εικόνα 2.1: Μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες των STRs γενετικών τόπων / κληρονομική μεταβίβαση.

Με βάση το διαφορετικό επαναλαμβανόμενο μοτίβο οι STRs γενετικοί τόποι μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε μονο-, δι-, τρι-, τετρα-, πεντα- και εξα-νουκλεοτιδικούς γενετικούς τόπους. Η ταξινόμησή τους γίνεται με βάση τόσο τον αριθμό των βάσεων, όσο και τον τύπο της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας σε: α)

τέλειες, όταν φέρει μόνο ολοκληρωμένες επαναλήψεις π.χ., (AT)₂₀ β) ατελής, όταν η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία διακόπτεται από διαφορετικά νουκλεοτίδια π.χ., (AT)₁₂ GC (AT)₈ και γ) σύνθετες, όταν υπάρχουν δύο ή περισσότερα διαφορετικά μοτίβα σε συνδυασμό, π.χ., (AT)₇ (GC)₆ με τις αλληλουχίες των δι-, τρι- και τετρανουκλεοτιδικών επαναλήψεων να είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες στις γενετικές μελέτες. Πέρα από τα κοινά αλλήλια των STRs γενετικών τόπων στον ανθρώπινο πληθυσμό, πολλές φορές παρατηρείται μία ποικιλομορφία στα μοτίβα των επαναλήψεων, τα οποία δεν φέρουν πλήρεις επαναλήψεις. Η ποικιλομορφία αυτή είναι αποτέλεσμα προσθήκης/ απαλοιφής (γεγονότων *Indels*) ή αντικατάστασης βάσεων και τα αλλήλια τα οποία προκύπτουν αναφέρονται ως **microvariants ή αλλήλια εκτός κλίμακας (“off-ladder” alleles)**, επειδή δεν ταιριάζουν στο μέγεθος των αντίστοιχων αλληλίων που περιέχονται στις πρότυπες κλίμακες μεγέθους (*Allelic Ladder, AL*). Ένα off-ladder αλλήλιο είναι το αλλήλιο το οποίο εντοπίζεται έξω από την αναμενόμενη περιοχή ($\pm 0,5$ nt) οποιουδήποτε γνωστού αλληλίου. Εντοπίζονται στους περισσότερους πολυμορφικούς γενετικούς τόπους, όπως τους FGA, D21S11, D18S51.

Όσον αφορά την ονοματολογία -για παράδειγμα στον STR γενετικό τόπο D3S1266- το πρόθεμα D αναφέρεται στο DNA, το νούμερο 3 στην χρωμοσωμική εντόπιση, το πρόθεμα S στην λέξη STR και το νούμερο 1266 ένας μοναδικός αναγνωρίσιμος αριθμός. Εάν εντοπίζονται σε ιντρόνια γονιδίων παίρνουν το όνομα του γονιδίου στο οποίο εμπεριέχονται.

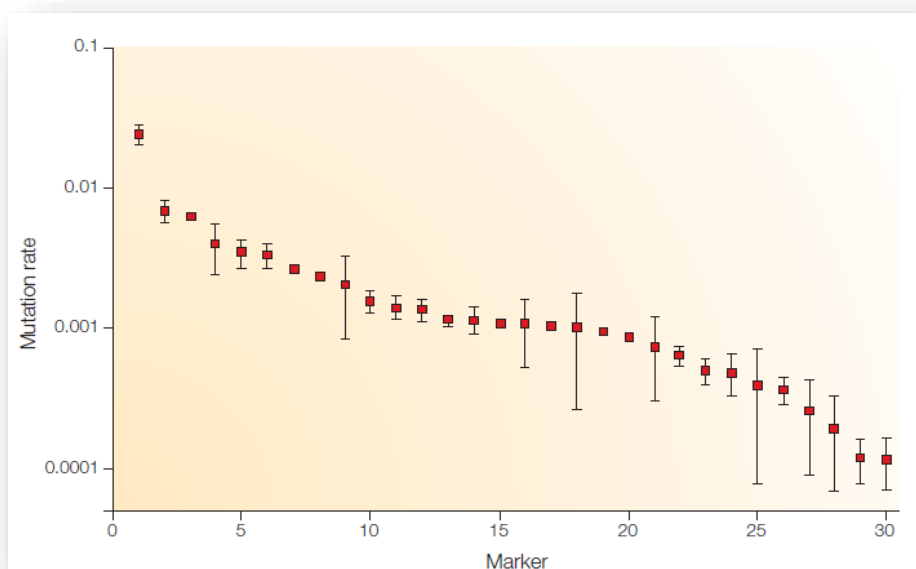
2.2.2 Εξέλιξη και μοντέλα μετάλλαξης

Το 1950, οι μεταλλάξεις στο ανθρώπινο γονιδίωμα πιστευόταν ότι ήταν ένα εξαιρετικά σπάνιο γεγονός. Μερικές δεκαετίες αργότερα, ανακαλύφθηκε ότι το RNA μπορούσε να μετατραπεί σε DNA μέσω της αντίστροφης μεταγραφής. Αυτή η πληροφορία άλλαξε τον τρόπο με τον οποίο σκέφτονταν έως τότε οι επιστήμονες: *το γονιδίωμά μας δεν είναι σταθερό αλλά δυναμικό*. Τις επόμενες δεκαετίες, αρκετοί επιστήμονες ταυτοποίησαν το γονιδίωμα με αρκετές αστάθειες [21]. Η ανακάλυψη ποικίλων μεταλλάξεων (τροποποιήσεις στην αλληλουχία και των δύο των βάσεων του DNA με συχνότητα $<1\%$ στο γενικό πληθυσμό) ή πολυμορφισμών (κοινές γενετικές παραλλαγές με συχνότητα $>1\%$ στο γενικό πληθυσμό), όπως ένας μεταβλητός αριθμός διαδοχικά διατεταγμένων επαναλαμβανόμενων DNA αλληλουχιών (VNTRs), επαναλαμβανόμενες DNA αλληλουχίες (STRs), νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί, προσθήκες / διαγραφές (INDELs) και παραλλαγές του αριθμού επαναλαμβανόμενων

αλληλουχιών (CNVs) έχουν συμβάλει στην αναγνώριση περιοχών (ή σχετικών με αυτές τις περιοχές γονιδίων) ή γονιδίων που σχετίζονται με διάφορες ασθένειες

Βέβαια, οι STR αλληλουχίες λόγω της φυσικής επαναληψιμότητάς τους οδηγούν σε γεγονότα ολίσθησης κατά τη διάρκεια της αντιγραφής ή κατά την επιδιόρθωση βλαβών του DNA. Πρόκειται για ένα είδος μετάλλαξης που οδηγεί είτε σε επέκταση, είτε σε μείωση του αριθμού των επαναλήψεων κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA [22]. Παρουσιάζουν υψηλότερο ρυθμό μετάλλαξης από άλλους τύπους γενετικών τροποποιήσεων [23]. Το ποσοστό μετάλλαξης στο ανθρώπινο γονιδίωμα κυμαίνεται από 10^{-6} έως 10^{-2} nt ανά γενεά [24]. Συμβάλλουν με αυτό τον τρόπο σε μεγάλο βαθμό στην αύξηση του δυναμικού εύρους των γενετικών παραλλαγών στον άνθρωπο.

Ο Αμερικάνικος Σύνδεσμος Τραπεζών Αίματος (*American Association of Blood Banks, AABB*), έχει δημοσιεύσει στοιχεία τα οποία προέρχονται από διάφορα εργαστήρια ελέγχου αμφισβητούμενης γονικότητας σχετικά με τα ποσοστά εμφάνισης μεταλλάξεων στους διάφορους γενετικούς τόπους STRs [25] (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2: Ποσοστά μετάλλαξης των μικροδορυφορικών γενετικών τόπων στο ανθρώπινο γονιδίωμα μετά από γενεαλογικές αναλύσεις (λογαριθμική κλίμακα, με 95% διαστήματα εμπιστοσύνης). Οι δείκτες δίνονται με την ακόλουθη σειρά: D10S1214, D12S1090, ACTBP2, D19S253, D9S302, D3S1744, FGA, vWA, D22S683, D18S51, D8S1179, D21S11, Cyp19, D3S1358, CSF1P0, D18S849, D13S317, D17S5, D5S818, D7S820, Penta E, D16S539, FESFPS, F13A01, LIPOL, D1S80, F13B, D2S1338, TH01, TPOX σύμφωνα με την αναφορά της AABB (<http://www.aabb.org/sa/facilities/Pages/relationshipreports.aspx>).

Η γνώση μας σχετικά με τις μεταλλάξεις και την εξελικτική δυναμική αυτών εξακολουθεί να είναι ελλιπής. Κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα όσον αφορά την εξελικτική δυναμική των STRs γενετικών τόπων, μεταξύ των οποίων τα επικρατέστερα είναι:

A. Το μοντέλο των *άπειρων αλληλίων* (*Infinite Alleles Model, IAM*): Οι Kimura and Crow έχουν προτείνει αυτό το μοντέλο το 1964 [26] βασισμένο στην παραδοχή ότι, κάθε νέα μετάλλαξη παράγει ένα νέο αλληλόμορφο και όλες οι μεταλλάξεις είναι ίσης πιθανότητας να συμβούν. Ως εκ τούτου, μπορεί να περιλαμβάνει οποιοδήποτε αριθμό επαναλήψεων και να οδηγεί πάντα σε ένα νέο αλληλόμορφο, το οποίο δεν εντοπίζεται στον υπάρχοντα πληθυσμό.

B. Το μοντέλο *σταδιακής μετάλλαξης* (*Stepwise Mutation Model, SMM*): Το μοντέλο αυτό αναπτύχθηκε από τους Ota και Kimura το 1973 [27], για να εξηγήσει τις ακόλουθες μεταλλάξεις: α) μικρές αλλαγές στον αριθμό της επανάληψης β) ίσες πιθανότητες αύξησης ή μείωσης του αριθμού των επαναλήψεων γ) απερίοριστο μέγεθος των αλληλομόρφων. Το SMM μοντέλο συνάδει με τον μηχανισμό ολίσθησης του αντιγραφόμενου κλώνου και σήμερα είναι αποδεκτός ως ο κύριος μηχανισμός πρόκλησης των STRs μεταλλάξεων. Σε αυτό το μοντέλο, τα αλληλία μπορεί να μεταλλαχθούν με συνέπεια την αύξηση ή τη μείωση του αριθμού των επαναλαμβανόμενων μονάδων πέραν της μίας. Η προσθήκη ή η απώλεια μίας επαναλαμβανόμενης μονάδας ονομάζεται μετάλλαξη ενός σταδίου (*Single-Step, SMM*), ενώ η προσθήκη ή η απώλεια περισσότερων της μίας επαναλαμβανόμενων μονάδων ονομάζεται μοντέλο δύο σταδίων (*Two-Phase Mutation model, TPM*), ή μοντέλο πολλαπλών μεταλλάξεων (*Multistep Mutation Model, MMM*). Αρκετές είναι οι μελέτες που έχουν δείξει ότι, όσο πιο πολύπλοκη είναι η επαναλαμβανόμενη δομή, τόσο μικρότερη είναι η πιθανότητα να συμβούν γεγονότα μεταλλαγής [28].

2.2.3 Μηχανισμοί μετάλλαξης και επιδιόρθωσης του DNA

Παρόλο που οι STRs γενετικοί τόποι ανακαλύφθηκαν στο ευκαρυωτικό DNA στις αρχές του 1970, ο μηχανισμός πρόκλησης μεταλλάξεων παραμένει ελάχιστα κατανοητός. Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί τρεις πιθανοί μηχανισμοί: 1. το άνισο crossing over κατά την διάρκεια της μείωσης, 2. ο μηχανισμός ρετρομετάθεσης και 3. η ολίσθηση του αντιγραφόμενου κλώνου κατά την διάρκεια της αντιγραφής. Μεταξύ αυτών των μηχανισμών ο τρίτος θεωρείται ο επικρατέστερος.

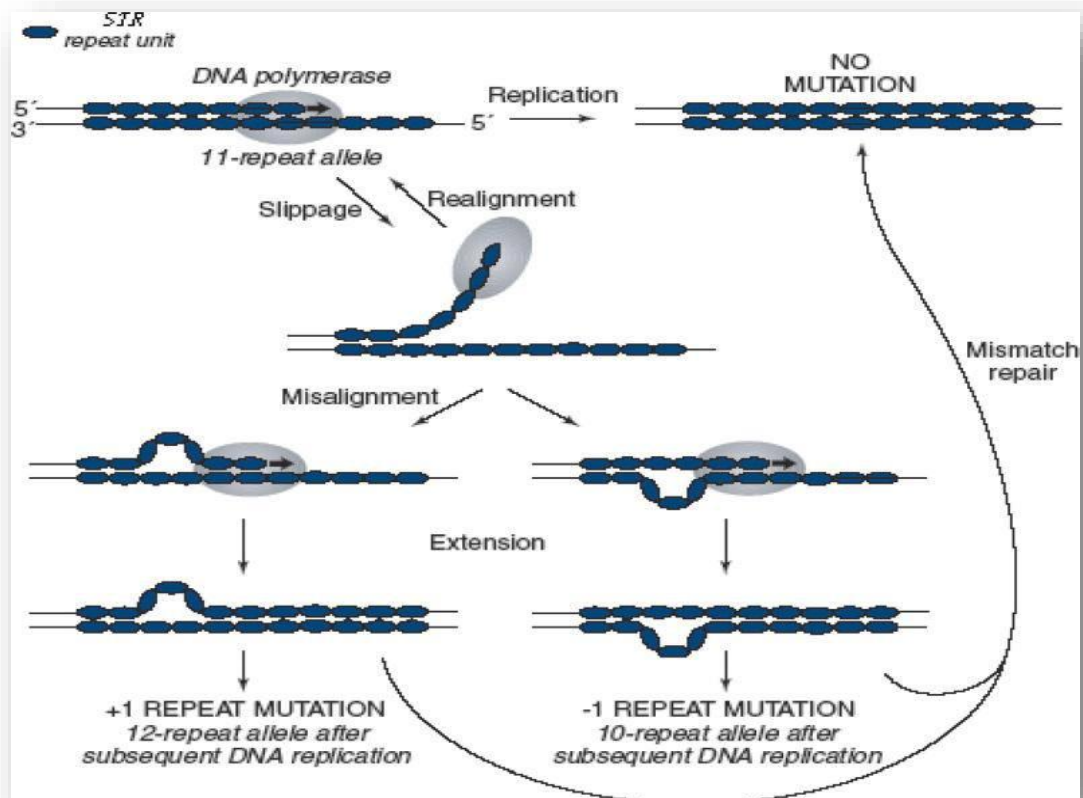
A. άνισο crossing over κατά την διάρκεια της μείωσης (*unequal crossing over*-γενετικός ανασυνδυασμός): ο μηχανισμός αυτός είναι καλά μελετημένος και γεννά μεγάλα τμήματα από satellite DNA. Αφορά την ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των ομολόγων χρωμοσωμάτων και μπορεί να θεωρηθεί υπεύθυνος για την δημιουργία STR multistep μεταλλάξεων [29].

B. μηχανισμός ρετρομετάθεσης (retrotransposition): ο μηχανισμός αυτός υποστηρίζει ότι περιοχές STRs πλούσιες σε A γεννούνται από μία 3' επέκταση ρετρομετάθεσης, παρόμοια με αυτή της πολυαδενυλίωσης του mRNA [30]. Απαιτούνται όμως περαιτέρω μελέτες για την αποσαφήνιση αυτής της θεωρίας.

Γ. μηχανισμός της ολίσθησης του αντιγραφόμενου κλώνου DNA (replication slippage ή DNA slippage) κατά την διάρκεια της αντιγραφής: το μοντέλο αυτό προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Kornberg et al. το 1964. Σήμερα φαίνεται ότι είναι ευρέως αποδεκτό ως η κύρια εξήγηση της δημιουργίας των STR μεταλλάξεων [17]. Η κακή ευθυγράμμιση που προκαλεί τις μεταλλάξεις συμβαίνει μεταξύ του νεοσυντιθέμενου κλώνου DNA και του συμπληρωματικού κλώνου εκμαγείου (*template*) κατά την διάρκεια της αντιγραφής. Οι δύο αλυσίδες διίστανται και επαναϋβριδοποιούνται λανθασμένα, σχηματίζοντας βρόγχο (*loop*), ο οποίος είναι σταθερός λόγω της επαναλαμβανόμενης φύσης της ακολουθίας του DNA. Εάν η σύνθεση του DNA συνεχιστεί, τότε ο επαναλαμβανόμενος αριθμός των STRs μεταβάλλεται (Σχήμα 2.3). Στην περίπτωση όπου ο βρόγχος σχηματίζεται στον νεοσυντιθέμενο κλώνο, τότε θα προκύψει μετάλλαξη με αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων, ενώ βρόχοι στον συμπληρωματικό κλώνο εκμαγείο, θα οδηγήσουν σε μείωση του αριθμού τους [31]. Ωστόσο, ο αριθμός των περιστατικών ολίσθησης δεν είναι ο ίδιος με το ποσοστό των μεταλλάξεων όπου παρατηρούνται. Πειράματα *in vitro* έχουν δείξει ότι η DNA ολίσθηση συμβαίνει σε πολύ μεγάλο ποσοστό, αλλά *in vivo* τα περισσότερα DNA loops αναγνωρίζονται και εξαλείφονται από τα επιδιορθωτικά ένζυμα-εξωνουκλεάσες του κυττάρου (*exonuclease proofreading*) και του επιδιορθωτικού μηχανισμού αταίριαστων ζευγών βάσεων του κυττάρου (**Mismatch Repair, MMR**). Αποτυχία του MMR συστήματος κατά τη διάρκεια της αντιγραφής οδηγεί σε αύξηση της μικροδορυφορικής αστάθειας (10^{-3}) και οι κωδικές περιοχές που περιέχουν τυχαίες επαναλήψεις γίνονται επιρρεπείς σε μεταλλάξεις, όπως συμβαίνει στους καρκινικούς ιστούς.

Μεταλλάξεις παρατηρούνται τόσο στα σωματικά όσο και στα γαμετικά κύτταρα. Οι STR μεταλλάξεις που συμβαίνουν στα σωματικά κύτταρα δεν κληρονομούνται,

διότι *in vivo* τα περισσότερα DNA loops αναγνωρίζονται και εξαλείφονται από τον επιδιορθωτικό μηχανισμό του κυττάρου. Αντίθετα σωματικές μεταλλάξεις (*somatic mutation*) που λαμβάνουν χώρα στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση *triallelic pattern* στο παιδί, κατά το οποίο δύο τύποι κυττάρων με διαφορετικούς γονοτύπους μπορεί να συνυπάρχουν και διαπιστώνονται με την παρουσία τριών κορυφών στο ηλεκτροφόρημα των υπό έλεγχο γενετικών τόπων. Οι μεταλλάξεις που θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη είναι αυτές που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της τελευταίας μείωσης στα γαμετικά κύτταρα και οι οποίες μεταβιβάζονται στους απογόνους, χωρίς όμως να εμφανίζονται στους γονείς. Αυτές χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων διερεύνησης συγγένειας μεταξύ δύο ή περισσότερων ατόμων.



Σχήμα 2.3: Μηχανισμός ολίσθησης του αντιγραφόμενου κλώνου DNA (*replication slippage* ή *DNA slippage*).

2.2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν το ποσοστό των μεταλλάξεων

Τα ποσοστά μετάλλαξης διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των διαφόρων γενετικών τόπων STR και των αλληλομόρφων τους, και τα οποία επηρεάζονται από το μήκος, τον αριθμό και τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων των επαναλαμβανόμενων μονάδων, τις διακοπές εντός του μοτίβου, το μήκος και τις πλευρικές αλληλουχίες του μοτίβου. Συγκεκριμένα:

1. το μήκος του μοτίβου: ένας αρνητικός συσχετισμός έχει προταθεί μεταξύ του μήκους της επαναλαμβανόμενης μονάδας και του ποσοστού ολίσθησης από τους Kruglyak et al, οι οποίοι έχουν δείξει ότι το ποσοστό ολίσθησης είναι υψηλότερο στα δινουκλεοτίδια STR και χαμηλότερο στα τετρανουκλεοτίδια. Τα μικρού μήκους μοτίβα επιτρέπουν περισσότερες ευκαιρίες για κακή ευθυγράμμιση, ενώ μεγαλύτερα μοτίβα απαιτούν υψηλότερη ενέργεια αποχωρισμού των συμπληρωματικών κλώνων και άρα μικρότερη πιθανότητα σχηματισμού ενός σταθερού βρόγχου [28].

2. ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μονάδων: γενεαλογικές μελέτες διαφορετικών πληθυσμιακών ομάδων έχουν δείξει ότι το ποσοστό των μεταλλάξεων αυξάνεται αυξανόμενου του αριθμού των επαναλήψεων. Περισσότερες επαναλαμβανόμενες μονάδες, περισσότερες και οι ευκαιρίες για ολίσθηση κατά την διάρκεια της αντιγραφής. Παράλληλα όμως, γενετικοί τόποι με πολλές επαναλήψεις είναι και οι περισσότερο πολυμορφικοί, γι' αυτό και προτιμώνται στην δημιουργία ενός γενετικού προφίλ [28].

3. η σύνθεση της επαναλαμβανόμενης μονάδας: ακολουθίες με υψηλή περιεκτικότητα σε AT μεταλλάσσονται ταχύτερα από εκείνες με υψηλή περιεκτικότητα σε GC [32], γεγονός που υποδηλώνει ότι η σταθερότητα θα μπορούσε να επηρεάσει την συχνότητα των μεταλλάξεων μειώνοντας τη συχνότητα ολίσθησης του αντιγραφόμενου κλώνου.

4. οι διακοπές: τα επαναλαμβανόμενα μοτίβα έχουν αυξημένη την τάση να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές όπως φουρκέτες, τετραπλές δομές, H-DNA δομές που αυξάνουν την πιθανότητα κακής ευθυγράμμισης με την επακόλουθη ολίσθηση της DNA πολυμεράσης. Σημειακές μεταλλάξεις ή άλλες διακοπές εντός του πλαισίου της επανάληψης αυξάνει τη σταθερότητα του γενετικού τόπου μειώνοντας την πιθανότητα ολίσθησης από την DNA πολυμεράση [28].

5. η πλευρική αλληλουχία: Οι Glenn et al παρατήρησαν μια σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της ποικιλομορφίας αλληλομόρφων και της συγκέντρωσης σε GC στις πλευρικές αλληλουχίες [33].

6. το φύλο και η ηλικία: τα σπερματοζωάρια υπόκεινται σε περισσότερες μειώσεις από ότι τα ωάρια, αλλά και αυξανόμενης της ηλικίας αυξάνεται και ο ρυθμός των μειώσεων στα οποία υπόκεινται, και ως εκ τούτου έχουν υψηλότερη πιθανότητα μεταλλάξεων. Μελέτες έχουν δείξει ότι, το σπέρμα ενός άντρα υπόκειται σε περίπου 380 και 540 μειώσεις από την ηλικία των 28 και 35 αντίστοιχα [34].

7. ο γενετικός ανασυνδυασμός: υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις κατά πόσο ο γενετικός ανασυνδυασμός συσχετίζεται με τις STRs μεταλλάξεις [29]. Εξάλλου, STRs γενετικοί τόποι οι οποίοι δεν υφίστανται γενετικό ανασυνδυασμό όπως το ανθρώπινο χρωμόσωμα Y, εμφανίζουν τον ίδιο ρυθμό μετάλλαξης.

2.2.5 Βάσεις δεδομένων γενετικών δεικτών STRs

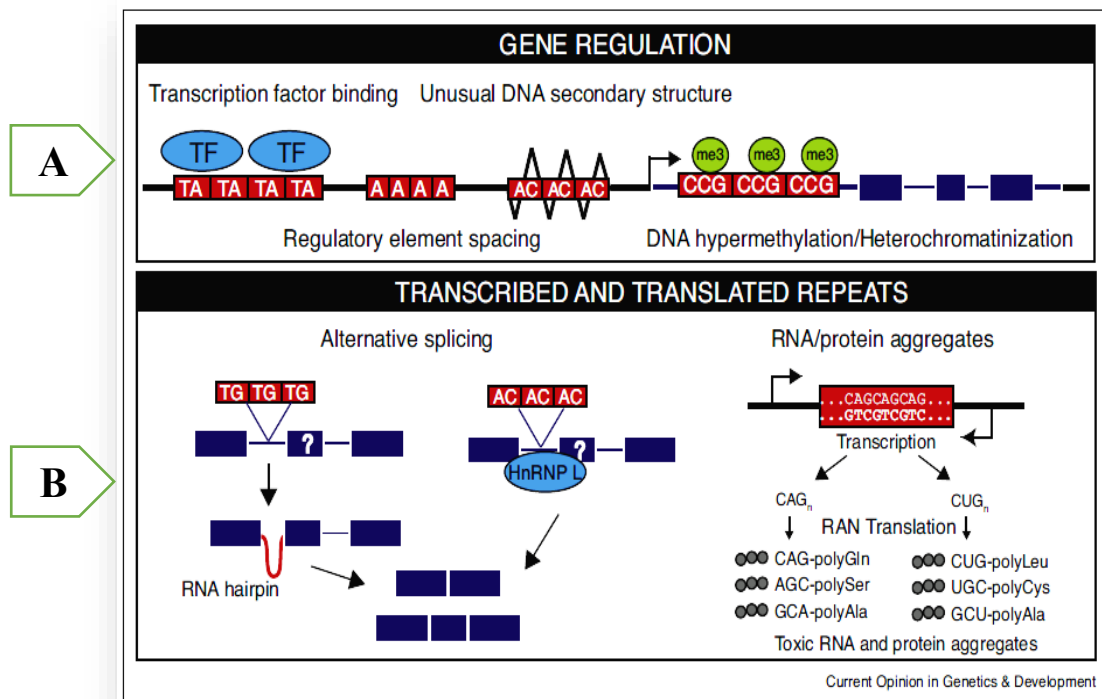
Από τις αρχές του 2005 ο κατάλογος των πληθυσμιακών μελετών έχει αυξηθεί σημαντικά βασιζόμενος σε έναν πολύ μεγάλο όγκο βιβλιογραφικών αναφορών, διαθέσιμες στην <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/population/PopSurvey.htm> ιστοσελίδα. Συγκεκριμένα, για τους STR γενετικούς δείκτες μία από τις πιο περιεκτικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες στο διαδίκτυο πηγές είναι η βάση δεδομένων στο Εθνικό Ινστιτούτο Προτύπων και Τεχνολογίας των STRs γενετικών τόπων (*National Institute of Standards and Technology Short Tandem Repeat Internet Database, NIST* <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase>), η οποία ιδρύθηκε το 1997 από τους John Butler και Dennis Reeder [35]. Νέες πληροφορίες συνεχώς προστίθενται περιλαμβάνοντας ποικιλία αλληλίων, triallelic patterns και οδηγίες προς τους επιστήμονες. Πρόσφατα, έχουν δημιουργηθεί νέα τμήματα για να περιγράψουν εν εξελίξει προσπάθειες με miniSTRs, θέματα επικύρωσης, SNPs ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος, Y-chromosome δείκτες και βάσεις αυτών. Παράλληλα υπάρχουν βάσεις, στις οποίες μπορεί να ανατρέξει κανείς, προκειμένου να προβεί στον υπολογισμό της συχνότητας ενός συγκεκριμένου γενετικού προφίλ. Για παράδειγμα, προγράμματα όπως το OmniPop, (Brian Burritt, San Diego Police Department <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/population/OmniPop150.4.2.xls>), STATCEL (OMSPublishing Inc.), Powerstats version 1.2 (Promega Corp.) επιτρέπουν τον υπολογισμό της συχνότητας ενός γενετικού προφίλ χρησιμοποιώντας τις συχνότητες των STRs αλληλίων διαφορετικών πληθυσμιακών ομάδων.

Επιπρόσθετα, αρκετά προγράμματα έχουν δημιουργηθεί για την δημιουργία των γενεαλογικών δέντρων και τον υπολογισμό του δείκτη γονικότητας (W), όπως το “Familias program” (<http://www.nr.no/familias>).

2.2.6 STRs γενετικοί δείκτες και ασθένειες

Ένας άλλος τομέας στον οποίο εμπλέκονται οι STRs γενετικοί τόποι είναι η Ιατρική Γενετική. Ο ρόλος των STRs σε ανθρώπινες ασθένειες διερευνήθηκε πάνω από δύο δεκαετίες πριν. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τρινουκλεοτιδικές επεκτάσεις που παρατηρήθηκαν στο σύνδρομο του εύθραυστου X (Fragile X Syndrome) [36, 37] και τη μυϊκή ατροφία της σπονδυλικής στήλης και του βολβού [38]. Από τότε, οι ακολουθίες STRs έχουν ενοχοποιηθεί σε δεκάδες διαταραχές [39]. Περαιτέρω μελέτες έχουν δείξει ότι αυτές οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες οδηγούν σε μια ποικιλία παθογόνων επιδράσεων (Σχήμα 2.4), συμπεριλαμβανομένων τη συσσώρευση πολυγλουταμίνης [39], την υπερμεθυλίωση [40], την RNA τοξικότητα (RNA toxicity) [41] και το φαινόμενο Repeat Associated Non-ATG (RAN) translation (νωτιαιοπαρεγκεφαλική αταξία τύπου 8 - SCA8, μυοτονική δυστροφία τύπου I - DM1, σύνδρομο του εύθραυστου X που συσχετίζεται με τρόμο / αταξία - FXTAS, αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση - ALS, μετωποκροταφική άνοια - FTD) [42, 43]. Επιπλέον, κάποιες άλλες φαίνεται ότι επηρεάζουν το μάτισμα του mRNA (κυστική ίνωση [44]) ή ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση (προοδευτική μυοκλονική επιληψία MELF ή ασθένεια Lafora [45]) και σύνδρομο Gilbert [46]. Αρκετοί από αυτούς τους μηχανισμούς παρουσιάζονται σε πολλούς γενετικούς τόπους, υποδεικνύοντας ότι πιθανότατα αντιπροσωπεύουν φαινόμενα σε ένα ευρύ φάσμα του ανθρώπινου γονιδιώματος.

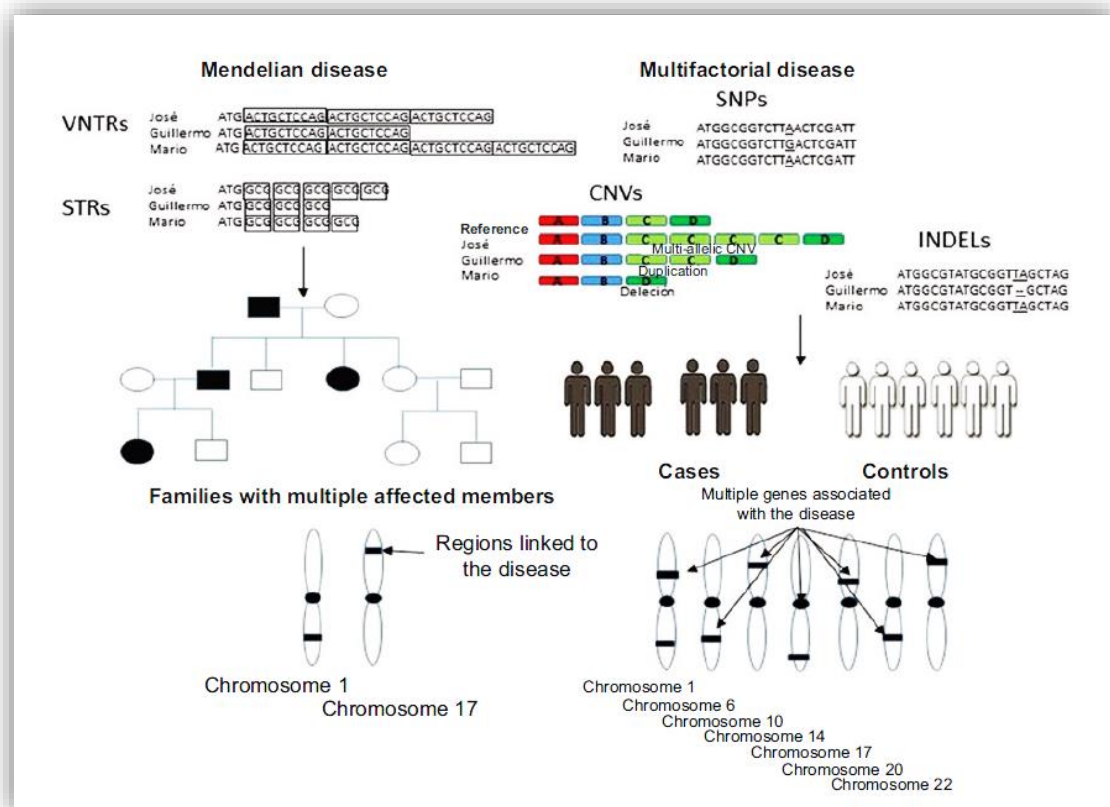
Οι VNTRs και STRs γενετικοί τόποι έχουν ενοχοποιηθεί επίσης για Μενδελιανές (ή μονογονιδιακές) ασθένειες, όπως μυϊκή δυστροφία Duchenne ή μυϊκή δυστροφία Becker, κυστική ίνωση, δρεπανοκυτταρική αναιμία, κ.ά., οι οποίες εξαιτίας της χαμηλής συχνότητάς τους είναι εξαιρετικά σπάνιες στο γενικό πληθυσμό (Πίνακας 2.1) [47-52]. Το χαρακτηριστικό τους είναι ότι ένα μόνο τροποποιημένο γονίδιο επιδρά και οδηγεί σε φαινότυπο. (Εικόνα 2.5) Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις, ακόμα και αν υπάρχει κάποια μετάλλαξη, αυτή δε θα οδηγήσει σε ασθένεια, αλλά σε ημιτελή διείσδυση, όπου λιγότερο από 100% των ατόμων έχουν τον προβλεπόμενο φαινότυπο. (Πίνακας 2.1 και Εικόνα 2.5).



Σχήμα 2.4: Μηχανισμοί με τους οποίους οι STRs επηρεάζουν το φαινότυπο. Μια σχηματική άποψη γνωστών και προτεινόμενων μηχανισμών με τους οποίους οι STRs θα μπορούσαν να ρυθμίσουν την έκφραση και τη λειτουργία των γονιδίων. Στο σχήμα A, από αριστερά προς τα δεξιά, οι STRs μπορούν να σχηματίσουν θέσεις δέσμευσης του παράγοντα μεταγραφής [53,54], να επηρεάσουν την απόσταση μεταξύ ρυθμιστικών στοιχείων [55], να προκαλέσουν ασυνήθιστες δευτερογενείς δομές DNA όπως το Z-DNA [56], ή να διαμορφώσουν επιγενετικές ιδιότητες όπως η μεθυλίωση του DNA [57] και η ετεροχρωματοποίηση (heterochromatinization)[58]. Στο σχήμα B, από τα αριστερά προς τα δεξιά, οι STRs μπορούν να μεσολαβήσουν σε επιδράσεις σε επίπεδο RNA και πρωτεΐνης με διαμόρφωση εναλλακτικού ματίσματος μέσω της δευτερογενούς δομής του RNA [59], επηρεάζοντας τις πρωτεϊνικές θέσεις δέσμευσης του RNA [60], ή σχηματίζοντας συσσωματώματα τοξικών RNA και πρωτεϊνικών [61]. (Μωβ κουτιά = γονίδια, μαύρες γραμμές = DNA, κόκκινα κουτιά = STRs, μπλε κύκλοι = πρωτεΐνες σύνδεσης DNA / RNA, γκρι κύκλοι = αμινοξέα, πράσινοι κύκλοι = τροποποιήσεις DNA).

Πίνακας 2.1: Χαρακτηριστικά Μενδελιανών και πολυπαραγοντικών ασθενειών.

Traits	Mendelian disease	Multifactorial disease
Objective	Identification of the main gene or genes linked in the families	Identification of the gene/genes of small effect size associated with a population base
Genetic alteration	Mutation	Polymorphism
Inheritance Model	Well defined Autosomal recessive, autosomal dominant, X-linked, uniparental dysomia, etc.	Undefined
Effect of the alteration	High Generally, all individuals who have the mutation in a single gene also have the disease (except for incomplete penetrance)	Low In individuals who have all associated variants they do not trigger the disease, but cause susceptibility to diseases
Frequency of the alteration	Rare Lower than 1% in a population	Low-common With a frequency of at least 1% in the general population
Variants used in these studies	VNTRs, STRs, SNPs	VNTRs, STRs, SNPs, CNVs, INDELS
Effect of the environment	Practically none	Strongly influenced
Clinical presentation	They occur at the earliest stage of life or during childhood	They frequently occur more towards the stage of young adulthood or adulthood. Others, such as obesity and type 2 diabetes, currently also occur in children



Εικόνα 2.5: Προσδιορισμός περιοχών ή γονιδίων με VNTRs, STRs, SNPs, CNVs και INDELs σε οικογένειες ή σχετικά γονίδια διαφορετικών ατόμων, σε διαφορετικές ασθένειες ή άλλα χαρακτηριστικά. Οι VNTRs και STRs γενετικοί τόποι έχουν χρησιμοποιηθεί για τη χαρτογράφηση χρωμοσωμικών περιοχών που εμπλέκονται σε διάφορες Μενδελιανές ασθένειες, όπου ένα μόνο γονίδιο ή λίγα γονίδια με μεγάλη διεισδυτικότητα είναι υπεύθυνα για τον παρατηρούμενο φαινότυπο. Σε ανάλογες γενετικές μελέτες, οι VNTRs και STRs έχουν χρησιμοποιηθεί για να αναγνωρίσουν γονίδια με μικρό μέγεθος επιρροής. Όμως, λόγω της μικρής κατανομής τους μέσα στο γονιδίωμα και στα γονίδια, οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι δείκτες σε αυτές τις μελέτες είναι οι SNPs, παρόλο που οι CNVs και INDELs γενετικοί τόποι χρησιμοποιούνται επίσης.

Η πλειονότητα των διαταραχών που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι τώρα ακολουθούν αυτοσωμικό κυρίαρχο πρότυπο κληρονομικότητας, κάτι που ήταν εύκολο να ταυτοποιηθεί με αναλύσεις γενεαλογικών δένδρων και τη συσχέτισή τους με διάφορες παθήσεις. Ωστόσο, οι STRs μπορούν να συμβάλλουν σε ένα τρόπο κληρονομικότητας που δεν υπόκειται στις παραδοσιακές τεχνικές συσχέτισης. Για παράδειγμα, οι STRs προβλέπεται ότι συνεισφέρουν σε μεγαλύτερο αριθμό de novo μεταλλάξεων ανά γενεά, από οποιονδήποτε άλλο τύπο παραλλαγής [63], των οποίων ο ρόλος σε καταστάσεις, όπως ο αυτισμός και η νευροαναπτυξιακές διαταραχές, δεν έχουν μέχρι στιγμής διερευνηθεί. Επιπροσθέτως, οι STRs εμπεριέχουν συχνά σε υψηλό βαθμό πολλαπλά αλληλόμορφα, κι έτσι μπορούν να αποδώσουν σύνθετα μοντέλα κληρονομικότητας με όχι και τόσο καλή συσχέτισή τους με κάποια γενετική ανωμαλία ή ανάλυση διαλλαλικών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs).

Σήμερα, η μελέτη τους έχει επεκταθεί ευρέως στον τομέα των Ιατρικών Ερευνών μέσω της ακολουθίας επόμενης γενιάς (NGS) μεθοδολογίας. Η NGS έχει τη δυνατότητα να αποκαλύπτει περισσότερους από ένα εκατομμύριο STRs γενετικούς τύπους, ενώ έχει αποδειχθεί μία τεράστια πρόκληση ο προσδιορισμός του γονότυπου των STRs. Βέβαια, εξαιτίας της κακής ποιότητας των κυττάρων [64, 65] και ακόμη και γνωστές παθογόνες STRs μεταλλάξεις δεν μπορούν να ανιχνευθούν σε πολλές περιπτώσεις [66]. Σύμφωνα με τη Melissa Gymrek, η επανάληψη του ιντρονίου GGGGCC που εμπλέκεται στην αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) και τη μετωποκροταφική άνοια (FTD) [67, 68] προσδιορίστηκε μέσω ενός συνδυασμού συσχετισμών (linkage) και NGS. Συγκεκριμένα, η επανάληψη αυτή εντοπίστηκε μέσα από τη συσχέτιση των διαταραχών που παρατηρήθηκαν στην περιοχή του γονιδιώματος που αναλύθηκε και σε ένα σύνολο εσφαλμένων SNPs που προκύπτουν από την κακή στοίχιση της αλληλουχίας στην περιοχή με την εκτεταμένη επανάληψη. Τα νέα εργαλεία βιοπληροφορικής και η πρόοδος στις τεχνολογίες αλληλούχισης αρχίζουν να ξεπερνούν αυτές τις προκλήσεις και παρέχουν το πρώτο γονιδιωματικό πορτρέτο των STRs παραλλαγών σε πληθυσμιακή κλίμακα.

2.2.7 Εφαρμογές των STRs γενετικών τύπων

Η δυνατότητα της εύκολης και χαμηλού κόστους ενίσχυσής τους μέσω της PCR τεχνικής, η κατανομή τους σε όλο το ανθρώπινο γονιδίωμα, ο μεγάλος πολυμορφισμός τους, αλλά και η κληρονομική μεταβίβασή τους τους καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμους σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών.

Σήμερα, η γνώση της πλήρους αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος μας επιτρέπει να υπολογίσουμε την συχνότητα των STRs αλληλίων, αλλά και να κατανοήσουμε τον άμεσο ρόλο αυτών στην οργάνωση του γονιδιώματος, στον ανασυνδυασμό, την γονιδιακή ρύθμιση, την γενετική ποικιλότητα. Είναι εξαιρετικά χρήσιμα στην κατασκευή γενετικών χαρτών, στην χρωμοσωμική εντόπιση γονιδίων, στην αναγνώριση ατόμων στην Ιατροδικαστική, στον έλεγχο αμφισβητούμενης γονικότητας, καθώς επίσης και στην διάγνωση διαφόρων ασθενειών [69, 70].

Ειδικότερα, στον έλεγχο **αμφισβητούμενης γονικότητας** ένας απόγονος κληρονομεί το ένα αλληλόμορφο από τον αρσενικό γονέα και το άλλο από τον θηλυκό γονέα, ακολουθώντας τους κανόνες κληρονομικότητας του Μέντελ. Ο έλεγχος έχει εξαιρετικά υψηλή διακριτική ικανότητα, καθώς ένα τυχαίο άτομο θα έχει μία

εξαιρετικά χαμηλή πιθανότητα να ταιριάζει με ένα συγκεκριμένο γενετικό προφίλ ατόμου που ανήκει στην ίδια πληθυσμιακή ομάδα που ανήκει ο υπό έλεγχο γονέας [71].

2.2.8 Ανάλυση των STRs γενετικών τόπων

Οι πολυμορφικές θέσεις των STRs γενετικών τόπων μπορούν να αντιγραφούν ταυτόχρονα με πολλαπλή PCR προσθέτοντας περισσότερα από ένα σετ εκκινητών στο μίγμα της αντίδρασης [72]. Ένα από τα πρώτα πολυπλέγματα STRs που αναπτύχθηκε ήταν μια δευτεροταγής G-quadruplex δομή (G-quadruplex secondary structure- G4) που δημιουργήθηκε από την υπηρεσία της εγκληματολογικής επιστήμης (Forensic Science Service - FSS) και περιλάμβανε τέσσερις STRs γενετικούς τόπους [73]. Η FSS ακολουθώντας μιας δεύτερης γενιάς πολυπλεκτική ανάλυση (second-generation multiplex - SGM) δημιούργησε έξι πολυμορφικούς STRs και ένα δείκτη αναγνώρισης φύλου [74]. Καθώς η τεχνολογία εξελίχθηκε γρήγορα, ο αριθμός των STRs που μπορούν να ενισχυθούν ταυτόχρονα έχουν αυξηθεί από τρεις ή τέσσερις - με συστήματα χρώματος αργύρου - σε πάνω από 15 χρησιμοποιώντας ετικέτες φθορισμού πολλαπλών χρωμάτων. Παρά το γεγονός ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει χιλιάδες γενετικούς δείκτες STRs (~500.000 loci) ένα πολύ μικρό ποσοστό έχει επιλεγεί για χρήση στον έλεγχο γονιότητας, αλλά και στον έλεγχο ταυτότητας στην Ιατροδικαστική γενικότερα. Οι STR περιοχές που εξετάζονται έχουν επιλεγεί βάση κριτηρίων: α) δεν έχουν καμία επίπτωση στο φαινότυπο των ατόμων, β) παρουσιάζουν υψηλό βαθμό πολυμορφισμού (Πίνακας 2.2), γ) παρουσιάζουν χαμηλή συχνότητα μεταλλάξεων (low mutational rate), δ) είναι μικρού μεγέθους (100 έως 300 βάσεις) και που είναι πιθανό να έχουν παραμείνει ανέπαφες από τις κακουχίες, που συνήθως έχουν υποστεί τα εγκληματολογικού ενδιαφέροντος δείγματα «πειστήρια»

2.2.9 Περιορισμοί ανάλυσης των STRs γενετικών τόπων

Παρά το γεγονός ότι οι STRs γενετικοί τόποι έχουν πολλά πλεονεκτήματα, έναντι άλλων μοριακών δεικτών, το σύνολο των τελικών δεδομένων μπορεί να περιλαμβάνει ορισμένα σφάλματα κατά τον προσδιορισμό του γονοτύπου, λάθη που μπορεί να στρεβλώσουν τα τελικά συμπεράσματα. Τα σφάλματα αυτά μπορεί να προκύψουν είτε από την ποιότητα του αντιδραστήριου, είτε από σφάλματα της Taq πολυμεράσης, είτε από επιμόλυνση.

Πίνακας 2.2: STRs γενετικοί τόποι που αναλύονται με τα εμπορικά kits, η χρωμοσωμική τους εντόπιση, ο πολυμορφισμός και σήμανσή τους.

STR γενετικός τόπος	Επαναλ.μονάδα (SFG forma)	Διακύμανση αλληλίων	Τα μεγέθη των PCR προϊόντων που ενισχύονται με τα kits της Applied Biosystems STR Kits και σήμανσή τους (Dye Label)	Αριθμός αλληλίων
CSF1PO	TAGA	5–16	CO: 276–320 bp (JOE) ID: 276–320 bp (6FAM)	20
FGA	CTTT	12.2–51.2	Pro: 196–348 bp (5FAM) SGM/SE: 196–348 bp (NED) ID: 196–348 (PET)	80
TH01	TCAT	3–14	CO: 160–204 bp (JOE) SGM/SE: 160–204 bp (NED) ID: 160–204 bp (VIC)	20
TPOX	GAAT	4–16	CO: 209–257 bp (JOE) ID: 209–257 bp (NED)	15
VWA	[TCTG][TCTA]	10–25	Pro/SGM: 152–212 bp (5FAM) ID: 152–212 bp (NED) SE: 152–212 bp (6FAM)	29
D3S1358	[TCTG][TCTA]	8–21	Pro/CO: 97–149 bp (5FAM) ID: 97–149 bp (VIC) SE: 97–149 bp (6FAM)	25
D5S818	AGAT	7–18	Pro: 134–178 bp (NED) ID: 134–178 bp (PET)	15
D7S820	GATA	5–16	Pro/CO: 253–297 bp (NED) ID: 253–297 bp (6FAM)	30
D8S1179	[TCTA][TCTG]	7–20	Pro: 123–175 bp (JOE) ID: 123–175 bp (6FAM) SE: 123–175 bp (VIC)	15
D13S317	TATC	5–16	Pro: 193–237 bp (NED) ID: 193–237 bp (VIC)	17
D16S539	GATA	5–16	CO/SGM: 233–277 bp (5FAM) ID: 233–277 bp (VIC) SE: 233–277 bp (6FAM)	19
D18S51	AGAA	7–39.2	Pro/SGM: 264–394 (JOE) ID: 264–394 (NED) SE: 264–394 (PET)	51
D21S11	Complex [TCTA][TCTG]	12–41.2	Pro/SGM: 138–256 bp (JOE) ID: 138–256 bp (6FAM) SE: 138–256 bp 17(PET)	89
D2S1338	[TGCC][TTCC]	15–28	SGM: 289–341 bp (5FAM) ID: 289–341 bp (VIC) SE: 289–341 bp (6FAM)	17
D19S433	AAGG	9–17.2	SGM/ID/SE: 106–140 bp (NED)	26
SE33	Complex AAAG	4.2–37	SE: 203–333 bp (VIC)	>100

Τα σφάλματα αυτά μπορεί να οδηγήσουν σε:

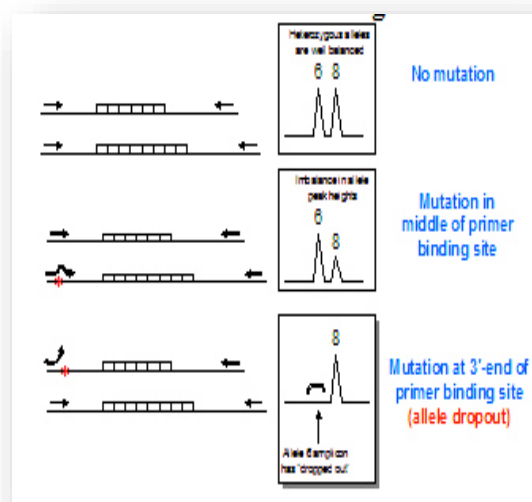
A. Null αλληλόμορφα: κατά την ενίσχυση των DNA γραμμικών θραυσμάτων που περιέχουν STR επαναλαμβανόμενες περιοχές, είναι πιθανό να παρατηρηθεί το φαινόμενο *allele dropout*, το οποίο οφείλεται στην αδυναμία ενίσχυσης του STR γενετικού τόπου λόγω μετάλλαξης στην θέση του DNA στόχου που υβριδοποιείται ο εκκινητής (*primer-binding region*) (Σχήμα 2.6). Αποτέλεσμα αυτού είναι

η απώλεια του αλληλίου («σιωπηρό αλλήλιο», *null allele*) [75]. Ο επανασχεδιασμός του εκκινητή μπορεί να επιλύσει αυτό το πρόβλημα.

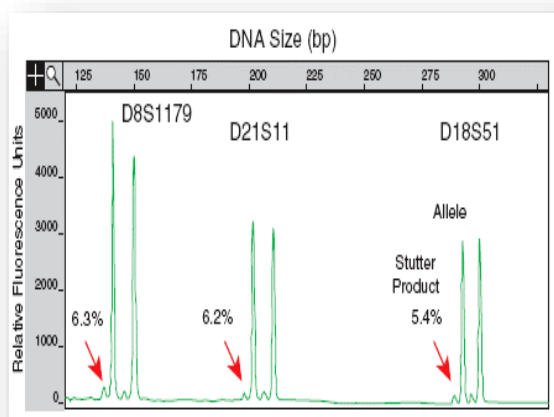
B. Παραπροϊόντα (artifacts) και Stutter προϊόντα: αυτά μπορεί να παρατηρηθούν στις n-2 θέσεις, πριν από την πραγματική κορυφή, και εμφανίζονται λόγω φορμαμιδίου, πολυμερούς ή κακής ποιότητας τριχοειδούς, ή όταν η μετουσίωση ήταν αναποτελεσματική. Οι stutter κορυφές έχουν συνήθως ύψος λιγότερο από το 15% της κορυφής του αλληλίου με το οποίο σχετίζεται (Εικόνα 2.7). Αλληλόμορφα με μεγαλύτερο αριθμό επαναλαμβανόμενων

μονάδων, αλλά και επαναλαμβανόμενα μοτίβα που είναι μικρότερα σε μήκος - π.χ. δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις - γενικά εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά stutter, εξαιτίας του γεγονότος ότι είναι πιο ασταθή [76].

Γ. Μη κλωνική προσθήκη (non template addition): Οι DNA πολυμεράσες, καταλύουν την προσθήκη ενός μονού νουκλεοτιδίου (συνήθως αδερίνη) στο 3' άκρο των δύο κλώνων ενός δίκλωνου DNA γραμμικού θραύσματος (*non-template addition*)

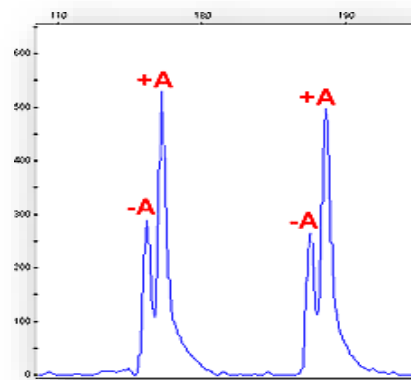


Σχήμα 2.6: Ο αντίκρουπος της ποικιλομορφίας της περιοχής δέσμησης του εκκινητή.



Εικόνα 2.7: Στο ηλεκτροφόρημα οι STRs γενετικοί τόποι D8S1179, D21S11 και D18S51 είναι ετερόζυγοι. Με βέλος δείχνονται τα προϊόντα stutter και το ποσοστό των παραπροϊόντων τους.

και αναφέρεται ως φαινόμενο «αδενυλίωσης» (adenylation) ή τύπος «+A» του νεοσυντιθέμενου κλώνου [76]. Εάν η προσθήκη αυτή είναι ατελής (μερική αδενυλίωση -A/+A) τότε δημιουργούνται κορυφές που το λογισμικό ανάλυσης μπορεί να τις ερμηνεύει λάθος και η γονοτύπηση να είναι ανακριβείς (Εικόνα 2.8). Επομένως όλα τα προϊόντα μιας PCR αντίδρασης πρέπει να είναι είτε +A, είτε -A, αλλά και το AL που θα χρησιμοποιηθεί θα πρέπει



Εικόνα 2.8: Απεικόνιση της μη-κλωνικής προσθήκης με την παρουσία δισχιδών κορυφών (+A/-A).

να έχει την ίδια κατάσταση αδενυλίωσης, προκειμένου να διασφαλιστεί η σωστή γονοτύπηση ενός συγκεκριμένου γενετικού τύπου.

Δ. Homoplasmy: πρόκειται για αλληλόμορφα με πανομοιότυπο μήκος (bp), διαφορετικής κατεύθυνσης αλλά και διαφορετικής εξελικτικής ιστορίας [77]. Επειδή στο φαινόμενο αυτό δεν λαμβάνεται συνήθως υπόψη η πραγματική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών μπορεί να υποτιμηθεί σε γενεαλογικές μελέτες.

Ε. Ανισορροπία γενετικής σύνδεσης (Linkage disequilibrium, DL): είναι οι αποκλίσεις από την τυχαία σύνδεση των αλληλομόρφων σε έναν πληθυσμό, οι οποίες προκαλούνται κατά κύριο λόγο από υψηλά ποσοστά ενδογαμίας. Είναι ιδιαίτερα προβληματική στις πληθυσμιακές μελέτες ή στον έλεγχο αμφισβητούμενης γονικότητας [77].

2.3 ΑΛΛΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ

Α. Χρωμόσωμα Y (Y-chromosome)

Όλα τα αρσενικά άτομα της ίδιας πατρικής γενεαλογίας έχουν το ίδιο Y χρωμόσωμα και άρα οι Y-STR γενετικοί δείκτες είναι ίδιοι από γενιά σε γενιά. Αυτό το χαρακτηριστικό πρότυπο κληρονομησης καθιστά το Y χρωμόσωμα ιδιαίτερα δημοφιλές για τον προσδιορισμό της καταγωγής των αρσενικών ατόμων σε μελέτες γενεαλογίας. Στην ιατροδικαστική όμως αποτελεί μειονέκτημα, γιατί καθιστά αδύνατη τη διάκριση μεταξύ αδερφών ή μεταξύ πατέρα και γιου. Έτσι μετά από σύγκριση δύο γενετικών προφίλ μπορεί να ειπωθεί μόνο ότι τα δύο προφίλ προέρχονται από το ίδιο άτομο ή άτομα με την ίδια πατρική γενεαλογία, για αυτό και αποτελούν μία εναλλακτική πρακτική ελέγχου πατρότητας, αλλά μόνο σε περιπτώσεις που δεν

υπάρχουν άλλα μέλη στην οικογένεια από την πατρική γενεαλογία. Επίσης, επειδή οι Y-STR γενετικοί τύποι δεν κληρονομούνται ανεξάρτητα και το χρωμόσωμα Y δεν ανασυνδυάζεται, δεν είναι δυνατόν να υπολογιστούν οι πιθανότητες παρουσίας στον πληθυσμό ενός συγκεκριμένου προφίλ DNA. Ο λόγος των πιθανοτήτων (*Likelihoods*) για το χρωμόσωμα Y θα πρέπει να βασίζεται στις συχνότητες των απλοτύπων καταχωρημένες σε βάσεις δεδομένων (*Y-Chromosome Haplotype Reference Database, YHRD*/<http://www.yhrd.org/index.html> και <http://www.ystr.charite.de>).

B. Χρωμόσωμα X (*X-chromosome*)

Η βιοστατιστική αξιολόγηση των δεικτών του X-χρωμοσώματος δεν έχει αναπτυχθεί, για αυτό και τα εργαστήρια δεν τους χρησιμοποιούν συστηματικά στον έλεγχο γονικότητας [78].

Γ. Μιτοχονδριακό DNA (*Mitochondrial DNA, mtDNA*)

Οι γενετικοί δείκτες του mtDNA περνούν *en bloc* από γενιά σε γενιά μέσω της μητέρας και ως εκ τούτου συμπεριφέρονται ως ένας *απλότυπος*. Ο υπολογισμός του PI πρέπει να βασίζεται στις συχνότητες των απλοτύπων τους, καταχωρημένες σε βάσεις δεδομένων αναφοράς mtDNA, οι οποίες μέχρι τώρα δεν είναι αρκετά διευρυμένες στις διάφορες πληθυσμιακές ομάδες [79].

Δ. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (*Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs*)

Οι SNPs πολυμορφισμοί αποτελούν ανεξάντλητη πηγή γενετικών δεικτών, οι οποίοι βρίσκουν ευρεία εφαρμογή και στην ιατροδικαστική [80]. Ωστόσο, αν και οι SNPs πολυμορφισμοί είναι δυνατόν να αξιοποιηθούν για την ταυτοποίηση ατόμων, η χρησιμοποίησή τους σε ιατροδικαστικές μελέτες παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα. Δεδομένου ότι για κάθε SNP υπάρχουν δύο μόνο αλληλόμορφα απαιτείται η ανάλυση τουλάχιστον 50 διαφορετικών SNPs προκειμένου το αποτέλεσμα που θα προκύψει να είναι τόσο στατιστικά σημαντικό, όσο αυτό που προκύπτει από την ανάλυση των 13 γενετικών τύπων STRs.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

3.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΜΟΝΑΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΑΠΟΤΥΠΩΜΑΤΟΣ

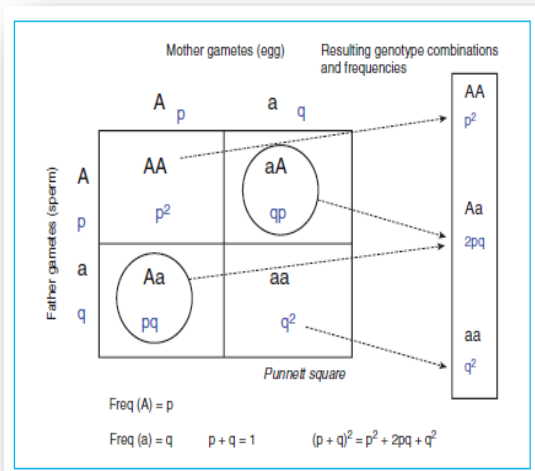
Οι συχνότητες των STRs αλληλομόρφων χρησιμοποιούνται στην Ιατροδικαστική για την εκτίμηση της μοναδικότητας του γενετικού αποτυπώματος [81].

Συγκεκριμένα, προκειμένου να ελεγχθεί εάν ένα συγκεκριμένο γενετικό προφίλ είναι μοναδικό (ανάλυση 16 STRs γενετικών τόπων), θα πρέπει να ελεγχθεί το προφίλ όλων των κατοίκων της Γης. Επειδή αυτό δεν είναι εφικτό, εκτιμάται στατιστικά η πιθανότητα το δεδομένο προφίλ να

απαντάται σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό. Οι υπολογισμοί γίνονται σύμφωνα με την **αρχή της ισορροπίας των Hardy-Weinberg** (Godfrey Hardy, 1877-1947 και Wilhelm Weinberg 1862-1937), η οποία βασίζεται στην παραδοχή ότι οι γονότυποι είναι κατανεμημένοι στον πληθυσμό και παραμένουν σταθεροί από γενιά σε γενιά, εφόσον δεν προκύψουν δραματικές πληθυσμιακές αλλαγές [82].

Η εξίσωση Hardy-Weinberg ορίζει ότι:

- Αν ένα αλληλίο **A** έχει συχνότητα **p** και ένα αλληλίο **a** έχει συχνότητα **q** (στον ίδιο STR γενετικό τόπο) τότε :
- $p + q = 1$ (δηλαδή το άθροισμα των αλληλίων ενός γεν τόπου ισούται με την μονάδα) (Σχήμα 4)
- $(p + q)^2 = 1 = (p^2 + 2pq + q^2)$
- Οι ομοζυγώτες και οι ετεροζυγώτες σε έναν πληθυσμό υπολογίζονται ως εξής:
- $AA = p^2$



Σχήμα 3.1: Η εξίσωση Hardy-Weinberg συνδυάζοντας τα δύο αλληλία A και a με p και q συχνότητες αντίστοιχα.

- $\alpha\alpha = q^2$
- $A\alpha = 2pq$
- $AA + A\alpha + \alpha\alpha = 1$

Η συχνότητα εμφάνισης ενός γενετικού προφίλ υπολογίζεται από το γινόμενο της συχνότητας και των 16 ανεξάρτητων STR γονοτύπων. Τα αποτελέσματα της DNA εξέτασης αποκλείουν κάποιο άτομο ως τον δότη συγκεκριμένου βιολογικού υλικού σε ποσοστό 100%, ενώ σε περίπτωση ταύτισης του βιολογικού υλικού με το γενετικό τύπο συγκεκριμένου ατόμου, η **στατιστική/διακριτική ικανότητα του αποτελέσματος ανέρχεται σε τετράκις, πεντάκις και εξάκις εκατομμύρια**, ανάλογα με τη συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων που συνθέτουν το συγκεκριμένο γενετικό τύπο σε συγκεκριμένη πληθυσμιακή βάση δεδομένων. Επομένως, η ταύτιση δίδεται *«πέρα από κάθε λογική αμφιβολία»* αφού η στατιστική πιθανότητα ανέρχεται σε πολλές χιλιάδες φορές τον πληθυσμό της γης (πληθυσμός της Γης περίπου $6,5 \times 10^9$).

Η χρήση των 16 STRs γενετικών τόπων επιτρέπει με πολύ μεγάλη ασφάλεια την ταυτοποίηση ενός ατόμου με εξαίρεση τους μονο-ζυγωτικούς διδύμους. Για το λόγο αυτό η επιστημονική κοινότητα έχει πάψει να επικεντρώνει τις προσπάθειές της στην αύξηση των εξεταζομένων STRs γενετικών περιοχών, αλλά στην αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου.

3.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΜΦΙΣΒΗΤΟΥΜΕΝΗΣ ΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η χρήση των STRs γενετικών τόπων αποτελεί σήμερα την πλέον ενδεδειγμένη μέθοδο πιστοποίησης πατρότητας/μητρότητας. Με βάση τους κανόνες της κληρονομικότητας του Mendel ο κάθε γονέας και το παιδί θα πρέπει να μοιράζονται ένα κοινό αλληλόμορφο σε όλες τις υπό μελέτη περιοχές. Συγκεκριμένα, σε κάθε υποψήφιο εξετάζονται τουλάχιστον 16 πολυμορφικές περιοχές πυρηνικού αυτοσωμικού DNA (aSTRs-DNA), συμπεριλαμβανομένης και μίας γενετικής περιοχής με την οποία γίνεται ο καθορισμός του φύλου (μέσω των αλληλομόρφων του γονιδίου της αμελογενίνης). Από την ανάλυση του πυρηνικού DNA καταγράφεται για κάθε ελεγχόμενο ένα σετ αριθμών, γνωστό ως *«γενετικό αποτόπωμα DNA» (DNA profile)* και το οποίο είναι χαρακτηριστικό και μοναδικό κάθε ανθρώπου. Η συγκριτική μελέτη των γενετικών προφίλ των εμπλεκόμενων ατόμων οδηγεί στην απόρριψη ή όχι της συγγένειας.

Το 2002, η Επιτροπή πατρότητας (*Paternity Testing Commission, PTC*) της Διεθνούς Εταιρείας Ιατροδικαστικής Γενετικής (*International Society for Forensic Genetics, ISFG* - <http://www.isfg.org>) δημοσίευσε μία σειρά συστάσεων και κατευθυντήριων οδηγιών βασισμένες στο πρότυπο *ISO 17025 standards*, που αφορούσαν τις επιλεγμένες γενετικές περιοχές που έχουν σημασία στον έλεγχο γονικότητας [83]. και επικεντρώνεται σε θέματα που αφορούν εκθέσεις πραγματογνωμοσύνης και πιστοποιητικά διακρίβωσης.

3.2.1 Αποκλεισμός γονικότητας

Ένας γονέας αποκλείεται να είναι ο βιολογικός γονέας ενός παιδιού όταν δεν έχει τα πατρικά/μητρικά αλληλία του παιδιού (Υποχρεωτικά Πατρικής Προέλευσης Αλληλία, **ΥΠΠΑ - Paternal Obligate Alleles, POAs**) σε όλους τους υπό έλεγχο γενετικούς τόπους. Βέβαια, σύμφωνα με τις οδηγίες της AABB, ο φερόμενος ως πατέρας (ΦΠ) θα αποκλειστεί από την γονικότητα εάν έχει ≥ 3 aSTRs διαφορετικά αλληλία με το παιδί στο σύνολο των ΥΠΠΑ aSTRs αλληλίων, καθώς θεωρείται ότι θα ήταν εξαιρετικά σπάνιο φαινόμενο να συμβούν ταυτόχρονα τρεις ή περισσότερες *de novo* μεταλλάξεις.

- Η πιθανότητα ένας τυχαίος άνδρας φερόμενος ως πατέρας (ΦΠ) να αποκλειστεί από την πατρότητα, συγκρινόμενος με όλα τα πιθανά ζεύγη μητέρας και παιδιού, ονομάζεται **πιθανότητα αποκλεισμού πατρότητας** (*Probability of Paternity Exclusion, PPE*) ή **μέση πιθανότητα αποκλεισμού** (*Mean Exclusion Chance, MEC*) και η οποία εξαρτάται από τον πολυμορφισμό του γενετικού τόπου που ελέγχεται [84].

Στον έλεγχο γονικότητας, η πιθανότητα αποκλεισμού στην περίπτωση ελέγχου και των τριών γενετικών προφίλ πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 99%. Όταν k ο αριθμός των αλληλίων, τότε υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$MEC_T = \sum_{i=1}^k p_i(1 - p_i)^2 + \sum_{i < j}^k (p_i p_j)^2 (3p_i + 3p_j - 4)$$

Στην περίπτωση όμως απουσίας της μητέρας, όταν τα πατρικής προέλευσης αλληλία του παιδιού δεν μπορούν να προσδιοριστούν, ο αποκλεισμός της συγγένειας επιτυγχάνεται γίνεται όταν ο ΦΠ δε φέρει κανένα από τα αλληλία του παιδιού. Τότε υπολογίζεται ως εξής:

$$MEC_M = \sum_{i=1}^k p_i^2 (1 - p_i)^2 + \sum_{i < j}^k (p_i p_j) (1 - p_i - p_j)^2$$

- Οι γενετικές εξετάσεις για τον έλεγχο πατρότητας, συνήθως περιλαμβάνουν υπολογισμούς σχετικά με την ισχύ και την ικανότητα της εξέτασης να αποκλείει ψευδώς τον ΦΠ (Alleged Fathers - AFs). Για να προσδιοριστεί η ισχύς αποκλεισμού της γενετικής εξέτασης, υπολογίζεται η τιμή του δείκτη αποκλεισμού (Power of Exclusion - PE). Αναφέρεται στο ποσοστό ανδρών που ανήκουν στον ίδιο πληθυσμό με τον ΦΠ, οι οποίοι θα αποκλείονταν σε ένα δεδομένο σύνολο γενετικών δεικτών αν είχαν ελεγχθεί με το συγκεκριμένο παιδί [85].

$$PE = 1 - RMNE$$

- Εναλλακτικά, προσδιορίζεται ο δείκτης RMNE (Random Man Not Excluded), και εκφράζει την πιθανότητα ένας τυχαίος άνδρας που ανήκει στον ίδιο πληθυσμό με τον ΦΠ να είναι ο βιολογικός πατέρας του παιδιού [85].

$$RMNE = [a(2-a)]$$

όπου a η συχνότητα του ΥΠΠΑ.

Στην περίπτωση κατά την οποία απουσιάζει το γενετικό προφίλ της μητέρας (DUO περίπτωση), ο παραπάνω μαθηματικός τύπος διαμορφώνεται ως εξής:

$$RMNE = [(a+b)(2-a-b)]$$

όπου a και b , οι συχνότητες των πιθανών ΥΠΠΑ.

3.2.2 Μη αποκλεισμός γονικότητας

Αρχικά ελέγχουμε το γενετικό προφίλ της μητέρας, του παιδιού και του ΦΠ. Στην περίπτωση που η συγγένεια δεν αποκλείεται, υπολογίζεται ο δείκτης γονικότητας (PI), ο συνδυασμένος δείκτης γονικότητας (CPI) και η πιθανότητα γονικότητας ή συγγένειας (W).

- Ο **δείκτης γονικότητας (Parentage Index, PI)** δηλώνει την πιθανότητα το συγκεκριμένο γενετικό αλληλόμορφο που εμφανίζεται στο παιδί να υποστηρίζει την υπόθεση ότι ο ΦΠ είναι ο βιολογικός πατέρας του παιδιού, σε σχέση με έναν τυχαία επιλεγμένο, άσχετο άνδρα. Υπολογίζεται δε, με βάση την συχνότητα τόσο των

ελεγχόμενων φαινοτύπων/αλληλομόρφων, όσο και το συνδυασμό των φαινοτύπων/απλοτύπων που παρουσιάζουν οι «φερόμενος ως πατέρας», «μητέρα» και «παιδί» στον υπό μελέτη πληθυσμό.

$$Paternity\ Index\ (PI) = \frac{H + h}{2h} = \frac{(1 - h) + h}{2h} = \frac{1}{2h} = \frac{1}{2 \sum_{i=1}^n P_i^2}$$

όπου P_i είναι η συχνότητα του αλληλίου i σε ένα πληθυσμό n ατόμων, h η ομοζυγωτία και H η ετεροζυγωτία

- **Ο συνδυασμένος δείκτης γονικότητας (Combined Parentage Index, CPI),** καθορίζεται από το γινόμενο των επιμέρους PIs του κάθε ελεγχόμενου γενετικού τύπου και ορίζει ένα στα πόσα άτομα φέρει το συγκεκριμένο γενετικό προφίλ στη συγκεκριμένη πληθυσμιακή ομάδα.

Στην περίπτωση που ο ΦΠ δεν αποκλείεται να είναι ο βιολογικός πατέρας του παιδιού, η τιμή του CPI πρέπει να είναι τουλάχιστον 10000 και αντιστοιχεί σε πιθανότητα πατρότητας (W) 99,99%. Εάν ο «φερόμενος» ως πατέρας/μητέρα έχει το πατρικό/μητρικό αλληλίο του παιδιού σε συγκεκριμένους STRs γενετικούς τύπους, ο πραγματογνώμων δικαστικός επιστήμονας, θα πρέπει να εκφράσει αριθμητικώς την **τελική πιθανότητα γονικότητας/συγγένειας (Plausibility of Parentage- W)**. Η εκτίμησή της γίνεται βάση μαθηματικού μοντέλου, το οποίο λαμβάνει υπόψιν τόσο τις συχνότητες του ΥΠΠΑ του παιδιού στην συγκεκριμένη πληθυσμιακή ομάδα, αλλά και του γεγονότος εάν οι τρεις ελεγχόμενοι φέρουν τα αλληλία σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία, ή μοιράζονται κοινά αλληλία. Υπολογίζεται δε, ως εξής: Ο πραγματογνώμων επιστήμονας θέτει δύο ανταγωνιστικές υποθέσεις και υπολογίζει τις πιθανότητες των δεδομένων.

- H_0 : ο «καθ' υπόθεση» ως πατέρας δεν είναι ο βιολογικός πατέρας.
- H_1 : ο «καθ' υπόθεση» ως πατέρας είναι ο βιολογικός πατέρας.

Έστω ότι E και I δηλώνουν την επιβεβαίωση ή την απόρριψη του ΦΠ με βάση την DNA γονοτύπηση αντιστοίχως, σε σχέση με το H_1 . Τότε η επιβεβαίωση DNA μπορεί να εκφραστεί αριθμητικώς από το λόγο των πιθανοτήτων (LR ή CPI). Για κάθε έλεγχο αμφισβητούμενης πατρότητας ελέγχουμε τον γονότυπο της μητέρας, του παιδιού και του ΦΠ (G_C, G_M, G_{AF}), όπου M (mother) για την μητέρα, C (child) για το παιδί και AF (alleged father) για τον ΦΠ. Επίσης, σε έναν γενετικό τόπο ο γονότυπος του παιδιού C αποτελείται από το πατρικό AP και το μητρικό AM αλληλίο και δηλώνεται ως GC ($AP,$

AM). Εφόσον θεωρηθεί ότι η μητέρα και ο ΦΠ δεν σχετίζονται γενετικά, ο λόγος των πιθανοτήτων (LR-CPI) υπολογίζεται με τον ακόλουθο τρόπο:

$$CPI = \frac{P(E|H_1, I)}{P(E|H_0, I)} = \frac{P(G_C, G_M, G_{AF}|H_1, I)}{P(G_C, G_M, G_{AF}|H_0, I)} = \frac{P(G_C|G_M, G_{AF}, H_1, I)}{P(G_C|G_M, G_{AF}, H_0, I)}$$

$$= \frac{P(A_M|G_M)P(A_P|G_{AF}, H_1)}{P(A_M|G_M)P(A_P|G_{AF}, H_0)} = \frac{P(A_P|G_{AF}, H_1)}{P(A_P|G_{AF}, H_0)}$$

Στην εξίσωση αυτή η εκτίμηση του $P(A_P|G_{AF}, H_0)$ και $P(A_P|G_{AF}, H_1)$ είναι άμεσα συνδεδεμένη με την υπόθεση ότι ο ΦΠ και ο βιολογικός πατέρας δεν σχετίζονται γενετικά.

Οι τιμές των PIs για όλους τους πιθανούς συνδυασμούς των γονοτύπων της μητέρας, του παιδιού και του ΦΠ παρατίθενται στον πίνακα 3.1, στον οποίο καταγράφονται οι τιμές των CPI στην περίπτωση ύπαρξης και των τριών γενετικών προφίλ [86]. Ο δείκτης CPI είναι ίσος με $P(H_1|E, I)$ και από αυτόν υπολογίζεται η πιθανολόγηση πατρότητας W (Wahrscheinlichkeit- W).

$$W = P(H_1|E, I) = \frac{CPI \times P(H_1|I)}{CPI \times P(H_1|I) + (1 - P(H_1|I))}$$

Θεωρώντας ότι η πιθανολόγηση πατρότητας $P(H_1|I)$ είναι ίση με 0.5 $\{P(H_1|I)=0.5\}$ κι έτσι προκύπτει η εξίσωση:

$$W = P(H_1|E, I) = \frac{CPI}{CPI + 1}$$

Πίνακας 3.1: Οι δείκτες PI στην περίπτωση ελέγχου και των τριών γενετικών προφίλ.

G_C	G_M	G_{AF}	PI (μέθοδος 1)	PI (μέθοδος 2)	PI (μέθοδος 3)
$A_i A_i$	$A_i A_i$	$A_i A_i$	$1/P_i$	$1+30 / 40+(1-0) P_i$	$1 / P_i(1-20)+20$
		$A_i A_j (i \neq j)$	$1/2P_i$	$1+30 / 2(30+(1-0) P_i)$	$1 / 2P_i(1-20)+20$
	$A_i A_j (i \neq j)$	$A_i A_i$	$1/P_i$	$1+30 / 30+(1-0) P_i$	$1 / P_i(1-20)+20$
		$A_i A_j (i \neq j)$	$1/2P_i$	$1+30 / 2(20+(1-0) P_i)$	$1 / 2P_i(1-20)+20$
$A_i A_j (i \neq j)$	$A_i A_i$	$A_j A_j$	$1/P_j$	$1+30 / 20+(1-0) P_j$	$1 / P_j(1-20)+20$
		$A_i A_j$	$1/2P_j$	$1+30 / 2(20+(1-0) P_j)$	$1 / 2P_j(1-20)+20$
		$A_j A_k (k \neq i, j)$	$1/2P_j$	$1+30 / 2(0+(1-0) P_j)$	$1 / 2P_j(1-20)+20$
	$A_i A_j (i \neq j)$	$A_i A_i$	$1/P_i + P_j$	$1+30 / 40+(1-0)(P_i+P_j)$	$1 / (P_i+P_j)(1-20)+20$
		$A_i A_j$	$1/P_i + P_j$	$1+30 / 40+(1-0)(P_i+P_j)$	$1 / (P_i+P_j)(1-20)+20$
		$A_j A_k (k \neq i, j)$	$1/2(P_i + P_j)$	$1+30 / 2(30+(1-0)(P_i+P_j))$	$1 / 2(P_i+P_j)(1-20)+20$
	$A_i A_k (k \neq i, j)$	$A_j A_j$	$1/P_j$	$1+30 / 20+(1-0)P_j$	$1 / P_j(1-20)+20$
		$A_j A_i (i \neq j)$	$1/2P_j$	$1+30 / 2(0+(1-0) P_j)$	$1 / 2P_j(1-20)+20$

G_C : οι γονότυποι του παιδιού, G_M : οι γονότυποι της μητέρας, G_{AF} : οι γονότυποι του ΦΠ.
 A_i, A_j : τα αλληλία τα οποία συνθέτουν τον γονότυπο
 P_i και P_j : η συχνότητα εμφάνισης του αλληλίου A_i και A_j στον πληθυσμό αναφοράς

PI (μέθοδος 1): Η τιμή του PI όταν ο ΦΠ δεν σχετίζεται συγγενικά με τον βιολογικό πατέρα.

PI (μέθοδος 2): Η τιμή του PI όταν ο ΦΠ, ο βιολογικός πατέρας και η μητέρα ανήκουν στον ίδιο υποπληθυσμό. Η τιμή της σταθεράς θ έχει οριστεί ίση με 0.03 σύμφωνα με τις συστάσεις του National Research Council (NRC).

PI (μέθοδος 3): Η τιμή του PI όταν ο ΦΠ είναι συγγενής του βιολογικού πατέρα (αδελφός – αδελφός, πατέρας – παιδί). Η τιμή της σταθεράς θ έχει οριστεί ίση με 0.25.

3.2.2.1 Απουσία γενετικού προφίλ του βιολογικού πατέρα ή της βιολογικής μητέρας

Στην περίπτωση που τα γενετικά προφίλ του/της βιολογικού/ής πατέρα/μητέρας δεν είναι διαθέσιμα για οποιοδήποτε λόγο, η πιθανολόγηση γονικότητας μπορεί να απαιτηθεί δικαστικώς, να αναλυθεί και να εκφραστεί αριθμητικώς. Σε αυτή την περίπτωση, η πιθανολόγηση γονικότητας ακολουθεί διαφορετική στατιστική ανάλυση [86]. Ο πίνακας 3.2 δείχνει τις τιμές PIs στην περίπτωση απουσίας της βιολογικής μητέρας.

Πίνακας 3.2: Οι δείκτες PI στην περίπτωση απουσίας δείγματος DNA της μητέρας.

G_C	G_{AF}	PI (μέθοδος 1)	PI (μέθοδος 2)	PI (μέθοδος 3)
$A_i A_i$	$A_i A_i$	$1/P_i$	$1+2\theta / (1-\theta) P_i+3\theta$	$1 / P_i(1-2\theta)+2\theta$
	$A_i A_j$ ($i \neq j$)	$1/2P_i$	$1+2\theta / 2((1-\theta) P_i+\theta)$	$1 / 2(P_i(1-2\theta)+2\theta)$
$A_i A_j$ ($i \neq j$)	$A_i A_i$	$1/2P_i$	$1+2\theta / 2(1-\theta) P_i+2\theta$	$1 / 2(P_i(1-2\theta)+\theta)$
	$A_i A_j$ ($i \neq j$)	$1/4P_i + 1/4P_j$	$(P_i+P_j)(1+2\theta)/2(2(1-\theta) P_i P_j+(P_i+P_j)\theta)$	$P_i P_j / 2(P_i P_j(1-2\theta)+(P_i P_j)\theta)$
	$A_i A_k$ ($k \neq i, j$)	$1/4P_i$	$1+2\theta / 2(2(1-\theta) P_i+\theta)$	$1 / 2(2P_i(1-2\theta)+\theta)$

G_C : οι γονότυποι του παιδιού, G_{AF} : οι γονότυποι του ΦΠ

A_i, A_j : τα αλληλίου τα οποία συνθέτουν τον γονότυπο

P_i , και P_j : η συχνότητα εμφάνισης του αλληλίου A_i και A_j στον πληθυσμό αναφοράς

PI (μέθοδος 1): Η τιμή του PI όταν ο ΦΠ δεν σχετίζεται συγγενικά με τον βιολογικό πατέρα.

PI (μέθοδος 2): Η τιμή του PI όταν ο ΦΠ, ο βιολογικός πατέρας και η μητέρα ανήκουν στον ίδιο υποπληθυσμό. Η τιμή της σταθεράς θ έχει οριστεί ίση με 0.03 σύμφωνα με τις συστάσεις του National Research Council (NRC).

PI (μέθοδος 3): Η τιμή του PI όταν ο ΦΠ είναι συγγενής του βιολογικού πατέρα (αδελφός – αδελφός, πατέρας – παιδί). Η τιμή της σταθεράς θ έχει οριστεί ίση με 0.25.

3.2.2.2 Πιθανή μετάλλαξη

Η πιθανότητα μετάλλαξης πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψιν από τους ειδικούς πραγματογνώμονες, διαφορετικά μπορεί να οδηγήσει σε μια εσφαλμένη γνωμοδότηση αποκλεισμού της συγγένειας. Σύμφωνα με τις συστάσεις της ISFG όταν καταγράφονται

γενετικές ασυμβατότητες (*mismatches*) από πιθανές μεταλλάξεις μεταξύ των εξετασθέντων ατόμων, ο δείκτης PI πρέπει να τροποποιηθεί [87].

Για τα τυπικά DNA συστήματα, ο μέσος ρυθμός μετάλλαξης κυμαίνεται από 0,005 έως 1% και επηρεάζονται από το φύλο, την ηλικία, καθώς και τα μεγέθη των STRs αλληλίων. Υποθέτοντας ότι τα αλλήλια του ΦΠ, της μητέρας και του παιδιού σε περιπτώσεις ελέγχου αμφισβητούμενης πατρότητας είναι αντίστοιχα (A, B), (C, D), (C, E) και λαμβάνοντας υπόψη τις συγκεκριμένες πιθανότητες μεταβίβασης, αγνοώντας την ταυτόχρονη ύπαρξη πολλαπλών γεγονότων μετάλλαξης, τότε ισχύει η εξίσωση: $X = (1/2) (1/2) (\mu_{A,E} + \mu_{B,E})$ και $Y = (1/2)e$, όπου e αντιπροσωπεύει την πιθανότητα συχνότητας του αλληλίου «E» σε έναν συγκεκριμένο πληθυσμό και X , Y αντιπροσωπεύουν την πιθανότητα της υπόθεσης «συγγένειας» και «μη συγγένειας» αντιστοίχως [87].

Έτσι ο δείκτης PI ισούται με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$PI = \frac{X}{Y} = \frac{\mu_{A,E} + \mu_{B,E}}{2e}$$

ή σύμφωνα με τους Sharif Akhteruzzaman και συν., ο παραπάνω μαθηματικός τύπος μπορεί να τροποποιηθεί ως εξής:

$$PI = \mu / \text{average power of exclusion} \quad [88]$$

Όπου μ η συχνότητα μετάλλαξης του συγκεκριμένου γενετικού τόπου.

3.2.2.3 Πιθανά σιωπηλά ή μη λειτουργικά αλλήλια (*silent ή null αλλήλια*)

Η εμφάνιση ενός απλοτύπου σε ομόζυγη κατάσταση μπορεί να κρύβει την πιθανότητα ενός σιωπηλού ή μη λειτουργικού αλληλίου. Συγκεκριμένα, παρατηρείται διαφορετική ομοζυγωτία στον υποτιθέμενο πατέρα και το παιδί. Ο εντοπισμός των σιωπηλών αλληλίων για τα τυποποιημένα συστήματα STR, λόγω του καλού σχεδιασμού των εκκινήτων, δεν είναι συχνός. Ωστόσο, ένα σιωπηλό ή ανενεργό αλληλόμορφο θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη στον υπολογισμό του PI και να υπολογίζεται με βάση την συχνότητα μετάλλαξης που παρατηρείται στο συγκεκριμένο αλληλόμορφο, όπως αυτές είναι καταχωρημένες σε βάση δεδομένων [89].

3.2.2.4 Ύπαρξη συγγένειας μεταξύ των εμπλεκόμενων ατόμων

Με βάση τους νόμους της κληρονομικότητας του Μέντελ, στην περίπτωση που δύο άτομα είναι συγγενείς μεταξύ τους, η πιθανότητα να μοιράζονται ένα αλληλίο είναι πολύ μεγαλύτερη. Πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των γενετικών προφίλ και οι οποίες λαμβάνουν υπόψιν τους τόσο τη δομή του πληθυσμού όσο και τη συγγένεια των δύο ατόμων [90].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΚΟΠΟΣ

Οι περισσότερες περιπτώσεις διερεύνησης γονικότητας διεξάγονται για την ανάδειξη νομικής ευθύνης ενός παιδιού και αφορούν, είτε τον προβληματισμό ατόμων σε καθαρά προσωπικό επίπεδο (ανεπίσημη πραγματογνωμοσύνη), είτε επιβεβλημένη διερεύνηση, που εμπίπτει στα πλαίσια τόσο του Ποινικού (βιασμός, αιμομιξία, εγκατάλειψη και κακοποίηση εγκυμονούσας), όσο του Αστικού Δικαίου (αναγνώριση εξώγαμου τέκνου, αποποίηση πατρότητας). Σε αυτές τις περιπτώσεις ο έλεγχος εκτελείται κατόπιν δικαστικής απόφασης και από οριζόμενο από το δικαστή ειδικό πραγματογνώμονα. Τα τελευταία χρόνια, αρκετές είναι και οι περιπτώσεις ελέγχου μητρότητας που αφορούν την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (δότες ωαρίων, παρένθετες μητέρες, εξωσωματική γονιμοποίηση).

Σήμερα στον έλεγχο αμφισβητούμενης γονικότητας χρησιμοποιούνται ευρέως οι αυτοσωμικοί μοριακοί δείκτες autosomal Short Tandem Repeats (aSTRs), οι οποίοι κληρονομούνται σύμφωνα με τους κανόνες κληρονομικότητας του Μέντελ. Ο έλεγχος του STR γενετικού προφίλ παρέχει εξαιρετικά υψηλή διακριτική ικανότητα. Ωστόσο, το ποσοστό μετάλλαξης στους STRs γενετικούς τόπους είναι πολύ υψηλό (10^{-6} έως 10^{-2}). Ο κίνδυνος διεξαγωγής ενός τεστ στο οποίο καταγράφονται γενετικές STR ασυμβατότητες είτε λόγω παρουσίας μεταλλάξεων, είτε λόγω αποτυχίας διάκρισης ενός σιωπηλού αλληλίου, μπορεί να έχει τεράστιο αντίκτυπο στα γενετικά τεκμήρια απόδειξης μίας συγγένειας και τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε μια εσφαλμένη έκθεση πραγματογνωμοσύνης. Η αποσαφήνιση τέτοιων δυσεπίλυτων περιπτώσεων απαιτεί πρόσθετες εργαστηριακές δοκιμές, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις στις οποίες το τεστ διεξάγεται χωρίς την συμμετοχή του άλλου γονέα, καθώς η παράλειψη των μητρικών-πατρικών γενετικών δεδομένων μειώνει σημαντικά τα αποδεικτικά στοιχεία της συγγένειας.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της συνεισφοράς των aSTRs γενετικών δεικτών στην διερεύνηση αμφισβητούμενης «πατρότητας» ή «μητρότητας», όπου η προηγηθείσα ανάλυση μέσω aSTRs κατέγραψε αλληλικές ανομοιότητες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη συμπεριελήφθησαν 261 περιπτώσεις ελέγχου αμφισβητούμενης γονικότητας, Αστικού Δικαίου, οι οποίες προσήλθαν στο Τμήμα Ανοσολογίας - Ιστοσυμβατότητας του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ο Ευαγγελισμός – Οφθαλμιατρείο Αθηνών - Πολυκλινική» και αφορούσαν το διάστημα 2014-2019. Συγκεκριμένα, στο σύνολο των περιπτώσεων οι 227 περιπτώσεις αποτελούνταν από την μητέρα, το παιδί και τον καθ' υπόθεση πατέρα (trio cases), ενώ στις 34 περιπτώσεις έλειπε το DNA του/της πατέρα/μητέρας (duo-motherless ή duo-fatherless περιπτώσεις).

Μεταξύ των 261 περιπτώσεων αμφισβητούμενης γονικότητας, με τρία τουλάχιστον ελεγχόμενα άτομα «πατέρας», «μητέρα» και «παιδί», σε 15 περιπτώσεις με επιβεβαιωμένη συγγένεια, εντοπίστηκαν αλληλικές ανομοιότητες μεταξύ του παιδιού και του/της ΦΠ/ΦΜ. Από τα ευρήματα που προέκυψαν αξιολογήθηκαν οι aSTRs γενετικοί τόποι παρουσία των γενετικών δεδομένων του δεύτερου γονέα ή απουσίας του στον έλεγχο αμφισβητούμενης «πατρότητας» ή «μητρότητας». Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι δείκτες PI και W, καθώς και οι δείκτες RMNE και PE τόσο στην περίπτωση παρουσίας των γενετικών δεδομένων του δεύτερου γονέα, αλλά και πώς αυτοί μεταβάλλονται στην περίπτωση απουσίας του γενετικού προφίλ της μητέρας/του πατέρα.

Η δε διαδικασία καταγραφής και αρχειοθέτησης των δειγμάτων καθώς και η προστασία του ιδιωτικού απορρήτου, διεξήχθησαν σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές που ορίζουν οι αρχές των ανθρώπινων δικαιωμάτων. Επιπλέον, ελήφθη συγκατάθεση για γενετικές μελέτες από όλους τους συμμετέχοντες.

5.2 Εργαστηριακοί παράμετροι – Μέθοδοι που μελετήθηκαν

Δείγματα περιφερικού αίματος σε αντιπηκτικό (sodium citrate 2%) ή/και παρειακού επιχρίσματος ελήφθησαν από 690 άτομα Καυκάσιων. Το g-DNA απομονώθηκε από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος μέσω αυτοματοποιημένης

διαδικασίας (Maxwell® 16 Blood DNA Purification kit) ή από κύτταρα παρειαικού επιχρίσματος (Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA kit) και εν συνεχεία το απομονωμένο DNA ποσοτικοποιήθηκε μέσω φασματοφωτομετρίας στο υπεριώδες φάσμα στα 260 nm (NanoPhotometer™ spectrophotometer, Implen GmbH, Germany). Επιπρόσθετα, υπολογίστηκε η καθαρότητα μέσω του λόγου A260/A280, η οποία ήταν πάνω από >1,7.

Σε όλες τις περιπτώσεις ελέγχου προσδιορίστηκαν οι γενετικοί πολυμορφισμοί με τεχνικές μοριακής βιολογίας 16 γενετικών τόπων STRs (Short Tandem Repeats) μέσω της PCR-Fragment Analyses μεθοδολογίας.

Συγκεκριμένα, 690 δείγματα g-DNA ενισχύθηκαν μέσω της πολυπλεκτικής PCR (multiplex PCR) στους 16 aSTRs (autosomal Short Tandem Repeats) γενετικούς τόπους: *D10S1248*, *vWA*, *D16S539*, *D2S1338*, *D8S1179*, *D21S11*, *D18S51*, *D22S1045*, *D19S433*, *TH01*, *FGA*, *D2S441*, *D3S1358*, *D1S1656*, *D12S391*, *SE33* και στην γενετική περιοχή για τον προσδιορισμό του φύλου (*Amelogenin marker HUMAMEL*), κάνοντας χρήση του AmpFI STR® NGM SElect™ PCR kit (Applied Biosystems). Η ανίχνευση των γραμμικών θραυσμάτων DNA έγινε με βάση το μοριακό τους βάρος μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (capillary electrophoresis-CE) στον ABI 3130 γενετικό αναλυτή της Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Ως πολυμερές διαχωρισμού χρησιμοποιήθηκε το POP-4™ πολυμερές της Applied Biosystems.

Για την aSTR γονοτύπηση (DNA profiling) χρησιμοποιήθηκε το GeneMapper® IDX1.3 λογισμικό (Applied Biosystems, Foster City CA).

5.3 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα της aSTRs ανάλυσης για κάθε περίπτωση αμφισβητούμενης πατρότητας/μητρότητας συγκρίθηκαν μεταξύ τους και οδηγήθηκαν σε αποκλεισμό ή μη αποκλεισμό της γονικότητας για κάθε «φερόμενο» ως γονέα (ΦΓ).

Η πατρότητα/μητρότητα αποκλείεται στις περιπτώσεις που το πατρικής/μητρικής προέλευσης κληρονομούμενο αλληλίο απουσιάζει σε τουλάχιστον τρεις aSTR γενετικούς τόπους. Συγκεκριμένα, για την STRs ανάλυση υπήρξε η εξής κατηγοριοποίηση: α) η συγγένεια απορρίφθηκε όταν ο αριθμός των ασύμβατων STRs γενετικών τόπων ήταν ≥ 3 , β) η συγγένεια δεν απορρίφθηκε, όταν ο αριθμός των ασύμβατων STRs γενετικών τόπων ήταν < 3 και το CPI κυμάνθηκε μεταξύ $0,0001 < \text{CPI} < 10.000$ και γ) η συγγένεια επιβεβαιώθηκε όταν ο αριθμός των ασύμβατων

STR γενετικών τόπων ήταν <3 και $CPI \geq 10.000$. Τα δεδομένα που προέκυψαν από τον μοριακό έλεγχο στην περίπτωση μη αποκλεισμού, αναλύθηκαν με τις τρέχουσες παραδεκτές μεθόδους στατιστικής [90] για την εξαγωγή των δεικτών: PE, RMNE, PI, CPI και W. Για τον δε υπολογισμό τους χρησιμοποιήθηκε πληθυσμιακή βάση δεδομένων Καυκάσιων [91].

Τα στατιστικά προγράμματα Cervus 2.0 και Genepop 4.0.10 (<http://genepop.curtin.edu.au/>) χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των δεικτών PE και RMNE [85]. Παράλληλα, με σκοπό τη δημιουργία των γενεαλογικών δένδρων (pedigrees) και τον υπολογισμό των CPI και W δεικτών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα «Famílias» (<http://www.nr.no/familias>) σύμφωνα με τις οδηγίες και τις συστάσεις ISFG.

Ως κριτήριο συσχέτισης ποιοτικών χαρακτηριστικών χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία X^2 κατά Pearson. Για την παρουσίαση της σχέσης ποιοτικών χαρακτηριστικών υπολογίστηκαν οι σχετικοί λόγοι συμπληρωματικών πιθανοτήτων (μονοπαραμετρικό Odds Ratio). Για τις παραπάνω στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό λογισμικό SPSS 17. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά εάν το p-value ήταν μικρότερο του 0,05.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ

(Γενικές αρχές τεχνικών – Περιγραφή - Αντιδραστήρια)

Για τη γονοτύπηση των STRs αλληλίων εφαρμόστηκε η μέθοδος **DNA Fragment Analysis** μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (Capillary Electrophoresis-CE) και της χρήσης του γενετικού αναλυτή ABI 3130 (Applied Biosystems -Foster City, CA, USA).

Η ενίσχυση και ανάλυση των γονιδιακών θραυσμάτων DNA περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Σήμανση των γραμμικών θραυσμάτων DNA του υπό εξέταση δείγματος με πολλαπλές φθορίζουσες χρωστικές, μέσω εκκινητών συζευγμένων με αυτά, μία εκ των οποίων χρησιμοποιείται για την σήμανση του προτύπου μεγέθους (size standard) που υπάρχει σε κάθε δείγμα.
- Ενίσχυση των σημασμένων γονιδιακών θραυσμάτων DNA εφαρμόζοντας την πολυπλεκτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (multiplex-PCR).
- Διαχωρισμός των γραμμικών θραυσμάτων DNA κατά μέγεθος εφαρμόζοντας CE ηλεκτροφόρηση.
- ανάλυση των δεδομένων με τη χρήση του κατάλληλου λογισμικού για τον προσδιορισμό (Σχήμα 6.1):
 - α) **του μεγέθους** (bp): το λογισμικό ανάλυσης καθορίζει το σχετικό μέγεθος κάθε επισημασμένου με φθορίζουσα χρωστική γραμμικού θραύσματος DNA του υπό εξέταση δείγματος, συγκρίνοντάς το με τα γνωστά μεγέθη γονιδιακών θραυσμάτων του πρότυπου μεγέθους (fragment analysis).
 - β) **του STR γονοτύπου**: το λογισμικό ανάλυσης αντιστοιχεί το σχετικό μέγεθος κάθε σημασμένου με φθορίζουσα χρωστική γραμμικού θραύσματος DNA σε bp με γνωστά αλληλόμορφα STRs γενετικών τόπων, καθορισμένα από το χρήστη (STR genotyping).



Σχήμα 6.1: Διαδικασία STR γονοτυπικής ανάλυσης. Απαιτούνται πακέτα λογισμικού για DNA fragment analysis και STR genotyping (GeneScan Software-πεδία 2,3,4), (Genotyper Software-πεδία 5,6), αλλά και η εκτεταμένη ανασκόπηση των δεδομένων από εκπαιδευμένους αναλυτές/εξεταστές είναι απαραίτητη

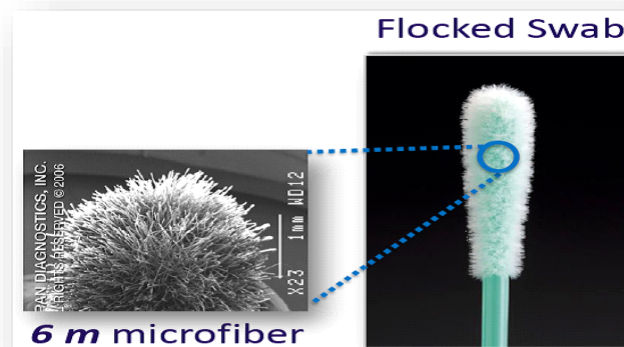
6.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα βιολογικά δείγματα που λαμβάνονται μπορεί να είναι πλήρες ολικό αίμα από τα ενήλικα άτομα και παρειακό επίχρισμα από τα ανήλικα τέκνα. Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η λήψη του βιολογικού δείγματος για καθεμία περίπτωση είναι:

1. **Πλήρες ολικό αίμα:** η λήψη γίνεται με απλή φλεβοκέντηση σύμφωνα με τους παγκόσμιους κανόνες ασφαλείας σε σωληνάρια με αντιπηκτικό (EDTA ή Sodium Citrate). Άτομα τα οποία έχουν υποβληθεί πρόσφατα σε μετάγγιση αίματος πρέπει να αναμένουν τουλάχιστον 3 μήνες μέχρι την λήψη, ενώ άτομα τα οποία έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση μυελού των οστών δεν μπορούν να υποβληθούν σε αυτή την εξέταση [92].
2. **Παρειακό επίχρισμα:** το παρειακό επίχρισμα λαμβάνεται με την χρήση στυλεών από το εσωτερικό μέρος της στοματικής κοιλότητας με περιστροφικές κινήσεις.

Στις μέρες μας αποτελεί την πλέον αποδεκτή μέθοδο για τη συλλογή δειγμάτων DNA από ανήλικα άτομα και αντιπροσωπεύει τη μέθοδο εκλογής. Σε αντίθεση με το πλήρες ολικό αίμα ή κηλίδες αίματος πάνω σε κάρτες FTA®, το άτομο που πραγματοποιεί την λήψη δεν εκτίθεται σε κανενός είδους μολυσματικό παράγοντα. Τέλος, η εξέταση δεν επηρεάζεται από το γεγονός ότι τα ελεγχόμενα άτομα μπορεί να έχουν υποβληθεί σε μετάγγιση ή σε μεταμόσχευση μυελού των οστών. Μετά την λήψη του δείγματος οι στυλεοί αφήνονται για λίγο χρόνο (15 λεπτά) στον αέρα για να στεγνώσει το σάλιο, ούτως ώστε τα ένζυμα που περιέχει να μην καταστρέψουν το DNA και ακολούθως τοποθετούνται σε ειδικό φάκελο ή σε ειδικό σωληνάριο που φέρουν αφύγρανση [93].

Η συλλογή του παρειακού επιχρίσματος των υπό εξέταση δειγμάτων με σκοπό την απομόνωση g-DNA πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του 4N6FLOQSwab. Εφαρμόζεται πατενταρισμένη τεχνολογία, που βασίζεται σε ένα σύνολο ινιδίων, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη ανάκτηση του DNA και η αποτελεσματική έκλουσή του. Σχεδιασμένα για ταχεία απορρόφηση και γρήγορη απελευθέρωση του δείγματος, αυξάνουν την ευαισθησία σε δείγματα αναφοράς και δείγματα ιατροδικαστικών υποθέσεων (κηλίδες αίματος, επιδερμίδα και άλλα βιολογικά υλικά εγκληματικού ενδιαφέροντος), περιορισμένης ποσότητας ή ίχνη DNA. Δεν περιέχουν DNase, RNase ή ανθρώπινο DNA, το οποίο θα μπορούσε να ενισχυθεί δίνοντας λανθασμένα αποτελέσματα. Είναι ειδικά επεξεργασμένα με αντιμικροβιακά αντιδραστήρια, όπως το ETO (Ethylene Oxide, αιθοξυλομάδα), παρεμποδίζοντας έτσι την μικροβιακή επιμόλυνση [93].



Εικόνα 6.2: Μορφολογία του 4N6FLOQSwab στυλεού.

6.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA (GENOMIC-DNA, G-DNA)

Για την απομόνωση του g-DNA χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

1. ειδικό kit απομόνωσης DNA από περιφερικό αίμα, κάνοντας χρήση του Maxwell® 16 Blood DNA Purification kit, εφαρμόζοντάς το σε πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα απομόνωσης Maxwell® 16 MDx Instrument για τους **υπό έλεγχο γονείς** και
2. ειδικό kit απομόνωσης DNA από παρειακό επίχρισμα (buccal swabs), κάνοντας χρήση του Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA kit εφαρμόζοντάς το σε πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα απομόνωσης Maxwell® 16 MDx Instrument για **τα υπό έλεγχο τέκνα**.

6.2.1 Απομόνωση g-DNA περιφερικού αίματος με τη χρήση Maxwell® 16 Blood DNA Purification kit

6.2.1.1 Maxwell® 16 MDx Instrument (Cat. # AS3000)

Πρόκειται για ένα πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα με δυνατότητα απομόνωσης DNA, RNA ή πρωτεϊνών από τα ακόλουθα [94]:

- ολικό αίμα (αρχικού όγκου δείγματος 20-400μl)
- buffy coat (αρχικού όγκου δείγματος 250-500μl)
- ιστός (αρχικού όγκου δείγματος έως 100mg)
- κύτταρα (αρχικού όγκου δείγματος έως $4,2 \times 10^6$ κύτταρα)
- εγκληματολογικά υλικά: (κηλίδα αίματος, σίελος (buccal swabs)), δείγματα σάρωσης, τρίχα, νύχι, τσίχλα, αποτσίγαρα κλπ).

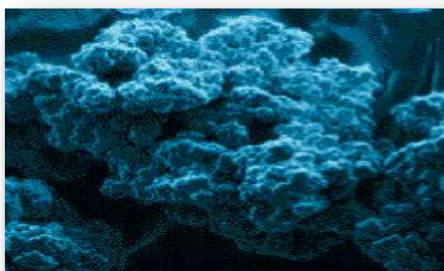


Εικόνα 6.3: Συσκευή Maxwell® 16 Blood DNA Purification kit.

6.2.1.2 Αρχή της μεθόδου

Η απομόνωση των νουκλεϊνικών οξέων επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των **παραμαγνητικών σφαιριδίων** (MagneSil™ Paramagnetic Particles-PMPs) και **μαγνητίτη** (magnetite) σε αναλογία 1:1, κατασκευασμένα από την Promega Corporation. Ο **μαγνητίτης** είναι ένα ορυκτό σιδήρου, το οποίο από χημικής άποψης πρόκειται για ένα επιτεταρτοξείδιο του σιδήρου (Fe_3O_4). Περιέχει περίπου 72,4% σίδηρο (Fe) και 27,6% οξυγόνο (O) και φέρει μαγνητικές ιδιότητες. Τα **παραμαγνητικά σφαιρίδια** είναι επικαλυμμένα με διοξείδιο του πυριτίου (SiO_2) μικροσωματίδια και φέρουν πυρήνα μαγνητίτη (Fe_3O_4). Η βιομηχανική διαδικασία παρασκευής των παραμαγνητικών σφαιριδίων έχει σαν αποτέλεσμα το διοξείδιο του πυριτίου να περικλείει τον μαγνητίτη, εξαλείφοντας την έκπλυση και τη μη ειδική δέσμευση μορίων στο σίδηρο του μαγνητίτη. Μια σχετικά υψηλή συγκέντρωση μαγνητίτη καθιστά τα σφαιρίδια εξαιρετικά ευαίσθητα σε ένα μαγνητικό πεδίο. Τα σφαιρίδια είναι «παραμαγνητικά» στη φύση τους, δηλαδή έλκονται από έναν μαγνήτη όταν είναι τοποθετημένα σε ένα μαγνητικό πεδίο, αλλά δεν διατηρούν «μαγνητική μνήμη» σχετικά με τη μεταφορά τους στο μαγνητικό πεδίο. Αυτό το χαρακτηριστικό εμποδίζει τη συσσώρευση και επιτρέπει την εύκολη διασπορά των σφαιριδίων. Η πρόσδεση του DNA στα σφαιρίδια πραγματοποιείται παρουσία χαοτροπικών αλάτων, όπως υδροχλωρική γουανιδίνη (Guanidine hydrochloride), θειοκυανιούχος γουανιδίνη (Guanidine thiocyanate) κ.ά, τα οποία διαθέτουν δυνατότητα λύσης των κυττάρων, καθώς και αδρανοποίησης των νουκλεασών [95].

Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι σε ένα βελτιστοποιημένο διάλυμα δέσμευσης (παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων χαοτροπικών αλάτων υπό όξινες συνθήκες), τα παραμαγνητικά σφαιρίδια δεσμεύουν επιλεκτικά νουκλεϊκά οξέα από σύνθετα μίγματα. Έτσι, λόγω του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου που εφαρμόζεται, τα παραμαγνητικά σφαιρίδια προσκολλώνται στην επιφάνεια που βρίσκεται ο εξωτερικός μαγνήτης και με αυτό τον τρόπο το DNA διαχωρίζεται από τα άλλα μακρομόρια του κυττάρου. Στη συνέχεια εκλούεται καθαρό αφού προηγηθούν διαδοχικές πλύσεις [95].

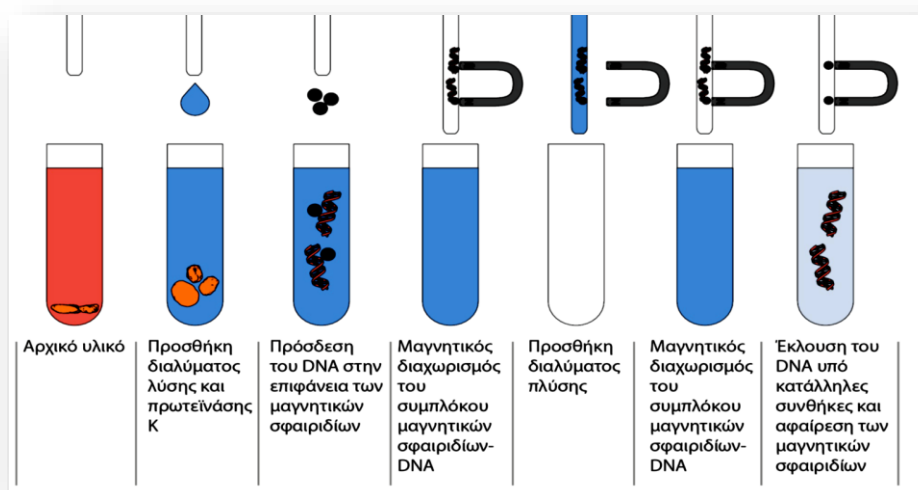


Εικόνα 6.4: Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης των παραμαγνητικών σφαιριδίων MagneSil Paramagnetic Particles.

6.2.1.3 Τεχνική

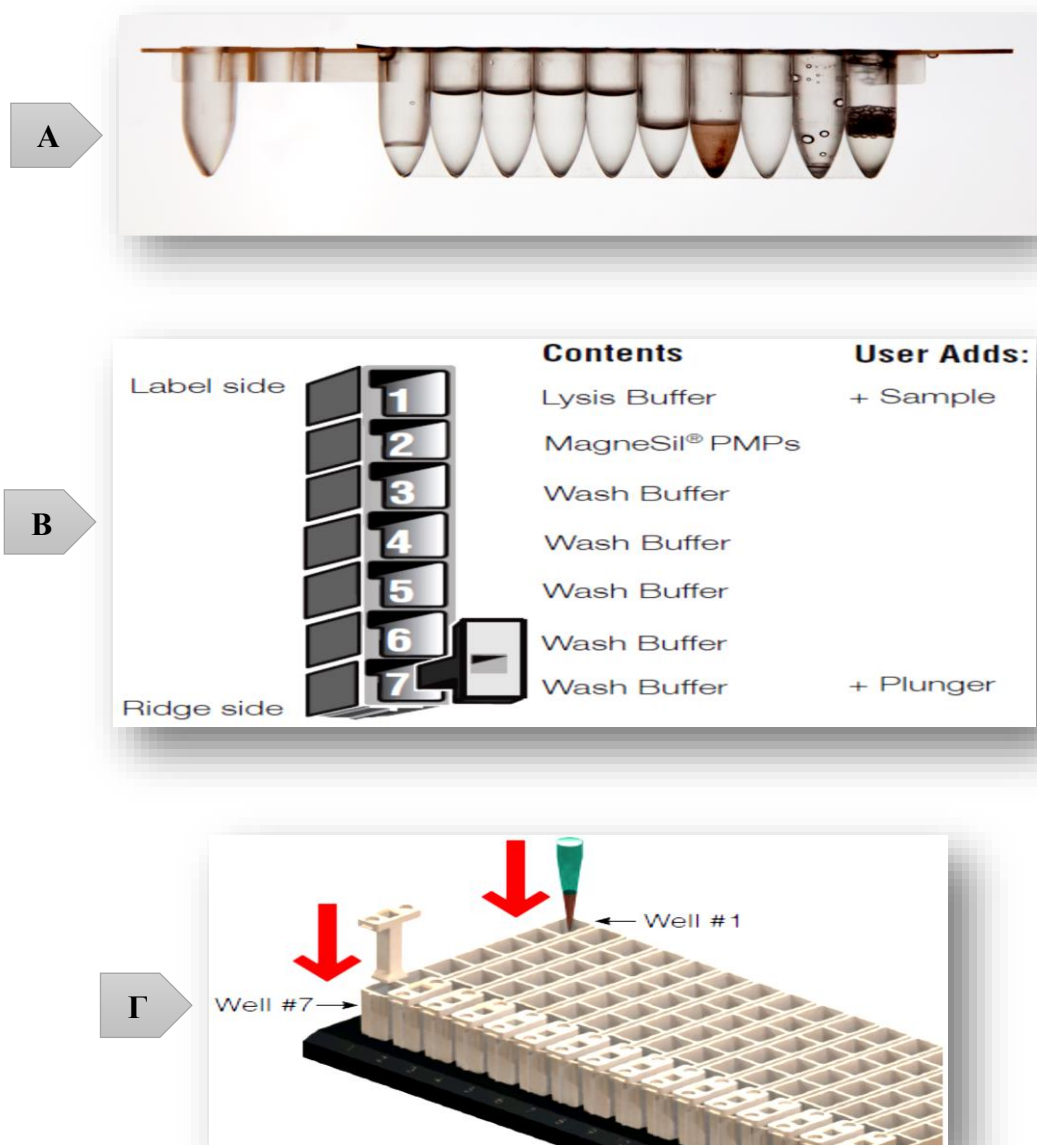
Το g-DNA των δειγμάτων απομονώθηκε από ειδικό σωληνάριο το οποίο περιείχε ολικό αίμα με αντιπηκτικό Sodium Citrate 3,8%.

Η μέθοδος περιλαμβάνει τρία βήματα: πρόσδεση, έκπλυση και έκλυση. Η διαδικασία απομόνωσης του DNA ξεκινάει με την λύση των κυττάρων παρουσία χαοτροπικών αλάτων και απορρυπαντικού και την απελευθέρωση του DNA. Στην συνέχεια, προστίθενται τα παραμαγνητικά σφαιρίδια και το κυτταρικό DNA προσδένεται στα σφαιρίδια κυρίως μέσω δύο μηχανισμών δέσμευσης. Αυτοί είναι: α) ελκτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φωσφορικών ομάδων του DNA και ομάδων σιλανόλης που βρίσκονται στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου και β) υδρόφοβη σύνδεση ανάμεσα σε μια βάση του DNA και σε μια υδρόφοβη περιοχή του διοξειδίου του πυριτίου. Ο κεντρικός πυρήνας μαγνητίτη δίνει την δυνατότητα στα παραμαγνητικά σφαιρίδια να διαχωριστούν από το διάλυμα όταν τοποθετηθούν σε ένα μαγνητικό πεδίο, καθώς λόγω του μαγνητίτη τα σφαιρίδια έλκονται από τον εξωτερικό μαγνήτη. Με αυτόν τον τρόπο, το σύμπλοκο DNA-σφαιρίδια, διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα μακρομόρια του κυττάρου. Αφού γίνουν διαδοχικές πλύσεις ώστε να απομακρυνθούν τα μη δεσμευμένα κυτταρικά στοιχεία, άλατα και άλλοι αναστολείς, τα σφαιρίδια αναμιγνύονται με ένα ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης το οποίο είναι ελαφρά αλκαλικό και εμφανίζει χαμηλή αλατότητα. Με αυτό τον τρόπο το DNA διαχωρίζεται από τα σφαιρίδια, συλλέγεται και είναι έτοιμο για ανάλυση (Εικόνα 6.5) [96].



Εικόνα 6.5: Στάδια μεθόδου απομόνωσης g-DNA. Στο πρώτο βήμα γίνεται η λύση των κυττάρων ώστε να απελευθερωθεί το gDNA. Στη συνέχεια το gDNA προσδένεται στα PMPs και το σύμπλοκο gDNA-PMPs δεσμεύεται στο μαγνήτη και ακολούθως υπόκεινται σε διαδοχικές πλύσεις. Τέλος γίνεται η έκλυση του gDNA.

Η συνολική απόδοση του Maxwell® 16 Blood DNA Purification kit στην απομόνωση g-DNA από δείγματα ολικού αίματος εξαρτάται από τον όγκο του δείγματος και τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος/ml. Ο όγκος του δείγματος του πλήρους αίματος που χρησιμοποιείται είναι από 700 µl με ένα μέσο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων γύρω στα $4,2 \times 10^6$ έως $1,2 \times 10^7$ /ml πλήρους αίματος (τιμές για ένα υγιές ενήλικο άτομο).



Εικόνα 6.6: A, B) Κασέτα με προδιανεμημένα αντιδραστήρια. Η κασέτα περιέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια για τη διαδικασία απομόνωσης του DNA και χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με αυτόματα συστήματα απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων. **Γ) Maxwell® 16 DNA Purification Kit:** περιεχόμενα ενός kit καθαρισμού αίματος, κυττάρων ή ιστών. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα δείγματα προστίθενται στη θέση # 1 και τα έμβολα (plungers) στη θέση #7.

Πίνακας 6.1: Βήματα εργασίας για την απομόνωση g-DNA από περιφερικό αίμα κάνοντας χρήση του αναλυτή Maxwell® 16 DNA Purification Kit.

<u>Βήμα 1</u>
1) Φόρτωση δειγμάτων. Οι φύσιγγες οι οποίες περιέχουν προδιανεμημένα όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια τοποθετούνται στη βοηθητική βάση. Κάθε φύσιγγα αντιστοιχεί σε ένα δείγμα
2) Αφαίρεση του αεροστεγούς καλύμματος από κάθε φύσιγγα
3) Τοποθέτηση των εμβόλων (plungers) στη θέση #7 της κάθε φύσιγγας
4) Φόρτωση 700μL από κάθε δείγμα αίματος (αφού πρώτα έχει αναδευτεί ή έχει ξεπαγωθεί και αναδευτεί αν πρόκειται για κατεψυγμένο) στη θέση #1 της κάθε φύσιγγας
<u>Βήμα 2</u>
Επιλογή του κατάλληλου προγράμματος για την απομόνωση του g-DNA από τη συσκευή Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit
<u>Βήμα 3</u>
1) Οι φύσιγγες μεταφέρονται από τη βοηθητική βάση στην πλατφόρμα του Maxwell 16
2) Οι μπλε κυβέτες έκλουσης του DNA τοποθετούνται στις ειδικές εσοχές της πλατφόρμας απέναντι από κάθε φύσιγγα
3) Προσθήκη 400μL ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (elution buffer) σε κάθε κυβέτα
4) Επιλογή του κατάλληλου προγράμματος από τη συσκευή του Maxwell® 16 Blood DNA Purification kit και έναρξη της διαδικασίας απομόνωσης
<u>Βήμα 4</u>
1) Ηχητικό σήμα και αναγραφή μηνύματος στην οθόνη παραπέμπουν στο τέλος της διαδικασίας απομόνωσης
2) Οι μπλε κυβέτες με το έκλουμα του DNA μεταφέρονται στο μαγνητικό διαχωριστή
3) Με τη χρήση πιπέτας το έκλουμα μεταφέρεται σε σωληνάρια αποθήκευσης. Κατά τη μεταφορά του εκλούματος δίνεται προσοχή ώστε οι μπλε κυβέτες να μην ανασκόνονται από τη μαγνητική βάση
4) Οι φύσιγγες και τα έμβολα απορρίπτονται σε κατάλληλους κάδους συλλογής απορριμμάτων και η πλατφόρμα της συσκευής Maxwell 16 καθαρίζεται με διάλυμα αιθανόλης περιεκτικότητας 70%

Η συνολική απόδοση του γονιδιωματικού DNA από τα δείγματα πλήρους αίματος εξαρτάται από τον όγκο του δείγματος και τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων ανά mL (white blood cells/ml). Κάθε κασέτα που παρέχεται από τη συσκευή Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit έχει σχεδιαστεί για τον καθαρισμό του g-DNA από 700 μ l πλήρους αίματος, υποθέτοντας ότι ο μέσος αριθμός λευκοκυττάρων αίματος κυμαίνεται από $4,2 \times 10^6$ έως $1,2 \times 10^7$ / ml πλήρες αίματος (τιμές για έναν κανονικό υγιή ενήλικα). Η υπέρβαση του συνιστώμενου όγκου ή η χρήση δείγματος με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων εκτός αυτού του εύρους μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς την απόδοση και την ποιότητα του καθαρισμένου γενωμικού DNA.

6.2.2 Απομόνωση g-DNA παρειακού επιχρίσματος (buccal swabs) με τη χρήση του Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA kit

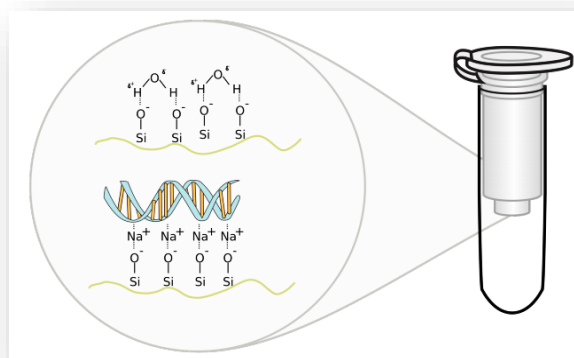
Η απομόνωση του g-DNA από παρειακό επίχρισμα πραγματοποιήθηκε κάνοντας χρήση του **PureLink® Genomic DNA Mini kit**. Η αρχή της μεθόδου περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

6.2.2.1 Αρχή μεθόδου

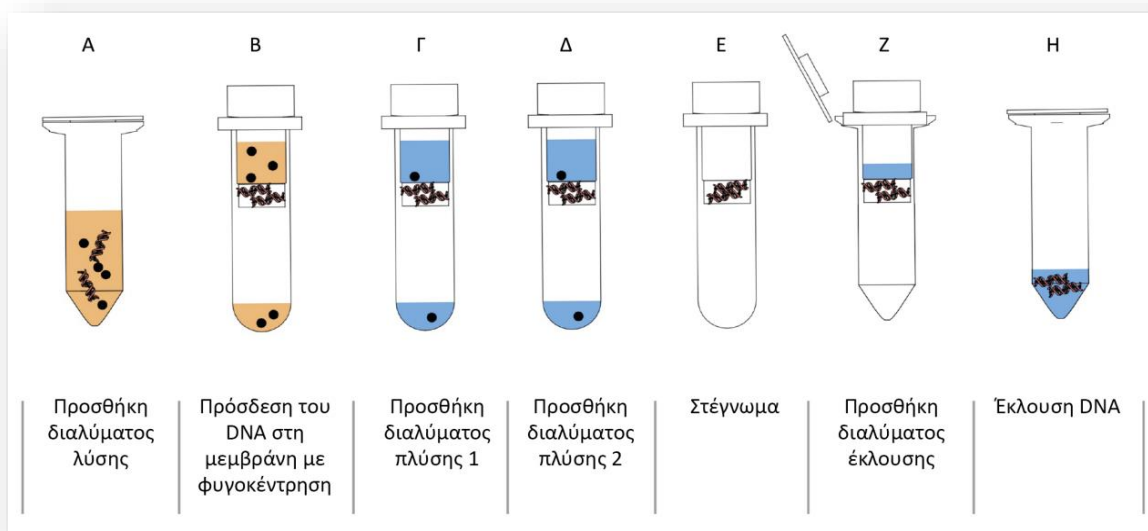
Το **PureLink® Genomic DNA Mini Kit** βασίζεται στην επιλεκτική δέσμευση του DNA σε μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου (silica-based membrane) παρουσία χαοτροπικών αλάτων. Το κυτταρόλυμα μπορεί να προκύψει από μία ποικιλία υλικών όπως ιστοί, κύτταρα ή αίμα. Τα κύτταρα ή οι ιστοί πέπτονται με πρωτεϊνάση K στους 55°C χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα πέψης, που βοηθά στην πρωτεϊνική μετουσίωση και ενισχύει τη δράση πρωτεϊνάσης K. Τυχόν υπολείμματα νουκλεϊνικού RNA απομακρύνονται με πέψη κάνοντας χρήση RNase A, πριν από την πρόσδεση των δειγμάτων στην μεμβράνη του διοξειδίου πυριτίου. Το κυτταρόλυμα αναμιγνύεται με αιθανόλη και με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης του DNA (PureLink^R Genomic Binding Buffer), το οποίο επιτρέπει υψηλή δέσμευση του g-DNA με την ειδική στήλη (PureLink^R Spin Column), καθώς τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA έχουν μεγάλη συγγένεια προς τα θετικά φορτισμένα μόρια του πυριτίου της μεμβράνης. Το g-DNA δεσμεύεται στη μεμβράνη του διοξειδίου του πυριτίου της στήλης και τα υπόλοιπα μακρομόρια του κυττάρου απομακρύνονται με διεξοδική πλύση μέσω ρυθμιστικών διαλυμάτων πλύσης (PureLink^R washing buffer 1&2). Το g-

DNA στη συνέχεια εκλύεται κάνοντας χρήση χαμηλής ιοντικής ισχύος ρυθμιστικών διαλυμάτων αλάτων (Elution buffer) [97].

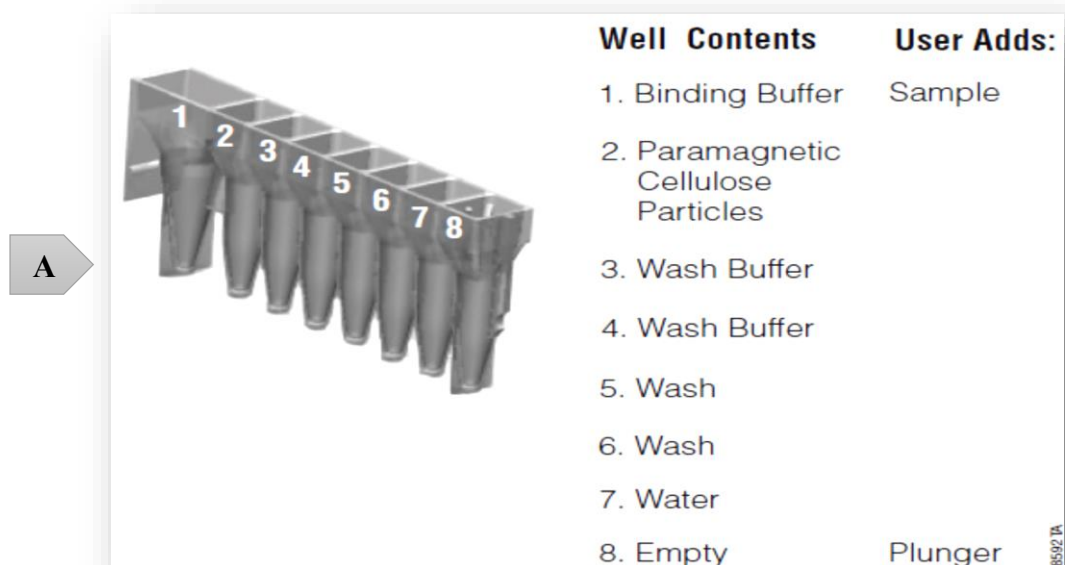
Τα βήματα απομόνωσης αναγράφονται αναλυτικά στον πίνακα 6.2. Το απομονωμένο DNA είναι 20-50 kb σε μέγεθος και είναι κατάλληλο για PCR, για πέψη με περιοριστικά ένζυμα αλλά και Southern blotting τεχνική. Το PureLink® Genomic DNA Mini Kit έχει σχεδιαστεί για την απομόνωση υψηλής ποιότητας g-DNA από ιστούς θηλαστικών, δείγματα αίματος, παρειικά επιχρίσματα (buccal swabs), βακτήρια, ζυμομύκητες, ιστούς εγκλεισμένους σε παραφίνη και σταθεροποιημένους με φορμαλίνη (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded-FFPE) και σε Oragene™ διατηρημένο σίελο.



Εικόνα 6.7: Πρόσδεση των DNA μορίων σε μια μεμβράνη με γέλη πυριτίου. Στη μεμβράνη πυριτίου μιας στήλης δεσμεύονται μόρια νερού και μόρια DNA παρουσία διαλύματος υψηλής αλατότητας. Εικόνα: «Qiagen Mini Spin Column» από Sq uidonius (talk), με άδεια Public Domain. Πηγή: Wikimedia Commons.



Εικόνα 6.8: Στάδια απομόνωσης γενωμικού DNA με στήλες που φέρουν μεμβράνη πυριτίου.



Εικόνα 6.9: **A) Κασέτα Maxwell® 16 LEV DNA Purification.** Περιεχόμενα ενός kit καθαρισμού παρειακού επιχρίσματος. Σε όλες τις περιπτώσεις τα δείγματα προστίθενται στη θέση # 1. **B) Ρύθμιση και διαμόρφωση της κασέτας Maxwell® 16 LEV στις αντίστοιχες θέσεις της συσκευής.** Το διάλυμα έκλουσης προστίθεται στα σωληνάρια έκλουσης όπως υποδεικνύεται στο σχήμα.

6.2.2.2 Τεχνική

Πίνακας 6.2: Βήματα εργασίας για την απομόνωση g-DNA παρειακού επιχρίσματος κάνοντας χρήση του αναλυτή Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA kit.

Βήμα 1	Συλλογή δείγματος
Βήμα 2	Συναρμολόγηση μίας στήλης καθαρισμού για κάθε δείγμα
Βήμα 3	Ανάμειξη 300 μL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης + 30 μL πρωτεΐνης K για κάθε δείγμα, σε ξεχωριστό σωληνάριο
Βήμα 4	Προσθήκη 330 μL διαλύματος λύσης/πρωτεΐνης K στην κεφαλή του στυλεού (SWAB) στη στήλη καθαρισμού
Βήμα 5	Vortex για 10 δευτερόλεπτα
Βήμα 6	Επώαση για 20 λεπτά στους 56 ° C
Βήμα 7	Φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα
Βήμα 8	Αφαίρεση της στήλης καθαρισμού με την κεφαλή του στυλεού (SWAB) και απόρριψή της
Βήμα 9	Προσθήκη του κυτταρολύματος στη θέση # 1 της κάθε φύσιγγας Maxwell® 16 LEV
Βήμα 10	Τοποθέτηση των εμβόλων (plungers) στη θέση #8 της κάθε φύσιγγας
Βήμα 11	Τοποθέτηση ενός κενού σωληναρίου έκλουσης στη θέση #8 της κάθε φύσιγγας
Βήμα 12	Προσθήκη 50 μL διαλύματος έκλουσης στον πυθμένα κάθε σωληναρίου έκλουσης
Βήμα 13	Επιλογή του κατάλληλου προγράμματος από τη συσκευή Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA kit και έναρξη της διαδικασίας απομόνωσης
Βήμα 14	Μετά το τέλος της έκλουσης, κάθε σωληνάριο έκλουσης αφαιρείται, καλύπτεται και αποθηκεύεται κατάλληλα μέχρι να χρησιμοποιηθεί
Βήμα 15	Οι φύσιγγες και τα έμβολα απορρίπτονται σε κατάλληλους κάδους συλλογής απορριμμάτων και η πλατφόρμα της συσκευής Maxwell 16 καθαρίζεται με διάλυμα αιθανόλης περιεκτικότητας 70%

6.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ g-DNA

Ο έλεγχος της καθαρότητας και η ποσοτικοποίηση του απομονωμένου g-DNA (διαλυτοποιημένο σε nuclease-free διάλυμα έκλουσης-10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8) έγινε μέσω φασματοφωτομετρίας στο υπεριώδες φάσμα στα 260nm [98], κάνοντας χρήση του NanoPhotometer™ σπεκτροφωτόμετρου (Implen GmbH, Germany).

Ο λόγος (OD260/OD280) εκφράζει την καθαρότητα του δείγματος DNA

Για υψηλής καθαρότητας DNA ο λόγος =1,8-2,0

✓ Επιμόλυνση με πρωτεΐνες ο λόγος $\frac{OD260}{OD280} < 1,8$

✓ Επιμόλυνση με RNA ο λόγος $\frac{OD260}{OD280} > 2,0$

απορρόφηση στα 260 nm x συντελεστή αραίωσης x 50 = μg/ml DNA

Η μέγιστη ποσότητα του DNA για το AmpFlSTR® NGM SElect™ kit είναι 1,0ng σε έναν μέγιστο όγκο 10μL για 29 κύκλους.

6.4 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ g-DNA ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)

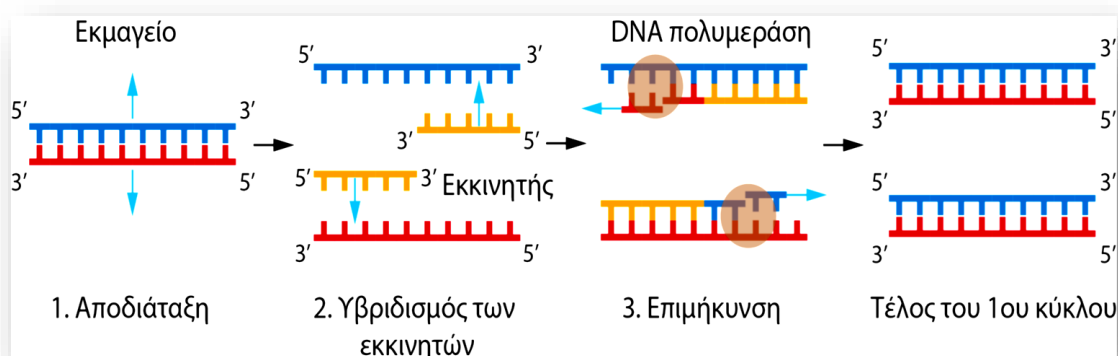
6.4.1 Ιστορική ανασκόπηση

Βασικός σταθμός στην Μοριακή Διαγνωστική και το χαρακτηρισμό των διαφόρων γενετικών ασθενειών αποτέλεσε η επινόηση μοριακών μεθόδων ενίσχυσης του g-DNA και κυρίως της PCR. Η PCR είναι η μέθοδος που έφερε πραγματική επανάσταση στη μοριακή βιολογία από την ανακάλυψή της το 1983. Πρόκειται για μία *in vitro* ενζυμική αντίδραση, η οποία εκμεταλλεύεται ορισμένα χαρακτηριστικά του *in vivo* μηχανισμού αντιγραφής του DNA, με σκοπό τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων τμημάτων του αρχικού γενετικού υλικού και κατ' επέκταση την ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Ο τελικός σκοπός της αντίδρασης είναι ο εκθετικός πολλαπλασιασμός ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA που αποτελεί το στόχο της αντίδρασης, έτσι ώστε να είναι εφικτή η περαιτέρω μελέτη του με διάφορες μεθόδους, όπως η αλληλούχιση, η πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, η ηλεκτροφόρηση κ.ά. Η αλληλουχία του νουκλεϊνικού οξέος-στόχου μπορεί να είναι ένα απλό γονίδιο, ένα τμήμα γονιδίου ή μια μη κωδικοποιούσα αλληλουχία. Η αντίδραση εκτελείται σε τρία επαναλαμβανόμενα στάδια: (α) αποδιάταξη του γενετικού υλικού, (β) υβριδισμός των

εκκινητών στη συμπληρωματική τους αλληλουχία του DNA και (γ) επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας DNA. Η ταχύτητα, η ειδικότητα, η μεγάλη ευαισθησία και το χαμηλό της κόστος την καθιστούν μια από τις πλέον χρησιμοποιούμενες μεθόδους σε ερευνητικό και διαγνωστικό επίπεδο [99].

Η αντίδραση PCR σχεδιάστηκε και παρουσιάστηκε από τον Dr Kary Mullis το 1983, ο οποίος τότε εργάζονταν στην εταιρεία βιοτεχνολογίας *Cetus Corporation* στο Emeryville της Καλιφόρνιας. Το 1989 το περιοδικό *Science* επέλεξε την PCR σαν το «μέγιστο επιστημονικό επίτευγμα» και την Taq DNA πολυμεράση σαν το «μόριο της χρονιάς» και εν συνεχεία το 1993 ο Kary Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας.

Έχει δε, εφαρμογές σε μία πολύ μεγάλη ποικιλία βιολογικών δειγμάτων, ακόμη και σε «αρχαϊκά» δείγματα, όπως οστά, στα οποία το DNA βρίσκεται σε αποδομημένη μορφή. Από τη μελέτη του ανθρωπίνου γονιδιώματος (Human Genome Project), στην έρευνα στόχων και στην ανάπτυξη γονιδιακών θεραπειών, υπάρχουν λίγες μόνο περιοχές της γενετικής έρευνας που δεν εξαρτώνται από την PCR σήμερα.



Εικόνα 6.10: Τα στάδια της PCR αντίδρασης

Πίνακας 6.3: Τυπικό πρόγραμμα PCR για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA.

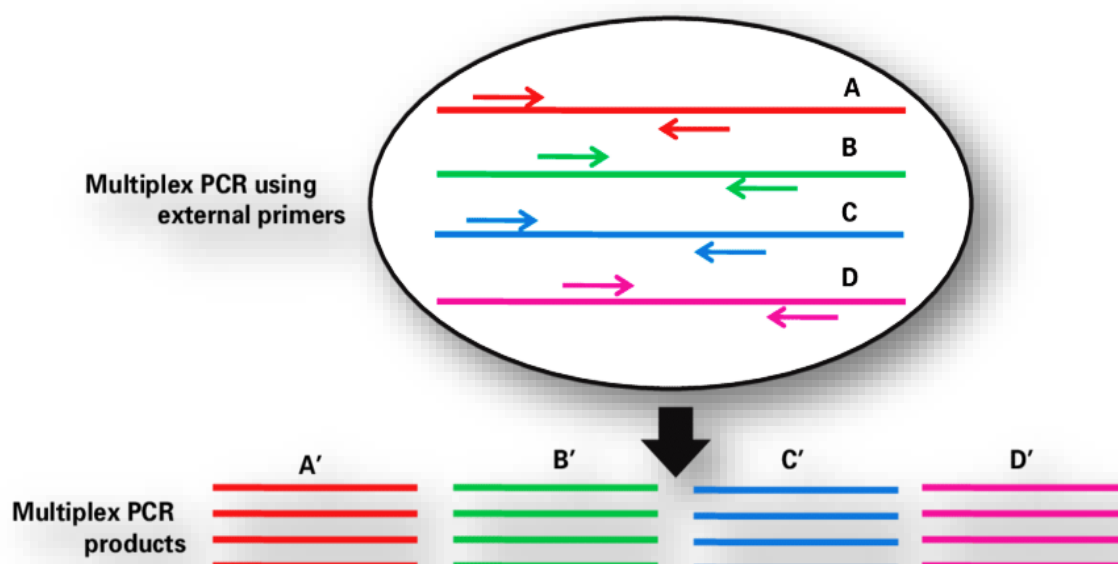
Συνθήκες	Αρχικό στάδιο επώασης	Βέλτιστος αριθμός κύκλων (30)			Τελική επιμήκυνση	Τελικό στάδιο
		Αποδιάταξη	Υβριδισμός	Επιμήκυνση		
Θερμοκρασία	94 °C	94 °C	67 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Χρόνος	5 min	15-30 sec	15-30 sec	45 sec	10 min	∞

Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί πολυάριθμες παραλλαγές της PCR. Μία από αυτές είναι η multiplex-PCR, η οποία εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη.

6.4.2 Multiplex-PCR (Edwards και Gibbs 1994)

6.4.2.1 Βασικές αρχές multiplex-PCR

Η ταυτόχρονη ενίσχυση δύο ή περισσότερων περιοχών του DNA με μία μόνο αντίδραση είναι κοινώς γνωστή ως πολυπλεκτική ή πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (*multiplex-PCR*). Πρόκειται για μια ταχεία και εύκολη δοκιμασία ενίσχυσης g-DNA τόσο στο κλινικό, όσο και στο ερευνητικό εργαστήριο, ωστόσο, η ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής multiplex-PCR συνήθως απαιτεί στρατηγικό σχεδιασμό και πολλαπλές προσπάθειες για την βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης. Παράλληλα, υπάρχουν μία σειρά διαφόρων παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν την αντίδραση και να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικά προϊόντα ενίσχυσης, στην άνιση ή απουσία ενίσχυσης κάποιων αλληλουχιών του DNA στόχου, αλλά και δυσκολίες στην αναπαραγωγή κάποιων αποτελεσμάτων. Για τους λόγους αυτούς η ενδεδειγμένη αξιολόγηση και επικύρωση των συνθηκών της multiplex PCR είναι απαραίτητη. Η ευαισθησία και η ειδικότητα πρέπει να ελέγχεται εξονυχιστικά, ενώ η συμμετοχή σε εξωτερικούς και εσωτερικούς ελέγχους ποιότητας πρέπει να εφαρμόζονται αυστηρά [100].



Εικόνα 6.11: Πολυπλεκτική ή πολλαπλή PCR (*multiplex PCR*). Αντίδραση ενίσχυσης στην οποία δύο ή περισσότερα ζεύγη εκκινητών, ειδικά για διαφορετικούς στόχους, εισάγονται στο ίδιο σωληνάριο αντίδρασης. Έτσι, μπορούν να ενισχυθούν ταυτόχρονα περισσότερες από μία μοναδικές αλληλουχίες-στόχοι σε ένα δείγμα και να παραχθούν ταυτόχρονα πολλά διαφορετικά προϊόντα ενός γονιδίου.

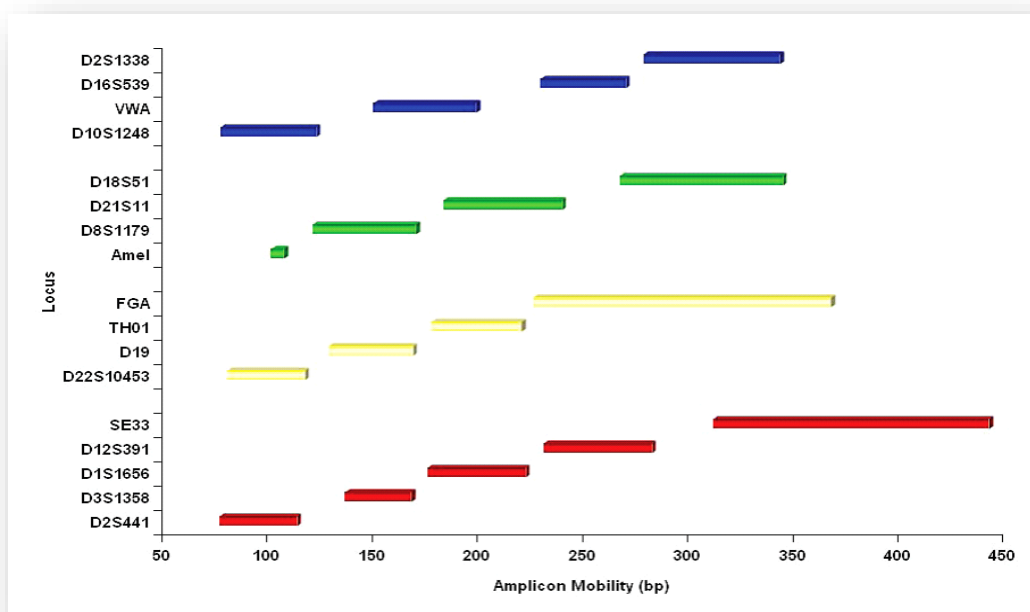
6.4.3 Ενίσχυση των γενετικών τόπων STRs μέσω του AmpFlSTR® NGM SElect™ PCR kit

6.4.3.1 Εισαγωγή

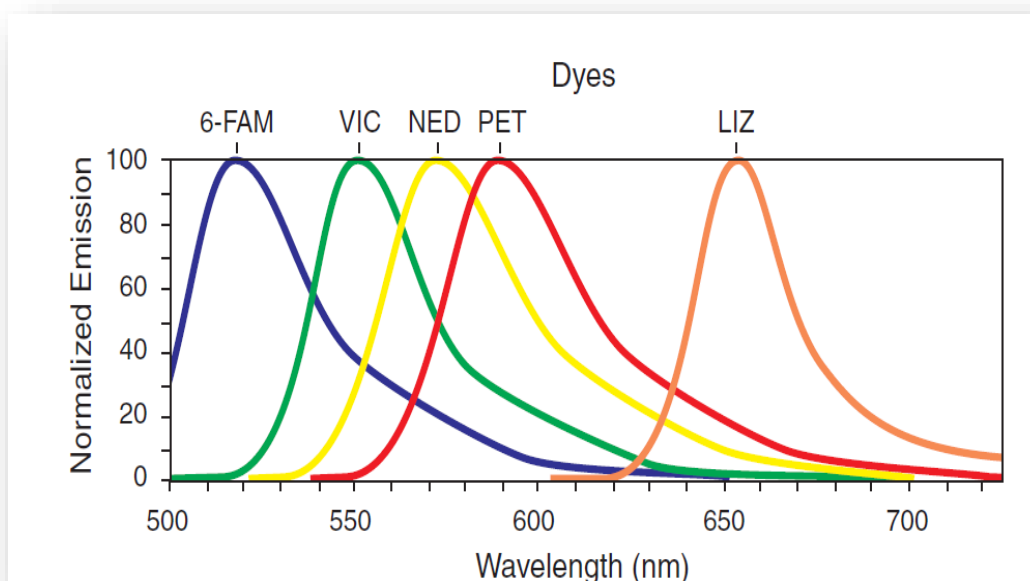
Με το AmpFlSTR® NGM SElect™ PCR kit επιτυγχάνεται η εκλεκτική ενίσχυση των 17 STRs γενετικών τόπων D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D22S1045, D19S433, TH01, FGA, D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391 συμπεριλαμβανομένου και του υψηλά πολύμορφου γενετικού τόπου SE33, καθώς και του γενετικού τόπου για τον προσδιορισμό του φύλου (Αμελογενίνη). Η τεχνολογία της Applied Biosystem κάνοντας χρήση ειδικών εκκινητών για τον κάθε γενετικό τόπο, συζευγμένων με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές, επιτυγχάνει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών STRs γενετικών τόπων, των οποίων το μήκος (bp) των αλληλίων μπορεί να επικαλύπτεται ανά γενετικό τόπο (Εικόνα 6.12). Η πολυπλεκτική ανάλυση κάνει χρήση πέντε διαφορετικών φθορίζουσών χρωστικών: 1) τη χρωστική 6-FAM™ (6-Carboxyfluorescein) που εκπέμπει στο μικρότερο μήκος κύματος (μπλε χρώμα, 2) τη χρωστική VIC® (πράσινη), 3) τη χρωστική NED™ (κίτρινη), 4) τη χρωστική PET® (Photoinduced Electron Transfer-κόκκινη) και 5) τη χρωστική LIZ™ (πορτοκαλί), που χρησιμοποιείται για την σήμανση του GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0 (Εικόνα 6.13).

Για την ενίσχυση των STRs γενετικών τόπων χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit AmpFlSTR® NGM SElect™ PCR kit [101].

Ειδικότερα, στην STR γονοτύπηση τα αλληλόμορφα των επικαλυπτόμενων θέσεων (ίδιο μήκος σε bp) διακρίνονται μέσω της επισήμανσης των ειδικών εκκινητών με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές. Η πολυσύνθετη ανάλυση διαχωρίζει τα διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές μέσω διακριτών φασματικών συνιστωσών. Οι εκκινητές οι οποίοι σχεδιάζονται για STR γονοτύπηση πρέπει να υβριδοποιούνται άριστα πάνω στους γενετικούς τόπους STRs ώστε να επιτευχθεί καλός διαχωρισμός μεγέθους μεταξύ των γενετικών τόπων που έχουν επισημανθεί με την ίδια φθορίζουσα χρωστική. Επιπλέον, θα πρέπει να αποδίδουν ισχυρή ενίσχυση με καλή ισορροπία/αναλογία του ύψους της κορυφής στις περιπτώσεις ετεροζυγωτίας και παράλληλα, ενίσχυση χωρίς μη ειδικά προϊόντα (παραπροϊόντα-artifacts) που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν τη σωστή ερμηνεία του DNA προφίλ ενός δείγματος.



Εικόνα 6.12: Απεικονίζονται τα εύρη των μεγεθών των γενετικών περιοχών που ενισχύονται.



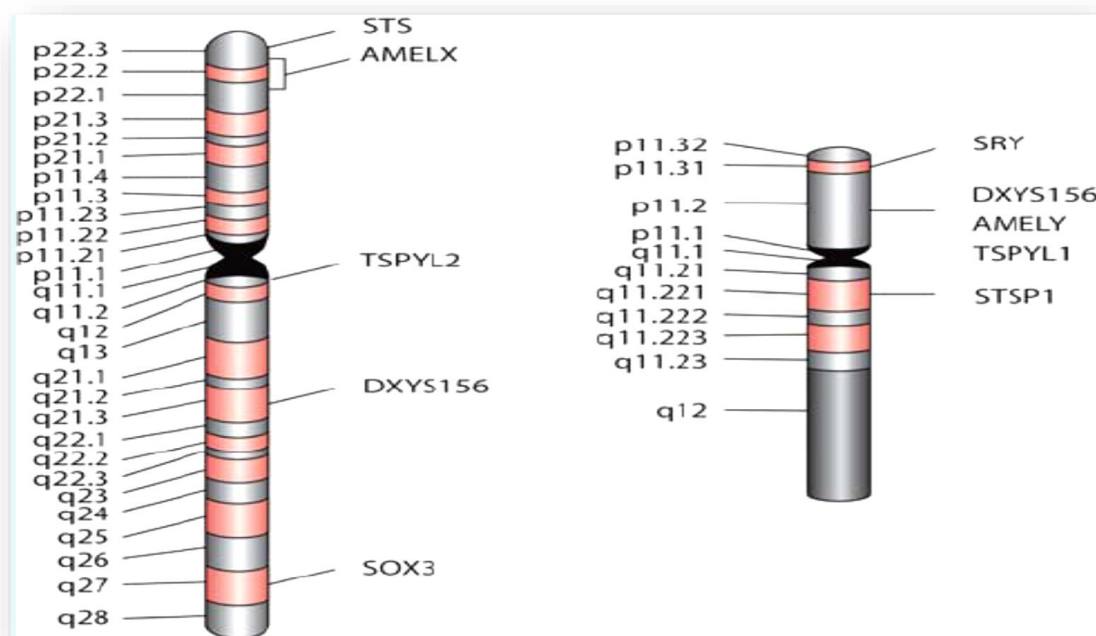
Εικόνα 6.13: Φάσματα εκπομπής των πέντε φθορίζουσών χρωστικών που χρησιμοποιούνται από το AmpFISTR® NGM Select™ kit.

Κατά τη διάρκεια συλλογής των πρωτογενών δεδομένων στα όργανα ABI PRISM® 3130 τα σήματα φθορισμού διαχωρίζονται μέσω φραγμάτων περίθλασης με βάση το μήκος κύματός τους και προβάλλονται σε ειδική κάμερα CCD.

Στον πίνακα 6.4 αναγράφονται οι 17 STRs γενετικοί τόποι, οι οποίοι ενισχύονται από το AmpFISTR® NGM SElect™ kit, η χρωμοσωμική τους εντόπιση, η επαναλαμβανόμενη μονάδα, ο πολυμορφισμός τους και η φθορίζουσα χρωστική με την οποία είναι σημασμένοι (U.S. National Institute of Standards and Technology (NIST) - www.cstl.nist.gov/div831/strbase/).

6.4.3.2 Καθορισμός φύλου

Στις σχετικές αναλύσεις ελέγχονται και τα αλληλόμορφα του γονιδίου της **αμελογενίνης** (μιας πρωτεΐνης του σμάλτου των δοντιών), το οποίο εντοπίζεται στα φυλετικά χρωμοσώματα. Στην περιοχή στην οποία εδράζεται το γονίδιο αυτό δεν συμβαίνουν ανασυνδυασμοί, παρά το γεγονός ότι είναι ομόλογη στα δύο φυλετικά χρωμοσώματα. Το αλληλόμορφο του γονιδίου της αμελογενίνης, στο χρωμόσωμα X φέρει στο 1^ο του ιντρόνιο ένα έλλειμμα μήκους 6 bp σε σχέση με το χρωμόσωμα Y. Έτσι, εάν ενισχυθεί με εφαρμογή της PCR τεχνικής στα αρσενικά άτομα προκύπτουν δύο τμήματα DNA που διαφέρουν μεταξύ τους κατά 6 bp (106 bp και 112 bp), ενώ στα θηλυκά προκύπτει μόνο το μικρότερο τμήμα (106 bp). Από την γονοτύπηση των αλληλομόρφων της αμελογενίνης είναι δυνατόν να εξακριβωθεί αν κάποιο δείγμα DNA προέρχεται από έναν άντρα ή από μία γυναίκα [102].



Εικόνα 6.14: Κυτταρογενετικός χάρτης των ανθρώπινων χρωμοσωμάτων X (αριστερά) και Y (δεξιά), με τις θέσεις των δεικτών καθορισμού του φύλου. Το γονίδιο της αμελογενίνης εντοπίζεται στην περιοχή 22.1-22.3 του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος X (Xp22.1 - Xp22.3) και στην περιοχή 11.2 του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος Y (Yp11.2).

Πίνακας 6.4: Οι 17 STRs γενετικοί τύποι, οι οποίοι ενισχύονται από το AmpFISTR® NGM Select™.

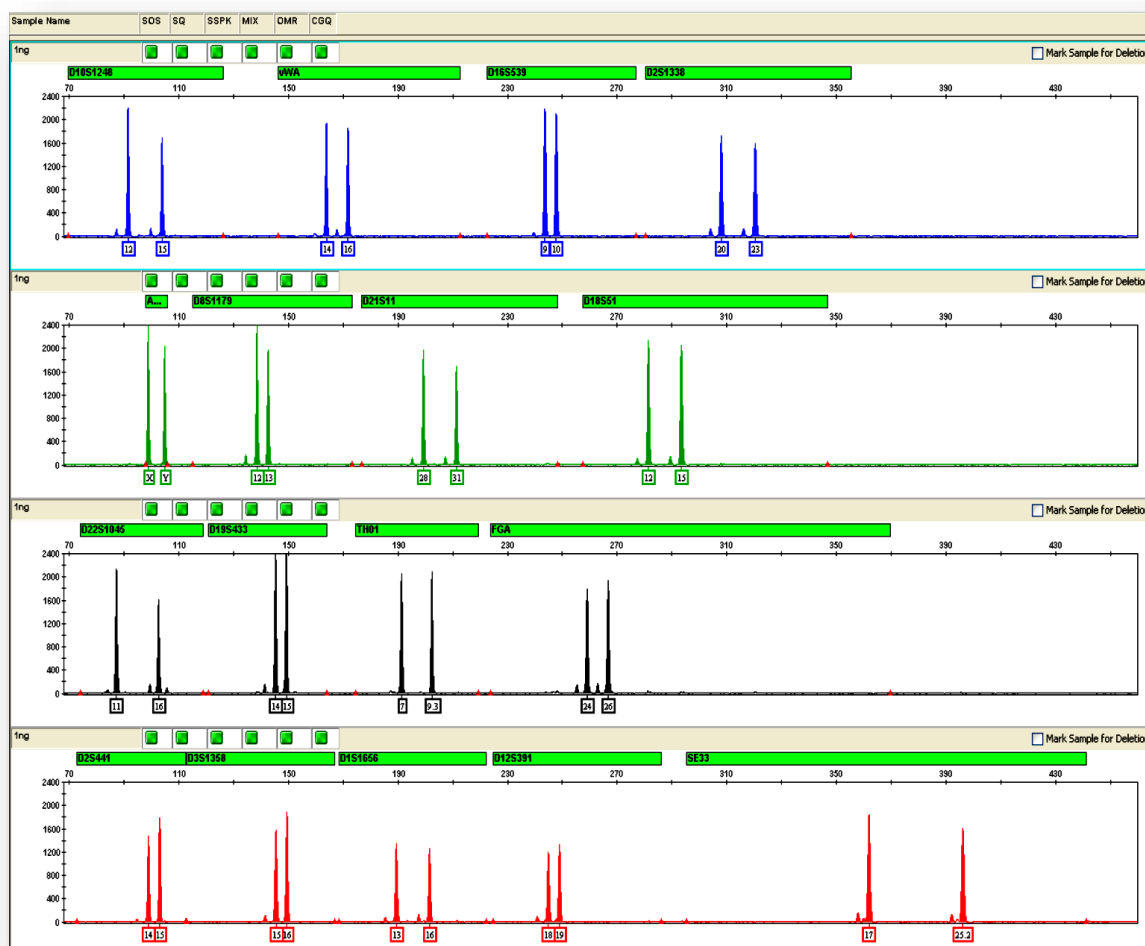
Γενετικοί τύποι STRs	Χρωμοσωμική εντόπιση	Επαναλαμβανόμενη μονάδα 5'-3'	Αλλήλια που περιλαμβάνονται στην AmpFISTR® NGM Select™ πρότυπη κλίμακα μεγέθους (Allelic Ladder)	Φθορίζουσα χρωστική
D10S1248	10q26.3	GGAA complex	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18	6-FAM™
vWA	12p13.31	TCTA complex	11, 12, 13, 14, 15,, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	6-FAM™
D16S539	16q24.1	GATA complex	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	6-FAM™
D2S1338	2q35	TGCC complex	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	6-FAM™
Amelogenin	X:p22.1-22.3 Y:p11.2	NA	X, Y	VIC®
D8S1179	8q24.13	TCTA complex	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	VIC®
D21S11	21q11.2-q21	TCTA complex	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38	VIC®
D18S51	18q21.33	AGAA complex	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	VIC®
D22S1045	22q12.3	ATT complex	8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	NED™
D19S433	19q12	AAGG complex	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	NED™
TH01	11p15.5	AATG complex	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3	NED™
FGA	4q28	TTTC complex	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2	NED™
D2S441	2p14	TCTA complex	9, 10, 11, 11.3, 12, 13, 14, 14, 16	PET®
D3S1358	3p21.31	TCTA complex	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	PET®
D1S1656	1q42.2	TAGA complex	9, 10, 11, 12, 13, 14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3, 18.3, 19.3, 20.3	PET®
D12S391	12p13.2	AGAT complex	14, 15, 16, 17, 18, 19, 19.3, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	PET®
SE33	6q14	AAAG complex	4.2, 6.3, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20.2, 21, 21.2, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2., 26.2, 27.2, 28.2, 29.2, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 34.2, 35, 35.2, 36, 37	PET®

6.4.4.3 Πρωτόκολλο εργασίας

6.4.4.3.1 Πρότυπα τα οποία απαιτούνται για την PCR ενίσχυση και την STR γονοτύπηση των STRs γενετικών τύπων είναι:

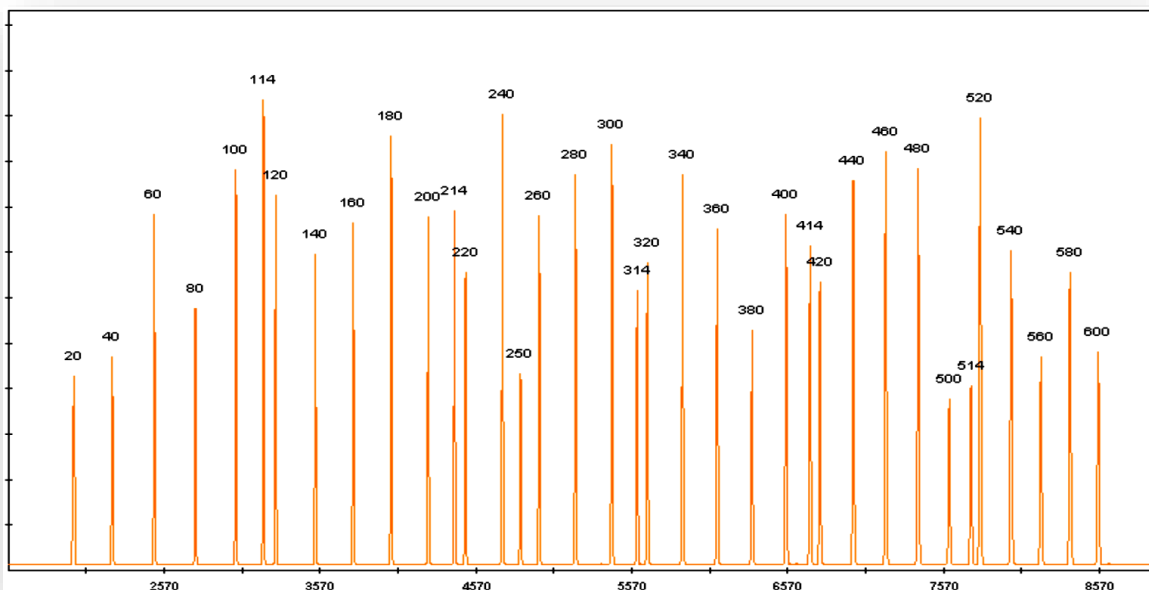
- 1. Control DNA 007:** Το AmpFISTR® Control DNA 007 χρησιμοποιείται από το AmpFISTR® NGM Select™ kit, ως θετικό δείγμα ελέγχου για την δημιουργία του γνωστού γενετικού προφίλ, μέσω του οποίου ελέγχεται η

αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης και η δυνατότητα γονοτύπησης του kit (Εικόνα 6.15).



Εικόνα 6.15: Ο STR γονότυπος του θετικού δείγματος ελέγχου DNA 007 ενός AmpFISTR® NGM Select™ kit.

2. **GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0:** Τα μήκη των τμημάτων DNA τα οποία προσδιορίζονται με την χρήση του AmpFISTR® NGM Select™ kit είναι: 60, 80, 100, 114, 120, 140, 160, 180, 200, 214, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 314, 320, 340, 360, 380, 400, 414, 420, 440 και 460 bp σημασμένο με LIZ φοθορίζουσα χρωστική (Εικόνα 6.16).



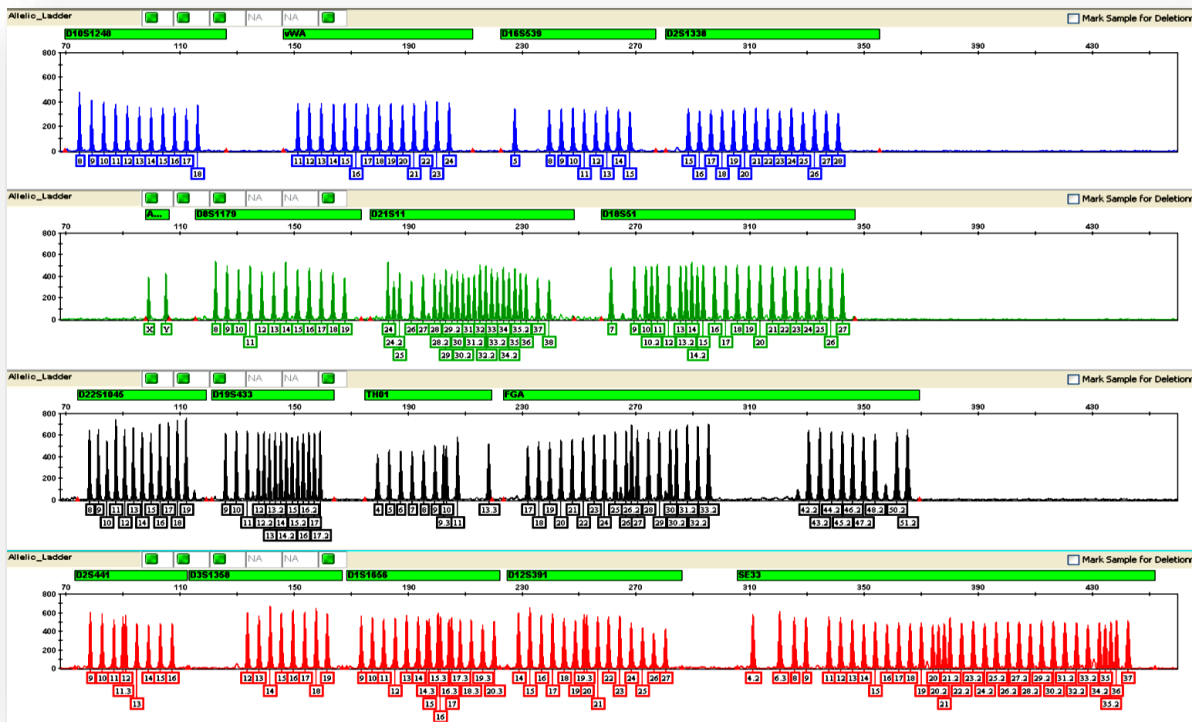
Εικόνα 6.16: Τα μεγέθη των γραμμικών θραυσμάτων του GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard σε ζεύγη βάσεων (bp).

3. AmpFISTR® NGM SElect™ Allelic Ladder (AL): Για την ακριβή γονοτύπηση των δειγμάτων δηλ. τον ακριβή χαρακτηρισμό των αλληλίων, θα πρέπει παράλληλα με τα υπό εξέταση δείγματα να αναλύεται και ένα δείγμα που περιέχει πρότυπες κλίμακες μεγέθους (AL), ο αριθμός των οποίων κυμαίνεται ανάλογα με τον τύπο του γενετικού αναλυτή που χρησιμοποιείται. Για τον ABI PRISM® 3130 απαιτείται ένας AL για κάθε 4 εγχύσεις (injections), όπου σε κάθε μία αναλύονται 4 δείγματα. Το AmpFISTR® NGM SElect™ AL περιέχει τα περισσότερα από τα καταγεγραμμένα και καταχωρημένα αλληλία σε βάσεις δεδομένων των 16 aSTRs. Στην εικόνα 6.17 αναγράφονται όλα τα γνωστά αλληλία, τα οποία ο AmpFISTR® NGM SElect™ AL προσδιορίζει μέσω του GeneMapper® ID-X λογισμικού. Το μήκος κάθε αλληλίου έχει επιβεβαιωθεί με αλληλούχιση.

Ένας AL θα πρέπει να αναλύεται κάτω από τις ίδιες συνθήκες με τα υπό εξέταση δείγματα διότι:

- Οι τιμές μεγεθών που αποκτούνται για το ίδιο δείγμα μπορούν να διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων πλατφορμών/γενετικών αναλυτών, εξαιτίας του διαφορετικού πολυμερούς ηλεκτροφόρησης, αλλά και των διαφορετικών συνθηκών ηλεκτροφόρησης.

- Οι διαταραχές στην θερμοκρασία περιβάλλοντος (του εργαστηρίου) μπορούν να επηρεάσουν την ταχύτητα μετανάστευσης μέσα στο πολυμερές.



Εικόνα 6.17: AmpFISTR® NGM Select™ Allelic Ladder. Αναγράφονται όλα τα γνωστά αλληλίου των 16 STRs γενετικών τόπων που είναι καταχωρημένα σε βάση δεδομένων.

6.4.4.3.2. Ενίσχυση των γονιδιακών θραυσμάτων STRs

Τα δείγματα g-DNA ενισχύθηκαν μέσω πολυπλεκτικής PCR (multiplex PCR) κάνοντας χρήση του AmpFISTR® NGM Select™ PCR kit. Συγκεκριμένα, 10 μl από το DNA δείγμα ελέγχου (1,0ng/10 μl) ενισχύθηκε σε έναν τελικό όγκο PCR αντίδρασης 25 μl στο οποίο περιέχονταν: 10,0 μL AmpFISTR® NGM Select™ μείγμα ενίσχυσης (master mix) συμπεριλαμβανομένης της hot-start Taq DNA πολυμεράσης και 5,0 μL από το AmpFISTR® NGM Select™ σύνολο εκκινητών (primer set) σημασμένα στο 5' άκρο τους με φθορίζουσα χρωστική (6-FAM™, VIC®, NED™, PET®). Η ενίσχυση μέσω της PCR τεχνικής πραγματοποιήθηκε κάνοντας χρήση του TECHNE TC-412 θερμικού κυκλοποιητή (www.techne.com) εφαρμόζοντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας (Πίνακας 6.5).

Παράλληλα με τα υπό έλεγχο δείγματα ελέγχθηκαν ταυτόχρονα ένα θετικό και ένα αρνητικό δείγμα ελέγχου. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 10μL

TE buffer (10mM Tris, 0,1mM EDTA, pH 8,0), ενώ ως θετικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 10μL από το 007 θετικό δείγμα ελέγχου DNA (0,1ng/μL) το οποίο διατίθεται με το kit των αντιδραστηρίων προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της PCR αντίδρασης ή τυχόν επιμολύνσεις.

Πίνακας 6.5: Τυπικό πρόγραμμα του AmpFISTR® NGM SElect™ PCR kit για τον πολλαπλασιασμό των γονιδιακών θραυσμάτων STRs.

Συνθήκες	Αρχικό στάδιο επώασης	Βέλτιστος αριθμός κύκλων (25-28)*			Τελική επιμήκυνση	Τελικό στάδιο
		Αποδιάταξη	Υβριδισμός	Επιμήκυνση		
Θερμοκρασία	95 °C	94 °C	59 °C	65 °C	60 °C	4 °C
Χρόνος	1 min	3 sec	16 sec	29 sec	5 min	∞

*Καθορίζεται από το εκάστοτε εργαστήριο

6.5 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΓΡΑΜΜΙΚΩΝ ΘΡΑΥΣΜΑΤΩΝ DNA ΜΕΣΩ ΤΡΙΧΟΕΙΔΙΚΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ (CE) ΣΤΟΝ ABI 3130 ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΑΝΑΛΥΤΗ ΤΗΣ APPLIED BIOSYSTEMS

Για την γονοτύπηση των STRs αλληλίων εφαρμόστηκε **DNA Fragment Analysis** μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (Capillary Electrophoresis-CE) και χρήση του γενετικού αναλυτή ABI 3130 (Applied Biosystems -Foster City, CA, USA).



Εικόνα 6.18: Ο ABI PRISM® 3130 γενετικός αναλυτής της Applied Biosystems.

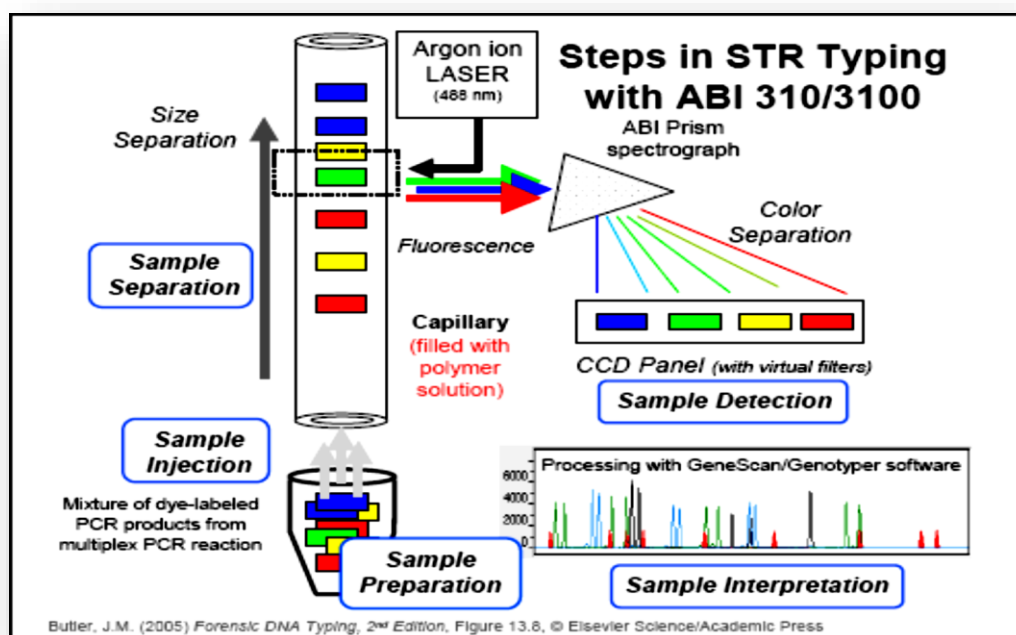
6.5.1 Αρχή μεθόδου

Η CE είναι μια τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ιοντικά φορτισμένων γραμμικών θραυσμάτων DNA ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος (bp). Κατά τη διάρκειά της, τα μονόκλωνα αρνητικά φορτισμένα DNA προϊόντα της PCR αντίδρασης (και οποιαδήποτε άλλα αρνητικά φορτισμένα μόρια, όπως άλας ή μη ενσωματωμένοι εκκινητές και νουκλεοτίδια) εισάγονται στο τριχοειδές ως αποτέλεσμα ηλεκτροκινητικής έγχυσης (electrokinetic injection). Η ποσότητα του DNA που εκχύεται σε μία τριχοειδική στήλη (Q_{inj}) είναι άμεσα εξαρτημένη από το ηλεκτρικό πεδίο (E), το χρόνο έκχυσης (t), την πραγματική συγκέντρωση του DNA στο δείγμα (DNA_{sample}), της διαμέτρου στο σημείο εισόδου του τριχοειδούς (πr^2) και την ιοντική ισχύ του δείγματος (λ_{sample}) έναντι του ρυθμιστικού διαλύματος (λ_{buffer}).

Αυτό μπορεί να περιγραφεί από την ακόλουθη εξίσωση:

$$[DNA_{inj}] = Et(\pi r^2)(\mu_{ep} + \mu_{eof})[DNA_{sample}](\lambda_{buffer}/\lambda_{sample})$$

όπου r είναι η ακτίνα του τριχοειδούς, μ_{ep} είναι η κινητικότητα των μορίων του δείγματος και μ_{eof} είναι η ηλεκτροωσμωτική κινητικότητα, η οποία είναι αμελητέα σε ένα επικαλυμμένο τριχοειδές [103].



Εικόνα 6.19: Σχηματική απεικόνιση του διαχωρισμού των γραμμικών θραυσμάτων DNA και της ανίχνευσης των STRs αλληλίων μέσω του ABI 3130 γενετικού αναλυτή.

Η εφαρμογή της πολυπλεκτικής ανάλυσης του DNA επιτυγχάνεται με την ομοιοπολική σύνδεση διαφορετικής φθορίζουσας χρωστικής πάνω στο 5'-άκρο του

κάθε εκκινητή. Αυτές οι φθορίζουσες χρωστικές όταν διεγερθούν από μία ακτίνα λέιζερ αργού (488nm) εκπέμπουν σε διαφορετικές περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Ένας αναλυτής πολλαπλών μηκών κύματος, όπως είναι η συσκευή CCD (**charge-coupled device** - **CCD**, συσκευή ή διάταξη συζευγμένου φορτίου), χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί το είδος της φθορίζουσας χρωστικής, με την οποία είναι συζευγμένα τα γραμμικά θραύσματα DNA, καθώς αυτά διαπερνούν το παράθυρο ανίχνευσης. Τα προϊόντα ενίσχυσης των STRs γενετικών τόπων μπορεί να επικαλύπτονται σε μέγεθος (bp), γι' αυτό και ο διαχωρισμός τους, αλλά και η ανάλυσή τους, γίνονται εφικτά κάνοντας χρήση φθορίζουσών χρωστικών που εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος.

Όμως, παρά την διαφορά στο μήκος κύματος εκπομπής τους υπάρχει φασματική επικάλυψη μεταξύ τους. Για την αποφυγή αυτής της επικάλυψης χρησιμοποιείται ο αλγόριθμος matrix calculation, απαραίτητος για την βαθμονόμηση των οργάνων, δημιουργώντας σήματα που μπορούν να αποδοθούν σε μόνο μια φθορίζουσα χρωστική και να αποτραπούν φαινόμενα όπως το "cross-talk", "bleed through", ή "pull-up" μεταξύ των διαφορετικών φασματικών καναλιών. Το φαινόμενο "pull-up" μπορεί εύκολα να αναγνωριστεί με την μορφή μικρών κορυφών διαφορετικού χρώματος από αυτό των κύριων κορυφών.

Ο τύπος του πολυμερούς που χρησιμοποιείται, το τριχοειδές, το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (συγκέντρωση, pH), η θερμοκρασία εφαρμογής, αλλά και η τάση του πεδίου είναι διάφοροι άλλοι παράγοντες που έχουν επίπτωση στον διαχωρισμό των γραμμικών θραυσμάτων DNA σε ένα σύστημα CE. Ειδικά στις πλατφόρμες που φέρουν πολλαπλά τριχοειδή απαιτείται να διατηρηθεί η εκλέπτυνση και το ιξώδες χαμηλό, γι' αυτό και ως μέσο διαχωρισμού βιολογικών μορίων χρησιμοποιούνται τα εμπορικά διαθέσιμα πολυμερή πολυ-διμεθυλακρυλαμίδης (poly-dimethylacrylamide) POP-4 για την STR γονοτύπηση και POP-6 για την αλληλούχιση του DNA (Applied Biosystems). Το ρυθμιστικό διάλυμα (genetic analyzer buffer, GAB) που χρησιμοποιείται συνήθως από το ABI 3130 είναι 100 mM TAPS (N-tris-(hydroxymethyl) methyl-3-aminopropane-sulfonic acid) και 1 mM EDTA pH 8.0 ρυθμισμένο με NaOH, το οποίο σταθεροποιεί και διαλυτοποιεί το DNA, παρέχοντας ταυτόχρονα φορείς φορτίου. Παράλληλα, για την επίτευξη της αποδιάταξης του DNA, η θερμοκρασία στην τριχοειδή στήλη έχει ρυθμιστεί σε θερμοκρασία υψηλότερη από ότι αυτή του δωματίου (60°C), και επιπλέον έχουν προστεθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα ουσίες όπως το φορμαμίδιο (formamide), η ουρία (urea) ή 2-πυρρολιδινόνης (2-

pyrrolidinone), οι οποίες δεν επιτρέπουν στο DNA να επαναϋβριδοποιηθεί (reannealing). Ο διαχωρισμός λαμβάνει χώρα σε τριχοειδές με εσωτερική διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ 50-100 μm , επικαλυπτόμενο με επίστρωση για να αποφευχθούν φαινόμενα όπως αυτό της ηλεκτροοσμωτικής ροής (electroosmotic flow-EOF).

6.5.2 Πρωτόκολλο εργασίας

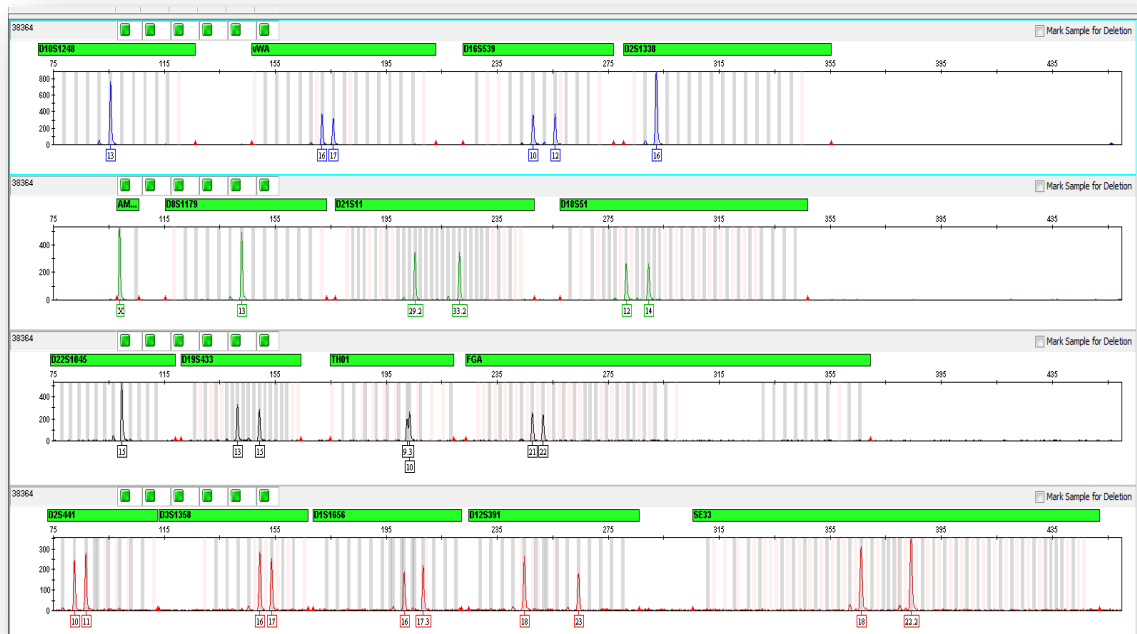
Η αποδιάταξη των σημασμένων με φθορίζουσα χρωστική προϊόντων της PCR έγινε με Hi-Di™ φορμαμίδιο της Applied Biosystems (Weiterstadt, Germany) πριν την ηλεκτροκινητική έκχυση και ο διαχωρισμός των γονιδιακών θραυσμάτων DNA έγινε με βάση το μοριακό τους βάρος σε τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis-CE) στον ABI 3130 γενετικό αναλυτή της Applied Biosystems εφαρμόζοντας τις ακόλουθες συνθήκες inj. secs:3, inj. kV:15.0, run kV:15.0, run °C:60, run time:30sec. Ως πολυμερές διαχωρισμού χρησιμοποιήθηκε το POP-4™ πολυμερές της Applied Biosystems. Για την aSTRs DNA γονοτύπηση χρησιμοποιήθηκε γνωστού μοριακού βάρους δείκτης (GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0). Για τον χαρακτηρισμό των STRs αλληλίων (STR γονοτύπηση), μία πρότυπη κλίμακα μεγέθους AmpFlSTR® NGM SElect™ AL η οποία περιέχει τα πιο κοινά αλληλία τα οποία εμφανίζονται στον υπό έλεγχο πληθυσμό, ελέγχθηκε παράλληλα στην ίδια έκχυση με τα DNA δείγματα.

6.5.3 Ανάλυση των πρωτογενών δεδομένων

Μετά την ηλεκτροφόρηση, τα πρωτογενή δεδομένα του κάθε δείγματος αποθηκεύονται σε έναν φάκελο .fsa., μέσω του λογισμικού *Data Collection* και στη συνέχεια ακολουθεί η ανάλυση και η ερμηνεία τους, aSTR γονοτύπηση (DNA profiling), κάνοντας χρήση του *GeneMapper® ID Software v1.3* της Applied Biosystems (Foster City CA).

Για τη δημιουργία ενός γενετικού προφίλ μέσω του *GeneMapper® IDv1.3 Software*, πρέπει να γνωρίζουμε ότι:

- Η ανάλυση απαιτεί μία τουλάχιστον πρότυπη κλίμακα μεγέθους (AL) ανά έκχυση.
- Όλα τα δείγματα των AL πρέπει να φέρουν την ένδειξη “Allelic Ladder” στο πρόγραμμα ανάλυσης, διότι η μη εφαρμογή αυτής της ρύθμισης θα οδηγήσει σε αποτυχία της ανάλυσης. Επίσης, οι AL πρέπει να αναλύονται με τις ίδιες μεθόδους ανάλυσης και παραμέτρους που χρησιμοποιούνται και στα υπό εξέταση δείγματα, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η σωστή STR γονοτύπηση (allele calling).



Εικόνα 6.20: Γενετικός χάρτης 17 STR γενετικών τόπων. Κάθε κορυφή του ηλεκτροφορήματος αντιπροσωπεύει ένα επισημασμένο με φθορίζουσα χρωστική γραμμικό θραύσμα DNA, το οποίο δείχνει ένα πατρικής ή μητρικής προέλευσης αλληλίο. Οι vWA, D16S539, D2S11, D18S51, D19S433, TH01, FGA, D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391 και SE33 γενετικοί τόποι είναι ετερόζυγοι, ενώ οι D10S1248, D2S1338, D8S1179 και D22S1045 είναι ομόζυγοι. Το δείγμα αυτό αφορά μία γυναίκα όπως μπορούμε να διακρίνουμε από την μία κορυφή στην περιοχή της αμελογενίνης (amelogenin).

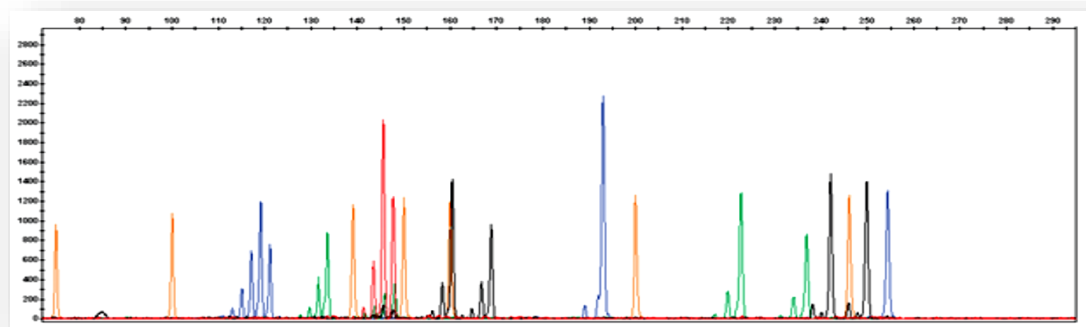
6.5.4 Αξιολόγηση των δειγμάτων

6.5.4.1 Λογισμικά προγράμματα STR γονοτύπησης

Το λογισμικό συλλογής δεδομένων (Data Collection), εκτελεί τρεις κύριες λειτουργίες: ελέγχει τις συνθήκες διεξαγωγής της ηλεκτροφόρησης, τα είδη και τα μήκη κύματος εκπομπής των φθορίζουσών χρωστικών και επιτρέπει στον χρήστη να δημιουργήσει τις λίστες των ονομάτων των υπό έλεγχο δειγμάτων. Καταγράφεται η σειρά με την οποία κάθε δείγμα εγχύεται μέσα στο τριχοειδές, ο χρόνος έγχυσης, η τάση (voltage) και η θερμοκρασία διεξαγωγής καθώς επίσης, ορίζεται και το φίλτρο ανάλογα με το είδος των φθορίζουσών χρωστικών που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση. Τα αρχικά δεδομένα (οπτικά σήματα), τα οποία λαμβάνονται ονομάζονται «πρωτογενή δεδομένα» (raw data). Στην συνέχεια, το πρόγραμμα GeneMapper είναι απαραίτητο για τη μετατροπή των αρχικών δεδομένων σε πληροφορίες, προκειμένου να προχωρήσουμε στην δημιουργία ενός STR γονοτύπου.

Το λογισμικό GeneMapper εκτελεί τρεις βασικές λειτουργίες. Ορίζει το κατώτερο σημείο των κορυφών, όπως αυτό έχει χαρακτηριστεί από τον χρήστη.

Διαχωρίζει τις κορυφές με βάση την σήμανσή τους (φθορίζουσα χρωστική) και επίσης ορίζει τα STR αλληλία με βάση το μέγεθός τους (bp) συγκρίνοντάς τα με ένα εσωτερικό πρότυπο (size standard) επισημασμένο με μια διαφορετική φθορίζουσα χρωστική, το οποίο τρέχει πάντα με κάθε δείγμα. Η γονοτύπηση εκτελείται μετά από σύγκριση του μεγέθους (bp) των αλληλομόρφων με τον AL.



Εικόνα 6.21: Fragment analysis. Επισημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές γραμμικά θραύσματα DNA διαχωρίζονται και καθορίζεται το μέγεθός τους σε bp. Οριζόντια: Intensity (RFU), Κάθετα: Size (bp).

6.5.5 Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Η ακριβής STR γονοτύπηση απαιτεί: α) το μοριακό μέγεθος των υπό εξέταση γραμμικών θραυσμάτων DNA πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 75-500 ζεύγη βάσεων (bp), β) υψηλής ακρίβειας ανάλυση των επεξεργασμένων δειγμάτων, ώστε να επιτραπεί η σύγκριση των STR αλληλομόρφων με τους AL, γ) αποτελεσματικό διαχωρισμό των φθορίζουσών χρωστικών για να αποφευχθεί το φαινόμενο διάχυσης της χρωστικής “bleed through” μεταξύ των 4 ή 5 διαφορετικών φθορίζουσών χρωστικών που χρησιμοποιούνται, δ) τη δυνατότητα ανάλυσης από 1 bp έως και 350 bp περίπου ώστε να επιτρέπεται η ανίχνευση των microvariant αλληλομόρφων.

Πριν οι επιστήμονες-πραγματογνώμονες υποβάλλουν τα στοιχεία αναλύσεων θα πρέπει να γίνεται εκτεταμένη ανασκόπηση των δεδομένων. Συγκεκριμένα, η ποιοτική εκτίμηση της διακριτικής ικανότητας ενός ηλεκτροφορήματος γίνεται μέσω του οπτικού ελέγχου του σήματος (πλάτος και ύψος κορυφής). Το βέλτιστο ύψος της κορυφής για το γραμμικό θραύσμα του εσωτερικού πρότυπου μήκους 100 βάσεων, είναι 500-1.000RFU **RFU (Relative Fluorescent Units)**, ενώ οι τιμές για τα κατώτατα όρια του πλάτους της κορυφής είναι συνήθως 50-150RFU στον ABI PRISM 3130 γενετικό αναλυτή, αλλά θα πρέπει να καθορίζονται από τα εκάστοτε εργαστήρια.

Παράλληλα, εκτός από τις πρότυπες κλίμακες μεγέθους (AL), που τυπικά καλύπτουν όλο το πλάτος της ηλεκτροφορητικής μέτρησης, απαιτούνται και ενισχυμένα γνωστά γενετικά προφίλ, τα οποία χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της επιτυχίας της ενίσχυσης αλλά και της ανάλυσης. Επίσης, απαραίτητη για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ενισχυμένων γραμμικών θραυσμάτων είναι η συνέγχυση μαζί με κάθε υπό έλεγχο δείγμα ενός εσωτερικού προτύπου (Internal Lane Standard, ILS ή size standard).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

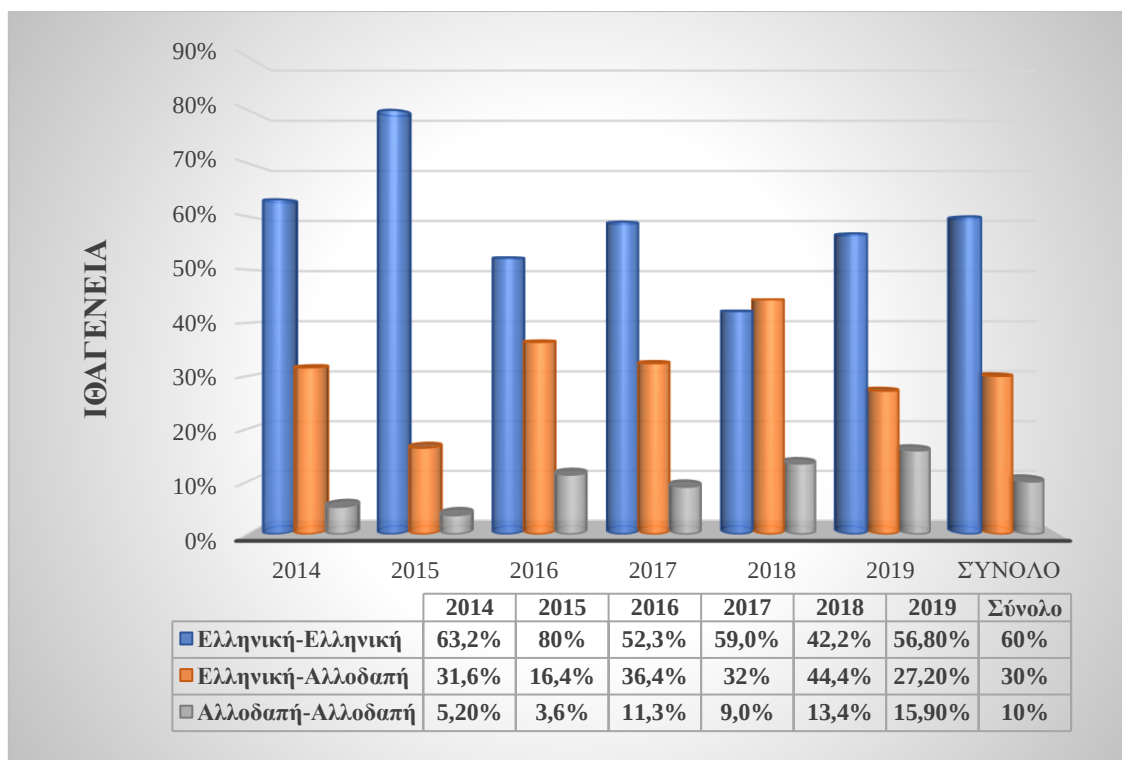
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη αφορά την αξιολόγηση των STR μεταλλάξεων στον έλεγχο αμφισβητούμενης γονικότητας. Συγκεκριμένα ελέγχθηκαν 261 περιπτώσεις (690 άτομα Καυκάσιων) αμφισβητούμενης πατρότητας/μητρότητας Αστικού Δικαίου, καταχωρημένες στα αρχεία του Τμήματος Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός – Οφθαλμιατρείο Αθηνών - Πολυκλινική» από το 2014 έως και το 2019.

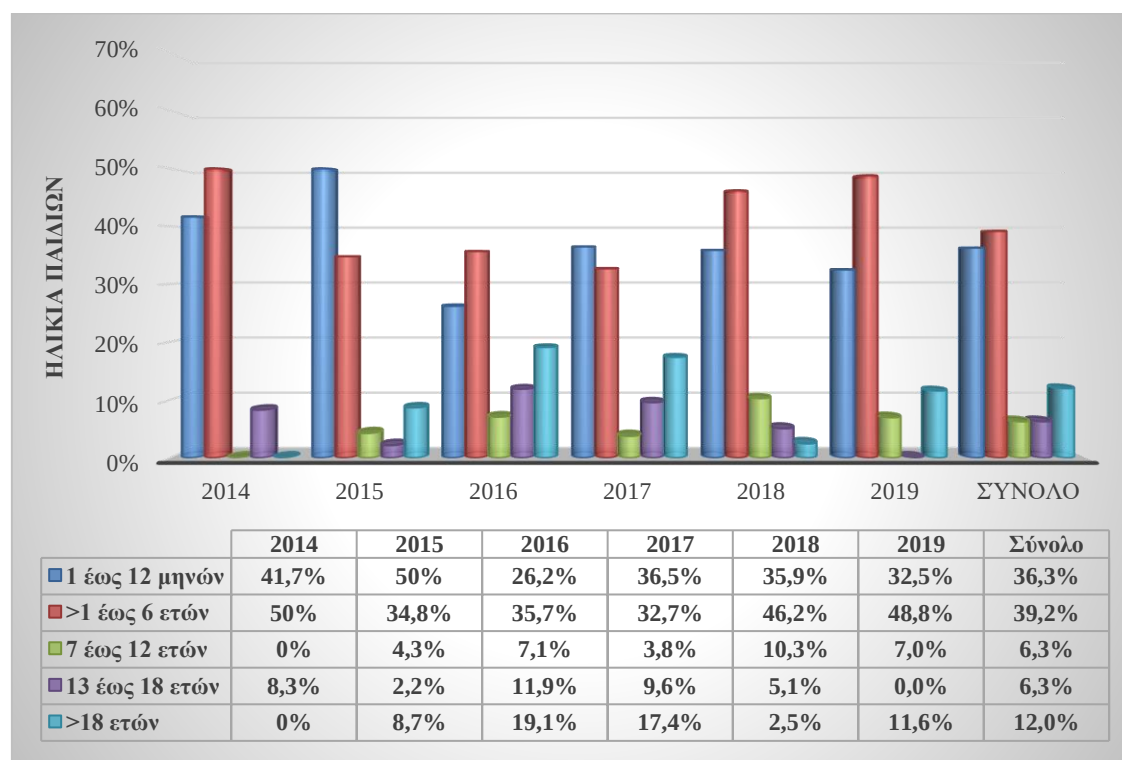
Οι έλεγχοι περιλάμβαναν φερόμενους ως γονείς (ΦΓ) άτομα διάφορων εθνικοτήτων, γι' αυτό και έγινε κατηγοριοποίηση των περιπτώσεων, ανάλογα με την ιθαγένεια τους σε τρεις (3) κατηγορίες: 1) Ελληνική-Ελληνική, 2) Ελληνική-Αλλοδαπή και 3) Αλλοδαπή-Αλλοδαπή. Στις αναλύσεις που πραγματοποιηθήκαν, οι περισσότερες περιπτώσεις αφορούσαν την κατηγορία Ελληνική-Ελληνική Ιθαγένεια (**155/261, 60%**), ενώ οι λιγότερες την κατηγορία Αλλοδαπή-Αλλοδαπή Ιθαγένεια (**26/261, 10%**). Στην κατηγορία Ελληνική-Αλλοδαπή Ιθαγένεια το ποσοστό των περιπτώσεων που κατεγράφη ήταν **80/261, 30%** (Εικόνα 7.1).

Όσον αφορά τις ηλικίες των παιδιών κατά τον έλεγχο παρατηρήθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ήταν από 1 έτους έως και 6 ετών (**93/237, 39,2%**). Ακολούθησαν οι ηλικίες από 1 μηνός έως και 12 μηνών (**26/237, 36,3%**), ενώ το μικρότερο ποσοστό αφορούσε τις ηλικίες από 7 έως 12 ετών (**15/237, 6,3%**) και 13 έως 18 ετών (**15/237, 6,3%**). Αξιοσημείωτο ήταν το ποσοστό των ατόμων, των οποίων η ηλικία ήταν πάνω από 18 ετών (**28/237, 12%**) (Εικόνα 7.2).

Η γονοτύπηση των δειγμάτων της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε σε g-DNA από δείγματα περιφερικού αίματος ή/και παρειακού επιχρίσματος ως προς 16 aSTRs γενετικούς πολυμορφισμούς, κάνοντας χρήση του kit των 16 aSTRs που περιλαμβάνονται στο *AmpFI STR®NGMSelect™ kit* (*D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D22S1045, D19S433, TH01, FGA, D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391, SE33*).

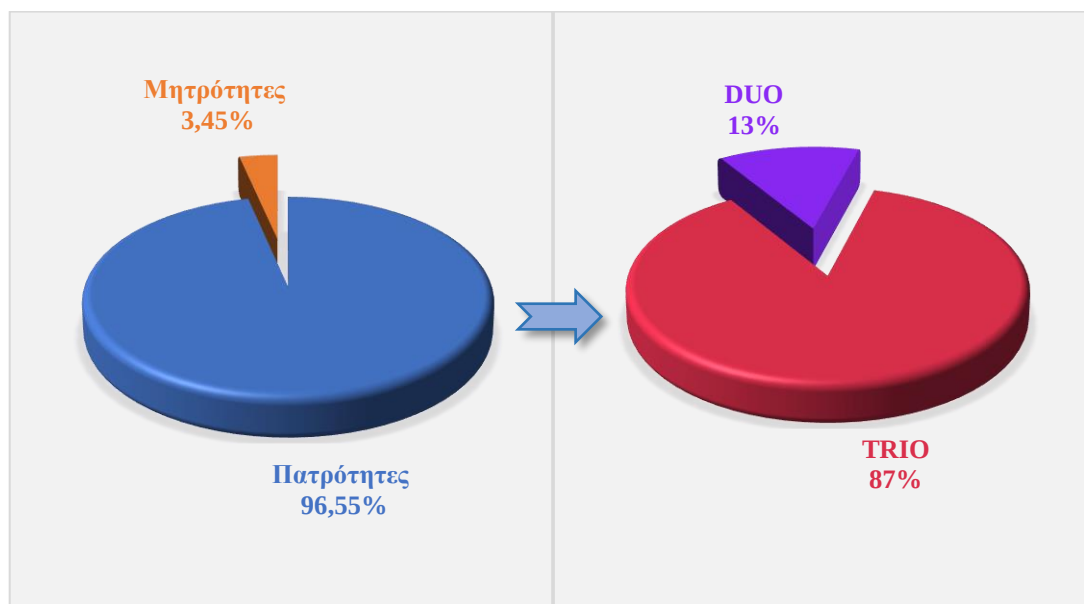


Εικόνα 7.1: Η κατανομή των περιπτώσεων που μελετήθηκαν ανάλογα με την ιθαγένεια τους.



Εικόνα 7.2: Η ηλικιακή κατανομή των περιπτώσεων που μελετήθηκαν.

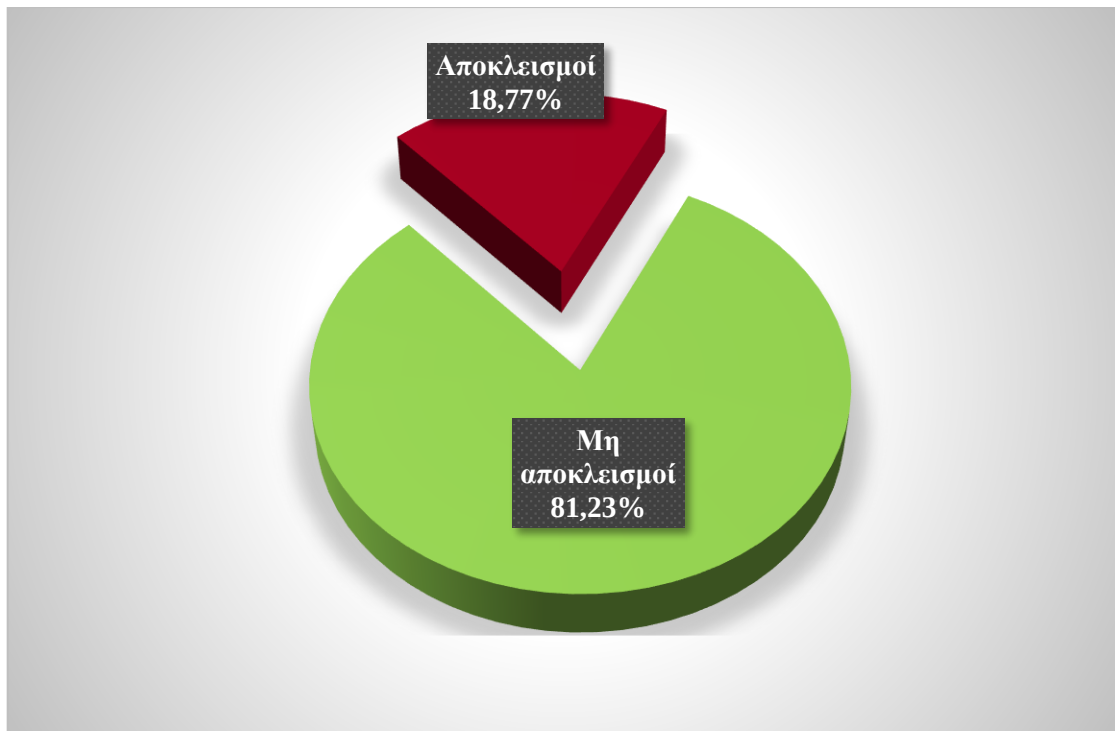
Στο σύνολο των περιπτώσεων που ελέγχθηκαν, οι 252 (**252/261, 96,55%**) αφορούσαν τον έλεγχο πατρότητας και οι 9 (**9/261, 3,45%**) τον έλεγχο μητρότητας. Από αυτές, οι 227 (**227/261, 87%**) αποτελούνταν από την μητέρα, το παιδί και τον «φερόμενο» ως πατέρα (ΦΠ) (trio περιπτώσεις), ενώ στις 34 (**34/261, 13%**) το DNA του/της πατέρα/μητέρας δεν ήταν διαθέσιμο (duo-fatherless ή duo-motherless περιπτώσεις) (Εικόνα 7.3).



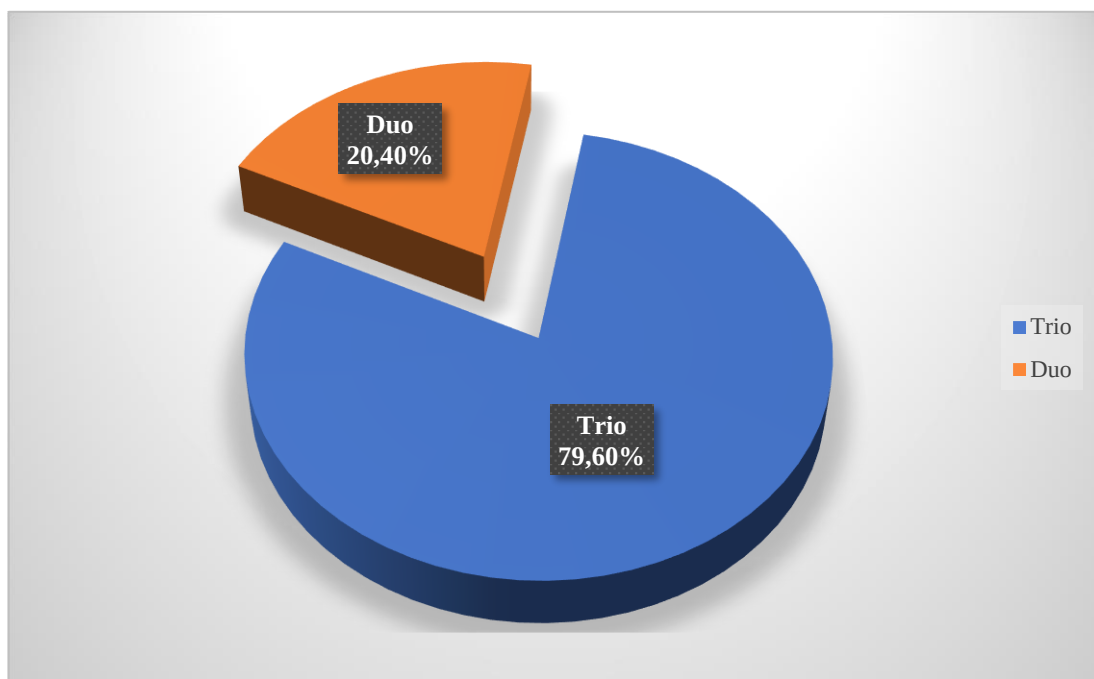
Εικόνα 7.3: Σχηματική απεικόνιση του ποσοστού (%) των περιπτώσεων ελέγχου μητρότητας ή ελέγχου πατρότητας, καθώς και του ποσοστού (%) των trio και duo-fatherless ή duo-motherless περιπτώσεων ελέγχου γονικότητας.

7.1 ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ

Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της aSTRs μοριακής ανάλυσης για κάθε ελεγχόμενη περίπτωση αμφισβητούμενης πατρότητας/μητρότητας (trio ή duo motherless/fatherless) οδηγηθήκαμε σε αποκλεισμό ή μη αποκλεισμό της γονικότητας. Συγκεκριμένα, σε 49 περιπτώσεις ελέγχου (**49/261, 18,77%**) αποδείχθηκε με απόλυτη σαφήνεια αποκλεισμός της γονικότητας (**39 trio, 79,60%** και **10 duo, 20,40%**) (Εικόνα 7.5). Σε όλες τις περιπτώσεις ο αποκλεισμός επιβεβαιώθηκε με τεκμήρια αποκλεισμού σε τουλάχιστον τρεις aSTRs γενετικούς τόπους. Σε 212 περιπτώσεις ελέγχου γονικότητας (**212/261, 81,23%**) δεν τεκμηριώθηκε αποκλεισμός (Εικόνα 7.4).



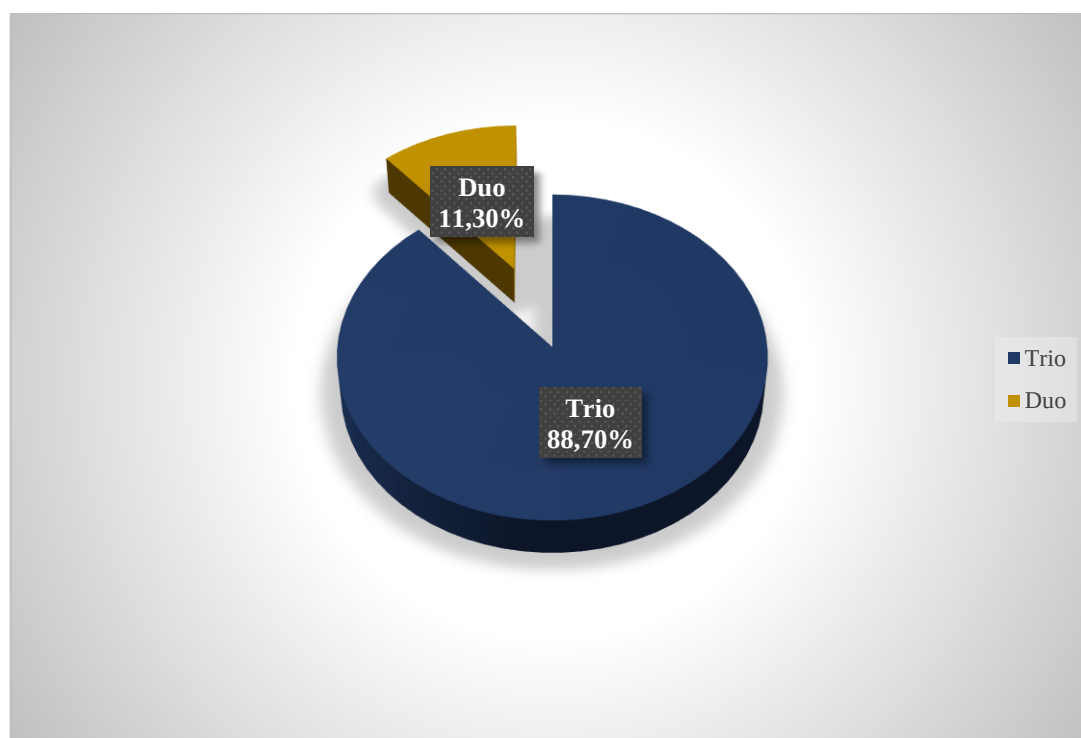
Εικόνα 7.4: Σχηματική απεικόνιση του ποσοστού (%) των περιπτώσεων ελέγχου γονικότητας που αποδείχθηκε αποκλεισμός ή μη αποκλεισμός της γονικότητας.



Εικόνα 7.5: Σχηματική απεικόνιση του ποσοστού (%) των trio και duo-fatherless ή duo-motherless περιπτώσεων ελέγχου γονικότητας, στις οποίες αποδείχθηκε ο αποκλεισμός της γονικότητας.

7.2 ΜΗ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ

Στο σύνολο των 261 περιπτώσεων ελέγχου γονικότητας που εξετάστηκαν μέσω aSTRs μοριακής ανάλυσης, στις 212 (**188 trio, 88,70%** και **24 duo, 11,30%**) δεν υπήρξε αποκλεισμός γονικότητας (Εικόνα 7.6). Τα δεδομένα που προέκυψαν από τον μοριακό έλεγχο αναλύθηκαν για την εξαγωγή των στατιστικών δεικτών PE, RMNE, PI, CPI και W, προκειμένου να αξιολογηθεί ο έλεγχος πατρότητας/μητρότητας.



Εικόνα 7.6: Σχηματική απεικόνιση του ποσοστού (%) των trio και duo-fatherless ή duo-motherless περιπτώσεων ελέγχου γονικότητας, στις οποίες δεν αποδείχθηκε ο αποκλεισμός της γονικότητας.

Ειδικότερα:

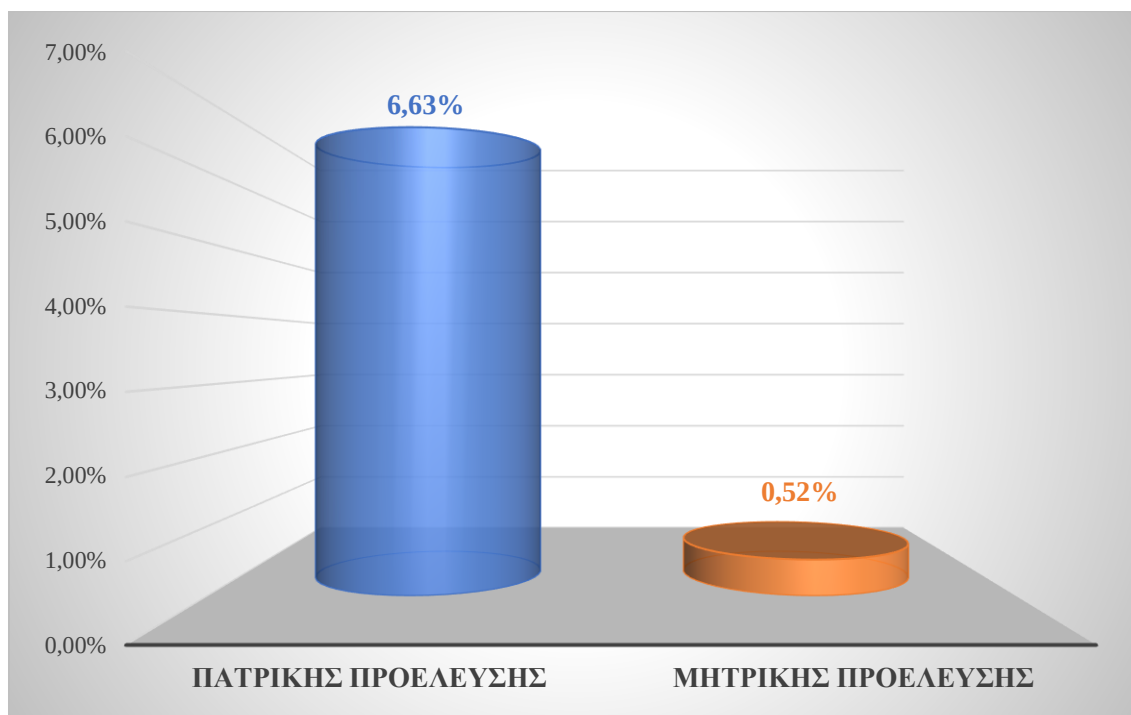
- α) οι δείκτες **PE_{STR}** και **RMNE_{STR}** υπολογίστηκαν από 99,9999987000 (trio περίπτωση) έως 99,9999999999 (trio περίπτωση) και $1,7600 \times 10^{-13}$ (trio περίπτωση) έως $1,3207 \times 10^{-8}$ (trio περίπτωση) αντίστοιχα. Οι δείκτες αυτοί μας επιτρέπουν να προσδιορίσουμε τη δύναμη του ελέγχου στον αποκλεισμό ενός άνδρα που ελέγχεται για την πατρότητα.
- β) ο δείκτης **CPI_{STR}** από $4,3 \times 10^4$ (trio περίπτωση) έως $3,2 \times 10^{13}$ (trio περίπτωση). Ο συγκεκριμένος δείκτης υποδεικνύει το βαθμό συγγένειας μεταξύ του παιδιού και του φερόμενου ως γονέα.
- γ) ο δείκτης **W_{STR}**, ο οποίος κυμάνθηκε από 99,9977251530 (trio περίπτωση με μετάλλαξη) έως 99,9999999999 (trio περίπτωση).

7.3 ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΙΚΩΝ ΑΝΟΜΟΙΟΤΗΤΩΝ ΛΟΓΩ aSTR ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΕ ΔΕΚΑΠΕΝΤΕ (15) ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΜΗ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

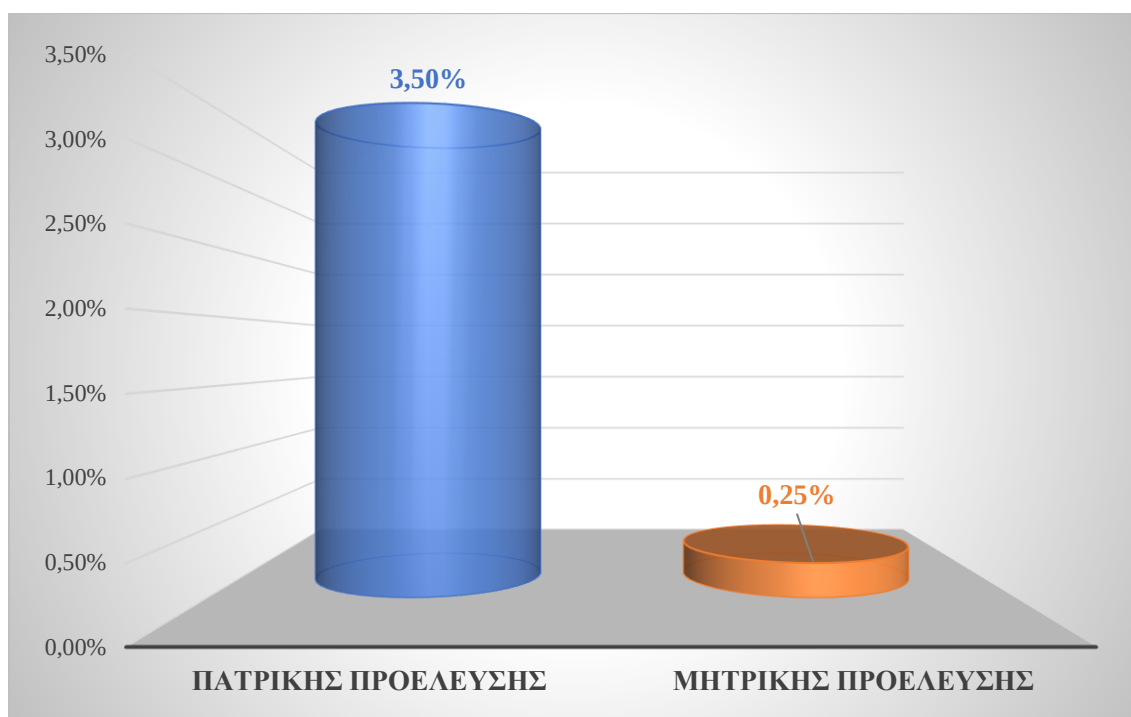
Επίσης, μεταξύ των 212 περιπτώσεων μη αποκλεισμού της συγγένειας μέσω των aSTRs κατεγράφησαν **δεκαπέντε (15)** αλληλικές ανομοιότητες (γενετικές ασυμβατότητες) μεταξύ του «φερόμενου» ως γονέα (ΦΓ) και του παιδιού σε ισάριθμες περιπτώσεις ελέγχου γονικότητας (**15/212, 7,07%**), δηλαδή μία μετάλλαξη ανά περίπτωση ελέγχου, χωρίς όμως αυτό να συνεπάγεται αποκλεισμό της συγγένειας, δεδομένου ότι για τον αποκλεισμό απαιτούνται περισσότερες των δύο STR μεταλλάξεων. Η διαφορά πατρικής έναντι μητρικής μετάλλαξης ήταν 6,63 % : 0,52% αντίστοιχα (Εικόνα 7.7), ενώ η διαφορά πατρικής (3,50%) έναντι μητρικής μετάλλαξης (0,25%) στο σύνολο των ελεγχθέντων ατόμων (Εικόνα 7.8), βρέθηκε αυξημένη σε επίπεδο στατιστικά σημαντικό (14:1, $p=0.001$) (Πίνακας 7.2).

Χαρακτηρίστηκαν δε ως γεγονότα μετάλλαξης, εντοπιζόμενα εντός της γενετικής περιοχής, συμπληρωματική του εκκινητή (1 περίπτωση, Null αλλήλιο) ή εντός της γενετικής περιοχής που κωδικοποιεί για το αλλήλιο (14 περιπτώσεις). Οι αλληλικές αυτές ανομοιότητες αποδόθηκαν στην απώλεια ή προσθήκη του επαναλαμβανόμενου τετρανουκλεοτιδίου κατά μία μονάδα (loss/gain single-step mutation) ή στην απώλεια ή προσθήκη δύο επαναλήψεων (loss/gain double-step mutation), αποτέλεσμα ολίσθησης του αντιγραφόμενου κλώνου κατά την διάρκεια της αντιγραφής του DNA (Πίνακας 7.1).

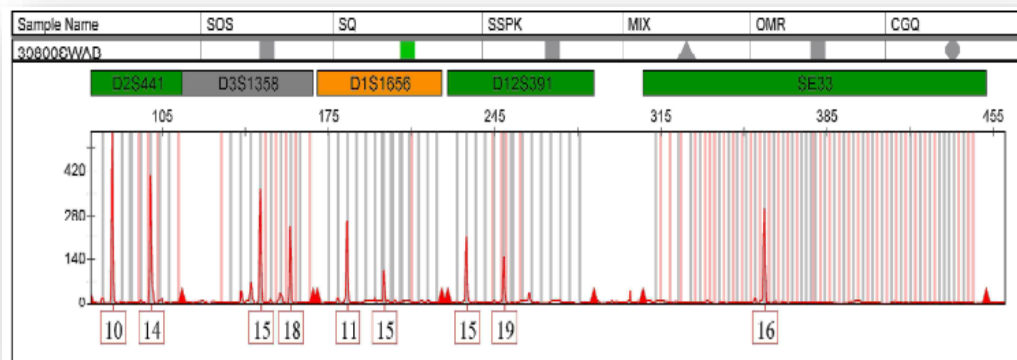
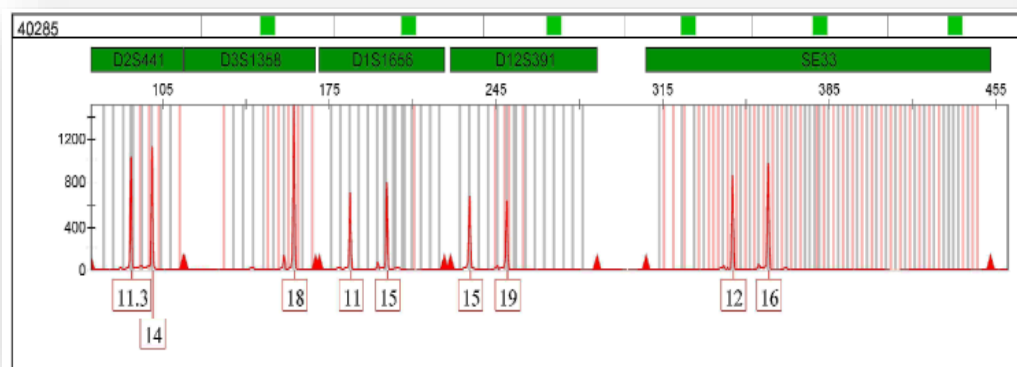
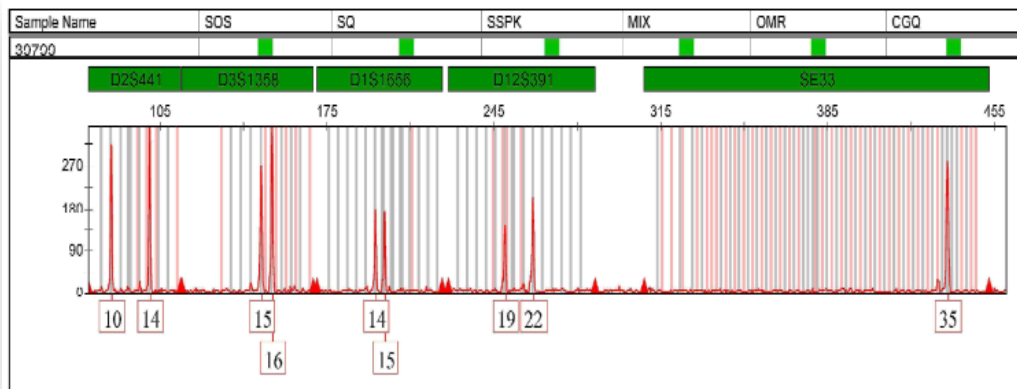
Μεταξύ των 15 περιπτώσεων με αλληλικές ανομοιότητες, οι τέσσερις (4) αφορούσαν μεταλλάξεις πατρικής προέλευσης στον *SE33* γενετικό τόπο, εκ των οποίων η μία οδήγησε σε σιωπηλό αλλήλιο (*Null allele*) (Εικόνα 7.9). Επιπλέον, τρεις (3) περιπτώσεις περιλάμβαναν αλληλικές ανομοιότητες πατρικής προέλευσης στον *vWA* γενετικό τόπο (Εικόνα 7.10), εκ των οποίων στη μία περίπτωση απουσίαζε το DNA της μητέρας (duo–motherless περίπτωση), ενώ βρέθηκαν άλλες τρεις (3) περιπτώσεις μεταλλάξεων πατρικής προέλευσης στον *D12S391* γενετικό τόπο. Οι υπόλοιπες πέντε (5) περιπτώσεις αφορούσαν μία μετάλλαξη στον *FGA* (πατρικής προέλευσης), στον *D8S1179* (πατρικής προέλευσης), στον *D10S1248* (πατρικής προέλευσης), στον *D3S1358* (πατρικής προέλευσης) και στον *D2S1338* (μητρικής προέλευσης) γενετικό τόπο (Πίνακας 7.1).



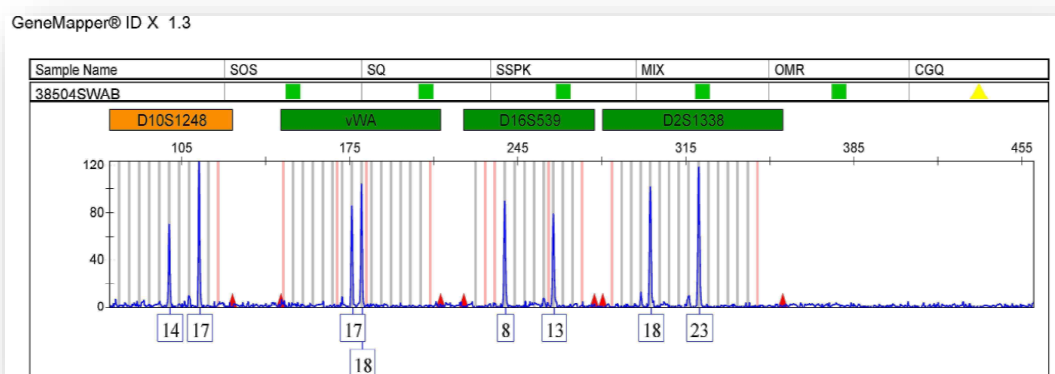
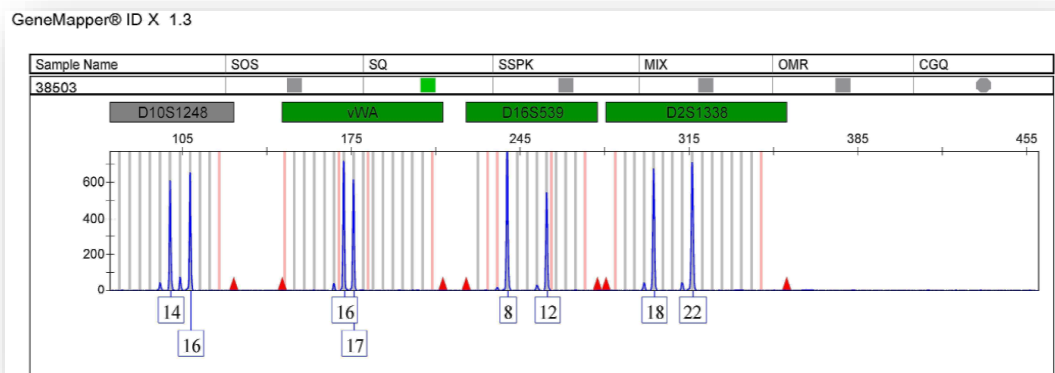
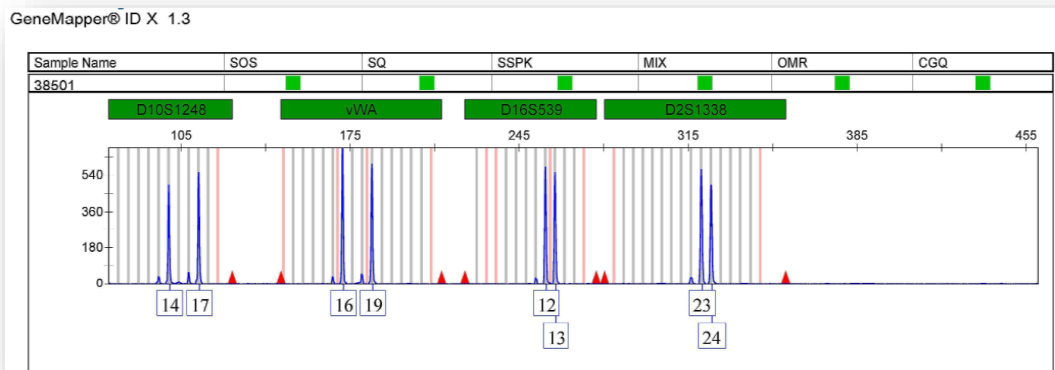
Εικόνα 7.7: Σχηματική απεικόνιση του ποσοστού (%) των πατρικών έναντι μητρικών μεταλλάξεων.



Εικόνα 7.8: Σχηματική απεικόνιση του ποσοστού (%) των πατρικών έναντι μητρικών μεταλλάξεων στο σύνολο των ελεγχθέντων ατόμων.



Εικόνα 7.9: Περίπτωση ελέγχου αμφισβητούμενης γονιότητας. Μία αλληλική ανομοιότητα μεταξύ του ΦΠ (ID:39799) και του παιδιού (ID:39800SWAB) παρατηρήθηκε στον SE33 aSTR γενετικό τόπο. (Πιθανό σιωπηλό αλληλίο: SE33 35*16). Βιολογική μητέρα (ID:40285). Η πατρότητα δεν αποκλείεται.



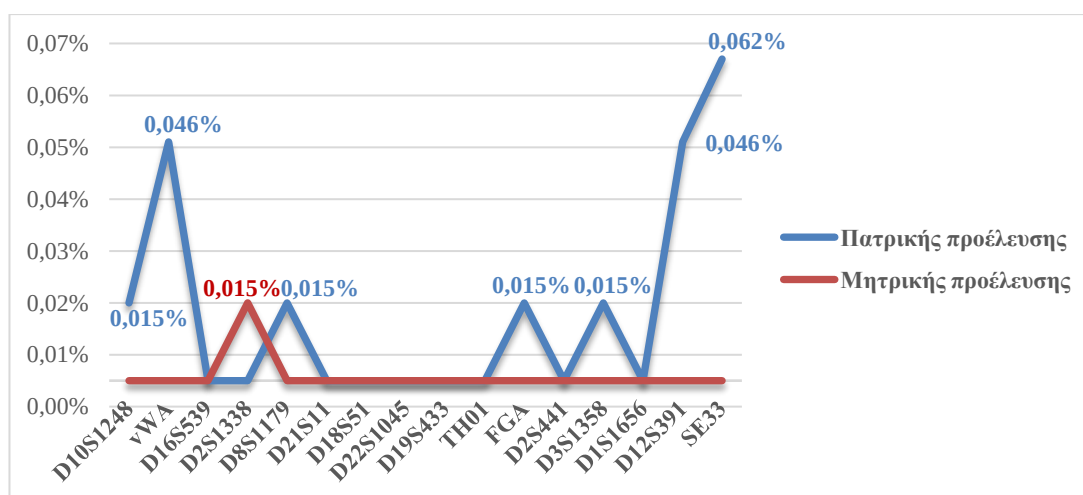
Εικόνα 7.10: Περίπτωση ελέγχου αμφισβητούμενης γονικότητας. Μία αλληλική ανομοιότητα μεταξύ του ΦΠ (ID:38501) και του παιδιού (ID:38504SWAB) παρατηρήθηκε στον vWA aSTR γενετικό τόπο. (Πιθανή μετάλλαξη: vWA 19→18 ή 16→18). Βιολογική μητέρα (ID:38503). Η πατρότητα δεν αποκλείεται.

Τα PI των συγκεκριμένων aSTRs γενετικών τόπων δεν απορρίφθηκαν, αλλά συνυπολογίστηκαν για την εξαγωγή του δείκτη W κάνοντας χρήση της συχνότητας μετάλλαξης του συγκεκριμένου aSTR γενετικού τόπου, όπως αυτή αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Οι δε δείκτες PE_{STR} (99,9999987000 - 99,9999999999) και $RMNE_{STR}$ ($1,7600 \times 10^{-13}$ - $1,3207 \times 10^{-8}$) ενίσχυαν σε μεγάλο βαθμό την υπόθεση ύπαρξης συγγένειας μεταξύ των ΦΓ και του παιδιού και όχι την συμπτωματική παρουσία του ΥΠΠΑ.

Και οι 15 περιπτώσεις ελέγχου γονιότητας αναλύθηκαν ξανά από τα αρχικά πρότυπα δείγματα για να επιβεβαιωθεί το μη αναμενόμενο αποτέλεσμα.

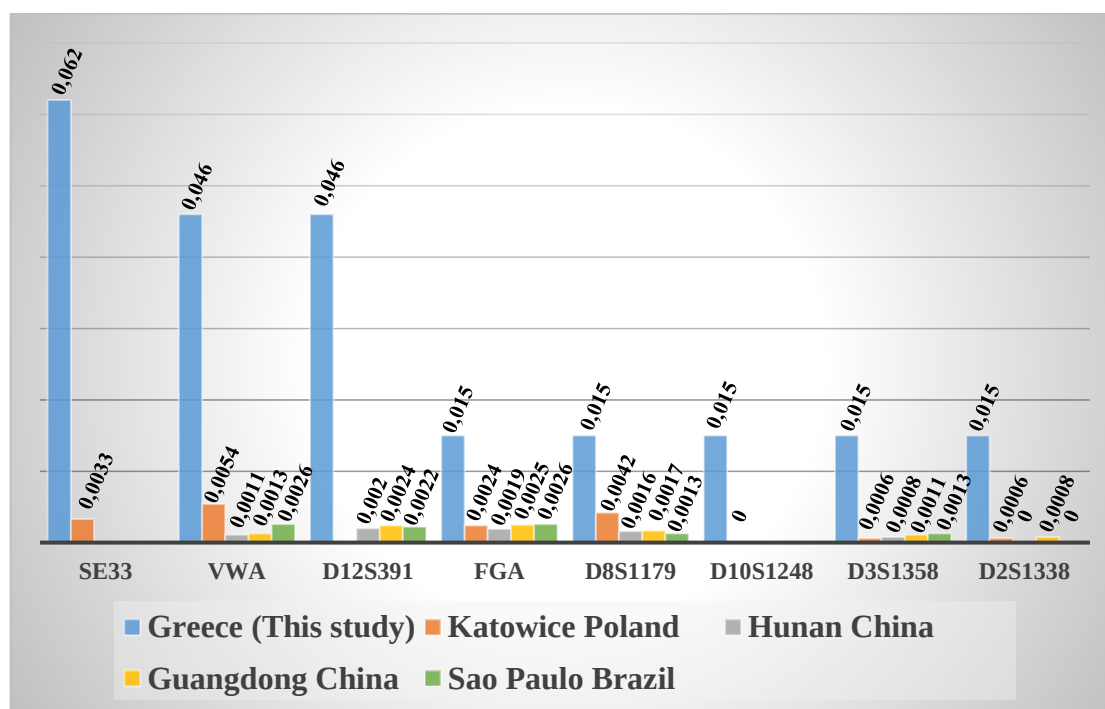
Οι επιβεβαιωμένες περιπτώσεις γονεϊκής-γενετικής σχέσης που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη για τον υπολογισμό της συχνότητας των aSTRs μεταλλάξεων απέδωσαν 6.400 γονεϊκές μεταβιβάσεις αλληλομόρφων σε 400 γονεϊκές μειώσεις (15/400, 3,75%).



Εικόνα 7.11: Συχνότητα μετάλλαξης των aSTRs γενετικών τόπων στους Κανκασίους.

Συγκεκριμένα, ο γενετικός τόπος που εμφάνισε τις περισσότερες μεταλλάξεις ήταν ο SE33 με συχνότητα 0,062% (4/6.400), ενώ οι γενετικοί τόποι με τις λιγότερες μεταλλάξεις ήταν οι FGA, D8S1179, D10S1248, D3S1358 και D2S1338 με συχνότητα 0,015% (1/6.400) ο καθένας. Οι γενετικοί τόποι με ενδιάμεση τιμή ήταν οι vWA και D12S391 με συχνότητα 0,046% (3/6.400) αντιστοίχως. Οι γενετικοί τόποι D16S539, D21S11, D18S51, D22S1045, D19S433, TH01, D2S441 και D1S1656 δεν εμφάνισαν καμία μετάλλαξη στο σύνολο των ελεγχθέντων ατόμων (Πίνακας 7.3) (Εικόνα 7.11).

Παράλληλα, έγινε προσπάθεια να συγκριθούν τα δεδομένα της δικής μας μελέτης με αυτά άλλων ανάλογων μελετών της παγκόσμιας βιβλιογραφίας, τα οποία παρατίθενται στην εικόνα 7.12.

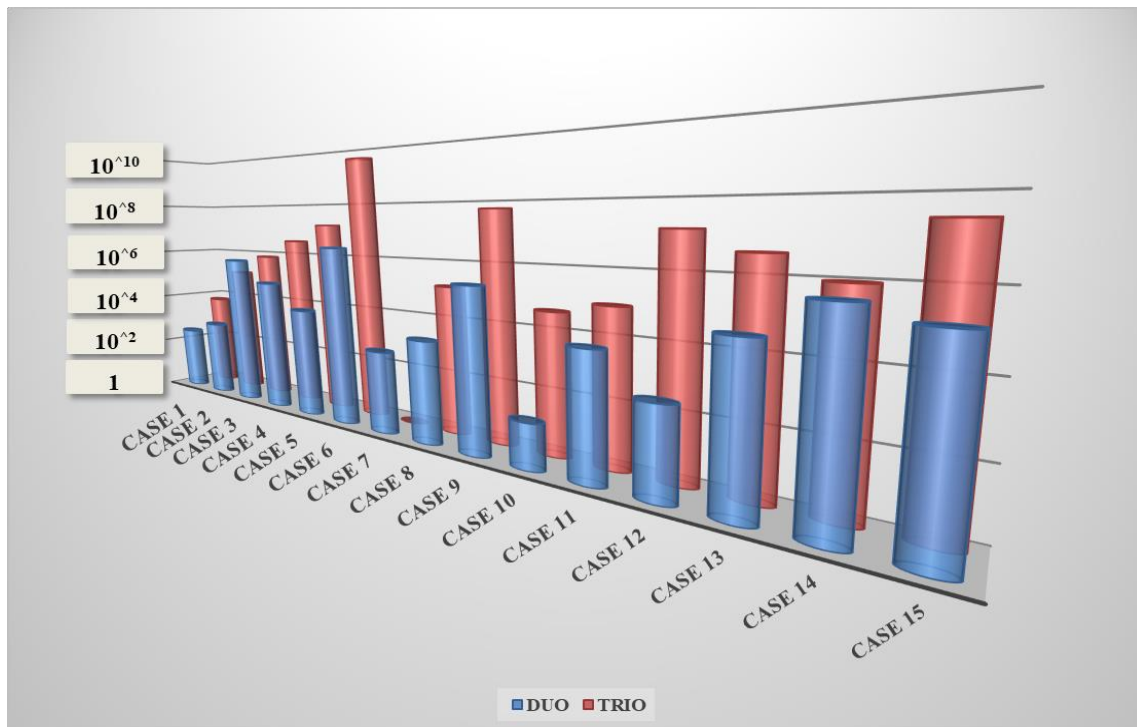


Εικόνα 7.12: Συγκριτική μελέτη της συχνότητας των aSTRs μεταλλάξεων της δικής μας μελέτης με άλλες της παγκόσμιας βιβλιογραφίας.

7.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ 15 ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΑΝ ΑΛΛΗΛΙΚΕΣ ΑΝΟΜΟΙΟΤΗΤΕΣ ΣΕ DUO MOTHERLESS

Προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσο η απουσία των γενετικών δεδομένων ενός εκ των δύο υποτιθέμενων γονέων επηρέαζε την εγκυρότητα του τελικού αποτελέσματος, οι 15 περιπτώσεις που εμφάνισαν αλληλική ανομοιότητα μελετηθήκαν χωρίς το γενετικό προφίλ της μητέρας (duo motherless περίπτωση). Τα τελικά αποτελέσματα έδειξαν ότι οι δείκτες CPI και W μειώθηκαν σημαντικά, κάτι που ελαττώνει την πιθανότητα ο ΦΠ να είναι πράγματι ο βιολογικός πατέρας του παιδιού και κατ' επέκταση συνεπάγεται την αύξηση του κινδύνου για ψευδείς αποκλεισμούς (Πίνακας 7.4 – Εικόνα 7.13).

Συγκεκριμένα, σε οχτώ περιπτώσεις ελέγχου που καταγράφηκε αλληλική ανομοιότητα, ο δείκτης CPI υπολογίστηκε <10.000 (Πίνακας 7.4 - Περιπτώσεις N^ο 1, N^ο 2, N^ο 3, N^ο 7, N^ο 8, N^ο 10, N^ο 11 και N^ο 12). Η επίλυση της συγγένειας ήταν αδύνατη (deficiency περίπτωση) καθώς η γονικότητα δεν μπορούσε να αποκλεισθεί ή να επιβεβαιωθεί με στατιστική βεβαιότητα.



Εικόνα 7.13: Η μεταβολή των CPI δεικτών κατά την ανάλυση των 15 περιπτώσεων που εμφάνισαν αλληλικές ανομοιότητες από trio σε duo motherless.

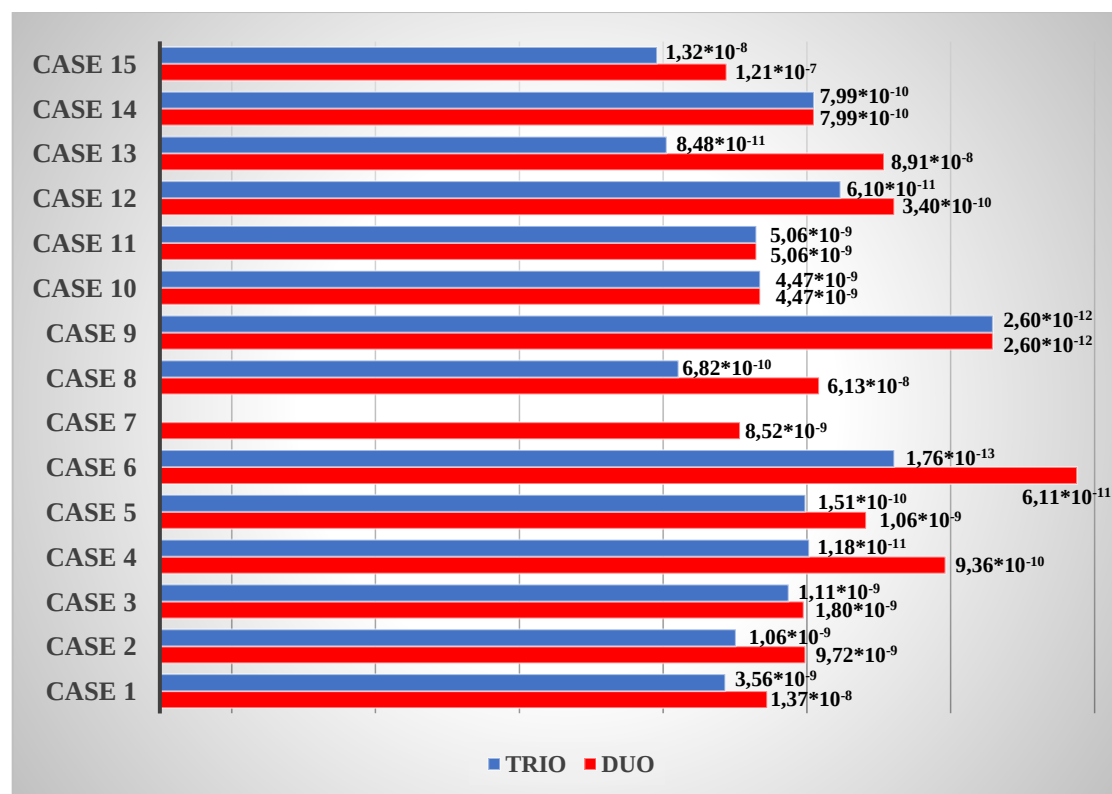
Επιπρόσθετα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν τέσσερις (4) περιπτώσεις, τα γενετικά προφίλ των οποίων παρατίθενται στους πίνακες 7.5, 7.6, 7.7 και 7.8 (περιπτώσεις N°4, N°11, N°14 και N°15 αντίστοιχα), κατά τις οποίες με την απουσία του προφίλ της μητέρας έπαψε να υφίσταται η μετάλλαξη στους αντίστοιχους γενετικούς τόπους STRs. Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό ότι καθίσταται επιτακτική η ανάγκη ελέγχου των γενετικών προφίλ και των δύο γονέων, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ή να αποφευχθεί η πιθανότητα λανθασμένων συμπερασμάτων.

Προκειμένου να ελέγξουμε την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων για τις 15 περιπτώσεις αλληλικής ανομοιότητας, υπολογίστηκαν οι δείκτες PE και RMNE. Ο δείκτης PE αναφέρεται στο ποσοστό ανδρών που ανήκουν στον ίδιο πληθυσμό με τον ΦΠ και οι οποίοι θα αποκλείονταν σε ένα δεδομένο σύνολο γενετικών δεικτών αν είχαν ελεγχθεί με το συγκεκριμένο παιδί. Αντίθετα, ο δείκτης RMNE εκφράζει την πιθανότητα ένας τυχαίος άνδρας που ανήκει στον ίδιο πληθυσμό με τον ΦΠ να είναι ο βιολογικός πατέρας του παιδιού. Οι δείκτες αυτοί, όπως ακριβώς και οι δείκτες CPI και W, υπολογίστηκαν και στην περίπτωση απουσίας του γενετικού προφίλ της μητέρας (duo motherless περίπτωση). Στο δείκτη PE αφαιρώντας το προφίλ της μητέρας παρατηρήθηκε μείωση, αλλά όχι σε βαθμό, ώστε να αλλοιωθεί το τελικό συμπέρασμα (Εικόνα 7.14). Όσον αφορά το δείκτη RMNE, οι τιμές του στις περισσότερες

περιπτώσεις αυξήθηκαν χωρίς ωστόσο να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα, ενώ σε κάποιες άλλες δεν παρουσίασαν μεταβολή (Εικόνα 7.15).



Εικόνα 7.14: Η μεταβολή των PE δεικτών κατά την ανάλυση των 15 περιπτώσεων που εμφάνισαν αλληλικές ανομοιότητες από trio σε duo motherless.



Εικόνα 7.15: Η μεταβολή των RMNE δεικτών κατά την ανάλυση των 15 περιπτώσεων που εμφάνισαν αλληλικές ανομοιότητες από trio σε duo motherless.

Πίνακας 7.1: Οι αSTRs γενετικοί τύποι, τα γενετικά προφίλ, η πιθανή μετάλλαξη, το είδος της μετάλλαξης, το φύλο και η ηλικία των εξεταζόμενων ατόμων στις 15 περιπτώσεις μη αποκλεισμού που καταγράφησαν αλληλικές ανομοιότητες.

α/α	Γενετικός τύπος	Προφίλ πατέρα	Προφίλ μητέρας	Προφίλ παιδιού	ΥΠΠΑ/ ΥΜΠΑ	Πιθανή μετάλλαξη	Προέλευση μετάλλαξης	Ηλικία πατέρα	Επανάλ. μονάδα 5'-3'	Είδος μετάλλαξης	Συχνότητα μετάλλαξης στους καυκάσιους
1	SE33	18, 20	20, 34	19, 34	18 ή 20	18→19 20→19	Πατρική	45 ετών	AAAG complex	Προσθήκη ή Έλλειψη τετρανουκλεοτιδίου	6,4x10 ⁻³
2	SE33	35, 35	12, 16	16, 16	35	35→16	Πατρική	29 ετών	AAAG complex	Απόλεια αλληλίου (Null allele)	6,4x10 ⁻³
3	SE33	17, 25.2	19, 28.2	19, 24.2	25.2	25.2→24.2	Πατρική	39 ετών	AAAG complex	Έλλειψη τετρανουκλεοτιδίου	6,4x10 ⁻³
4	SE33	28.2, 33.2	22.2, 28.2	28.2, 32.2	33.2	33.2→32.2	Πατρική	41 ετών	AAAG complex	Έλλειψη τετρανουκλεοτιδίου	6,4x10 ⁻³
5	vWA	17, 19	16, 18	18, 20	19	19→20	Πατρική	41 ετών	TCTA complex	Προσθήκη τετρανουκλεοτιδίου	3,25x10 ⁻³
6	vWA	16, 19	16, 17	17, 18	19	19→18	Πατρική	36 ετών	TCTA complex	Έλλειψη τετρανουκλεοτιδίου	3,25x10 ⁻³
7	vWA	17, 20	-	18, 19	17 ή 20	17→18 20→19	Πατρική	33 ετών	TCTA complex	Προσθήκη ή Έλλειψη τετρανουκλεοτιδίου	3,25x10 ⁻³
8	D12S391	16, 21	22, 22	20, 22	21	21→20	Πατρική	31 ετών	AGAT complex	Έλλειψη τετρανουκλεοτιδίου	1,54x10 ⁻³
9	D12S391	21, 24	20, 20	20, 20	21	21→20	Πατρική	35 ετών	AGAT complex	Έλλειψη τετρανουκλεοτιδίου	1,54x10 ⁻³
10	D12S391	22, 24	19.3, 22	19.3, 23	22 ή 24	22→23 24→23	Πατρική	28 ετών	AGAT complex	Προσθήκη ή Έλλειψη τετρανουκλεοτιδίου	1,54x10 ⁻³
11	FGA	19, 23	20, 23	22, 23	23	23→22	Πατρική	35 ετών	TTC complex	Έλλειψη τετρανουκλεοτιδίου	3,71x10 ⁻³
12	D8S1179	13, 13	12, 12	12, 14	13	13→14	Πατρική	49 ετών	TCTA complex	Προσθήκη τετρανουκλεοτιδίου	2,06x10 ⁻³
13	D10S1248	14, 17	15, 15	15, 16	17	17→16	Πατρική	45 ετών	GGAA complex	Έλλειψη τετρανουκλεοτιδίου	1,54x10 ⁻³
14	D3S1358	15, 18	18, 18	18, 19	18	18→19	Πατρική	41 ετών	TCTA complex	Προσθήκη τετρανουκλεοτιδίου	1,68x10 ⁻³
15	D2S1338	24, 25	16, 24	23, 25	24	24→23	Μητρική	27 ετών	TGCC complex	Έλλειψη τετρανουκλεοτιδίου	2,49x10 ⁻⁴

Πίνακας 7.2: Διαφορά πατρικής έναντι μητρικής aSTR μετάλλαξης στο σύνολο των ελεγχθέντων ατόμων, όπως αυτή προκύπτει από την aSTR γονοτύπηση.

<i>Πιθανή διαφορά πατρικής έναντι μητρικής STR μετάλλαξης στο σύνολο των ελεγχθέντων ατόμων</i>		
<i>Μεταλλάξεις ανδρών (n, %)</i>	<i>Μεταλλάξεις γυναικών (n, %)</i>	<i>p-value</i>
14/400 ➡ 3,50%	1/400 ➡ 0,25%	0,001

Πίνακας 7.3: Συχνότητα μετάλλαξης των aSTRs γενετικών τόπων στους Καυκάσιους.

Γενετικός τόπος	Αριθμός μεταλλάξεων (n=15)	Συχνότητα μεταλλάξεων (15/400, 3,75%)
SE33	4	4 / 6.400 ➡ 0,062%
vWA	3	3 / 6.400 ➡ 0,046%
D12S391	3	3 / 6.400 ➡ 0,046%
FGA	1	1 / 6.400 ➡ 0,015%
D8S1179	1	1 / 6.400 ➡ 0,015%
D10S1248	1	1 / 6.400 ➡ 0,015%
D3S1358	1	1 / 6.400 ➡ 0,015%
D2S1338	1	1 / 6.400 ➡ 0,015%

Πίνακας 7.4: Η μεταβολή των CPI και W δεικτών κατά την ανάλυση των 15 περιπτώσεων που εμφάνισαν αλληλικές ανομοιότητες από trio σε duo motherless.

α/α	Εθνικότητα Πατέρα	Γενετικός τύπος	CPI TRIO	CPI DUO	W TRIO	W DUO
1	Ιρακινή	SE33	1,2x10 ⁵	835	99,9991715064	99,8803827751
2	Ελληνική	SE33	6,9x10 ⁵	5.693	99,9998550726	99,9824376537
3	Ελληνική	SE33	5,6x10 ⁵	291	99,9998232594	99,6575342466
4	Ελληνική	SE33	3,4x10 ⁶	8,3x10 ⁴	99,9999706186	99,9988002687
5	Ελληνική	vWA	1,5x10 ⁷	1x10 ⁴	99,9999936061	99,9903984638
6	Ελληνική	vWA	3,7x10 ⁹	2,5x10 ⁶	99,9999999731	99,9999600968
7	Ελληνική	vWA	-	788	-	99,8732572877
8	Αιγυπτιακή	D12S391	1,4x10 ⁵	3.262	99,9993293136	99,9693533558
9	Ελληνική	D12S391	5,4x10 ⁷	2,7x10 ⁵	99,9999981684	99,9996380510
10	Ρουμανική	D12S391	4,4x10 ⁵	32	99,9977251530	96,9696969697
11	Πακιστανική	FGA	9,1x10 ⁴	9.152	99,9989035207	99,9890746952
12	Ελληνική	D8S1179	1,4x10 ⁷	602	99,9999930313	99,8341625207
13	Ελληνική	D10S1248	3,8x10 ⁶	5,2x10 ⁴	99,9999736842	99,9980944395
14	Ελληνική	D3S1358	9,0x10 ⁵	4,8x10 ⁵	99,9998892221	99,9997924021
15	Ελληνική	D2S1338	2,6 x10 ⁷	2x10 ⁵	99,9999962088	99,9995027509

Πίνακας 7.5: Περίπτωση Νο4, αφαιρώντας το γενετικό προφίλ της μητέρας παύει να υφίσταται μετάλλαξη στον SE33 γενετικό τόπο.

α/α	Γενετικός Τόπος	ΦΠ	Μητέρα	Παιδί
1	D10S1248	13, 15	13, 15	13, 13
2	vWA	17,18	14, 17	17, 18
3	D16S539	10, 11	12, 13	10, 13
4	D2S1338	19, 25	20, 23	23, 25
5	Amelogenin	X, Y	X, X	X, X
6	D8S1179	12, 16	14, 14	12, 14
7	D21S11	27, 30	29, 31.2	29, 30
8	D18S51	12, 15	14, 16	14, 15
9	D22S1045	15, 16	15, 16	16, 16
10	D19S433	14.2, 14.2	13, 16.2	14.2, 16.2
11	THO1	9.3, 9.3	6, 9.3	9.3, 9.3
12	FGA	21, 22	21, 28	21, 22
13	D2S441	10, 11.3	12, 14	10, 12
14	D3S1358	15, 16	13, 18	16, 18
15	D1S1656	11, 12	11, 12	11, 11
16	D12S391	18.3, 23	22, 23	23, 23
17	SE33	28.2, 33.2	22.2, 28.2	28.2, 32.2

Πίνακας 7.6: Περίπτωση Νο11, αφαιρώντας το γενετικό προφίλ της μητέρας παύει να υφίσταται μετάλλαξη στον FGA γενετικό τόπο.

α/α	Γενετικός Τόπος	ΦΠ	Μητέρα	Παιδί
1	D10S1248	14, 15	13, 13	13, 15
2	vWA	16, 17	15, 16	16, 16
3	D16S539	11, 11	10, 11	10, 11
4	D2S1338	19, 21	17, 23	19, 23
5	Amelogenin	X, Y	X, X	X, X
6	D8S1179	12, 13	14, 16	12, 14
7	D21S11	30, 31	28, 29	29, 31
8	D18S51	13, 16	13, 18	13, 18
9	D22S1045	15, 15	14, 15	14, 15
10	D19S433	14, 14.2	14, 15	14, 15
11	THO1	6, 7	6, 6	6, 6
12	FGA	19, 23	20, 23	22, 23
13	D2S441	10, 11	11, 15	11, 15
14	D3S1358	15, 16	14, 16	14, 15
15	D1S1656	11, 12	12, 17.3	11, 17.3
16	D12S391	15, 19	22, 22	19, 22
17	SE33	26.2, 27.2	17, 31.2	17, 27.2

Πίνακας 7.7: Περίπτωση Νο14, αφαιρώντας το γενετικό προφίλ της μητέρας παύει να υφίσταται μετάλλαξη D3S1358 γενετικό τόπο.

α/α	Γενετικός Τόπος	ΦΠ	Μητέρα	Παιδί
1	D10S1248	14, 15	13, 16	13, 15
2	vWA	16,17	18, 19	17, 18
3	D16S539	8, 10	9, 11	9, 10
4	D2S1338	22, 23	18, 24	22, 24
5	Amelogenin	X, Y	X, X	X, Y
6	D8S1179	13, 14	13, 14	13, 14
7	D21S11	30.2, 32.2	30, 34.2	30, 32.2
8	D18S51	15, 23	12, 15	12, 15
9	D22S1045	15, 15	11, 15	15, 15
10	D19S433	14, 14	14, 15	14, 15
11	THO1	6, 6	9, 9.3	6, 9
12	FGA	20, 25	22, 23	20, 23
13	D2S441	11, 11	10, 14	11, 14
14	D3S1358	15, 18	18, 18	18, 19
15	D1S1656	11, 15	12, 17	11, 17
16	D12S391	17, 21	17, 23	17, 23
17	SE33	20, 32.2	24.2, 31.2	20, 31.2

Πίνακας 7.8: Περίπτωση Νο15, αφαιρώντας το γενετικό προφίλ της μητέρας παύει να υφίσταται μετάλλαξη D2S1338 γενετικό τόπο.

α/α	Γενετικός Τόπος	ΦΠ	Μητέρα	Παιδί
1	D10S1248	13, 15	15, 16	13, 16
2	vWA	16,17	15, 16	16, 17
3	D16S539	11, 13	11, 12	12, 13
4	D2S1338	24, 25	16, 24	23, 25
5	Amelogenin	X, Y	X, X	X, Y
6	D8S1179	12, 13	13, 14	13, 13
7	D21S11	30, 32.2	28, 30	28, 32.2
8	D18S51	15, 19	15, 15	15, 19
9	D22S1045	15, 15	16, 16	15, 16
10	D19S433	14, 17.2	14, 15	14, 14
11	THO1	6, 8	8, 9.3	6, 8
12	FGA	22, 24	22, 24	24, 24
13	D2S441	10, 11	11, 11	11, 11
14	D3S1358	15, 17	15, 18	15, 15
15	D1S1656	13, 15	11, 18.3	15, 18.3
16	D12S391	18, 19	15, 20	15, 18
17	SE33	18, 26.2	18, 28.2	18, 18

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σύγχρονη τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA άνοιξε νέους ορίζοντες στη διεξαγωγή δοκιμασιών ελέγχου συγγένειας στον άνθρωπο. Η αναγνώριση ατόμων στην Ιατροδικαστική καθίσταται επιτακτική ανάγκη σε εγκληματολογικές υποθέσεις, όπως η αναγνώριση δραστών βίαιων εγκλημάτων (π.χ. περιπτώσεις δολοφονιών, σεξουαλικών επιθέσεων), ταυτοποίηση αγνοουμένων/θυμάτων μαζικών καταστροφών [104-106]. Τα τελευταία χρόνια, η χρήση της ανάλυσης DNA παρέχει αξιόπιστα στοιχεία τόσο στην καταδίκη των παραβατών, όσο και στην απαλλαγή αθώων υπόπτων. Ένα άλλο πεδίο εφαρμογής της τυποποίησης του DNA είναι ο έλεγχος πατρότητας/μητρότητας χρησιμοποιώντας ειδικούς γενετικούς-αυτοσωματικούς, μιτοχονδριακούς και Υ-χρωμοσωμικούς δείκτες DNA [107-109], ενώ πολλές είναι οι περιπτώσεις που οι μέθοδοι ταυτοποίησης του DNA έχουν αυξήσει την ικανότητα επίλυσης πολύπλοκων προβλημάτων οικογενειακών σχέσεων ή κληρονομικών διαφορών [110].

Σήμερα, οι aSTRs γενετικοί τόποι, η ανάλυση των νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs), οι μικροί πολυμορφισμοί εισαγωγής/διαγραφής και οι μικροαπλότυποι χρησιμοποιούνται στους ελέγχους πατρότητας/μητρότητας [111-114]. Λόγω του υψηλού βαθμού πολυμορφισμού και της επακόλουθης διακριτικής ικανότητάς τους, οι aSTRs γενετικοί τόποι αποτελούν τους δείκτες πρώτης επιλογής παγκοσμίως για τη διενέργεια ελέγχων συγγένειας. Στο εμπόριο υπάρχουν αρκετά διαθέσιμα aSTR κιτ που έχουν αναπτυχθεί για την ανάλυση έως και 15-23 aSTR γενετικών τόπων σε ένα μόνο σωληνάριο PCR [115]. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε από την Ακαδημία Επιστημονικής Έρευνας & Τεχνολογίας και το Εθνικό Κέντρο Ερευνών στην Αίγυπτο, έδειξε ότι όσο περισσότεροι γενετικοί δείκτες DNA ελέγχθηκαν, τόσο μεγαλύτερη ήταν η πιθανότητα δύο ανεξάρτητα άτομα να έχουν διαφορετικούς γονότυπους.

Ωστόσο, ενώ εμφανίζουν επαρκή ισχύ για την επίλυση ελέγχων πατρότητας [116,117], η παραδοσιακή δοκιμασία τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης περιορίζει τον αριθμό και το μέγεθος του amplicon, λόγω του ότι οι aSTR γενετικοί τόποι πρέπει να

διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος και το χρώμα της βαφής τους. Επιπρόσθετα, μεταξύ των διαφόρων aSTRs γενετικών τόπων, οι τετρανουκλεοτιδικές επαναλήψεις είναι οι πιο δημοφιλείς από τις δι-, τρι-, πεντα- και εξα-νουκλεοτιδικές, καθώς μειώνουν τον σχηματισμό προϊόντων-θραυσμάτων (stutter products) που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης με PCR, λόγω του φαινομένου ολίσθησης του αντιγραφόμενου κλώνου (slipped strand mispairing) [118-120]. Η ανάλυση συγγενικών σχέσεων 2^{ου} ή 3^{ου} βαθμού συγγένειας εμφανίζει χαμηλή διακριτική ικανότητα του λόγου των πιθανοτήτων (LR ή CPI) [121]. Κατά συνέπεια, σε αυτές τις περιπτώσεις ελέγχου συγγένειας απαιτείται ο συνδυασμός περισσότερων των δύο κιτ με διαφορετικά σύνολα aSTRs γενετικών δεικτών, ώστε να καλυφθεί ένα ευρύτερο φάσμα γενετικών τόπων και να αυξηθεί η τιμή και η αξία του λόγου των πιθανοτήτων (LR ή CPI). Στην Ευρώπη χρησιμοποιούνται 34 aSTRs γενετικοί δείκτες για δοκιμασίες συγγένειας 1^{ου} και 2^{ου} βαθμού [122]. Οι Ilaria et al., αναφέρουν ότι 41 aSTRs αυξάνουν τη διακριτική ικανότητα της σχέσης μεταξύ ατόμων που είχαν ένα μόνο κοινό γονέα (half-sibling relationships) [123], ενώ στην ιαπωνική κοινότητα 39 aSTRs έχουν προταθεί για την διεξαγωγή ελέγχων 1^{ου} βαθμού συγγένειας [124]. Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες για την ακόμη μεγαλύτερη αύξηση του αριθμού των STR γενετικών δεικτών [125-127], ενώ άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η ανάλυση γενετικών δεικτών που εδράζονται στο χρωμόσωμα X μπορεί να είναι χρήσιμη στην επίλυση πολύπλοκων περιπτώσεων ελέγχου συγγένειας στην εγκληματολογική γενετική [128-132]. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι προσδιορισμού του γονοτύπου, συμπεριλαμβανομένων και των X-chromosomal specific STRs, Indels και SNPs. [133-141].

Η διαφοροποίηση των aSTRs γενετικών τόπων επιτυγχάνεται μέσω μεταλλάξεων, γεγονός που οδηγεί και στην αύξηση της ποικιλομορφίας τους [142]. Τα aSTRs αλληλόμορφα έχουν προκύψει μετά από αργή διαφοροποίηση σε βάθος χιλιάδων χρόνων ενός αρχικού προτύπου μορίου DNA [143], και η οποία οδήγησε σε αλλαγή μίας βάσης ή μίας ολόκληρης επανάληψης. Οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους πιστεύεται ότι σχετίζονται οι μεταλλάξεις των aSTRs είναι ο μηχανισμός ολίσθησης του αντιγραφόμενου κλώνου του DNA (replication slippage ή DNA slippage) ή η ελαττωματική επιδιόρθωση του DNA κατά την διάρκεια της αντιγραφής του, οι οποίοι βρίσκονται υπό μελέτη [142, 144]. Σε σχέση με άλλους προτεινόμενους μηχανισμούς, όπως είναι ο μη σωστός διαχωρισμός στο στάδιο της μείωσης και ο μηχανισμός της μετάθεσης των χρωμοσωμάτων, ο μηχανισμός ολίσθησης του αντιγραφόμενου κλώνου του DNA θεωρείται ευρέως ως ο κύριος μηχανισμός

μετάλλαξης των aSTRs [145]. Η aSTR μετάλλαξη που προκύπτει κατά τη διάρκεια της μείωσης μπορεί να οδηγήσει σε αλληλική ανομοιότητα σε έναν συγκεκριμένο γενετικό τόπο μεταξύ του ΦΠ και του παιδιού. Αυτή η αλληλική ανομοιότητα μπορεί να προκύψει είτε από κάποια προσθήκη, είτε από κάποια απώλεια μιας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας DNA και μπορεί να οφείλεται, είτε σε μεταλλάξεις που εντοπίζονται εντός της γενετικής περιοχής που κωδικοποιεί για το aSTR αλλήλιο, είτε εντός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στη θέση πρόσδεσης του εκκινητή.

Με βάση τις υπάρχουσες γνώσεις αρκετοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν την συχνότητα των aSTRs μεταλλάξεων, όπως είναι ο αριθμός, η μονάδα και η δομή της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας, η ηλικία των γονέων, ο ανασυνδυασμός και η σύνθεση της πλευρικής περιοχής (flanking sequence). Συγκεκριμένα, ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες-κλειδί για τη δημιουργία aSTR μεταλλάξης είναι ο αριθμός των επαναλήψεων. Μελέτες, όπως η οικογενειακή προσέγγιση [146] και η γενετική μελέτη των πληθυσμών [147], έχουν δείξει μία θετική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού μετάλλαξης και του αριθμού των επαναλήψεων σε πολλά σπονδυλωτά, δηλαδή ο ρυθμός μετάλλαξης των aSTRs αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο αριθμός των επαναλήψεων [148, 149]. Η κατεύθυνση της μετάλλαξης μπορεί να διαφέρει στα αλληλόμορφα διαφορετικών μεγεθών του ίδιου γενετικού τόπου [150]. Συγκεκριμένα, μια επέκταση συμβαίνει συχνότερα σε βραχείς aSTRs τόπους, ενώ υπάρχει μείωση του αριθμού των επαναλήψεων σε μεγαλύτερους γενετικούς τόπους [151]. Επίσης, άλλες μελέτες καταδεικνύουν ότι τα μακρύτερα αλλήλια έχουν υψηλότερους ρυθμούς μετάλλαξης από ό,τι τα βραχύτερα [152]. Παράλληλα, υποστηρίζεται ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις οφείλονται σε μετατοπίσεις ενός σταδίου (single-step), με μια ελαφρά τάση προς αύξηση του αριθμού των επαναλαμβανόμενων μονάδων. Ακόμη, ευρήματα μελετών δείχνουν σημαντική διαφορά στα ποσοστά μετάλλαξης των 13 CODIS aSTR γενετικών τόπων μεταξύ των πληθυσμών από διαφορετικές εθνικότητες ή γεωγραφικές περιοχές. Επίσης, η συχνότητα της μετάλλαξης δινουκλεοτιδικών επαναλήψεων είναι υψηλότερη από αυτή των τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων [153, 154]. Όσον αφορά στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα, το χρωμόσωμα Υ, καθώς επίσης και στα καρκινικά κύτταρα, έχει βρεθεί ότι η συχνότητα μετάλλαξης είναι αισθητά υψηλότερη στους ετεροζυγώτες με μεγάλο μήκος αλληλομόρφων [155]. Επαναλαμβανόμενα μοτίβα με μεγάλο αριθμό επανάληψης του δινουκλεοτιδίου AT μεταλλάσσονται ταχύτερα σε σχέση με εκείνα με υψηλό ποσοστό σε GC [153], υποδηλώνοντας ότι η σταθερότητα λόγω διπλών ή τριπλών δεσμών μεταξύ των

συμπληρωματικών κλώνων της πρότυπης ακολουθίας θα μπορούσε να επηρεάσει το ρυθμό μετάλλαξης. Συμπεραίνεται ότι οι ακολουθίες που περιέχουν σε μεγάλο βαθμό το δινουκλεοτίδιο GC, μειώσουν τη συχνότητα των γεγονότων ολίσθησης του αντιγραφόμενου κλώνου του DNA (replication slippage ή DNA slippage). Παράλληλα, έχει παρατηρηθεί ότι οι μεταλλάξεις πατρικής προέλευσης είναι πολύ πιο συχνές από τις μεταλλάξεις μητρικής προέλευσης και ο αριθμός τους είναι κατά πολύ μεγαλύτερος όσο αυξάνεται η ηλικία των ΦΠ κατά τη διάρκεια της σύλληψης του παιδιού. Η εξήγηση είναι ότι τα σπερματοζωάρια υφίστανται περισσότερους κύκλους αντιγραφής DNA από ότι τα ωάρια, αλλά και αυξανόμενης της ηλικίας αυξάνεται και ο αριθμός των μειώσεων στα οποία υπόκεινται και ως εκ τούτου έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα μετάλλαξης [156, 157].

Η παρουσία των aSTRs μεταλλάξεων είναι ιδιαίτερα σημαντική στον έλεγχο πατρότητας/μητρότητας, καθώς η μελέτη της ύπαρξης σχέσης μεταξύ του παιδιού και του ΦΓ γίνεται με βάση την υπόθεση ότι τα αλληλόμορφα παραμένουν τα ίδια κατά την μεταβίβασή τους από γενιά σε γενιά. Η υψηλή συχνότητα των aSTRs μεταλλάξεων σε κάποιους aSTR γενετικούς τύπους μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένο αποκλεισμό της συγγένειας [142]. Ωστόσο, αντίθετα η ίδια η υψηλή συχνότητα μπορεί να συμβάλλει στη διατήρηση των aSTRs γενετικών πολυμορφισμών και συνεπώς χρησιμεύει ιδιαίτερα στους ελέγχους ταυτοποίησης των ατόμων στην Ιατροδικαστική. Άρα, οι μεταλλάξεις ενδέχεται να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της συγγένειας μεταξύ δύο ατόμων, αλλά όχι τον έλεγχο ταυτοπροσωπίας θυμάτων ή δραστών στην εγκληματολογία, δεδομένου ότι η παρατηρούμενη μετάλλαξη θα οδηγεί σε ταύτιση του αγνώστου δείγματος με ένα μεμονωμένο άτομο [158].

Παρ' όλα αυτά, λόγω του υψηλού βαθμού μετάλλαξης κάποιων εκ των aSTRs γενετικών τύπων, τα γενετικά δεδομένα των ελέγχων μπορεί να αξιολογηθούν λανθασμένα ακόμα και στην περίπτωση που εμφανίζονται μία ή δύο γενετικές αναντιστοιχίες ανάμεσα στον ΦΓ και το παιδί [159, 160]. Η παράλειψή τους στον υπολογισμό του CPI αυξάνει δραματικά την πιθανότητα ψευδούς επιβεβαίωσης της συγγένειας και εγκυμονεί κινδύνους, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που ο βιολογικός γονέας είναι στενός συγγενής με τον ΦΓ [161, 162]. Ακόμη η αποτυχία διάκρισης ενός σιωπηλού αλληλίου μπορεί να έχει τεράστιο αντίκτυπο στα γενετικά τεκμήρια απόδειξης μιας συγγένειας. Απαιτείται λοιπόν η συλλογή αξιόπιστων πληροφοριών σχετικά με τους ρυθμούς και τα χαρακτηριστικά των aSTRs μεταλλάξεων, ώστε να εξασφαλιστεί η ορθότητα των ελέγχων μέσω των συγκεκριμένων γενετικών τύπων.

Η εκτίμηση του αριθμού των συμβάντων aSTRs μετάλλαξης μπορεί να γίνει συγκρίνοντας τους γονότυπους των γονέων με αυτούς των παιδιών και η αναζήτηση μπορεί να περιλαμβάνει πολλές μεταβιβάσεις αλληλομόρφων γονέα-παιδιού. [163].

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν δείγματα που λήφθηκαν από 690 άτομα. Αναλύθηκαν 261 περιπτώσεις αμφισβητούμενης γονικότητας εκ των οποίων οι 227 ήταν *trio* περιπτώσεις, ενώ οι 34 ήταν *duo* περιπτώσεις. Η πλειοψηφία αφορούσε ελέγχους πατρότητας (252), ενώ οι περιπτώσεις ελέγχου μητρότητας ήταν μόλις 9. Μεταξύ των 261 περιπτώσεων που μελετήθηκαν, βρέθηκαν 15 περιπτώσεις aSTR αλληλικής ανομοιότητας ανάμεσα στο παιδί και σε έναν από τους ΦΓ (ΦΠ ή ΦΜ). Στις 15 περιπτώσεις στις οποίες κατεγράφησαν αλληλικές ανομοιότητες, τα δεδομένα δεν μας επέτρεψαν να αποκλείσουμε τον ΦΓ, καθώς ο συνολικός αριθμός τους για κάθε ελεγχόμενη περίπτωση ήταν <3 .

Οι επιβεβαιωμένες περιπτώσεις γονεϊκής γενετικής σχέσης που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη για τον υπολογισμό της συχνότητας των aSTRs μεταλλάξεων απέδωσαν 6.400 γονεϊκές μεταβιβάσεις αλληλομόρφων σε 400 γονεϊκές μειώσεις. Σε αυτές κατεγράφησαν 15 αλληλικές ανομοιότητες {*SE33* (4 εκ των οποίων μία περίπτωση *Null allele*), *vWA* (3 εκ των οποίων μία περίπτωση *motherless*), *D12S391* (3), *FGA* (1), *D8S1179* (1), *D10S1248* (1), *D3S1358* (1), *D2S1338* (1)}, σε ισάριθμες περιπτώσεις ελέγχου γονικότητας (15/400, 3,75%). Η πλειονότητα των περιπτώσεων που παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις (13/15), αφορούσαν μετατοπίσεις ενός σταδίου ή προσθήκη ή απώλεια μίας ή δύο τετρα-νουκλεοτιδικών επαναλήψεων, υπόθεση γνωστή ως μοντέλο σταδιακής μετάλλαξης (*Stepwise Mutation Model*, *SMM*). Τα ευρήματά μας βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές [164, 165], ωστόσο, σε αντίθεση με άλλες δεν παρατηρήθηκε μετατόπιση πολλών σταδίων [166, 167]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι 14 περιπτώσεις (14/15) αφορούσαν μεταλλάξεις πατρικής προέλευσης, εκ των οποίων η μία ήταν σημειακή μετάλλαξη εντός της περιοχής πρόσδεσης του εκκινητή (σιωπηλό ή μη λειτουργικό αλληλίο, *null allele*), ενώ μόλις μία περίπτωση (1/15) αφορούσε μητρικής προέλευσης μετάλλαξη. Η διαφορά πατρικής έναντι μητρικής μετάλλαξης βρέθηκε αυξημένη σε επίπεδο στατιστικά σημαντικό (14:1, $p=0.001$) (Πίνακας 7.2).

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης βρίσκονται σε συμφωνία με άλλες μελέτες. Ενδεικτικά αναφέρονται, μεταξύ άλλων, μελέτες με αλληλικές ανομοιότητες μητρικής [168, 169] ή πατρικής προέλευσης στους γενετικούς τόπους TH01 [170], *vWA* [168, 169, 172], *D8S1179* [169, 173], *D5S818* [168], *FGA* [174], *D21S11* [169,

172, 174, 175, 176], D13S317 [170], D12S391 [173, 174], D18S51 [173, 177] και D10S1248 [174]. Σε ανάλογη μελέτη με την παρούσα, των Xu et al. [178], σε σύνολο 4.026 περιπτώσεων ελέγχου γονιότητας (303 trio και 3.723 duo) υπολογίστηκαν 68.743 γονεϊκές μεταβιβάσεις από 3.420 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις ($CPI > 10,000$). Σε αυτές παρατηρήθηκαν 62 περιπτώσεις αλληλικής ανομοιότητας (FGA (7), D8S1179 (6), D21S11 (6), Penta E (6), D12S391 (6), D19S433 (5), D7S820 (4), vWA (4), D3S1358 (3), D18S51 (3), D1S1656 (3), D5S818 (2), D2S441 (2), CSF1PO (1), TH01 (1), D13S317 (1), D16S539 (1), D6S1043 (1)), από τις οποίες οι 47 ήταν πατρικής προέλευσης, οι 13 μητρικής και οι 5 ήταν απροσδιόριστης προέλευσης (60 περιπτώσεις με μία aSTR αλληλική ανομοιότητα, και 5 περιπτώσεις με δύο aSTR αλληλικές ανομοιότητες). Η πλειονότητα των περιπτώσεων της μελέτης των xu et al., αφορούσαν μετατοπίσεις ενός σταδίου ή προσθήκη ή απώλεια μίας ή δύο τετρα-νουκλεοτιδικών επαναλήψεων.

Επίσης, στην παρούσα μελέτη σε μία trio περίπτωση μη αποκλεισμού, καταγράφηκε ένα σιωπηλό αλλήλιο (SE33), το οποίο εμφανίζονταν με διαφορετική ομοζυγωτία στον ΦΠ και το παιδί (SE33 35-35/16-16 αντιστοίχως). Οι δείκτες CPI και W υπολογίστηκαν σε $6,9 \times 10^5$ και 99,9998550726 αντιστοίχως, οι οποίοι δεν οδήγησαν στον αποκλεισμό της γονιότητας. Αρκετές είναι οι αναφορές καταγραφής σιωπηλών αλληλίων (TH01 [179, 180, 181], D8S1179 [180, 182, 183], FGA [184, 185], D18S51 [186], vWA [180, 187], D13S317 [181, 183]). Η λύση η οποία προτείνεται είναι η δυνατότητα ανάλυσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας χρησιμοποιώντας διαφορετικούς εμπρόσθιους και οπίσθιους εκκινητές, προκειμένου να εξακριβωθεί κατά πόσον η μετάλλαξη πραγματοποιήθηκε εντός της θέσης πρόσδεσης του εκκινητή.

Τόσο από τα δικά μας δεδομένα, όσο και από δεδομένα της παγκόσμιας βιβλιογραφίας, προκύπτει ότι οι aSTRs γενετικοί τόποι που μελετήθηκαν και οι μεταλλάξεις που καταγράφηκαν διαφέρουν ανάλογα με τον πληθυσμό που εξετάζεται και αυτό οφείλεται στη γενετική ετερογένεια που υπάρχει ανάμεσα στους διάφορους πληθυσμούς. Ωστόσο, πέρα από αυτές τις διαφορές, οι οποίες είναι λογικό να εμφανίζονται από πληθυσμό σε πληθυσμό, προκύπτουν και κάποιες ομοιότητες, όπως για παράδειγμα το γεγονός ότι ακολουθείται το μοντέλο σταδιακής μετάλλαξης (Stepwise Mutation Model, SMM) [188]. Επίσης, τα αποτελέσματά μας ήταν σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές, στις οποίες περισσότερο από το 90% των γεγονότων μετάλλαξης αφορούσαν μεταλλάξεις ενός σταδίου [189-191]. Ο

μηχανισμός της ολίσθησης του αντιγραφόμενου κλώνου του DNA είναι ευρέως αποδεκτός ως ο κύριος μηχανισμός aSTRs μεταλλάξεων [192, 193]. Τα αποτελέσματά μας ενισχύουν την εξήγηση του προτύπου της ολίσθησης της πολυμεράσης.

Ακόμη, ένα άλλο σημαντικό στοιχείο είναι ότι οι περισσότερες περιπτώσεις αλληλικής ανομοιότητας οφείλονται σε πατρικής προέλευσης μεταλλάξεις. Μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι η ηλικία του ΦΠ σχετίζεται με το υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων στους άρρενες, ειδικά στην ηλικία των 30 ετών και άνω. Έχει παρατηρηθεί δε, μια αύξηση από ένα έως δύο συμβάντα μεταλλάξεων ανά έτος ανά πατρική ηλικία [194, 195]. Μία άλλη μελέτη των Kong et al. [195] αναφέρει ότι η ηλικία του άρρενος γονέα σχετίζεται με το 94% των μεταλλάξεων. Η υψηλότερη εμφάνιση μεταλλάξεων στους άρρενες θα μπορούσε ίσως να αποδοθεί στη διαφορετική συχνότητα και τους τύπους των κυτταρικών διαιρέσεων κατά τη γένεση των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων (germ cells) [196]. Επιπλέον, τα μη διαφοροποιημένα αρσενικά βλαστικά κύτταρα (spermatogonia) συνεχίζουν να διαιρούνται κατά την ενηλικίωση και η γήρανσή τους θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξημένα ποσοστά μετάλλαξης των aSTRs γενετικών τόπων [197]. Επίσης, ενδιαφέρουσα είναι η μελέτη των Jeffreys et al. [198], οι οποίοι αναφέρουν ότι υπάρχει μία θετική συσχέτιση της συχνότητας των μεταλλάξεων με την ηλικία του πατέρα κατά την διάρκεια της σύλληψης, αλλά όχι με την ηλικία της μητέρας, κάτι που αποδόθηκε στο γεγονός ότι το PRDM9 γονίδιο, που ρυθμίζει τη διαδικασία του ανασυνδυασμού στο σπέρμα, θα μπορούσε ίσως να επηρεάσει τη μεταβολή της μειωτικής αστάθειας στα γαμετικά κύτταρα των ανδρών. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι τα οιστρογόνα παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση κατά των ελευθέρων ριζών και στην αντιγήρανση σε σύγκριση με τα ανδρογόνα, γεγονός που δηλώνει ότι τα οιστρογόνα ίσως παρέχουν ισχυρότερη προστασία στη γενετική μετάλλαξη [199]. Αν και αρκετές μελέτες οδήγησαν στην παρατήρηση ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην ηλικία του πατέρα και το ρυθμό μετάλλαξης για τους aSTR γενετικούς τόπους [200, 201], σε αντίστοιχες μελέτες του Y-χρωμοσωμικού STR γενετικού τύπου (Y-chromosomal STR) δεν αποδείχθηκε συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού μετάλλαξης και της ηλικίας των αρρένων ατόμων [202, 203].

Στην παρούσα μελέτη, η σχέση μεταξύ πατρικής ηλικίας και aSTRs μετάλλαξης ήταν εμφανής στις περισσότερες περιπτώσεις (12/14), με εξαίρεση δύο ελέγχους κατά τους οποίους η ηλικία των ΦΠ κατά τη σύλληψη ήταν <30 ετών.

Άλλοι παράγοντες όπως η αναμενόμενη ετεροζυγωτία (He) έχουν επίσης συσχετιστεί θετικά με το ποσοστό μετάλλαξης aSTR (Xiao et al., 2018), με βάση την

εκτιμώμενη ετεροζυγωτία από 3.723 άτομα μη συγγενείς από διάφορες περιπτώσεις ελέγχου πατρότητας Σε δύο προηγούμενες αναφορές (Lu et al., 2012, Xiao et al., 2018) έχει παρατηρηθεί γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στο ρυθμό μετάλλαξης και το βαθμό ετεροζυγωτίας για 24 ή 19 aSTRs γενετικούς τόπους. Στην παρούσα μελέτη, το περιορισμένο μέγεθος του δείγματός μας (690 άτομα), καθώς και η αναλογία trio/duo περιπτώσεων (227/34) δε μας επέτρεψαν να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα και απαιτείται περαιτέρω έλεγχος για να την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Επιπρόσθετα, μία άλλη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν κατά πόσο η απουσία του γενετικού προφίλ ενός εκ των δύο γονέων στον έλεγχο, μπορεί να επηρεάσει ή όχι την αξιοπιστία του ελέγχου. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε στην ανάλυση και τη μετατροπή όλων των trio περιπτώσεων στις οποίες καταγράφηκε aSTR αλληλική ανομοιότητα, σε duo (motherless). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι οι δείκτες CPI και W μειώθηκαν σημαντικά (ο CPI κυμάνθηκε από 32 έως $2,6 \times 10^7$ και ο W από 96,96969697 έως 99,9999600968), τιμές οι οποίες αποκλείουν την πιθανότητα ο ΦΠ να είναι πράγματι ο βιολογικός πατέρας του παιδιού και κατ' επέκταση συνεπάγεται την αύξηση του κινδύνου για ψευδή αποκλεισμό της συγγένειας και εξαγωγή εσφαλμένων συμπερασμάτων. Συγκεκριμένα, σε οχτώ περιπτώσεις ελέγχου (N°1, N°2, N°3, N°7, N°8, N°10, N°11 και N°12, Πίνακας 7.4) ο δείκτης CPI υπολογίστηκε <10.000 (από 32 έως 9.152). Η επίλυση της συγγένειας θα ήταν αδύνατη (deficiency περίπτωση) χωρίς τα γενετικά δεδομένα του άλλου γονέα, καθώς η γονικότητα δεν θα μπορούσε να αποκλεισθεί ή να επιβεβαιωθεί με στατιστική βεβαιότητα. Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό ότι καθίσταται επιτακτική η ανάγκη ελέγχου των γενετικών προφίλ και των δύο γονέων, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ή να αποφευχθεί η πιθανότητα λανθασμένων συμπερασμάτων. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με αυτά της διεθνούς βιβλιογραφίας. Χαρακτηριστικά, οι Akhteruzzaman et al. [204] αναφέρουν μία περίπτωση ψευδούς μη αποκλεισμού με δύο αλληλικές ανομοιότητες (D2S1338 και vWA). Ομοίως, οι Jha et al. [205] αναφέρουν αλληλικές ανομοιότητες στους D21S11 και D18S51 τόπους, όπου η περαιτέρω ανάλυση (Y-STRs) οδήγησε σε αποκλεισμό της πατρότητας. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η αποσαφήνιση δυσεπίλυτων περιπτώσεων απαιτεί τη χρήση πρόσθετων εργαστηριακών δοκιμασιών, όπως επιπλέον aSTRs γενετικούς τόπους, Y-/X-STRs ή SNPs γενετικούς δείκτες [166, 167, 206].

Παράλληλα, προκειμένου να ελέγξουμε την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων, υπολογίστηκαν και οι δείκτες PE και RMNE. Στο δείκτη PE αφαιρώντας το προφίλ

της μητέρας παρατηρήθηκε μείωση (κυμάνθηκε από 99,9999911 έως 99,9999999), αλλά όχι σε βαθμό ώστε να οδηγηθούμε σε παραπλανητικά αποτελέσματα. Όσον αφορά το δείκτη RMNE, οι τιμές του στις περισσότερες περιπτώσεις αυξήθηκαν (υπολογίστηκαν από $2,5973 \times 10^{-12}$ έως $1,2113 \times 10^{-7}$) χωρίς ωστόσο να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα, ενώ σε κάποιες άλλες δεν παρουσίασαν μεταβολή.

Επιπρόσθετα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν τέσσερις (4) περιπτώσεις, N°4, N°11, N°14 και N°15 (Πίνακες 7.5, 7.6, 7.7 και 7.8 αντίστοιχα), στις οποίες κατά την απουσία του γενετικού προφίλ της μητέρας, η aSTR μετάλλαξη έπαψε να υφίσταται, ενώ οι δείκτες CPI και W ελαττώθηκαν σημαντικά χωρίς ωστόσο να μεταβληθεί το τελικό αποτέλεσμα. Κατά συνέπεια, αξίζει να σημειωθεί ότι σε δυο περιπτώσεις είναι πολύ πιθανό κάποια γεγονότα μετάλλαξης να αγνοηθούν όταν κατά τη διεξαγωγή του τεστ, δε λαμβάνονται υπόψιν τα γενετικά δεδομένα του ενός εκ των δύο ΦΓ, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει και σε υποτιμημένο ποσοστό μετάλλαξης στον πληθυσμό.

Σε αυτή τη μελέτη έχει παραχθεί ένα αξιόπιστο σύνολο Ιατροδικαστικών δεδομένων, όσον αφορά την συχνότητα μετάλλαξης 16 aSTRs γενετικών τόπων και τα οποία είναι εξαιρετικά χρήσιμα στις δοκιμασίες ελέγχου αμφισβητούμενης γονικότητας στον Ελληνικό πληθυσμό. (Πίνακας 7.1). Τα αποτελέσματά μας βρίσκονται σε συμφωνία με άλλες αναφορές της παγκόσμιας βιβλιογραφίας. Οι Drożdżiok et al. [207] στη μελέτη τους, η οποία αφορούσε πληθυσμό της περιοχής Κατοβίτσε της Νότιας Πολωνίας, καταγράφουν αλληλικές ανομοιοότητες στους SE33, vWA, FGA, D8S1179, D10S1248, D3S1358 και D2S1338 γενετικούς τόπους, με εξαίρεση τον D12S391. Ομοίως, οι Martinez et al. [190] σε αντίστοιχη μελέτη σε πληθυσμό στο Σάο Πάολο της Βραζιλίας αναφέρουν αυξημένο ποσοστό μεταλλάξεων στους vWA, D12S391, FGA, D8S1179 και D3S1358 γενετικούς τόπους, με μόνη εξαίρεση τον D2S1338. Τέλος, οι Xu et al. [178] και οι Xiao et al. [152] σε αντίστοιχες μελέτες πληθυσμών των περιοχών Hunan και Guangdong της Κίνας, παραθέτουν δεδομένα που συνάδουν με την παρούσα μελέτη. Εξαίρεση αποτελεί ο γενετικός τόπος D2S1338. Ακόμη, θα πρέπει να αναφερθεί ότι τόσο στη μελέτη των Xu et al., όσο και στις μελέτες των Xiao et al. και των Martinez et al., δεν καταγράφονται δεδομένα αλληλικών ανομοιοτήτων που αφορούν τους γενετικούς τόπους SE33 και D10S1248. Όπως φαίνεται από τα δεδομένα της παρούσας μελέτης συγκριτικά με τις προαναφερθείσες, η μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεων καταγράφεται στους γενετικούς τόπους SE33, vWA, D12S391, FGA, D8S1179, D10S1248, D3S1358 και

D2S1338, κάτι που πιθανόν να οφείλεται στη γενετική ετερογένεια που εμφανίζεται ανάμεσα στους διάφορους πληθυσμούς (Εικόνα 7.12). Ωστόσο, υπάρχουν και αναφορές όπως των Xu et al., οι οποίοι στην έρευνά τους περιγράφουν χαμηλότερα ποσοστά μεταλλάξεων σε σχέση με τα δεδομένα που δημοσίευσε η AABB το 2010 (American Association of Blood Banks, 2008), κάτι το οποίο όπως αναφέρουν πιθανότητα οφείλεται στο γεγονός ότι αρκετά δείγματα της μελέτης τους αφορούσαν δυο περιπτώσεις. Άρα, όπως περιγράφουν, ήταν αναμενόμενο κάποια γεγονότα μετάλλαξης να αγνοηθούν με αποτέλεσμα να οδηγηθούν σε υποτίμηση του πραγματικού ποσοστού των μεταλλάξεων στον μελετώμενο πληθυσμό. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν δύο περιπτώσεις (2/65), οι οποίες θα μπορούσαν να αγνοηθούν, εάν ο ένας από τους δύο ΦΓ δεν είχε συμπεριληφθεί στη διενέργεια του ελέγχου, δεδομένο το οποίο συμφωνεί με τα δική μας μελέτη.

Συμπερασματικά η χρήση των aSTRs γενετικών τόπων αποτελεί την πλέον σύγχρονη προσέγγιση πιστοποίησης γονικότητας με δυνατότητα επίλυσης περιπτώσεων συγγένειας έως και 2^{ου} βαθμού. Προτείνεται: α) ο έλεγχος του 2 γονέα σε όλες τις περιπτώσεις προκειμένου να αποφευχθεί ο κίνδυνος εσφαλμένου μη αποκλεισμού και β) η χρήση επιπλέον γενετικών δεικτών aSTRs στην περίπτωση παρουσίας μεταλλάξεων προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα ψευδούς αποκλεισμού.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Ο έλεγχος του γενετικού προφίλ μέσω των διαδοχικά επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών αυτοσωμικού DNA (autosomal Short Tandem Repeats-aSTRs) χρησιμοποιείται και στην διερεύνηση αμφισβητούμενης γονικότητας. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση της συμβολής 16 aSTRs στην επίλυση περιπτώσεων αμφισβητούμενης γονικότητας που η προηγούμενη ανάλυση κατέγραψε μεταλλάξεις.

Υλικό και μέθοδοι: Στο χρονικό διάστημα από 2014 έως 2019 μελετήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος ή/και παρειακού επιχρίσματος 690 ατόμων. Ελέγχθησαν 16 aSTRs πολυμορφισμοί: D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D22S1045, D19S433, TH01, FGA, D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391, SE33, κατόπιν ενίσχυσης του DNA με AmpFlSTR®NGMSElect™ kit, εφαρμόζοντας Fragment Analysis μεθοδολογία και χρήση γενετικού αναλυτή Applied Biosystems 3130. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του GeneMapper® ID Software IDX1.3. Οι δείκτες Power of Exclusion (PE), Random Man Not excluded (RMNE), Combined Parentage Index (CPI), Probability of Parentage (W) υπολογίστηκαν με βάση την συχνότητα των aSTRs αλληλίων στους Καυκάσιους.

Αποτελέσματα: Σε 49 περιπτώσεις (39 trio / 10 duo) αποδείχτηκε ο αποκλεισμός της γονικότητας, με τεκμήρια αποκλεισμού σε ≥ 3 aSTRs, ενώ σε 212 περιπτώσεις (188 trio και 24 duo) η γονικότητα δεν αποκλείστηκε. Παράλληλα καταγράφηκαν 15 aSTRs μεταλλάξεις: SE33 (3), vWA (3), D12S391 (3), FGA (1), D8S1179 (1), D10S1248 (1), D3S1358 (1), D2S1338 (1) και 1 σιωπηλό αλληλίο (Null allele) στον SE33 σε 15 περιπτώσεις αμφισβητούμενης γονικότητας (15/212, 7,07%), (14 trio και 1 duo), οι οποίες αποδόθηκαν σε απώλεια ή προσθήκη μίας ή δύο τετρανουκλεοτιδικών επαναλήψεων. Η αναλογία πατρικής vs μητρικής μετάλλαξης/σιωπηλών αλληλίων ήταν 14:1 ($p=0,001$). Εντούτοις, στις περιπτώσεις αυτές δεν προέκυψε αποκλεισμός συγγένειας, καθώς ο αποκλεισμός απαιτεί δύο ασυμβατότητες κατ' ελάχιστον.

Συμπεράσματα: Η χρήση των aSTRs γενετικών τόπων αποτελεί την πλέον σύγχρονη προσέγγιση πιστοποίησης γονικότητας με δυνατότητα επίλυσης περιπτώσεων συγγένειας έως και 2^{ου} βαθμού. Προτείνεται α) ο έλεγχος του 2^{ου} γονέα σε όλες τις περιπτώσεις προκειμένου να αποφευχθεί ο κίνδυνος εσφαλμένου μη αποκλεισμού και β) η χρήση επιπλέον γενετικών δεικτών aSTRs στην περίπτωση παρουσίας μεταλλάξεων προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα ψευδούς αποκλεισμού.

ABSTRACT

Introduction: Autosomal Short Tandem Repeats (aSTRs) widely used in disputed paternity/maternity assessment. The aim of this study was to evaluate the impact of aSTRs mutations in parentage cases.

Materials/Methods: In the period from 2014 to 2019 a total of 690 DNA samples (261 parentage testing cases, 34 of which were fatherless or motherless cases) were investigated. G-DNA was isolated from whole blood and/or buccal swabs. Analysis was performed using 16 aSTRs loci (D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D22S1045, D19S433, TH01, FGA, D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391, SE33), using DNA AmpFISTR® NGM SElect™ commercial Kit and analysis of PCR products by electrophoresis on 3130 Genetic Analyzer. Fragment sizes were determined automatically using the GeneMapper® ID Software IDX1.3. Power of Exclusion (PE), Random Man Not Excluded (RMNE), Combined Parentage Index (CPI), and Probability of Parentage (W) values were calculated using allele frequency of Caucasoid.

Results: Out of 261 cases, 49 were excluded by aSTRs (at least 3 genetic aSTRs loci) and 212 were not excluded. Fourteen aSTR mutations (3 from each SE33, vWA and D12S391, and 1 from each FGA, D8S1179, D10S1248, D3S1358, D2S1338 locus) and 1 null allele (SE33) were observed in 15 (15/212, 7,07%) different parent/child allele transfers (1 of them was motherless case), without ruling out fatherhood. Mutations were single or double-step (repeat loss or gain). The ratio of paternal versus maternal mutations/null allele was statistically significant (14:1, $p=0.001$).

Conclusions: Paternity testing using aSTRs is an accurate and high-sensitivity method with the possibility of resolving kinship cases up to 2nd degree. It is recommended that a) both parents be controlled in all cases to avoid the risk of wrong inclusion due to the absence of mother or father's genotype, b) the use of additional genetic aSTRs loci in case of mutations in order to minimize the possibility of false exclusion.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Messier M, Li SH & Stewart CB. The birth of microsatellites. *Nature* 1996;381:483
2. Hao Fan and Jia-You Chu. A Brief Review of Short Tandem Repeat Mutation *Geno Prot Bioinfo* 2007;5(1):7-14.
3. Wilder J. & Hollocher H. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. *Mol Biol Evol* 2001; **18**(3):384-392.
4. Djaja Surya Atmadja, Evi Untoro. Mutation of STR in paternity testing. *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences* 2008;1(1):32-34.
5. Ota T. and Kimura M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet Res* 1973; **22**: 201-204.
6. Huang, QY, *et al.* Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. *Am J Hum Genet* 2002; **70**:625-634.
7. Ellegren, H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nat Genet* 2000; **24**:400-402.
8. Grover A, Sharma PC. Is spatial occurrence of microsatellites in the genome a determinant of their function and dynamics contributing to genome evolution? *Curr Sci* 2011;**100**(6):859-869.
9. Jobling MA. The diversity of the human genome. In *Human Evolutionary Genetics: Origins, Peoples & Disease* (eds. Jobling, M.A., et al.) 2004; **67** Garland Science, New York, USA.
10. Lai Y and Sun F. The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Mol Biol Evol* 2003;**20**: 2123-2131.
11. A.J. Jeffreys, V. Wilson, S.L. Thein, Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. *Nature* 1985; **314**:67–73.
12. H. Ellegren, *Nat. Rev. Genet.* **5** (2004) 435–445.
13. A.L. Edwards, A. Civitello, H.A. Hammond, T. Caskey, *Am. J. Hum. Genet.* **49** (1991) 746–756.
14. J.R. Collins, R.M. Stephens, B. Gold, B. Long, M. Dean, S.K. Burt, *Genomics* **82** (2003) 10–19.

15. A.J. Jeffreys, V. Wilson, S.L. Thein, Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 1985; **314** (1985) 67–73.
16. J.M. Butler, *Forensic DNA Typing: Biology, Technology and Genetics of STR Markers*, second ed., Elsevier Academic Press, London, New York, 2004.
17. Hao Fan and Jia-You Chu. A Brief Review of Short Tandem Repeat Mutation *Geno Prot Bioinfo* 2007;**5**(1):7-14.
18. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W et al.: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, **409**:860-921.
19. Djaja Surya Atmadja, Evi Untoro. Mutation of STR in paternity testing. *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences* 2008;**1**(1):32-34.
20. Lu D, Liu Q, Wu W, Zhao H. Mutation analysis of 24 short tandem repeats in Chinese Han population. *Int J Legal Med* 2012; **126**:331-335.
21. Ramel C. Mini-and microsatellites. *Environ Health Perspect.* 1997;**105**:781-789.
22. Hartl L.D and Ruvolo M, 2012, *Genetic Analysis of Genes and Genomes*, Jones & Bartlett Learning, Burlington, pg. 529.
23. Sun JX, Helgason A, Masson G, Ebenesersdóttir SS, Li H, Mallick S, Gnerre S, Patterson N, Kong A, Reich D et al.: A direct characterization of human mutation based on microsatellites. *Nat Genet* 2012, **44**:1161-1165.
24. Ellegren, H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nat Genet* 2000; **24**:400-402.
25. Lai Y and Sun F. The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Mol Biol Evol* 2003;**20**: 2123-2131.
26. Kimura M and Crow JF. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 1964;**49**:725-738.
27. Ota T and Kimura M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet Res* 1973;**22**: 201-204.
28. Lai Y, Sun F. The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Mol Biol Evol* 2003; **20**: 2123-2131.
29. Kayser M 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**:1580-1588.

30. Dauber EM, Kratzer A, Neuhuber F, et al. Germline mutations of STR-alleles include multi-step mutations as defined by sequencing of repeat and flanking regions. *Forensic Sci Int: Genetics* 2012; **6**(3):381-386.
31. Bhargava A, Fuentes FF. Mutational Dynamics of Microsatellites. *Mol Biotechnol* 2010; **44**(3): 250-266.
32. Balloux F, Ecoffey E, Fumagalli L, Goudet J, Wyttenbach A, Hausser J. Microsatellite conservation, polymorphism, and GC content in shrews of the genus *Sorex* (Insectivora, Mammalia). *Mol Biol Evol* 1998; **15**: 473-475.
33. Glenn TC, Stephan W, Dessauer HC, Braun MJ. Allelic diversity in alligator microsatellite loci is negatively correlated with GC content of flanking sequences and evolutionary conservation of PCR amplifiability. *Mol Biol Evol* 1996; **13**: 1151-54.
34. Kayser M, Roewer L, Hedman L, 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**: 1580-88.
35. John M. Butler. DNA Databases. In: Fundamentals of Forensic DNA Typing, John M. Butler (ed). *Elsevier Academic Press, London*, 2009:259-289.
36. Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RI: Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science* 1991, **252**:1711-1714.
37. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP: Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991, **65**:905-914.
38. La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH: Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991, **352**:77-79.
39. Mirkin SM: Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* 2007, **447**:932-940.
40. Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, Warren ST: DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 1992, **1**:397-400.
41. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J et al.: Expanded GGGGCC

- hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011, **72**:245-256.
42. Pearson CE: Repeat associated non-ATG translation initiation: one DNA, two transcripts, seven reading frames, potentially nine toxic entities! *PLoS Genet* 2011, **7**:e1002018.
 43. John Douglas Cleary, Laura P W Ranum: Repeat Associated non-ATG (RAN) Translation: New Starts in Microsatellite Expansion Disorders 2014 Jun;26:6-15.
 44. Hefferon TW, Groman JD, Yurk CE, Cutting GR: A variable dinucleotide repeat in the CFTR gene contributes to phenotype diversity by forming RNA secondary structures that alter splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:3504-3509.
 45. Borel C, Migliavacca E, Letourneau A, Gagnebin M, Be' na F, Sailani MR, Dermitzakis ET, Sharp AJ, Antonarakis SE: Tandem repeat sequence variation as causative cis-eQTLs for protein-coding gene expression variation: the case of CSTB. *Hum Mutat* 2012, **33**:1302-1309.
 46. Hsieh T-Y, Shiu T-Y, Huang S-M, Lin H-H, Lee T-C, Chen P-J, Chu H-C, Chang W-K, Jeng K-S, Lai MMC et al.: Molecular pathogenesis of Gilbert's syndrome: decreased TATA-binding protein binding affinity of UGT1A1 gene promoter. *Pharmacogenet Genom* 2007, **17**:229-236.
 47. Haraksingh RR, Snyder MP. Impacts of variation in the human genome on gene regulation. *J Mol Biol.* 2013;**425**:3970-3977.
 48. Press MO, Carlson KD, Queitsch C. The overdue promise of short tandem repeat variation for heritability. *Trends Genet.* 2014;**30**:504-512.
 49. Richard GF, Kerrest A, Dujon B. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008;**72**:686-727.
 50. Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA et. al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* 2010;**467**:1061-1073.
 51. Ramirez-Bello J, Vargas-Alarcon G, Tovilla-Zarate C, Fragoso JM. Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNPs (rSNPs) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases. *Gac Med Mex.* 2013;**149**:220-228.
 52. Ramirez-Bello J, Jimenez-Morales M. Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases. *Gac Med Mex.* 2017;**153**:238-250.

53. Hsieh T-Y, Shiu T-Y, Huang S-M, Lin H-H, Lee T-C, Chen P-J, Chu H-C, Chang W-K, Jeng K-S, Lai MMC et al.: Molecular pathogenesis of Gilbert's syndrome: decreased TATA-binding protein binding affinity of UGT1A1 gene promoter. *Pharmacogenet Genom* 2007, **17**:229-236.
54. Contente A, Dittmer A, Koch MC, Roth J, Dobbelsstein M: A polymorphic microsatellite that mediates induction of PIG3 by p53. *Nat Genet* 2002, **30**:315-320.
55. Rockman MV, Wray GA: Abundant raw material for cis-regulatory evolution in humans. *Mol Biol Evol* 2002, **19**:1991-2004.
56. Rothenburg S, Koch-Nolte F, Rich A, Haag F: A polymorphic dinucleotide repeat in the rat nucleolin gene forms Z-DNA and inhibits promoter activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:8985-8990.
57. Stoger R, Kajimura TM, Brown WT, Laird CD: Epigenetic variation illustrated by DNA methylation patterns of the Fragile-X gene FMR1. *Hum Mol Genet* 1997, **6**:1791-1801.
58. Kumari D, Usdin K: Chromatin remodeling in the noncoding repeat expansion diseases. *J Biol Chem* 2009, **284**:7413-7417.
59. Hefferon TW, Groman JD, Yurk CE, Cutting GR: A variable dinucleotide repeat in the CFTR gene contributes to phenotype diversity by forming RNA secondary structures that alter splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:3504-3509.
60. Hui J, Hung L-H, Heiner M, Schreiner S, Neumu"ller N, Reither G, Haas SA, Bindereif A: Intronic CA-repeat and CA-rich elements: a new class of regulators of mammalian alternative splicing. *EMBO J* 2005, **24**:1988-1998.
61. Pearson CE: Repeat associated non-ATG translation initiation: one DNA, two transcripts, seven reading frames, potentially nine toxic entities! *PLoS Genet* 2011, **7**:e1002018.
62. Julián Ramírez-Bello: Role of Genetic Variability in Mendelian and Multifactorial Diseases. 2019;**155**(5):463-470.
63. Willems T, Gymrek M, Poznik GD, Tyler-Smith C, 1000 Genomes Project Chromosome Y Group, Erlich Y: Population-scale sequencing data enable precise estimates of Y-STR mutation rates. *Am J Hum Genet* 2016, **98**:919-933.
64. Kirby A, Gnirke A, Jaffe DB, Bareova' V, Pochet N, Blumenstiel B, Ye C, Aird D, Stevens C, Robinson JT et al.: Mutations causing medullary cystic kidney disease type 1 lie in a large VNTR in MUC1 missed by massively parallel sequencing. *Nat Genet* 2013, **45**:299-303.

65. Li H: Toward better understanding of artifacts in variant calling from high-coverage samples. *Bioinformatics* 2014, **30**:2843- 2851.
66. Keogh MJ, Chinnery PF: Next generation sequencing for neurological diseases: new hope or new hype? *Clin Neurol Neurosurg* 2013, **115**:948-953.
67. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J et al.: Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011, **72**:245-256.
68. Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L et al.: A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011, **72**:257-268.
69. Shrestha S, Dong S, Li Z, Huang Z, Zheng F. Evaluation of factor VIII polymorphic short tandem repeat markers in linkage analysis for carrier diagnosis of hemophilia A. *Biomed Rep* 2016; **5**(2):228-232.
70. Carvalho R, Pinheiro MF, Medeiros R. Localization of candidate genes in a region of high frequency of microvariant alleles for prostate cancer susceptibility: the chromosome region Yp11.2 genetic variation. *DNA Cell Biol* 2010; **29**(1): 3-7.
71. Cifuentes LO, Martínez EH, Acuña MP, Jorquera HG. Probability of exclusion in paternity testing: time to reassess. *J Forensic Sci* 2006; **51**(2): 349-50.
72. M.C. Edwards, R.A. Gibbs, *PCR Methods Appl.* 3 (1994) 565–575.
73. C. Kimpton, D. Fisher, S. Watson, M. Adams, A. Urquhart, J. Lygo, P. Gill, *Int. J. Legal Med.* **106** (1994) 302–311.
74. R. Sparkes, C. Kimpton, S. Gilbard, P. Carne, J. Anderson, N. Oldroyd, D. Thomas, A. Urquhart, P. Gill, *Int. J. Legal Med.* **109** (1996) 195–204.
75. Lane AB. STR null alleles complicate parentage testing in South Africa. *Molecular Genetics* 2013;**103**(12):1004-1008.
76. Park H, Ra EK, Park SS, Seong MW. Detection of very large off-ladder alleles at the PentaE locus in a 15 locus autosomalSTR database of 199 Korean individuals. *Forensic Sci Int Genet* 2012; **6**(6):189-91.
77. Anmarkrud JA, Kleven O, Bachmann L, & Lifjeld, JT. Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasmy in the avian microsatellite locus HrU10. *BMC Evol Biol* 2008;**8**:138.

78. Szibor R, Krawczak M, Hering S, Edelmann J, Kuhlisch R, Krause D. Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int J Legal Med* 2003; **117**:67–74.
79. Salas A, Carracedo A, Macaulay V, Richards M, Bandelt JH. A practical guide to mitochondrial DNA error prevention in clinical, forensic, and population genetics. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **335**:891-899.
80. Butler MJ, Coble DM, Vallone MP. STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic Sci Med Pathol* 2007;**3**:200-205.
81. Pena SD, Chakraborty R. Paternity testing in the DNA era. *Trends Genet* 1994; **10**: 204-9.
82. Buckleton J, Triggs C and Walsh S. Forensic DNA Evidence Interpretation. CRC Press USA. 2005; 534p.
83. Butler J. U.S. Initiatives to Strengthen Forensic Science and International Standards in Forensic DNA. *Forensic Sci Int Genet* 2015; **18**: 4–20.
84. Cifuentes LO, Martínez EH, Acuña MP, Jorquera HG. Probability of exclusion in paternity testing: time to reassess. *J Forensic Sci* 2006; **51**(2): 349-50.
85. Scarpetta M, Einum DD. Derivation of the Random Grandparents Not Excluded (RGPNE) Statistic. AABB Annual Meeting Relationship testing, Seattle, 2005; 1:1.
86. Lee SH, Jae WJ, Han RG, Hwang JJ. Motherless case in paternity testing *Forensic Sci Int* 2000; **114**: 57-65.
87. Gjertson DW, Brenner CH, Baur MP, et al. ISFG: recommendations on biostatistics in paternity testing. *Forensic Sci Int Genet* 2007; **1**: 223-31.
88. Sharif Akhteruzzamana, Ashish Kumar Majumderb, Ahmad Ferdousb and Mohammad Eunus Alib. Australian Journal of Forensic Sciences. **Vol. 44**, No. 3, September 2012; 253–259.
89. Wang J. Effects of genotyping errors on parentage exclusion analysis. *Molecular Ecology* 2010; **19**: 5061-78.
90. Buckleton J, Triggs C and Walsh S. Forensic DNA Evidence Interpretation. CRC Press USA. 2005; 534p.
91. Sánchez-Diz P, Menounos PG, Carracedo A, Skitsa I. 16 STR data of a Greek population. *Forensic Sci Int Genet* 2008; **2**: 71-72.
92. Vandenberg N, van Oorschot, RAH, Mitchell RJ. An evaluation of selected DNA extraction strategies for short tandem repeat typing. *Electrophoresis* 1997; **18**: 1624-26.

93. Kline MC, Duewer DL, Redman JW, Butler JM, Boyer DA. Polymerase chain reaction amplification of DNA from aged blood stains: Quantitative evaluation of the “suitability for purpose” of four filter papers as archival media. *Analytical Chemistry* 2002; **74**: 1863-69.
94. Maxwell® 16 Blood DNA Purification kit Technical Manual: AS1010 (Promega Corporation, Madison Wisconsin, www.promega.com).
95. Paul Otto: MagneSil™ Paramagnetic Particles: Magnetics for DNA Purification. *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation*, **Volume: 7** issue: 3, page(s): 34-37. Issue published: June 1, 2002.
96. Γ. Παπανικολάου, Δ. Παλαιολόγου, Ε. Κατσαρέλη, Θ. Κατσίλα, Χ. Τσαρουχά, Μ. Τζέτη, Κ. Λιλάκος, Λ. Δούκισσας: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΣΤΟΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΠΑΓΚΟ, Κεφάλαιο 5: Απομόνωση DNA.
97. Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA kit Technical Manual: AS1295 (Promega Corporation, Madison Wisconsin, www.promega.com).
98. Γ. Παπανικολάου, Δ. Παλαιολόγου, Ε. Κατσαρέλη, Θ. Κατσίλα, Χ. Τσαρουχά, Μ. Τζέτη, Κ. Λιλάκος, Λ. Δούκισσας: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΣΤΟΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΠΑΓΚΟ, Κεφάλαιο 6: Έλεγχος της ποιότητας και μέτρηση της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων.
99. Garibyan L. & Avashia N. Polymerase chain reaction. *J. Invest. Dermatol* (2013).
100. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro Surveill.* 2018 Feb 8; **23**(6): 17-00672.
101. Ενίσχυση των γενετικών τόπων STRs μέσω του AmpFlSTR® NGM Select™ PCR kit, eg. www.thermofisher.com.
102. Morrill BH, Rickords LF, Schafstall HJ. Sequence length polymorphisms within primate amelogenin and amelogenin-like genes: usefulness in sex determination. *Am J Primatol* 2008; **70**(10): 976-85.
103. Shewale JG, Qi L, Calandro LM. Principles, Practice, and Evolution of Capillary Electrophoresis as a Tool for Forensic DNA Analysis. *Forensic Sci Rev* 2012; **24**(2): 79-100.
104. P. Gill, P.L. Ivanov, C. Kimpton, R. Piercy, N. Benson, G., Tully, I. Evett, E. Hagelberg, K. Sullivan, *Nat. Genet.* **6** (1994): 130–135.
105. T.M. Clayton, J.P. Whitaker, C.N. Maguire, *Forensic Sci. Int.* **76** (1995): 7–15.

106. O. Okamoto, Y. Yamamoto, S. Inagaki, K. Yoshitome, T. Ishikawa, K. Imabayashi, S. Miyaishi, H. Ishizu, *Acta Med. Okayama* **57** (2003): 59–71.
107. J.A. Thomson, V. Pilotti, P. Stevens, K.L. Ayres, P.G. Debenham, *Forensic Sci. Int.* **100** (1999): 1–16.
108. A. Torroni, A. Achilli, V. Macaulay, M. Richards, H.J. Bandelt, *Trends Genet.* **22** (2006): 339–345.
109. H. Rodig, L. Roewer, A. Gross, T. Richter, P. Knijff, M. Kayser, W. Brabetz, *Forensic Sci. Int.* **174** (2008): 182–188.
110. G. Lau, W.F. Tan, P.H. Tan, After the Indian Ocean Tsunami: Singapore's contribution to the international disaster victim identification effort in Thailand, *Ann. Acad. Med. Singapore* (2005).
111. C. Børsting, M. Mikkelsen, N. Morling, Kinship analysis with diallelic SNPs - Experiences with the SNPforID multiplex in an ISO17025 accredited laboratory, *Transfus. Med. Hemotherapy*. (2012).
112. Á. Carracedo, A. Rodriguez, M.V. Lareu, C. Phillips, A. Salas, M. Fondevila, M. García-Magariños, Resolving relationship tests that show ambiguous STR results using autosomal SNPs as supplementary markers, *Forensic Sci. Int. Genet.* **2** (2008) 198–204.
113. K.K. Kidd, A.J. Pakstis, W.C. Speed, R. Lagacé, J. Chang, S. Wootton, E. Haigh, J.R. Kidd, Current sequencing technology makes microhaplotypes a powerful new type of genetic marker for forensics, *Forensic Sci. Int. Genet.* **12** (2014) 215–224.
114. M. Kayser, P. De Knijff, Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology, *Nat. Rev. Genet.* (2011).
115. D.Y. Wang, S. Gopinath, R.E. Lagacé, W. Norona, L.K. Hennessy, M.L. Short, J.J. Mulero, Developmental validation of the GlobalFiler® Express PCR Amplification Kit: A 6-dye multiplex assay for the direct amplification of reference samples, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2015).
116. B. Brinkmann, H. Pfeiffer, M. Schürenkamp, C. Hohoff, The evidential value of STRs: An analysis of exclusion cases, *Int. J. Legal Med.* (2001).
117. J.A. Thomson, V. Pilotti, P. Stevens, K.L. Ayres, P.G. Debenham, Validation of short tandem repeat analysis for the investigation of cases of disputed paternity, *Forensic Sci. Int.* (1999).
118. P.S. Walsh, N.J. Fildes, R. Reynolds, *Nucleic Acids Res.* **24** (1996) 2807–2812.

119. C.A. Crouse, S. Rogers, E. Amriott, S. Gibson, A. Masibay, J. Forensic Sci. **44** (1999) 87–94.
120. H. Fan, J.-Y. Chu, Genomics Proteomics Bioinformatics **5** (2007) 7–14.
121. T. Tamura, M. Osawa, E. Ochiai, T. Suzuki, T. Nakamura, Evaluation of advanced multiplex short tandem repeat systems in pairwise kinship analysis, Journal Pre-proof Leg. Med. **17** (2015) 320–325.
122. M. Nothnagel, J. Schmidtke, M. Krawczak, Potentials and limits of pairwise kinship analysis using autosomal short tandem repeat loci, Int. J. Legal Med. (2010).
123. U. Ricci, F. Torricelli, S. Iozzi, A.L. Nutini, I. Carboni, Improving complex kinship analyses with additional STR loci, Electrophoresis. **35** (2014) 3145–3151.
124. R. Xiuyan, W. Weini, Y. Yaran, X. Bingbing, C. Jing, L. Yacheng, Y. Jiangwei, Genetic variability and phylogenetic analysis of 39 short tandem repeat loci in Beijing Han population, Yi Chuan. (2015).
125. J. Ge, B. Budowle, R. Chakraborty, Choosing Relatives for DNA Identification of Missing Persons, J. Forensic Sci. **56** (2011).
126. N. Pinto, R. Simões, A. Amorim, E. Conde-Sousa, Optimizing the information increase through the addition of relatives and genetic markers in identification and kinship cases, Forensic Sci. Int. Genet. (2019).
127. S.K. Mo, Y.C. Liu, S.Q. Wang, X.C. Bo, Z. Li, Y. Chen, M. Ni, Exploring the efficacy of paternity and kinship testing based on single nucleotide polymorphisms, Forensic Sci. Int. Genet. **22** (2016) 161–168.
128. V. Pereira, L. Gusmão, Types of genomes, sequences and genetic markers, in: A. Amorim, B. Budowle (Eds.), Handbook of Forensic Genetics. Biodiversity and Heredity in Civil and Criminal Investigation, World Scientific, New Jersey, 2016.
129. T.M. Diegoli, Forensic typing of short tandem repeat markers on the X and Y chromosomes, Forensic Sci. Int. Genet. **18** (2015) 140–151.
130. N. Pinto, L. Gusmão, A. Amorim, X-chromosome markers in kinship testing: a generalisation of the IBD approach identifying situations where their contribution is crucial, Forensic Sci. Int. Genet. **5** (2011) 27–32.
131. D. Kling, Curiosities of X chromosomal markers and haplotypes, Int. J. Legal Med. **132** (2018) 361–371.
132. A.O. Tillmar, D. Kling, J.M. Butler, W. Parson, M. Prinz, P.M. Schneider, T. Egeland, L. Gusmão, DNA commission of the international society for forensic

- genetics (ISFG): guidelines on the use of X-STRs in kinship analysis, *Forensic Sci. Int. Genet.* **29** (2017) 269–275.
133. C. Tomas, J.J. Sanchez, A. Barbaro, C. Brandt-Casadevall, A. Hernandez, M.B. Dhiab, M. Ramon, N. Morling, X-chromosome SNP analyses in 11 human Mediterranean populations show a high overall genetic homogeneity except in North-west Africans (Moroccans), *BMC Evol. Biol.* **8** (2008) 75.
 134. L. Gusmão, P. Sánchez-Diz, C. Alves, I. Gomes, M.T. Zarrabeitia, M. Abovich, et al., A GEP-ISFG collaborative study on the optimization of an X-STR decaplex: data on 15 Iberian and Latin American populations, *Int. J. Legal Med.* **123** (2009) 227–234.
 135. L. Li, C. Li, S. Zhang, S. Zhao, Y. Liu, Y. Lin, Analysis of 14 highly informative SNP markers on X chromosome by TaqMan SNP genotyping assay, *Forensic Sci. Int. Genet.* **4** (2010) 145–148.
 136. N.S. Freitas, R.L. Resque, E.M. Ribeiro-Rodrigues, J.F. Guerreiro, et al., X-linked insertion/deletion polymorphisms: forensic applications of a 33-markers panel, *Int. J. Legal Med.* **124** (2010) 589–593.
 137. T.M. Diegoli, M.D. Coble, Development and characterization of two mini-X chromosomal short tandem repeat multiplexes, *Forensic Sci. Int. Genet.* **5** (2011) 415–421.
 138. M. Nothnagel, R. Szibor, O. Vollrath, C. Augustin, J. Edelmann, M. Geppert, C. Alves, L. Gusmão, M. Vennemann, Y. Hou, U.D. Immel, S. Inturri, H. Luo, S. Lutz-Bonengel, C. Robino, L. Roewer, B. Rolf, J. Sanft, K.J. Shin, J.E. Sim, P. Wiegand, C. Winkler, M. Krawczak, S. Hering, Collaborative genetic mapping of 12 forensic short tandem repeat (STR) loci on the human X chromosome, *Forensic Sci. Int. Genet.* **6** (2012) 778–784.
 139. R. Pereira, V. Pereira, I. Gomes, C. Tomas, N. Morling, A. Amorim, M.J. Prata, A. Carracedo, L. Gusmão, A method for the analysis of 32 X chromosome insertion deletion polymorphisms in a single PCR, *Int. J. Legal Med.* **126** (2012) 97–105.
 140. T. Oki, T. Hayashi, M. Ota, H. Asamura, Development of multiplex assay with 16 SNPs on X chromosome for degraded samples, *Leg. Med. (Tokyo)* **14** (2012) 11–16.
 141. E. Prieto-Fernández, M. Baeta, C. Núñez, M.T. Zarrabeitia, R.J. Herrera, J.J. Builes, et al., Development of a new highly efficient 17 X-STR multiplex for forensic purposes, *Electrophoresis* **37** (2016) 1651–1658.

142. Butler JM. Forensic DNA typing, biology, technology, and genetics of STR markers. Elsevier Academic Press, Burlington; 2005. pp. 138–144
143. Ellegren H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Review Genetic* 2004; **5**:435–445.
144. Wiegand P, Meyer E, Brinkmann B. Microsatellite structures in the context of human evolution. *Electrophoresis* 2000; **2**:889–895.
145. Fan H, Chu JY. A Brief review of short tandem repeat mutation. *Geno. Prot. Bioinfo.* 2007; **5**:1.
146. Gettings KB, Aponte RA, Vallone PM, Butler JM. STR allele sequence variation: Current knowledge and future issues. *Forensic Science International: Genetics* 2015; **18**:118–130.
147. Brinkmann B, Klintschar 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**:1408–1415.
148. Goldstein DB, Clark AG. Microsatellite variation in North American populations of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.*, 1995; **23**:3882–3886.
149. Neef BD, Gross MR. Microsatellite evolution in vertebrates: Inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* 2001; **55**:1717–1733.
150. Huang QY, Xu FH, Shen H, Deng HY, Liu YJ, Liu ZY, Li JL. Recker R.R., Deng H.W. 2002. Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. *Am.J.Hum.Genet.* **70**:625–634.
151. Lee JS, Hanford MG, Jennifer L, Genova JL, Rosann A, Farber RA. Relative stabilities of dinucleotide and tetranucleotide repeats in cultured mammalian cells. *Hum. Mol. Genet.* 1999; **8**: 2567–2572.
152. Cheng Xiao, Zhiyong Peng, Feilong Chen, Hui Yan, Bofeng Zhu, Yunchun Tai, Pingming Qiu, Chao Liu, Xuheng Song, Zihao Wu, Ling Chen. Mutation Analysis of 19 Commonly Used Short Tandem Repeat Loci in a Guangdong Han Population. 2018 May; **32**:92-97.
153. Lai Y, Sun F. The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Mol. Biol. Evol.*, 2003; **20**:2123–2131.
154. Chakraborty R, Kimmel M, Stivers DN, Leslea J. Davison, Dekka R. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; **94**: 1041–1046.

155. Zhivotovsky LA, Feldman MW, Grishchuk SA. Biased mutations and microsatellite variation. *Mol. Biol. Evol.*, 1997; **14**:926–933.
156. Balloux F, Ecoffey E, Fumagalli L, Goudet J, Wyttenbach A, Hausser J. Microsatellite conservation, polymorphism, and GC content in shrews of the genus *Sorex* (Insectivora, Mammalia). *Mol Biol Evol* 1998; **15**: 473-475.
157. Glenn TC, Stephan W, Dessauer HC, Braun MJ. Allelic diversity in alligator microsatellite loci is negatively correlated with GC content of flanking sequences and evolutionary conservation of PCR amplifiability. *Mol Biol Evol* 1996; **13**: 1151-54.
158. AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit User Guide. Applied biosystems life technologies. Thermo Fisher Scientific, Inc. 2015. Available at http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_076395.pdf.
159. V. Narkuti, R.N. Vellanki, N. Anubrolu, K.K. Doddapaneni, P.C. Gandhi Kaza, L.N. Mangamoori, Single and double incompatibility at vWA and D8S1179/D21S11 loci between mother and child: implications in kinship analysis, *Clin Chim Acta* **395**(1-2) (2008) 162-5.
160. A.L. Nutini, A. Mariottini, L. Giunti, F. Torricelli, U. Ricci, Double incompatibility at human alpha fibrinogen and penta E loci in paternity testing, *Croat Med J* **44**(3) (2003) 342-6.
161. A.P. Dawid, J. Mortera, V.L. Pascali, Non-fatherhood or mutation? A probabilistic approach to parental exclusion in paternity testing, *Forensic Sci Int* **124**(1) (2001) 55-61.
162. J. Drabek, Validation of software for calculating the likelihood ratio for parentage and kinship, *Forensic Sci Int Genet* **3**(2) (2009) 112-8.
163. Gill P, Fereday L, Morling N, Schneider PM, The evolution of DNA databases- Recommendations for new European STR loci, *Forensic Sci. Int.*, 2006; **156** (2–3): 242–244.
164. Jina B, Sua Q, Luo H, et al. Mutational analysis of 33 autosomal short tandem repeat (STR) loci in southwest Chinese Han population based on trio parentage testing. *Forensic Sci Int Genet* 2016; **23**: 86-90.
165. Lu D, Liu Q, Wu W, Zhao H. Mutation analysis of 24 short tandem repeats in Chinese Han population. *Int J Legal Med* 2012; **126**: 331-35.

166. Jia YS, Zhang L, Qi LY, et al. Multistep microsatellite mutation leading to father-child mismatch of FGA locus in a case of non-exclusion parentage. *Leg Med (Tokyo)* 2015; **17**(5): 364-65.
167. Liu YX, Zhang WQ, Jia YS, et al. Multistep microsatellite mutation in a case of non-exclusion parentage. *Forensic Sci Int Genet* 2015; **16**: 205-07.
168. Narkuti V, Vellanki RN, Gandhi KP, Mangamoori LN. Mother-child double incompatibility at vWA and D5S818 loci in paternity testing. *Clin Chem Lab Med* 2007; **45**(10): 1288-91.
169. Narkuti V, Vellanki RN, Anubrolu N, et al. Single and double incompatibility at vWA and D8S1179/D21S11 loci between mother and child: Implications in kinship analysis. *Clin Chim Acta* 2008; **395**(1-2): 162-5.
170. Singh Negi D, Alam M, Bhavani SA, Nagaraju J. Multistep microsatellite mutation in the maternally transmitted locus D13S317: a case of maternal allele mismatch in the child. *Int J Legal Med* 2006; **120**(5): 286-92.
171. Yu J, Xiao C, Wei T, Pan C, Yi S, Huang D. Allele dropout at the STR loci TH01 and vWA and identification of two new point mutations upstream of the repeat region at the vWA locus. *Forensic Sci Int Genet* 2016; **23**: 4-7.
172. Hohoff C, Schürenkamp M, Brinkmann B. Meiosis study in a population sample from Nigeria: allele frequencies and mutation rates of 16 STR loci. *Int J Legal Med* 2009; **123**: 259-61.
173. Sun M, Zhang X, Wu D, Shen Q, Wu Y, Fu S. Mutations of short tandem repeat loci in cases of paternity testing in Chinese. *Int J Legal Med* 2016; **130**(5): 1203-4.
174. Hongdan W, Bing K, Ning S, et al. Evaluation of the genetic parameters and mutation analysis of 22 STR loci in the central Chinese Han population. *Int J Legal Med* 2017; **131**(1): 103-105.
175. Thangaraj K, Reddy AG, Singh L. Mutation in the STR locus D21S11 of father causing allele mismatch in the child. *J Forensic Sci* 2004; **49**: 99-103.
176. Brinkmann B, Meyer E, Junge A. Complex mutational events at the HumD21S11 locus. *Hum Genet* 1996; **98**: 60-4.
177. Narkuti V, Vellanki RN, Gandhi KP, Doddapaneni KK, Yelavarthi PD, Mangamoori LN. Microsatellite mutation in the maternally/paternally transmitted D18S51 locus: Two cases of allele mismatch in the child. *Clinica Chimica Acta* 2007; **381**: 171-75.

178. Wei Xu, Yuequn Wang, Dandan Zhang, Daixin Wang, Liang Zhou, Xiangli Ye, Chaogeng Zhu & Yongzhong Shi. Mutation analysis of 21autosomal short tandem repeats in Han population from Hunan, China. 2019 May;**46**(3):254-260.
179. Takayama T, Takada N, Suzuki R, Nagaoka S, Watanabe Y. Identification of a rare mutation in a TH01 primer binding site. *Leg Med* 2007; **9**(6): 289-92.
180. Yua J. Allele dropout at the STR loci TH01 and vWA and identification of two new point mutations upstream of the repeat region at the vWA locus. *Forensic Sci Inter Genet* 2016; **23**:14-17.
181. Li F, Xuan J, Xing J, Ding M, Wang B, Pang H. Identification of new primer binding site mutations at TH01 and D13S317 loci and determination of their corresponding STR alleles by allele-specific PCR. *Forensic Sci Int Genet* 2014; **8**: 143-46.
182. Leibelt C, Budowle B, Collins P, et al. Identification of a D8S1179 primer binding site mutation and the validation of a primer designed to recover null alleles. *Forensic Sci Int* 2003; **133**: 220-27.
183. Forrest WS, Kupferschmid DT, Hendrickson CB, Judkins T, Petersen JD, Scholl T. Two rare novel polymorphisms in the D8S1179 and D13S317 markers and method to mitigate their impact on human identification. *Croat Med J* 2004; **45**: 457-60.
184. Ricci U, Melean G, Robino C, Genuardi M. A single mutation in the FGA locus responsible for false homozygosities and discrepancies between commercial kits in an unusual paternity test case. *J Forensic Sci* 2007; **52**(2): 393-96.
185. Jeffreys AJ, Cotton VE, Neumann R, Lam KW. Recombination regulator PRDM9 influences the instability of its own coding sequence in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**(2): 600-05.
186. Clayton TM, Hill SM, Denton LA, Watson SK, Urquhart AJ. Primer binding site mutations affecting the typing of STR loci contained within the AmpFISTR_SGM Plus™ kit. *Forensic Sci Int* 2004; **139**: 255-59.
187. Hendrickson CB, Leclair B, Forrest S, et al. Accurate STR allele designations at the FGA and vWA loci despite primer site polymorphisms. *J. Forensic Sci* 2004; **49**: 250-54.
188. Viguera E, Canceill D, Ehrlich SD. Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J* 2001, **20**:2587-2595.

189. Sun H, Liu S, Zhang Y, White MR. Comparison of southern Chinese Han and Brazilian Caucasian mutation rates at autosomal short tandem repeat loci used in human forensic genetics. *Int J Legal Med.* 2014 Jan; **128**(1):1-9.
190. Martinez J, Branganholi DF, Ambrósio IB, Polverari FS, Cicarelli RMB. Mutation rates for 20 STR loci in a population from São Paulo state, Southeast, Brazil. *Ann Hum Biol.* 2017 Nov;**44**(7):659-662.
191. Sun L, Shi K, Tan L, Zhang Q, Fu L, Zhang X, Fu Gu, Li S, Cong B. Analysis of genetic polymorphisms and mutations at 19 STR loci in Hebei Han population. *Forensic Science International: Genetics* **31**, 2017:50-51.
192. Farrall M, Weeks DE. Mutational mechanisms for generating microsatellite allele-frequency distributions: an analysis of 4558 markers, *Am. J. Hum. Genet.* 1998;**62**: 1260–1262.
193. Jeffreys AJ, Neil DL, Neumann R. Repeat instability at human minisatellites arising from meiotic recombination, *EMBO J.*, 1998, **17** :4147-4157.
194. Francioli LC, Polak PP, Koren A, Menelaou A, Chun S, Renkens I, Genome of the Netherlands Consortium, et al. 2015. Genome-wide patterns and properties of de novo mutations in humans. *Nature Genetics* **47**:822–826.
195. Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, Gudjonsson SA, et al. 2012. Rate of de novo mutations, father's age, and disease risk. *Nature* **488**:471–475.
196. Brinkmann B, Klintschar M, Neuhuber F, Hühne J, Rolf B. 1998. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet* **62**:1408–1415.
197. De Andrade ES, Gomes AV, Raposo G, Mauricio-da-Silva L, Silva Rdos S. Mutation rates at 14 STR loci in the population from Pernambuco, Northeast Brazil. *Forensic Sci Int Genet.* 2009 Sep;**3**(4) : e141-143.
198. Jeffreys AJ, Cotton VE, Neumann R, Lam KW. Recombination regulator PRDM9 influences the instability of its own coding sequence in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**(2): 600-05.
199. Zetterberg M, Celojevic D. Gender and cataract - the role of estrogen. *Curr Eye Res* 2015; **40**(2): 176-90.
200. Qian XQ, Yin CY, Ji Q, Li K, Fan HT, Yu YF, Bu FL, Hu LL, Wang JW, Mu HF, Haigh S, Chen F. Mutation rate analysis at 19 autosomal microsatellites. *Electrophoresis.* 2015, **36**(14),1633-1639.

201. Sun JX, Helgason A, Masson G, Ebenesersdóttir SS, Li H, Mallick S, Gnerre S, Patterson N, Kong A, Reich D, Stefansson K. A direct characterization of human mutation based on microsatellites. *Nat Genet*, 2012, **44**:1161-1165.
202. Dupuy BM, Stenersen M, Egeland T, Olaisen B. Y-chromosomal microsatellite mutation rates: differences in mutation rate between and within loci. *Hum Mutat*. 2004, **23**(2):117-124.
203. Ge J, Budowle B, Aranda XG, Planz JV, Eisenberg AJ, Chakraborty R. Mutation rates at Y chromosome short tandem repeats in Texas populations. *Forensic Science International: Genetics* **3**, 2009 : 179-184.
204. Akhteruzzaman S, Majumder AK, Ferdous A, Ali ME. False paternity with one or two mismatches using commercial STR kits. *Aust J Forensic Sci* 2012; **44**(3): 253-59.
205. Jha DK, Rijal JP, Tuladhar BS, Pokharel BR. Mutations or exclusion: an uncommon parentage assessment case. *Scientific World* 2013; **11**(11): 74-76.
206. Borsting C, Morling N. Mutations and/or close relatives? Six case work examples where 49 autosomal SNPs were discordant genotypes with different STR kits. *Forensic Sci Int Genet* 2011; **5**: 339-41.
207. Kornelia Drożdżiok, Jadwiga Kabiesz, Marcin Tomsia, Rafał Skowronek, Krzysztof Rębała. Mutation analysis of short tandem repeats in a population sample from Upper Silesia (southern Poland) 2018 Apr 1; **33**:1-4.