

**Ryszard Słomski (1, 2, 3), Katarzyna Dziechciowska (1), Dobrawa Lisiecka (2), Barbara Siemieniako (3), Magdalena Słomska (1)**

## **Dochodzenie spornego ojcostwa na podstawie analizy DNA po śmierci ojca lub matki.**

### **Paternity disputes based on analysis of DNA after the death of alleged father or mother.**

1. Laboratorium Genetyki Molekularnej w Poznaniu
2. Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
3. Katedra Biochemii i Biotechnologii Akademii Rolniczej w Poznaniu

W pracy przedstawiono przykłady analiz DNA w dochodzeniu spornego ojcostwa przy braku materiału porównawczego od domniemanego ojca lub matki. DNA dziecka porównano z DNA uzyskanym od rodziny nieżyjącego o różnym stopniu pokrewieństwa. Zebrany materiał obejmuje 5 przypadków, które można było w pełni wyjaśnić na podstawie analizy DNA stosując zarówno badania hybrydizacyjne dla pojedynczych cech jak i badania z zastosowaniem PCR dla powtórzeń minisatelitarnych i mikrosatelitarnych. Wyniki badań wskazały na ogromną przydatność analizy DNA w rozwiązywaniu tych spraw.

This paper presents representative results of DNA analysis in paternity cases where genetic material from alleged father or mother was not available. In presented cases child's DNA was compared with DNA from living family members of different degrees of relationship. Collected examples include 5 cases which were explained after hybridization analysis with single locus probes followed by PCR analysis of minisatellite and microsatellite DNA repeats. Results indicate enormous usefulness DNA analysis in solving such cases.

## **WSTĘP**

Już od pojawienia się pierwszych prac o analizie DNA fingerprinting (1, 4, 9) założono, że ten sposób analizy DNA umożliwi precyzyjne określenie pokrewieństwa i rozpoczęto rutynowe jego stosowanie w sprawach imigracyjnych w Wielkiej

Brytanii (5, 10). Duży problem w opiniowaniu spraw o dochodzenie spornego ojcostwa stanowią sprawy deficytowe, w których nie żyje jedno z rodziców. Sprawy deficytowe wymagają analizy DNA osób należących do rodziny zmarłego, szczególnie rodziców i rodzeństwa. Zakłada się, że na podstawie określenia genotypu kilku loci w rodzinie zmarłego odtworzyć można układ poszczególnych alleli u osoby zmarłej. Bardzo informatywne są w tych przypadkach badania zarówno minisatelitarnych sekwencji powtórzonych jak i sekwencji mikrosatelitarnych (8). Niestety nie zawsze możliwe jest jednoznaczne wykazanie, że dziecko należy do rodziny osoby zmarłej. Dotyczy to sytuacji gdy oboje rodzice zmarłego nie żyją, a do badań porównawczych można użyć DNA tylko jednej osoby, np. brata lub siostry zmarłego. W przypadkach gdy na podstawie wyników rutynowo stosowanych sond i markerów genetycznych nie można wykazać ani wykluczyć ojcostwa nieżyjącego mężczyzny zaleca się badanie polimorficznych sekwencji chromosomów płci.

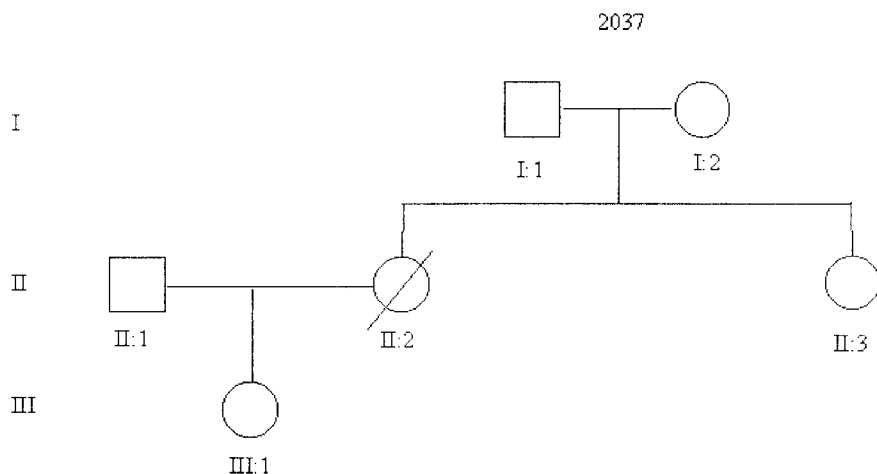
Celem niniejszej pracy jest przedstawienie wyników analizy fragmentów DNA uzyskiwanych w badaniach spornego ojcostwa w sprawach, w których domniemany ojciec lub matka nie żyli. Materiał obejmuje pięć spraw wyjaśnionych poprzez analizę DNA.

## MATERIAŁY I METODY

Materiał do badań stanowił DNA izolowany z limfocytów krwi obwodowej 5 rodzin uczestniczących w sprawach spornego ojcostwa w latach 1996–1997. Analiza restrykcyjna obejmowała trawienie DNA enzymem restrykcyjnym HinfI, a następnie hybrydyzację z sondami molekularnymi MS43A, MS31 i MS1 rozpoznającymi loci D12S11, D7S21 i D1S7 (1). Analiza DNA metodą PCR została wykonana dla loci D1S80 (6,7), HUMTH01(AATG)<sub>n</sub>, HUMCYAR04(AAAT)<sub>n</sub> i HUMPLA2A1(AAT)<sub>n</sub> z zastosowaniem starterów znakowanych fluorochromem Cy5 i sekwenatora ALFExpress.

## WYNIKI

Pierwsza sprawa (numer 2037) dotyczyła dochodzenia spornego ojcostwa przy braku materiału porównawczego od matki dziecka, (II:2). W jej miejsce stawili się rodzice (I:1 i I:2) i siostra nie żyjącej (II:3). W przypadku locus D1S7 (MS1), allel 8,2 występował u ojca i siostry zmarłej, natomiast allel 8,3 locus D7S21 (MS31) tylko u ojca zmarłej, podobnie jak allel 10,5 locus D12S11 (MS43A). Spośród alleli określonych metodą PCR, zarówno minisatelitarne jak i mikrosatelitarne allele dziecka można było przypisać do ojca dziecka i rodziny zmarłej matki.

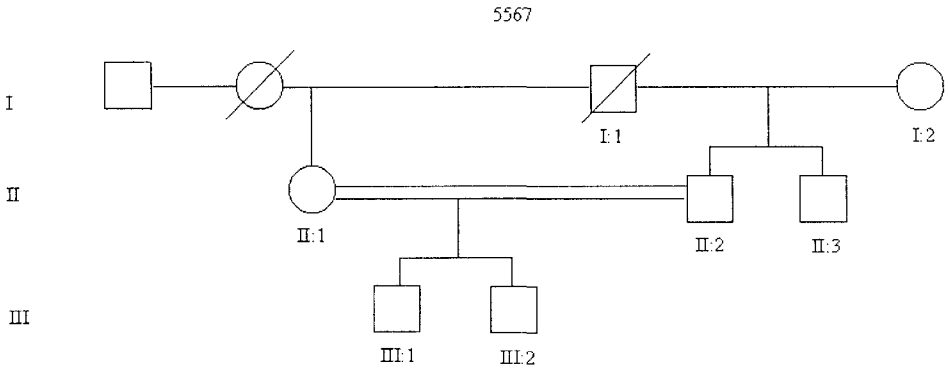


	II:1	III:1	II:2	I:1	I:2	II:3
D1S7 (MS1)	5,6-3,2	8,2-5,6	9,3/4,4-8,2	8,2-7,6	9,3-4,4	8,2-4,4
D7S21 (MS31)	8,9-7,6	8,3-7,6	8,9/5,3-8,3	10,4-8,3	8,9-5,3	10,4-8,9
D12S11 (MS43A)	11,3-4,5	11,3-10,5	8,7/7,3-10,5	10,5-3,9	8,7-7,3	10,5-7,3
D1S80	18-25	25-31	18/24-31	24-31	18-24	24-31
HUMTH01	6-10	6-8	6/10-8	6-8	6-10	6-6
HUMCYAR04	5-9	9-10	5/8-10	5-8	5-10	8-10
HUMPLA2A1	10-16	12-16	11-12	11-11	12-15	11-12

Ryc. 1. Rodowód i genotypy rodziny 2037

Fig. 1. Pedigree and genotypes of family 2037

Druga sprawa (numer 5567) dotyczyła kobiety (II:1), której domniemany ojciec (I:1) oraz matka nie żyli. Najbliższą rodzinę zmarłego stanowili jego synowie (II:2 i II:3) oraz ich matka (I:2). Wykonano badania porównawcze, które wykazały, że kobieta (II:1) oraz syn zmarłego (II:2) w przypadku loci D1S7, D7S21 i D12S11 posiadają w każdym z nich jeden wspólny allel, a ponadto w locus D1S80 obydwaj wspólnie allele. Natomiast u kobiety i drugiego syna nieżyjącego mężczyzny (II:3) występował jeden wspólny allel w locus D7S21 i D1S80. Bracia w tych loci charakteryzowali się obecnością czterech wspólnych alleli. Aspekt kazirodczy tej sprawy został już opisany w artykule zamieszczonym w „Archiwum” (3).



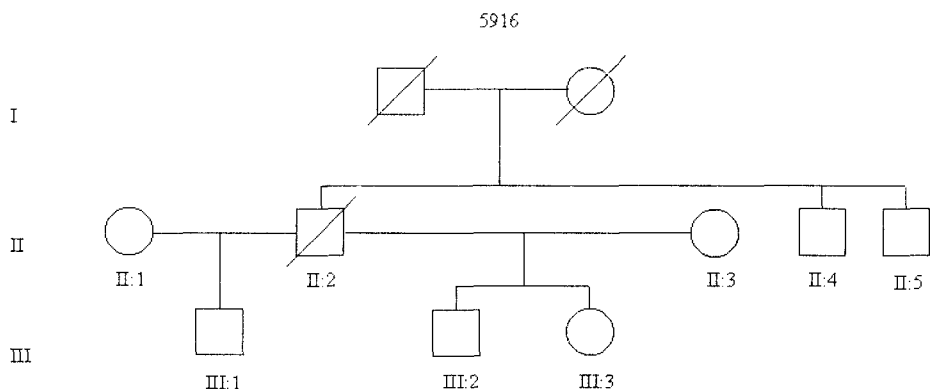
	II:1	III:1	III:2	I:1	II:2	II:3	I:2
D1S7 (MS1)	8,4-5,6	10,2-8,4	10,2-5,6	8,4-6,3	10,2-8,4	10,2-6,3	10,2-8,4
D7S21 (MS31)	8,1-7,3	8,1-7,3	9,9-7,3	7,3-N	9,9-7,3	9,9-7,3	9,9-5,1
D12S11 (MS43A)	11,2-4,9	8,9-4,9	11,2-4,9	11,2-5,8	11,2-8,9	6,4-5,8	8,9-6,4
D1S80	24-31	31-31	24-31	18-24/31	24-31	18-31	24-31
HUMTH01	6-8	6-6	6-8	6/8-10	6-8	6-10	6-8
HUMCYAR04	6-10	5-6	6-10	10-N	5-10	5-10	5-7
HUMPLA2A1	11-13	11-12	12-13	13-14	12-13	12-14	12-12

Ryc. 2. Rodowód i genotypy rodziny 5567

Fig. 2. Pedigree and genotypes of family 5567

Trzecia sprawa (numer 5916) dotyczyła dochodzenia spornego ojcostwa w stosunku do dziecka płci męskiej (III:1), przy czym domniemany ojciec (II:3) już nie żył. Do badań stawili się: syn zmarłego (III:2) z innego związku, kobieta (II:4) będąca matką tego syna, brat nieżyjącego (II:4) oraz powódka (II-1). Dziecko (III-1), w sprawie którego toczyło się postępowanie nie posiadało wspólnych alleli w loci D1S7, D7S21, D12S11 i D1S80 zarówno z bratem zmarłego (II-4) jak i z jego synem (III-2). Amplifikacja markera HUMCYAR04(AAAT)<sub>n</sub> wykazała obecność wspólnego allelu u badanego dziecka, brata oraz syna nieżyjącego mężczyzny. Dziecko posiadało również taki sam allel jak syn zmarłego w przypadku markera HUMPLA2A1(AAT)<sub>n</sub>. Obserwowano również allele występujące u prawnie uznanego syna zmarłego i porównywano z genotypem brata nieżyjącego mężczyzny. Ponieważ zaobserwowano ewentualne dziedziczenie jedynie alleli mikrosatelitar-

nych, przy braku dziedziczenia alleli minisatelitarnych skierowano do sądu zapytanie, czy dostępni do badań są inni członkowie rodziny zmarłego. Badanie przeprowadzone dla drugiego brata (II:5) i córki (III:3) zmarłego doprowadziło do wydania opinii potwierdzającej ojcostwo.



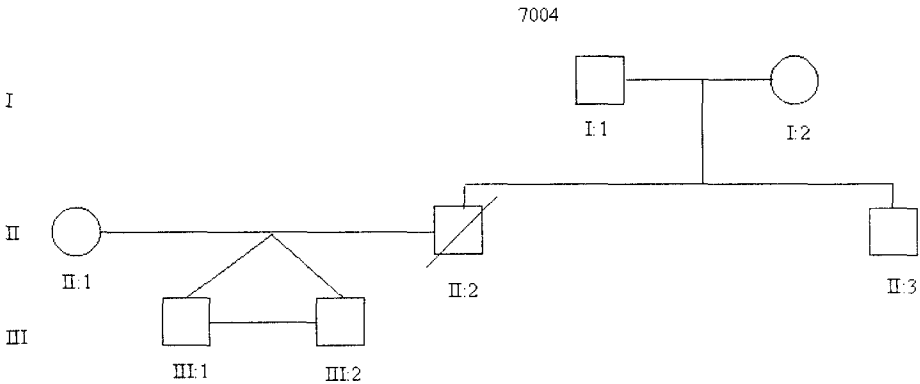
	II:1	III:1	II:2	III:2	III:3	II:3	II:4	II:5
D1S7 (MS1)	1-6	6-8	2/7/8-4	3-4	4-5	3-5	2-7	7-8
D7S21 (MS31)	8,6-6,1	8,6-5,2	4,8-N	7,0-4,8	7,0-4,8	7,0-3,8	5,7-4,8	5,7-4,8
D12S11 (MS43A)	8,5-5,0	8,5-5,2	8,1-5,2	8,1-6,8	6,8-5,2	8,6-6,8	8,1-3,8	5,6-3,8
D1S80	27-31	18-27	18-29	27-29	18-24	24-27	20-20	20-29
HUMTH01	10-10	6-10	6-N	6-6	6-10	6-10	10-10	6-10
HUMCYAR04	5-5	5-10	10/11-11	10-11	10-11	5-10	10-11	10-10
HUMPLA2A1	11-15	15-15	11/13-15	11-15	15-15	11-15	11-13	11-13

Ryc. 3. Rodowód i genotypy rodziny 5916

Fig. 3. Pedigree and genotypes of family 5916

Czwarta sprawa (numer 7004) dotyczyła dochodzenia spornego ojcostwa zmarłego mężczyzny (II:2), w stosunku do dwójki dzieci (III:1 i III:2), bliźnięt jednojajowych. Do badań stawili się oprócz matki (II:1) i dzieci obydwój rodzice (I:1, I:2) oraz brat nieżyjącego (II:3). Wspólny allel posiadały dzieci i matka domniemanego ojca w locus D1S7. Analiza locus D7S21 wykazała, że allel

o wielkości 9,1 kpz występuje u dzieci oraz brata i matki nieżyjącego mężczyzny. W przypadku locus D12S11 wykazano, że u dzieci, ich matki, brata oraz matki nieżyjącego występuje taki sam allel o wielkości 10,3 kpz. Amplifikacja markerów D1S80, HUMTH01(AATG)<sub>n</sub>, HUMPLA2A1(AAT)<sub>n</sub> i HUMCYAR04(AAAT)<sub>n</sub> wykazała obecność u dzieci alleli charakterystycznych dla rodziny zmarłego.

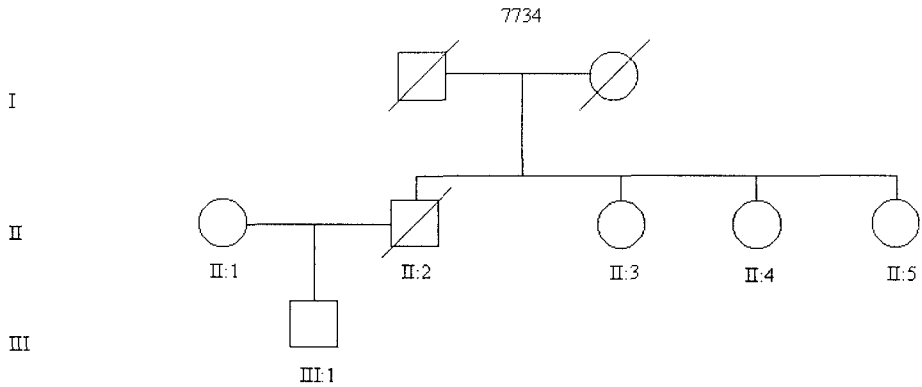


	II:1	III:1	III:2	II:2	I:1	I:2	II:3
D1S7 (MS1)	2-3	2-5	2-5	4/6-5	4-6	1-5	1-6
D7S21 (MS31)	6,5-6,3	9,1-6,3	9,1-6,3	6,5/4,9-9,1	6,5-4,9	9,1-4,8	9,1-6,5
D12S11 (MS43A)	10,3-9,5	10,3-10,3	10,3-10,3	9,9/5,9-10,3	9,9-5,9	10,3-8,7	10,3-5,9
D1S80	27-31	18-27	18-27	18-24/27	18-24	24-27	18-24
HUMTH01	10-10	6-10	6-10	6-6/10	6-10	6-10	10-10
HUMCYAR04	5-5	5-5	5-5	5-6/7	5-7	5-6	5-5
HUMPLA2A1	13-15	11-15	11-15	11-13/15	13-15	11-15	11-15

Ryc. 4. Rodowód i genotypy rodziny 7004

Fig. 4. Pedigree and genotypes of family 7004

W piątej sprawie dochodzenia spornego ojcostwa (numer 7734) badaniem objęto dziecko płci żeńskiej, narodzone ze związku z powódką (III:1), matkę dziecka (II:1) i trzy siostry domniemanego ojca (II:3, II:4 i II:5). Ta sprawa okazała się bardzo prosta w opiniowaniu, ponieważ wszystkie allele dziecka można było przypisać do matki i sióstr zmarłego.



	II:1	III:1	II:2	II:3	II:4	II:5
D1S7 (MS1)	2-3	2-5	4/6-5	2-5	4-6	1-5
D7S21 (MS31)	8,7-5,7	5,7-5,6	7,0/6,9-5,6	6,9-5,6	7,0-5,6	6,9-5,65
D12S11 (MS43A)	9,9-8,5	9,9-7,9	6,9/5,8/3,9-7,9	6,9-5,8	7,9-3,7	7,9-3,7
D1S80	23-24	24-24	18/24-24	24-24	18-24	24-24
HUMTH01	6-10	6-6	7/8/10-6	7-10	6-8	6-8
HUMCYAR04	5-10	5-6	6/10	6-10	6-10	6-10
HUMPLA2A1	11-11	11-15	12/15-15	12-15	12-12	12-15

Ryc. 5. Rodowód i genotypy rodziny 7734

Fig. 5. Pedigree and genotypes of family 7734

## WNIOSKI I DYSKUSJA

Sprawy dotyczące dochodzenia spornego ojcostwa, gdy domniemany ojciec nie żyje, stanowią jedynie niewielką część wszystkich spraw (ok. 0,5%), jednak z reguły są to sprawy trudne (1,2,3). Nasze doświadczenie ze spraw deficytowych wskazuje, że w tej grupie łatwiejsze do opiniowania są sprawy, w których w miejsce nieżyjącej osoby badaniem obejmie się jej rodziców. Niestety najczęściej DNA obojga rodziców nie jest dostępny do badań, dlatego badaniem obejmuje się rodzeństwo zmarłej osoby i ewentualne potomstwo. W przedstawionej pracy ostateczne wyniki uzyskano na podstawie różnych liczebnie rodzin, ale ważne jest, aby do badań została pobrana krew od całej rodziny osoby zmarłej.

W przypadku, gdy nie żyje matka dziecka, badanie spornego ojcostwa może być wykonane w zasadzie tylko na DNA dziecka i domniemanego ojca. Przy

zastosowaniu kilku sond dla loci minisatelitarnych i kilku dla mikrosatelitarnych uzyskać można wynik potwierdzający graniczący z pewnością. Posiłkować się również można badaniem typu multilocus. W sprawach, w których nie żyje matka dziecka, a pochodzenie dziecka jest kwestionowane należy badaniem objąć rodzinę zmarłej.

W badaniach, gdy nie jest dostępny DNA obydwu rodziców na pewno lepiej korzystać z analizy hybrydyzacyjnej dla loci minisatelitarnych, które wykazują znacznie wyższy polimorfizm niż loci mikrosatelitarne. Prawdopodobieństwo ojcostwa w sprawach analizowanych z zastosowaniem 7 markerów jest z reguły bardzo wysokie, chociaż wartość jego zależy od częstości występowania badanych alleli w populacji. W naszych badaniach prawdopodobieństwo ojcostwa wynosiło od 99,98690% do 99,99672%.

## PIŚMIENICTWO

1. Czarny M., Kwiatkowska J., Słomska M., Siemieniako B., Słomski R.: Możliwości badawcze polimorficznych loci DNA człowieka i ich wykorzystanie w badaniach medyczo sądowych. *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 1995, XLV, 3–4, 257–269.
2. Czarny M., Janiszewska H., Kwiatkowska J., Chlebowska H., Siemieniako B., Słomski R.: Czy analiza DNA jest zawsze skuteczna: Problemy w dochodzeniu spornego ojcostwa w przypadku bliskiego pokrewieństwa domniemanych ojców. *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 1995, XLV, 3–4, 287–295.
3. Czarny M., Słomski R., Kwiatkowska J., Chlebowska H.: Skuteczność analizy DNA w dochodzeniu spornego ojcostwa w przypadkach bliskich pokrewieństw. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 1996, XLVI, 289–297.
4. Jeffreys A.J., Wilson V., Thien S.W.: Individual-specific „fingerprints” of in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis. *Cell*, 1990, 60, 473–485.
5. Jeffreys A.J., Turner M., Debenham P.: The efficiency of multilocus DNA fingerprint probes for individualisation and establishment of family relationships, determined from extensive casework. *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, 48, 824–840.
6. Kasai K., Nakamura Y., White R.: Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT 118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic sciences. *J. Forensic Sci.*, 1990, 35, 1196–1200.
7. Kwiatkowska J., Dziechciowska K., Lisecka D., Słomski R.: DNA polymorphism in locus D1S80 in Poland. DNA profiling and detection of new alleles by heteroduplex formation between alleles of the same size. *J. Appl. Genet.* 38, 335–241, 1997.
8. Kwiatkowska J., Słomski R.: Powtórzenia sekwencji mikrosatelitarnych w genomie człowieka. *Postępy Biologii Komórki* 23, 19–29, 1996.
9. Pena S., Chakraborty R.: Paternity testing in the DNA era. *TIG*, 1994, 10, 6, 204–209.
10. Pena S.D.J., Chakraborty R., Epplen J.T., Jefferys A.J.: *DNA Fingerprinting*, Ed. S.D.J. Pena, R. Chakraborty, J.T. Epplen and A.J. Jefferys, Birhauser Verlag, 1993.

Adres autorów:

Zakład Genetyki Człowieka

60–479 Poznań

ul. Strzeszyńska 32