SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

SZOMATIKUS ÉS Y KROMOSZÓMÁN LOKALIZÁLÓDÓ STR MARKEREK POPULÁCIÓGENETIKAI VIZSGÁLATA

PhD dolgozat

Készítette:

Beer Zsuzsanna

Szakvezető:

Prof. Dr. Varga Tibor

Készült:

Szegedi Tudományegyetem

Szentgyörgyi Albert Orvostudományi Centrum

Igazságügyi Orvostani Intézet

2004

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS **5**
1.1. Történelmi előzmény 5
1.2. Kutatási előzmények 7
1.3. Célkitűzés 10
1.4. A humán genom felépítése 11
1.4.1. Mikroszatelliták mutációi 12
1.5. A DNS-fingerprint technika fejlődésének rövid története 12
1.6. Short Tandem Repeat jellemzése 13
1.6.1. Autoszómális markerek 16
1.6.2. Nemi-kromoszómák markerei 17
1.6.2.1. X-kromoszóma markerek 18
1.6.2.2. Y-kromoszóma markerek 19
1.6.3. STR markerek és allélok nevezéktana 20
1.7. Mitokondriális DNS 22
1.8. Adatbázisok 23
1.8.1. Kriminalisztikai adatbázisok 23
1.8.2. Populációgenetikai adatbázisok 24
1.9. Populációgenetikai áttekintés 26
1.9.1. Hardy-Weinberg egyensúly 26
1.9.2. Populációk polimorfizmusát befolyásoló tényezők 27
1.9.3. Populációk variabilitásának jellemzése 30

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK **32**
2.1. Mintavétel 32
2.2. A DNS-izolálás 32
2.2.1. DNS izolálása folyékony vérből 32
2.2.2. DNS izolálása vérfoltból 33
2.2.2.1. Chelex-es extrakció 33
2.2.2.2. Fenol-kloroformos extrakció 33
2.3. DNS koncentráció mérése 34
2.4. Autoszómális markerek 35

2.4.1. A vizsgált szomatikus STR markerek jellemzői 35
2.4.2. Multiplex kitek 35
2.5. Y-kromoszóma markerek 38
2.5.1. A vizsgált Y-kromoszóma STR markerek jellemzői 38
2.5.2. Singleplex vizsgálatok 38
2.5.3. Multiplex vizsgálatok 40
2.6. Allélszeparáció és allélmeghatározás 43
2.6.1. Horizontális gélelektroforézis 43
2.6.2. Kapilláris gélelektroforézis 44
2.7. Eredmények feldolgozása 46

3. EREDMÉNYEK 48
3.1. A magyar populáció jellemző értékei 48
3.1.1. Szomatikus STR markerek 48
3.1.1.1. Allélgyakorisági értékek 48
3.1.1.2. Genotípusok 49
3.1.2 Y-kromoszóma STR markerek 56
3.1.2.1. Allélgyakorisági értékek 56
3.1.2.2. Haplotípusok 56
3.2. A székely populáció jellemző értékei 61
3.2.1. Szomatikus STR markerek 61
3.2.1.1. Allélgyakorisági értékek 61
3.2.1.2. Genotípusok 62
3.2.2 Y-kromoszóma STR markerek 66
3.2.2.1. Allélgyakorisági értékek 66
3.2.2.2. Haplotípusok 66
3.3. A mongol populáció jellemző értékei 70
3.3.1. . Szomatikus STR markerek 70
3.3.1.1. Allélgyakorisági értékek 70
3.3.1.2. Diszkriminációs értékek 71
3.3.1.3. Genotípusok 71
3.3.2 Y-kromoszóma STR markerek 76
3.3.2.1. Allélgyakorisági értékek 76
3.3.2.2. Haplotípusok 77

3.4. A populációk közötti genetikai távolság 78
3.4.1. Autoszómális STR markerek 78
3.4.2. Y-kromoszóma STR markerek 78
3.5. A populációk összehasonlítása az adatbázisokban 80
3.5.1. Tipikus európai haplotípusok 80
3.5.2. A magyar populáció 80
3.5.3. A székely populáció 84
3.5.4. A mongol populáció 86

4. ÉRTÉKELÉS 88
4.1. Szomatikus markerek 88
4.2. Y kromoszóma markerek 89

5. HIVATKOZÁSOK 92

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 98

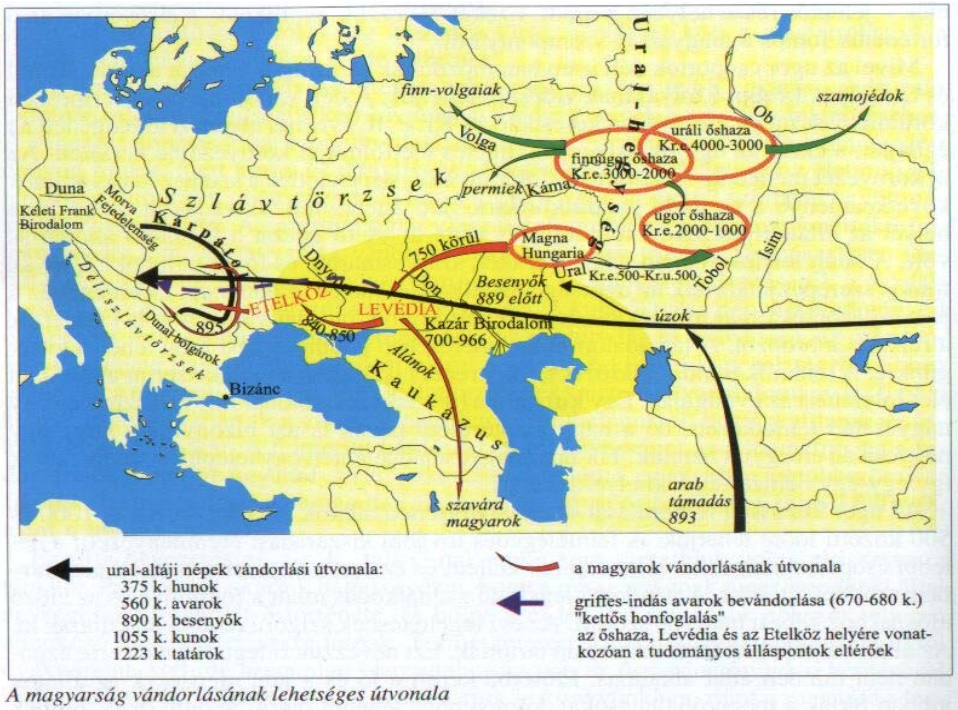
ÖSSZEFOGLALÓ (Magyar nyelvű összefoglaló) 99

ABSTRACT (Angol nyelvű összefoglaló) 104

1. BEVEZETÉS

1.1. Történelmi előzmény

A manapság történészeink által a leginkább elfogadott elmélet a magyart a finnugor nyelvek közé, a magyar népet pedig a finnugorok közé sorolja. Ezen elmélet szerint az ural-altáji népekhez tartozó finnugor nép az idõszámítás kezdete elõtt évezredekkel az Ural-hegységtõl nyugatra élt, a középsõ Volga vidéke és az Ural-hegység közötti, erdõkkel borított területen. Az i.e. II. évezredben a finn és az ugor nép feltehetõleg különvált, s a vadászó életmódot folytató ugorok az Uralhoz közelebb húzódva valószínûleg az Ural keleti oldalára is átjutottak. Ezután a Volga és Káma vidékére vándoroltak, ahol nomád állattenyésztéssel foglalkoztak. A magyarság önállósulása idõszámításunk kezdetén következhetett be, amikor a dél-szibériai sztyeppéken lovas török népek szomszédságában élt. Az V. században a török népekkel együtt folyamatosan nyugat felé vándorolt, és egészen a Don alsó folyásáig jutott el. A nyelvtudomány segít annak megállapításában, hogy a magyarok ekkor már ismerték a földmûvelést, és azt török népektõl vették át. A hun, bolgár-török, avar, türk, majd a kazár birodalom kötelékében élt magyarok a IX. század húszas éveiben még nyugatabbra, a Dnyeper felé húzódtak. A Don és a Dnyeper között elterülõ Levédiából azután folyamatosan nyugat felé vándoroltak, rövid ideig az Etelközben telepedtek meg, majd a Kárpát-medencébe áramlottak (10. ábra). A Kárpát-medence egészét megszálló magyarság az elfoglalt területeken jelentõs számú szláv lakosságot, mellettük avarokat és feltehetõleg bolgárokat talált.



10. ábra: a magyarság vándorlásának lehetséges útvonala.

László (1967) kettõs honfoglalás elmélete alapján az is valószínûsíthetõ, hogy az avarok VI. századi beáramlásakor az avarok mellett magyar nyelvû népelemek is megtelepedtek ezen a területen. Ezen népességet pedig lehetséges, hogy a székelyekkel kell azonosítanunk.

László (1967) szerint a honfoglalás két hullámban történt. A honfoglalás első hullámát, mely 670-680 táján történt, Onogur honfoglalásnak, vagy a fehérmagyarok honfoglalásának nevezi. Elméletét különböző forrásokkal támasztja alá. Hivatkozik az orosz őskrónikákra, melyek azt írják, hogy kezdetben jöttek a fehérugorok az avarok idejében, azután jöttek a feketeugorok Árpád idejében. Nyugati források is arról írtak, hogy Nimród népe Pannónia elfoglalása előtt telepedett be ide, a Kárpát-medencébe. Ezt a népet aztán Nagy Károly legyőzte. Árpád honfoglalása előtt száz-százötven-kétszáz évvel összesen hatvan onogurból származó név található az oklevelekben. Tehát bőséggel van olyan írott adat is, megemlékezés, feljegyzés, krónika, amelyek felvetik a lehetőségét annak, hogy itt Nimród népe hamarabb jelent meg, mint Árpád (szarmata leletek, hun leletek, germán leletek, longobárdok, avarok, szlávok, magyarok leletei).

László (1967) szerint a székelyek nem Nimród népétől, hanem Attila népétől származnak. Szerinte a székelység Árpád honfoglalása előtt már biztosan itt élt a

Kárpát-medencében. A székelyek is magukat Attila népétől származtatják, és a népi eredettudatot komolyan kell venni, de Anonymus is megírta, hogy Bihar környékéről mentek Árpád elé, és kötöttek szövetséget egymással. A székelyek Anonymus szerint Árpád idejében a Tiszántúlon, fõleg a bihari részen éltek [László 1967].
A székely nagy valószínűséggel egyik népe lehetett az onogur, fehérmagyar honfoglalásnak, de az is lehet, hogy a székelyek még korábban jöttek ide.
Mind a mai napig tisztázatlan, hogy a székelyek az ősmagyarokkal együtt jöttek-e a Kárpát-medencébe 896 körül, vagy néhány száz évvel korábban érkeztek.

1.2. Kutatási előzmények

Az ember evolúciójának DNS alapú vizsgálata a molekuláris biológia több területén elindult. Mivel a mitokondriális DNS (mtDNS) anyai ágon öröklődik, az Y kromoszóma apai ágon, ezért ezek vizsgálata egy-egy közös őshöz vezethet, így ezek vizsgálata volt célszerű. Az mtDNS alapú vizsgálat és az Y kromoszóma vizsgálat alapján azt kívánták meghatározni, hogy az emberiség ősanyja és ősapja hol alakult ki. Ez persze nem feltétlenül jelenti azt, hogy egyetlen ősanya és ősapa volt. Az első eredményeket mtDNS alapján érték el, mely szerint afrikai ősanyánk volt, az emberek Afrikából indulva népesítették be a többi kontinenst [Stoneking 1993]. Ez az ős mintegy 200 ezer évvel ezelőtt élt, melynek leszármazottai 60-70 ezer évvel ezelőtt kerültek Dél-Ázsia illetve Ausztrália területére az Indiai óceánon keresztül. Egy újabb vándorlási ütemben, 40-50 ezer évvel ezelőtt Európa és Észak-Ázsia területét népesítette be újabb embercsoport, szintén Afrikából indulva [Lahr és Foley 1994].
Az Y kromoszóma vizsgálatok is hasonló eredményre vezettek, a közös ős valószínűleg az afrikai kontinensről származik, de hogy ez az ős mikor élt, azt egyenlőre még nem határozták meg. A leszármazási vizsgálatokat mindenképpen a jelenkori populációból kiindulva kell elkezdeni, a jelenkori populációk genetikai hasonlóságait és különbségeit elemezni, olyan markerek alapján, melyek az evolúció során megmaradnak a genomban, illetve változásuk követhető; pl. az Alu-szekvenciák, Short tandem repeat (STR) markerek, single nucleotid polimorfizmusok (SNP) vizsgálata.
Szomatikus STR rendszerek alapján a jelenkori európai populációk között kis különbséget találtak csak, ami a szomatikus markerek gyakori rekombinációjának köszönhető. Az összesített F_{ST} értéke az Európában 13 szomatikus STR rendszerre:

0,0006, ami rendkívül alacsony érték [Budowle 2001]. E vizsgálat alapján felállított törzsfa szerint a finnek egy, a többi európai populációtól különálló csoportot képviselnek. Hozzájuk a török és görög populáció áll legközelebb, majd a szláv népek, a finnektől legtávolabb a spanyol, svájci és olasz populáció áll.
Y kromoszóma STR alapján végeztek vizsgálatokat eredetkutatási és összehasonlítási területeken. Ázsiában 16 populációban, összesen 2000 férfi 32 Y-STR és SNP markert vizsgálva keresték a legközelebbi közös őst, illetve annak korát. Találtak egy olyan haplotípust, illetve ehhez a haplotípushoz közel állókat, amelyek alapján sikerült beazonosítani egy őst, aki nagy valószínűséggel Dzsingisz kán férfirokona volt, pár 100 évvel korábban élt, mint ő. A mai Ázsia férfilakosságának kb. 8%-a hordozza azt a haplotípust, mely tőle származik [Zerjal és mtsai 2003]. Az európai populációk Y-STR haplotípusok összehasonlító vizsgálatai korábban azt mutatták, hogy a balti, norvég és magyar populációk a többi európai populációtól genetikailag távolabb állnak [Roewer 2001].

Hazánkban először a BM Bűnügyi Kutató és Szakértői Intézetében 1994-ben vezették be kriminalisztikai ügyekben a szomatikus kromoszómák DNS tulajdonságainak vizsgálatát, és ez az intézet végzett elsőként Budapest és környéke népességében az általuk alkalmazott rendszerekre vonatkozó populációgenetikai vizsgálatokat. Az SZTE Igazságügyi Orvostani Intézetében 1996 óta alkalmazunk a vitatott apaság kizárása vagy statisztikai valószínűsítése céljából DNS-STR rendszereket. A vizsgálatok bevezetése előtt itt is történtek a régió lakosságára vonatkozó populációgenetikai vizsgálatok. A budapesti [Füredi 1995, 1996, 1997,1999, Lászik 1999, 2001] és szegedi [Csete 1996, Szabó 1996] allélgyakorisági értékeken kívül Pécs és környéke [Kozma 1994, 1997] népességre vonatkozóan állnak rendelkezésre adatok. A nagyszámú magyarországi adat mindegyike ún. kevert populációból származik.

Korábbi mindössze 3 Y-kromoszómán lokalizálódó DNS-STR tulajdonság vizsgálata alapján azt találták, hogy szignifikáns különbségek állnak fenn az allélgyakorisági értékekben a Szeged környéki és a más kaukázoid népességek között [Csete 1999]. Öröklődő enzimdefektusok populációgenetikai vizsgálata is azt mutatta, hogy e megbetegedések előfordulási gyakorisága jelentősen eltér attól, amit finnugor népességben találtak. Finn kutatók 16 finnugor és 2 magyar népcsoportból származó

minta Y-kromoszómán lokalizálódó DNS-STR tulajdonságainak vizsgálata során azt találták, hogy a finn népesség allélgyakorisági értékei nem térnek el jelentősen az európai átlagtól, míg a vizsgált magyar minták és a nyugat-európai, valamint a tanulmányozott finnugor népcsoportok között is szignifikáns eltérések mutatkoznak [Lahermo 1999]. Az alkohol-dehidrogenáz és az aldehid-dehidrogenáz izoenzimek vizsgálata azt mutatta, hogy a kaukázoid népességen belül egyedül a magyar populációban találhatók olyan tulajdonságok, melyek a távol-keleti népességben gyakoriak. Mindezen adatok alapján merült fel annak a lehetősége, hogy izolált, genetikailag intaktnak tartott népességben vizsgáljuk az allégyakorisági értékeket és ezek alapján kíséreljük meg meghatározni a vizsgált magyar, más európai és ázsiai populációk közötti genetikai távolságokat.

Francia kutatók 1998-1999 években a Góbi-sivatagban mintegy 2500 éves, hun eredetűnek tartott csontvázmaradványokat tártak fel [Keyser 2002]. A fosszilis csontokból végzett DNS vizsgálatok értékeléséhez szükségessé vált kontrolként a jelenleg élő mongol népesség populációgenetikai vizsgálata. Ezen értékek ugyanakkor az általunk tervezett összehasonlításokhoz is felhasználhatóak, mivel elővizsgálataink során olyan Y-kromoszómán elhelyezkedő DNS-STR allélgyakorisági értékeket találtunk, melyek az általunk ismert irodalom szerint csak a mongol népességben fordulnak elő.

1.3. Célkitűzés

1. A kilenc szomatikus STR lokusz (D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D18S51, D21S11, FGA, VWA,) valamint 8 Y kromoszóma STR lokusz (DYS19, DYS385, DYS389/I, DYS389/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393) allélelosztásának felmérése a Szeged környéki populációban.

2. Ugyanezen szomatikus és Y kromoszóma STR rendszerek allélelosztásának felmérése a székely populációban.

3. A kevert magyar és a székely népesség populációgenetikai analízise, a populációk összehasonlítása és genetikai távolságának meghatározása. Az összehasonlító vizsgálatokhoz szükséges volt, hogy más európai népcsoportok adataival is elvégezzük az összehasonlítást.

4. Mivel a korábbi vizsgálatok is azt igazolták, hogy a magyar populáció az ázsiai populációkkal közelebbi kapcsolatot mutat, mint más európai populációk, célszerű volt felmérést végezni a mai mongol populációban is.

5. További célunk volt, hogy az eredményül kapott Y-STR haplotípusok felkerüljenek mind az európai, mind az ázsiai adatbázisba, melyek így az interneten keresztül elérhetővé válhatnak más kutatók számára is.

1.4. A humán genom felépítése

Az emberi nukleáris DNS mérete 3000 Mb (megabázis). A mitokondriumban található mitokondriális DNS (mtDNS) mérete 16,6 kb (kilobázis). A nukleáris genom körülbelül harmincezer gént tartalmaz, mely mindössze 3 %-át teszi ki a teljes genomnak. A fennmaradó 97 % az ún. intergénikus, vagyis gének közötti DNS.

Az intergénikus DNS-nek körülbelül 20 %-a repetitív, ismétlődő szekvencia. Az ismétlődések elhelyezkedése lehet egymást követő, azaz tandem ismétlődés, illetve elszórtan elhelyezkedő, ezek az ún. „interspersed" szekvenciák. Ez utóbbiak méretüknél fogva 2 csoportra bonthatók:

SINEs (short interspersed nuclear elements): rövidebb, általában 280 bp hosszúságú, ide tartoznak az Alu-szekvenciák;

LINEs (long interspersed nuclear elements): hosszabb, 500 bp - 7 kb közötti mérettartományban vannak. A LINEs a DNS-javító mechanizmusban játszanak fontos szerepet.

A tandem repeateknek méretüktől függően 3 típusát különböztetjük meg: szatelliták, miniszatelliták és mikroszatelliták.

Szatellita-DNS: ismétlődései hosszú láncot alkotnak a heterokromatikus régióban, illetve a centromer környékén.

Miniszatellita-DNS: 9-100 bp hosszúságú szekvenciái több ezerszer ismétlődnek egymás után. Ide soroljuk a VNTR-eket (variable number of tandem repeat).

Mikroszatellita-DNS: 1-6 bp hosszúságú egységek ismétlődnek egymás után, 150-900 bp-os szakaszt eredményezve. A rövidebb, 150-350 bp hosszú mikroszatellitákat STR-knek, azaz „short tandem repeat"-nek nevezzük. Mikroszatellita DNS nemcsak a gének közötti, hanem a génen belüli nem-kódoló régiókban, az intronokban is megtalálható.

1.4.1. Mikroszatelliták mutációi

A mikroszatellita DNS, szerkezetéből adódóan, színtere a különböző típusú mutációknak.

Deléció-duplikáció: a repetitív szekvencia miatt elcsúszás történik a bázispárosodáskor. Ez az adott repeat kieséséhez, azaz delécióhoz, vagy a repeat megkétszereződéséhez, duplikációhoz vezet.

Transzverzió: a crossing over az adott szakasz és egy másik kromoszómán lévő homológ szekvencia között történik, így az egyik szálon inzerció, a másik szálon deléció következik be.

1.5. A DNS-fingerprint technika fejlődésének rövid története

A molekuláris biológia nagyarányú fejlődésének köszönhetően a DNS vizsgálatok a biológia és az orvostudomány minden területén elterjedtek, így az igazságügyi orvostanban is. Mérföldkövet a "DNS-fingerprint" technika kifejlesztése jelentette.

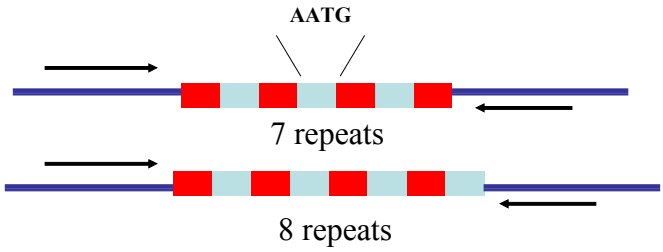
Az első olyan genetikai módszer, mellyel megkülönböztettek egyedeket az AB0 vércsoportrendszer volt. Mivel itt csak 4 genotípus-csoport van, ez a rendszer nem túl informatív. Az igazi áttörést a különböző számú ismétlődő genetikai szakaszok, repeatek vizsgálata jelentette, mely eredménye egyfajta genetikai ujjlenyomatot adott az egyes személyek azonosításához.

A DNS- fingerprintet először egy angol genetikus, Alec Jeffreys írta le [Jeffreys 1985]. Ő találta meg először 1985-ben az egymás után többszörösen ismétlődő szakaszokat és azt is megfigyelte, hogy ezeknek az ismétlődéseknek a száma személyenként változó. A DNS repeat szekvenciák vizsgálatára Alec Jeffreys egy technikát fejlesztett ki, megalkotta a humán identifikációs tesztet. Maguk a DNS repeatek az ún. VNTR-ek, vagyis változó számú tandem repeatek. A technika, amit Jeffreys használt, a restrikciós hossz-polimorfizmus (RFLP), melynek során olyan restrikciós enzimeket használt, melyek a VNTR-ek körüli régiókat hasították. Az igazságügyi orvostanban az RFLP módszert először egy bevándorlási ügyben, és nem sokkal később egy kettős gyilkosság ügyében alkalmazták. Single-locus és multi-locus RFLP próbákat is használtak. Ez utóbbi hátránya, hogy automatizálása nehézségekkel jár, illetve nem alkalmas kevert minták analízisére.

Később, a technikai lehetőségek fejlődésének eredményeként (PCR technika), olyan DNS repeatek vizsgálatára tértek át, melyek rövidebb szakaszokat jelentenek, így a degradált minták analízise is lehetővé vált, illetve egyszerre több markert lehetett vizsgálni. Ezek a DNS repeatek a miniszatelliták, melyek 1-5 kilobázis (kb) hosszúságúak, 20-50 repeatet tartalmaznak 15-100 bázispáros (bp-os) szakaszokból. A mikroszatelliták ezeknél is kisebbek, mindössze néhány 100 bp hosszúak. Ezek közül a Short Tandem Repeatek (STR) alkalmazása terjedt el magas diszkriminációs erejük és a gyors analízis lehetősége miatt. Az STR markerek alléljeinek kicsi mérete lehetővé tette, hogy egészen minimális mennyiségű biológiai mintából több markerre is értékelhető eredményt kapjunk. Így akár egyetlen hajszálból vagy cigarettavégből, de még megégett csontokból is képes a mai technika DNS-fingerprint meghatározására.

1.6. Short Tandem Repeat jellemzése

Az STR-ek, olyan tandem repeatek, melyeknél 2-6 bp ismétlődik 6-40-szer egymás után. Egy adott STR marker egyes alléljei az ismétlődések számában különböznek egymástól (1. ábra).



a repeat régió variábilis, míg a primerekhez kapcsolódó flanking régió konstans

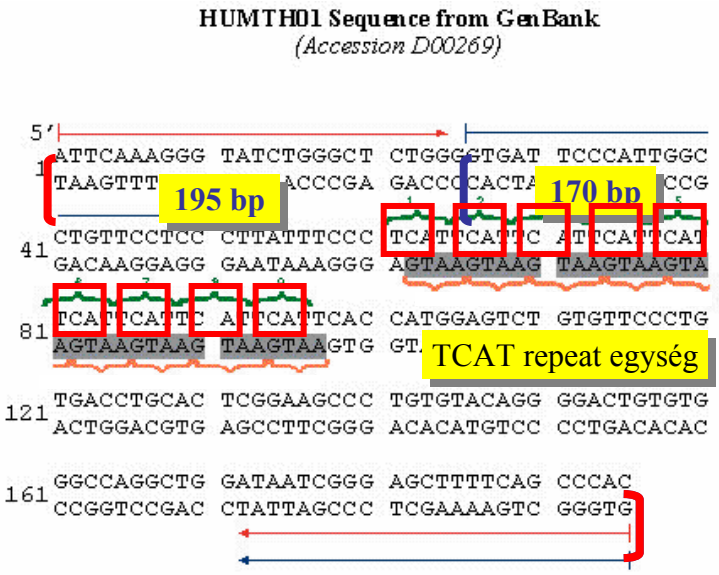
Homozigóta = mindkét allél ugyanolyan hosszúságú, ugyanannyi ismétlődést tartalmaz

Heterozigóta = az allélek különbözőek

1. ábra: a short tandem repeat egységek felépítése.

Vannak olyan STR rendszerek, melyek repeatjei egyfélék, és ezek ismétlődnek egymás után, és vannak olyanok, melyek többféle repeatből állnak. Ez utóbbi esetén, ha ugyanannyi bázispárból áll egy egység, akkor két embernek lehet ugyanolyan hosszúságú allélje egy adott STR markerre, még akkor is, ha szekvenciálisan különböznek. Ez viszonylag ritka, szekvenálással lehet ellenőrizni.

A 2. ábra a TH01 STR marker ismétlődéseit mutatja szekvenciális szinten. A különböző nyilak az egyes primerpárokat jelölik. Az egyik primerpár alkalmazásával a 9 ismétlődést tartalmazó allél 195 bázispárból áll, míg a másik primerpár alkalmazásával 170 bázispár nagyságú, hiszen a fragmentek nemcsak az ismétlődő szakaszokat tartalmazzák, hanem a primerek specifikus kötődési régióit is.

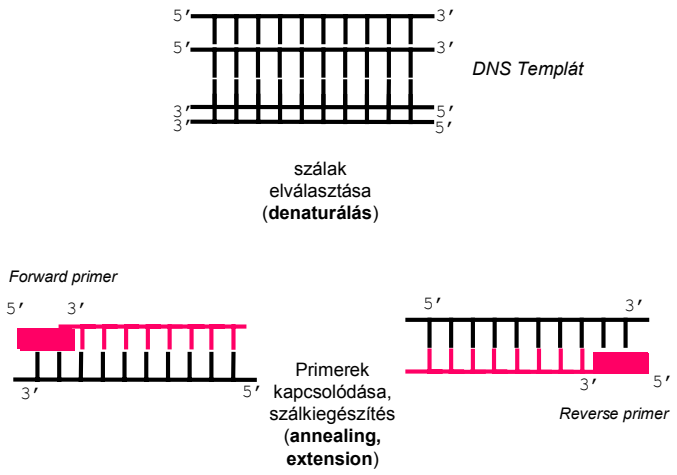


A különböző primer pár-termékekkel különböző méretű PCR termékeket kapunk ugyanarra az allélre

2. ábra: a TH01 STR marker PCR fragment DNS szekvenciája.

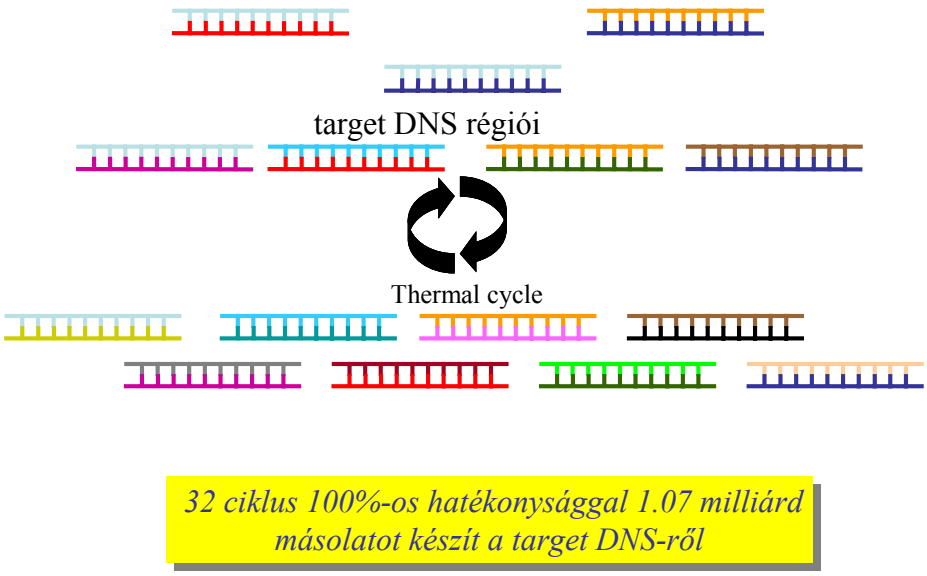
Az STR-rendszerek amplifikációját mind singleplex, mind multiplex PCR alkalmazásával el lehet végezni. A hagyományos singleplex PCR (3. ábra) egyetlen markert sokszoroz föl. Attól függően, hogy a detektálás milyen technikai eszközzel történik, alkalmazhatunk fluoreszcensen jelölt illetve jelöletlen primereket. Jelöletlen primer esetében a PCR terméket horizontális vagy vertikális poliakrilamid gélen futtatjuk meg, és ezüstfestéssel tesszük láthatóvá, míg jelölt primer esetében CCD kamerával felszerelt műszert alkalmazunk, mely lézerfény segítségével érzékeli a

DNS fragmenteket. Itt is poliakrilamid gélen történik a fragmentek elválasztása, mely lehet vertikális vagy kapilláris gélelektroforézis.



3. ábra: Singleplex PCR lépései.

Multiplex PCR alkalmazására is van lehetőség, sőt a gyakorlatban ma már ez a legelterjedtebb. Ennek segítségével rövid idő alatt akár 16 különböző STR rendszert is lehet vizsgálni (4. ábra). Alkalmas kevert, valamint degradált minták elemzésére is. A multiplex STR rendszerek vizsgálata automatizálható, ami jelentős előnyt jelent a többi módszerrel szemben. Itt egyetlen PCR reakcióban annyi primerpárt működtetünk, ahány szakaszt fel szeretnénk sokszorozni.



4. ábra: a multiplex PCR és hatékonysága.

1.6.1. Autoszómális markerek

Minden szomatikus kromoszómán van short tandem repeateket tartalmazó régió. Az igazságügyi gyakorlatban szükségessé vált olyan STR markerek alkalmazása, melyek megfelelően polimorfak, tehát lehetőleg több alléllel rendelkeznek, és ezek eloszlása a populációban sokféleséget eredményez. A polimorfizmus kialakításában szerepet játszik a szerkezetből adódó mutációs gyakoriság is, mely 1,2-2x10^{-3} nagyságrendű [Brinkmann 1998]. Nagyon fontos, hogy az adott STR markerhez lehessen jól működő, egyedi primerpárt tervezni, tehát ne legyen homológ a humán DNS más szakaszaival, hogy felsokszorozása egyértelmű, és hatékony legyen.

A személyazonosításban egymás mellett olyan STR rendszereket vizsgálnak, melyek különböző kromoszómákon vannak, így egymástól függetlenül, nem kapcsoltan öröklődnek.

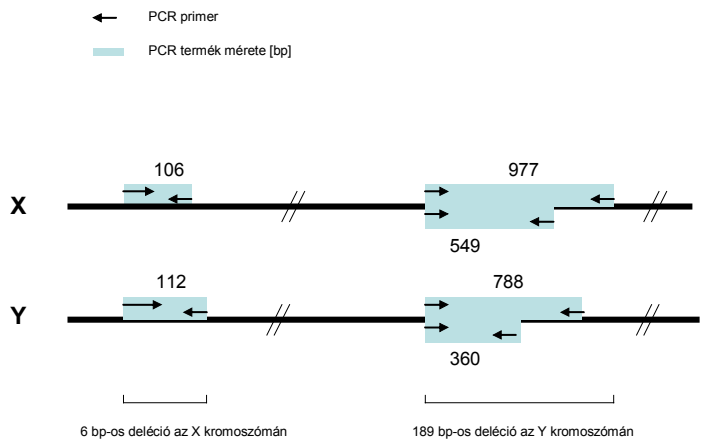
A szomatikus kromoszómák rekombinációja meglehetősen gyakori, így egy adott populációban a sokféleség viszonylag hamar kialakul. Ez leginkább a több alléllel rendelkező markerekre jellemző. Éppen ezért, egymáshoz viszonylag közel álló populációk közötti kapcsolat vizsgálatára ezek a szomatikus markerek nem alkalmasak. Ha azonban a populációban megtalálható egy különleges allél, ez jellemző lehet a adott népcsoportra.

Mivel az igazságügyi gyakorlatban, mind a kriminalisztikában, mind apasági vizsgálatokban, szükség van a helyi populáció felmérésére, meg kell vizsgálni, hogy az STR markerek alléljei milyen eloszlást mutatnak a populációban. Ez elengedhetetlen a kriminalisztikai vizsgálatokban a személyazonosság, származás-megállapítási perekben az apaság valószínűségének megállapításához. A felmért populációk adataival jellemezni lehet az adott népcsoportot, az adatok pedig felhasználhatóak a populációk összehasonlító vizsgálatai során.
A leggyakrabban használt autoszomális STR markerek: CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, TH01, TPOX, VWA, D2S1338.
Ritkábban vizsgált markerek: D12S391, Penta D, Penta E, LPL, CD4, D19S433.

1.6.2. Nemi kromoszómák markerei

Bár a megfelelően nagy számú és polimorf autoszomális markerek vizsgálata elegendő a személyazonosításhoz, illetve apasági vizsgálathoz, vannak olyan esetek, amikor a nemi kromoszómák STR markereit kell segítségül hívni. Bizonyos személyek rokonságának megállapításánál, ha olyan a rokonsági fok, hogy a szomatikus markerek vizsgálatával nem bizonyítható egyértelműen a származás, akkor a nemi kromoszómák, az X vagy az Y kromoszóma vizsgálata szükséges.
Populációgenetikai vizsgálatoknál egyre elterjedtebb a nemi kromoszómák, leginkább az Y kromoszóma STR markereinek vizsgálata.

A kriminalisztikai vizsgálatok egyik nagy jelentőségű markere az amelogenin marker, mely nem meghatározásra alkalmas (5. ábra). Ez a marker az X és az Y kromoszómán egyaránt megtalálható, de az X kromoszómán ez a szakasz 6 bp-ral rövidebb egy deléció miatt. Nőknél a testi sejtekből származó DNS analízisénél így 2 db azonos méretű fragment míg férfiaknál két különböző méretű fragment sokszorozható föl. A nagyobb mérettartományban is felsokszorozódó fragmentek mérete különbözik a férfiaknál és nőknél, de a gyakorlatban a poliakrilamid gélen elválasztható kisebb mérettartományú szakaszokat vizsgáljuk.



5. ábra: az amelogenin marker elhelyezkedése a nemi kromoszómákon.

1.6.2.1. X-kromoszóma markerek

Az X kormoszóma STR markerjeinek alkalmazása nem olyan széleskörűen elterjedt, mint más kromoszómák markerei, de vannak olyan esetek, amikor alkalmasabbnak bizonyulnak, mint más STR rendszerek, pl. nagymama-unoka rokonsági vizsgálatnál. Mivel a férfiak hemizigóták az X kromoszómára nézve, ezért apasági ügyekben lánygyermek esetében, alkalmas módszer az X kromoszóma short tandem repeatek elemzése.

Ismert X-kromoszóma STR markerek: DXS9895, DXS8378,, DXS7132, DXS6800, DXS7133, GATA172D05, DXS7423, DXS8377, DXS6803 [Edelmann 2003, Son 2002].

Azok az STR rendszerek, melyek az X kromoszómán egymáshoz közel helyezkednek el, kapcsoltsági csoportot alkotnak:

DXS7130: elhelyezkedése: Xp22-21; kapcsoltságban van DXS6807, DXS9895 és DXS8378 rendszerekkel;

DXS6803: elhelyezkedése: Xq11-13; kapcsoltságban van DXS6800, DXS7132 és ARA rendszerekkel.

A két kapcsoltsági csoport közötti genetikai távolság: 80 cM.

1.6.2.2. Y-kromoszóma markerek

A nemi kromoszómákon lokalizálódó öröklődő tulajdonságok közül mind populációgenetikai, mind igazságügyi orvostani szempontból az Y-kromoszóma DNS-STR tulajdonságai bírnak különös jelentőséggel [Jobling 1997]. Az Y kromoszóma az egyik legkisebb humán kromoszóma, mindössze 60 millió bázispárból (Mb) áll. Az X-Y párosodás során a kromoszómák közötti génkicserélődés egy egészen kis régióra az ún. pszeudoautoszómális (PAR) régióra korlátozódik. A meiózis során rekombináció csak ezen régiókban, azaz a rövid kar disztális részén (PAR1) valamint a hosszú kar végén (PAR2) következik be. Az Y kromoszóma szinte teljes hosszában haploid, apáról fiúra öröklődik.

Az elmúlt években az apai ágon öröklődő ún. nem rekombinálódó Y szakaszokból (NRY) származó információt a populációgenetikában, valamint evolúció-tanulmányokban előszeretettel alkalmazták. Az NRY különböző típusú polimorfizmusokat, különböző mutációs rátákkal tartalmaz, és a kutatók válogathatnak, melyik Y polimorfizmus segítségével vizsgálják az evolúció során bekövetkezett mutációs változásokat. Az Y-STR rendszerek alkalmasak rövid evolúcionáris időn belüli vagy ún. mikrogeográfikus analízisekre. Az allélgyakorisági értékek és az ismert, a szomatikus kromoszómákon lokalizálódó csoportoknál magasabb mutációs frekvenciák (10^{-3}–$2x10^{-3}$) alapján adott a lehetőség a populációk közötti genetikai távolság kiszámítására, melyből az egyes népcsoportok közötti rokonsági kapcsolatokra következtethetünk [Kayser 2001].

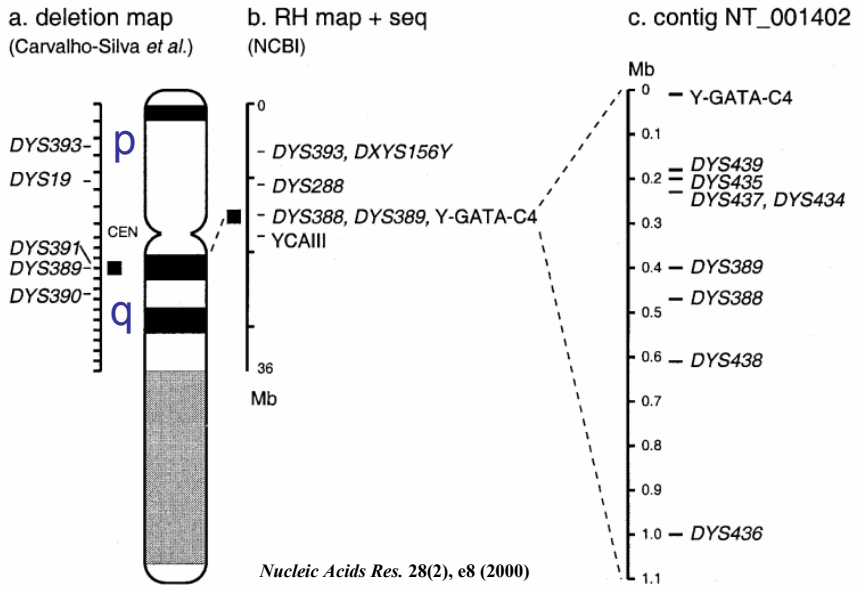
Az Y kromoszóma-specifikus STR-ek (6. ábra) fontos szerepet játszanak apasági ügyekben, ha fiúgyermekről van szó. Különös jelentőséggel bírnak akkor, ha a vélelmezett apa elhunyt. Ilyenkor lehetőség van arra, hogy az elhunyt családjából apai vérvonalról származó férfi Y kromoszómáját vizsgálják, bár az eredmény, ha nem kizárás, jelentheti azt is, hogy az apai vérvonalról valamelyik rokon a biológiai apa.

Az Y-STR vizsgálatok a kriminalisztikai ügyekben is rendkívüli jelentőséggel bírnak. Ha a gyanúsított férfi, mint az erőszakos bűncselekmények többsége esetében, ezek segítségével férfiaknál lehetővé válik a biztosabb személyazonosítás. Különösen fontos ez a szexuális bűncselekmények esetében, ahol a helyszínelés során talált nyomok többnyire keverten tartalmazzák az elkövető és az áldozat DNS-ét, azaz a női és férfi eredetű DNS-t. Az Y-STR rendszerek alkalmazásával meghatározhatjuk az

elkövető DNS-ét, így elkerülhetjük a spermium és a hámsejtek szétválasztását, ami egyébként sem vezetne eredményre az azoospermiás férfiaknál.

A polimorfikus Y-STR rendszerek közül a DYS19, DYS385, DYS389/I, DYS389/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 és az YCAII markerekből származik a legtöbb adat, melyeket adatbázisokban találhatunk meg az interneten [Roewer 2001]. Ezek azok az Y-STR markerek, melyeknek legjobban meghatározottak az amplifikációs körülményeik, legspecifikusabbak a primereik, így multiplex amplifikációs technikákat is ki lehet dolgozni, meghatározott a szekvenciájuk, nomenklaturájuk.

Egyéb Y-STR rendszereket is alkalmaznak igazságügyi területen: DYS434, DYS435, DYS436, DYS437, DYS438 és DYS439 [Ayub 2000], valamint DYS460, DYS461, GATA-10, GATA-C4 és GATA-H4 [White 1999]. Az utóbbi időben újabb Y-STR-ket is leírtak [Iida 2001, 2002].

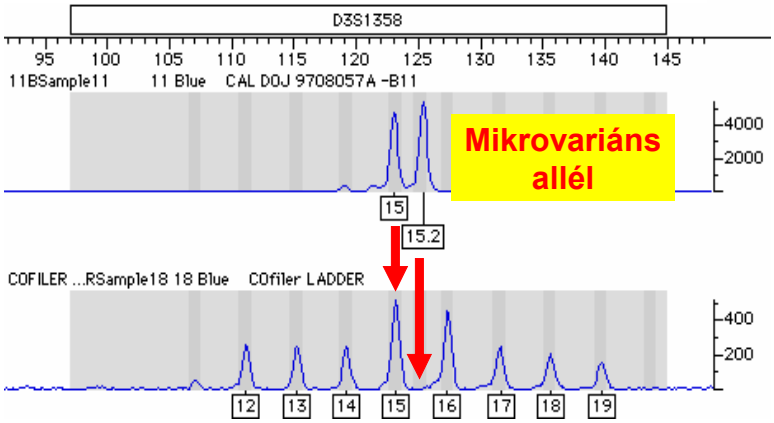


6. ábra: Az Y kromoszóma STR markereinek elhelyezkedése

1.6.3. STR markerek és allélok nevezéktana

Az Igazságügyi Haemogenetikusok Nemzetközi Egyesületének (ISFH) DNS Szakosztálya 1993. októberében határozta meg a különböző STR rendszerekre érvényes nomenklaturát, ami a mai napig érvényben van. Az STR rendszerek elnevezése általában az alapján töténik, hogy hol helyezkedik el a kromoszómán. Például a D21S11 STR marker pozíciója: 21p11.1. Némely esetben arról a génről

történik az elnevezés, amely génnek az intronjában található az adott marker, mint például a VWA rendszer esetében, ami a von Willebrand faktor gén 12-dik intronjában helyezkedik el. Az egyes allélokat az alapján nevezzük el, hogy mennyi ismétlődést tartalmaznak. Amennyiben egy allél nem teljes ismétlődést is tartalmaz, akkor azt két számmal jelöljük. Az egyik a teljes ismétlődések száma, a másik a fennmaradó bázispárok száma (7. ábra). A két értéket ponttal választjuk el. Pl. a HUMTH01 STR lokusz esetében van egy tipikus allél, mely viszonylag gyakori a kaukázoid népesség körében. Ez 1 bp-ral rövidebb, mint a 10 ismétlődést tartalmazó allél, mivel 1 adenin hiányzik a hetedik repeatből, így ezt az alléltípust 9.3-ként jelöljük.



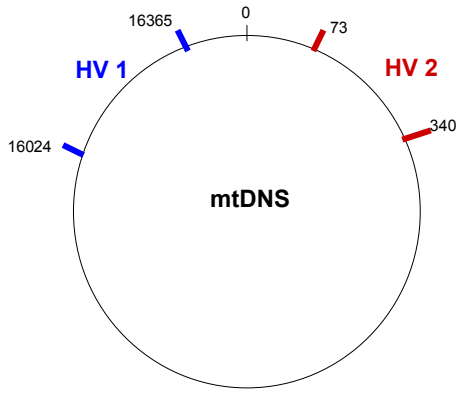
7. ábra: STR genotipizálás az allélétrához hasonlítás alapján.

Azon STR-ek esetében, amelyek komplex struktúrával rendelkeznek, vagyis nemcsak variáns ismetlődő elemeket tartalmaznak, hanem vannak köztes szakaszok, ún. nem-variáns repeatek is, megváltoztatták a nomenklaturát. Ilyen rendszerek: DYS19, DYS390 és DYS389. Az Igazságügyi Genetikusok Nemzetközi Szövetsége (ISFG) összegezte az Y-STR-ekre vonatkozó nomenklaturát [Gill 2001]. A további változtatásokat elkerülendő, mind a variáns mind a nem-variáns repeateket számolni kell.

1.7. Mitokondriális DNS (mtDNS)

Az igazságügyi orvostani vizsgálatokban a mitokondriális DNS analízise is elterjedt. A mtDNS vizsgálatokat elsősorban degradált minták esetében, illetve olyan családvizsgálatoknál végzik, melyeknél anyai ágon feltételezhető a rokoni kapcsolat. A mitokondriális DNS sérült, degradált, illetve nagyon régi, ősi minták analízisében rendkívül fontos szerepet játszik, mivel a kópiaszáma lényegesen nagyobb, mint a nukleáris DNS-nek, hiszen egy sejtben 100-1000 mitokondrium van.

A humán mitokondriális DNS 16,5 kb nagyságú. Ennek a nem kódoló, hipervariábilis régióját vizsgálják az igazságügyi orvostanban (8. ábra). Ezt a mintegy 1100 bp-os régiót D-loopnak nevezzük, személyazonosításban hasznos. Ezen szakaszon 5-10-szer gyakoribb a mutáció, mint a nukleáris DNS-en. A mitokondriumok anyai ágon öröklődnek, így monoklonárisnak is nevezhetjük őket. Az új variánsok mutáció révén jönnek létre. A nem rokon egyedek közötti variancia 1-2,3%, vagyis minden 100 bázisból egy vagy kettő különbözik.



8. ábra: a human mitokondriális DNS (mtDNS) hipervariábilis régiói

A hipervariábilis régióban szekvenciaanalízist végeznek. Azt vizsgálják, hogy egy adott pozícióban milyen bázis van jelen. Az adott hely variabilitása adja az adott terület variabilitását. Több ilyen terület paralel vizsgálata eredményez egy haplotípust.

Ez teszi lehetővé a személyazonosítást. Egy adott populációra jellemző a haplotípusok eloszlása, mellyel jellemezni lehet az adott populációt, illetve a haplotípusok különbségéből evolúciós változásokra következtethetünk.

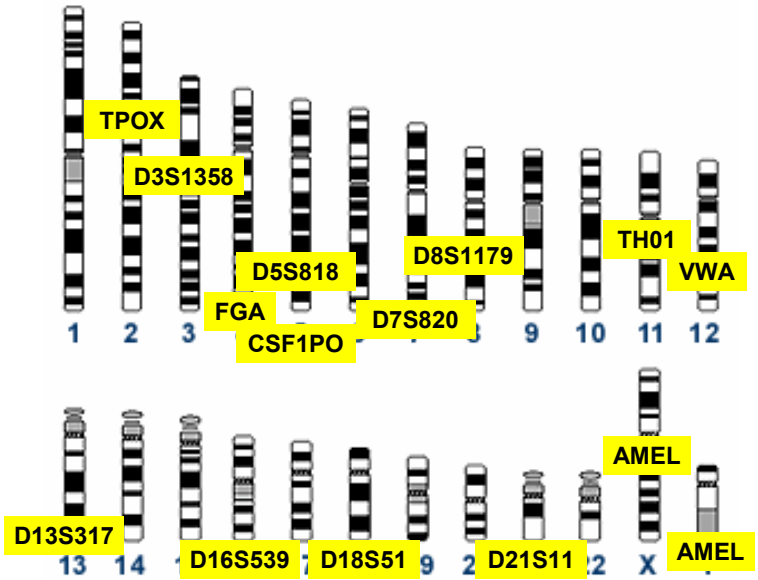
1.8. Adatbázisok

A különböző genetikai adatbázisok közül a DNS-STR rendszerekre vonatkozó adatbázisokat az igazságügyi orvostan több területen is felhasználja.
A különböző organizmusok, köztük az ember DNS-szekvencia adatbázisát az NCBI (National Center of Biological Information) honlapján találjuk. Ez az adatbázis segítségünkre van új STR rendszerek megtalálásában, primerek tervezésében, multiplex PCR reakciók kidolgozásában. Speciálisan igazságügyi területen alkalmazott adatbázisok a kriminalisztikai és populációgenetikai adatbázisok. A kriminalisztikai adatbázisok csak a rendőrség illetve a rendőrséggel kapcsolatban álló intézmények megbízott szemberei számára hozzáférhetőek, a populációgenetikai adatbázisok azonban ingyenesen elérhetőek és felhasználhatóak.

1.8.1. Kriminalisztikai adatbázisok

A kriminalisztikai gyakorlatban olyan DNS-adatbázisokat alkalmaznak, melyekben során tárolják a különböző bűncselekmények elkövetőinek, valamint a bűncselekmények helyszínén talált nyomokból izolált DNS-ek profilját. Egy újabb bűncselekmény felderítésében segíthet az, ha a helyszíni nyomokat összevetik a már korábban az adatbázisba felvitt adatokkal, mind az elkövetőkével, mind a más helyszínen talált minták adataival, így az esetleges egyezés az ügy lezárásához is vezethet; illetve egy újabb elkövető esetén a fel nem derített ügyek megoldását eredményezheti. Ezek az adatbázisok eleinte csak egy adott országon belül, az USA-ban egy adott államon belül voltak érvényben, de ma már lehetőség van arra is, hogy a különböző adatbázisokat összekapcsolják, hiszen a többszörös elkövetők nem feltétlenül maradnak meg egy államon belül. Az FBI által bevezetett kriminalisztikai adatbázis az ún. CODIS rendszer (9. ábra). A CODIS 13 szomatikus STR rendszert és a nem meghatározó, amelogenin markert foglalja magába. Minden FBI-hoz tartozó DNS laboratórium ugyanazokat az STR markereket vizsgálja, mivel csak egységes adatbázisokat lehet egymással összekapcsolni. Magyarországon ennek az

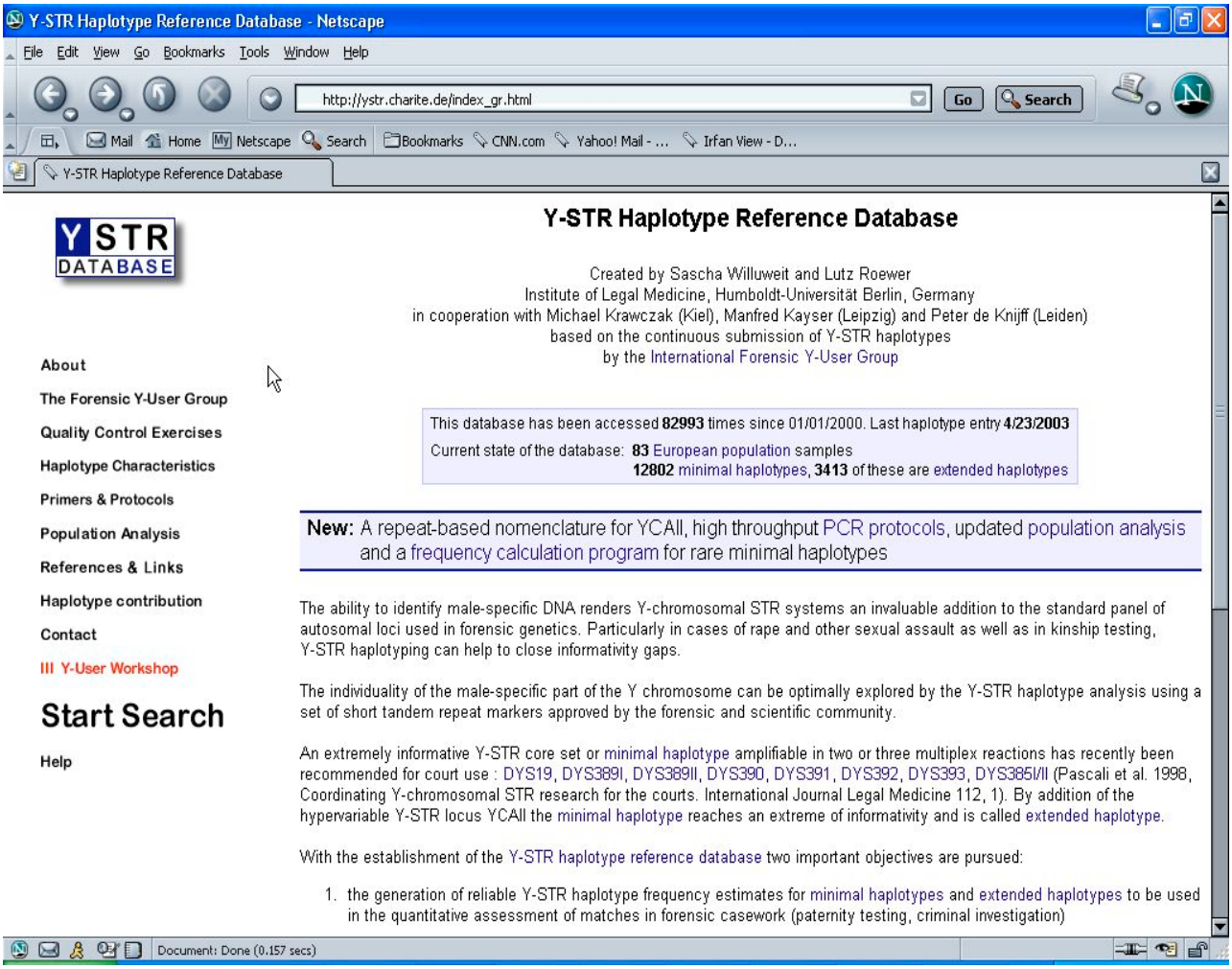
adatbázisnak a kivitelezése folyamatban van az ORFK Bűnügyi és Szakértői Kutatóintézetében.



9. ábra: 13 CODIS Core STR lokusz és elhelyezkedésük a kromoszómákon.

1.8.2. Populációgenetikai adatbázisok

Nemcsak kriminalisztikai célú DNS-adatbázisok léteznek, hanem populciógenetikai vizsgálatok eredményeit tartalmazó adatbázisok is, melyek az összehasonlító analíziseket segítik elő. Ilyenek például az interneten hozzáférhető ingyenes Y-STR adatbázisok, melyek adatállománya folyamatosan bővül, és ezzel párhuzamosan bővűl a felhasználói réteg is. A legkiterjedtebb adatbázis az Y-STR Haplotype Reference Database (YHRD) (10. ábra) [www.ystr.org]. Ez az adatbázis 1998 óta működik, 4 fő ok miatt jött létre: (1) megalkotni egy optimalizált, érzékeny módszert Y-STR rendszerek vizsgálatára, multiplex PCR megalkotása; (2) minőségi kontrol bevezetése olyan igazságügyi laboratóriumok számára, melyek Y-STR vizsgálatokat végeznek; (3) a különböző európai populációkban élő férfiak elterjedésének becslése; (4) az Y-STR haplotípusok gyakoriságának felmérése az igazságügyi gyakorlatok számára [Roewer 2000].



10 ábra: az Y-STR adatbázis honlapja.

Ez az adatbázis Y-STR haplotípusokat tartalmaz, jelenleg 83 európai populációra vonatkozóan. A haplotípus egy adott minta Y kromoszóma STR alléljeinek együttese. Az adatbázisban 13003 ún. minimál haplotípus és 3413 ún. kiterjesztett haplotípus található. A minimál haplotípus tartalmazza a DYS19, DYS385, DYS389/I, DYS389/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 rendszerekre vonatkozó adatokat, a kiterjesztett haplotípus tartalmaz egy további marker, az YCAII STR rendszert is.

Külön adatbázisban vannak az európai, az ázsiai és az Egyesült Államok populációinak adatai. Az ázsiai adatbázis 21 populáció 2387 minimál és 362 kiterjesztett haplotipusára vonatkozó adatot tartalmaz (2000.01.01.), míg az amerikai adatbázisban az Egyesült Államok 30 régiójából, ezen belül 10 afro-amerikai, 11 európai-amerikai és 9 spanyol populáció összesen 1705 minimal haplotípusa található meg. Ezeknek az adatbázisoknak a fejlesztése nemcsak a haplotípus gyakoriság

számítása és további valószínűségek számolása miatt fontos, hanem az összehasonlító populációanalízis miatt is. Az 1. táblázat tartalmazza a leggyakrabban használt Y-STR markerek eloszlását a három fő humán populációban [Gusmao 2003].
Az ilyen adatbázisokban anonim donorok DNS-ét használják.

Marker	**Észak-Portugália** kaukázoid (208)	**Mozambik** afrikai (N=112)	**Makao** ázsiai (N=63)
DYS19	56.4	69.1	62.3
DYS385	83.6	92.2	95.1
DYS389/I	57.8	49.5	60.3
DYS389/II	77.4	71.4	76.8
DYS390	58.4	52.8	68.5
DYS391	56.3	30.5	46.8
DYS392	57.6	1.8	68.4
DYS393	46.7	63.0	66.6
diverzitás	99.25	98.84	99.90

1. táblázat: a leggyakrabban vizsgált Y-STR rendszerek eloszlása a három embercsoportban.

1.9. Populációgenetikai áttekintés

A populációgenetika célja a populációk genetikai összetételének vizsgálata és a genetikai összetételt változtató mechanizmusok tanulmányozása. A genetikán belül a populációs nézőpont, módszertanilag pedig, a matematikai modellek alkalmazása különbözteti meg. A populációgenetika kulcsszerepet kap az evolúcióbiológiában, hiszen elemi evolúciós lépésnek egy populáció genetikai összetételének megváltozását tekintjük. Gyakorlati szempontból a populációgenetika fontos szerepet játszik például a humángenetikában (öröklődő rendellenességek előfordulása), vagy a a természetvédelemben (genetikai diverzitás megőrzése).
Egy populáció genetikai összetételét a populációban előforduló allélek és genotípusok gyakoriságaival írhatjuk le. Emellett a populációban található különböző allélek számát, az allélkombinációk gyakoriságát, iletve a heterozigóta egyedek gyakoriságát használják a populáció polimorfizmusának mérésére.

1.9.1. Hardy-Weinberg egyensúly

Egy homogén alapmodelben, ahol a populációt nem érik különböző hatások, vagyis nincs természetes szelekció, mutáció, genetikai sodródás, migráció, és a populáció pánmiktikus, tehát a párosodás véletlenszerű, akkor a populáció Hardy-

Weinberg eloszlást mutat. Természetesen ezek a feltételek abszolút értelemben sohasem valósulhatnak meg, s ez egyben biztosíték is arra, hogy evolúciós változás ha lassan is, de mindig van. A legtöbb populáció ennek ellenére közel áll a Hardy-Weinberg egyensúlyhoz. A genotípusok gyakoriságának összege 1 lesz.

Két (vagy több) lokusz együttes vizsgálatakor az első kérdés az, hogy az egyik lokuszon vett genotípus korrelál-e a másikon vett genotípussal. A lokuszok közötti távolság függvénye az, hogy milyen gyakori a kettő közötti rekombináció, és ez határozza meg kettőjük öröklődésének korrelációját, vagyis azt, hogy kapcsoltan öröklődnek-e. Ha nincs korreláció a két allél között, kapcsoltsági egyensúly áll fenn. Ettől az egyensúlytól való eltérés mértéke a linkage disequilibrium (*D*). Véletlenszerűen párosodó populációkban a linkage disequilibrium a rekombináció révén fokozatosan csökken. Független lokuszok esetén D minden generációban feleződik [Nei 1987].

A vizsgálatunk során alkalmazott szomatikus STR markerek mindegyike különböző kromoszómán lokalizálódik. Ilyen esetben nincs szükség a linkage disequilibrium vizsgálatára. Az Y kromoszóma szinte egész területén nincs rekombináció, így itt nincs értelme kapcsoltsági vizsgálatnak.

1.9.2. A populációk polimorfizmusát befolyásoló tényezők

Ha teljesülnek a Hardy-Weinberg feltételek, akkor a felnőttekben és az általuk létrehozott gamétákban az allélgyakoriság megmarad a kiindulási értéken. Ha a párosodás véletlenszerű, akkor az utódnemzedék zigótái Hardy-Weinberg eloszlást követnek, vagyis egy teljes generációváltás után az allélgyakoriság változatlan. Az allélgyakoriság akkor változhat meg, ha a feltételek valamelyike nem áll fenn.

Természetes szelekció

Ha egy allél nagyobb rátermettséget biztosít, akkor az őt hordozó egyedeknek több leszármazottjuk lesz, akikbe örökítik a kedvező allélt: így a kedvező allél elterjed a populációban. A kedvezőtlen alléllel rendelkező egyedek viszont kevesebb utódot produkálnak, tehát a rossz allél idővel eltűnik.

Mutáció

A mutáció ritka esemény (egy generációban az allélek $\mu=10^{-5}$-10^{-6} -od része mutál), ezért az allélgyakoriságot egy generációváltás alatt nem változtatja meg észrevehetően. Mégsem lenne evolúció mutáció nélkül, hiszen a mutáció hozza létre az új alléleket, amelyek pl. szelekció vagy sodródás révén elterjedhetnek és fixálódnak.

Genetikai sodródás

Genetikai sodródásnak nevezzük az allélgyakoriság kis populációban tapasztalható véletlenszerű ingadozását. Ennek oka a kis populációméret miatt bekövetkező mintavételi hiba: ha csak kevés utód születik, akkor ezek alléljei nem reprezentálják pontosan a populáció genetikai összetételét. Ha véletlen ingadozás során az egyik allél kivész, akkor a populáció tartósan szegényebb lett egy alléllel, hiszen az elveszett allél csak egy új mutációval jelenhet meg ismét. A sodródás tehát genetikailag "tisztítja" a populációkat. A genetikai sodródás speciális formái a „bottleneck" (amikor a populáció szaporodóképes egyedeinek száma minimálisra csökken, és ez a néhány egyed hozza létre a következő generációt, ami aztán tovább bővül), illetve az alapító hatás (néhány egyed új területre települve benépesíti az adott területet).

A különböző allélek eltűnésével, egy allél fixálódásával együtt jár a heterozigóták, vagyis a polimorfizmus eltűnése is.

A genetikai sodródás erősségét legegyszerűbben a heterozigóták *várható* gyakoriságának csökkenésével lehet jellemezni. A heterozigóták várható gyakorisága az utódok között: $H' = 1\text{-}1/(2N)\times H$. A sodródás miatt a heterozigóták annál gyorsabban fogynak el, minél kisebb a populáció: várható gyakoriságuk minden generációban $1\text{-}1/(2N)$-ed részére csökken.

Migráció

A migráció keveri a különböző populációkban található alléleket, így a populációk differenciálódása ellen hat. Ha a populációkban csak sodródás zajlik, már néhány egyed vándorlása megakadályozza a populációk genetikai differenciálódását.

Nem véletlenszerű párosodás

Sokféle típusa van; pl. a beltenyésztésről akkor beszélünk, ha rokon egyedek párosodnak egymással. A rokonok részben azonos allélleket hordoznak, ezért a beltenyésztés több homozigótát és kevesebb heterozigótát eredményez, azaz a genotípus-gyakoriságokat eltolja a Hardy-Weinberg eloszláshoz képest. A populáció allégyakoriságát azonban a beltenyésztés nem változtatja meg.

Mivel az STR rendszerek a gének nem kódoló régióiban illetve intergénikus nem kódoló régióiban vannak, ezek nem befolyásolják az egyedek rátermettségét, ennélfogva az általunk végzett vizsgálatnál a szelekcióval nem kell számolnunk

Mivel az STR rendszerek elterjedését a szelekció közvetlenül nem befolyásolja, így a mutáció során létrejött új allélek nem választódnak ki az evolúció során, hanem megmaradnak, ezért is játszanak különösen fontos szerepet a evolúciókutatásban, elsősorban a relatív rövid idő alatt történő genetikai változások vizsgálatában. Az STR markerek közül is az Y kromoszómán található rendszerek alkalmasabbak, mivel az Y-STR rendszerek mutációs rátája eltér a szomatikus STR–től, annál magasabb, 2 x 10^{-3} nagyságrendű. A genetikai sodródás által létrejött változásokat az STR markerekkel jól nyomon lehet követni.

Az általunk vizsgált markereknél a mutáció és genetikai sodródás egyensúlya, vagyis az ún. *neutrális elmélet* játszik szerepet. A sodródás miatt időről időre egy allél elvész a populációból, míg a mutáció révén új allélek jelennek meg. A populáció genetikai variabilitása beáll ugyan egy egyensúlyi értékre, de ebben az egyensúlyban a különböző allélek állandóan cserélődnek. Ezért nem lenne célszerű a populációt csupán az egyes allélek gyakoriságaival jellemezni. Emellett a populációban található különböző allélek számát, az allélkombinációk gyakoriságát, illetve a heterozigóta egyedek gyakoriságát használják a populáció polimorfizmusának mérésére.

Mivel a heterozigóták gyakorisága minden generációban $1-1/(2N)$-ed részére csökken a genetikai sodródás következtében, így mutáció nélkül a következő generációban csak $H'=1-1/(2N)\mathrm{x}H$ heterozigóta lenne. A mutációk viszont új alléleket hoznak létre, s ezzel növelik a heterozigóták gyakoriságát. Mind a sodródás, mind a mutáció hatását figyelembe véve a heterozigóták várható gyakorisága az utódok között $H' = (1-1/2N)\mathrm{x}H + 2\mu(1-H)$.

Homogén populáció esetében a heterozigozitás egy egyensúlyi állapot felé tart, ahol:

$H^* = 4N\mu/(4N\mu+1)$ [Ridley 1998]

1.6.3. Populációk variabilitásának jellemzése

Az igazságügyi orvostanban rendkívül fontos a különböző populációk polimorfizmusának jellemzése. Elsősorban a haplotípus, illetve genotípus gyakorisággal jellemezhetünk egy populációt. Az adott markerekre vonatkozóan, melyekkel vizsgáljuk a populációt, megadhatjuk a diszkriminációs erőt (PD=power of discrimination):

$$PD=\sum_{i=a}^{n} G^2$$ G: genotípus gyakoriság,

a kizárási (PE=power of exclusion) erőt:

$$PE= h^2 (1-2xhxH)^2$$ h: heterozigoták száma

H: homozigóták száma,

valamint a polimorfizmusra jellemző értéket (PIC=polymorphism information content):

$$PIC=1-\sum_{i=a}^{n}\sum_{j\geq i}^{n} P_{ij}^2 - [\cdot(\sum_{i=a}^{n}\sum_{j\geq i}^{n} P_{ij}^2)^2 + \sum_{i=a}^{n}\sum_{j\geq i}^{n} P_{ij}^4]$$ P: allélgyakoriság.

[Brenner és Morris 1989]

Ismernünk kell, hogy egy adott személy haplo-/genotípusa mennyire egyedi a populációban. Ezt a populáció és a vizsgált marker polimorfizmusa egyaránt befolyásolja.

A különböző populációk összehasonlító vizsgálatait egyrészt azért végzik, hogy megállapítsák, mennyire különülnek el az adott populációk egymástól, milyen mértékben hordoznak saját jellegeket, illetve milyen a populációk keveredési mértéke; másrészt azért, hogy megállapítsák, a korábbi tényeket mennyire támasztják alá a genetikai változások.

Az összehasonlítás során célszerű az egyedi jellegek vizsgálata, illetve olyan markerek elemzése, melyek változásai követhetők, megmaradnak a genomban az evolúció során. Ilyen markerek pl. a short tandem repeatek, melyeknél az egyes markerek mutációs rátájának ismerete időbeli felbontást is eredményez.

Az STR rendszerekkel jellemzett populációk összehasonlításakor számolhatunk az egyes egyedek haplo-/genotípusával, melyet a különböző markerek alléljeinek összessége ad meg, illetve ezek populáción belüli eloszlásával.

Két populáció közötti variancia mértékének kifejezésére szolgál az F_{ST} érték, mely azt mutatja meg, milyen a differenciálódás mértéke két populáció között. Az F_{ST} értékének meghatározása két haplotípus közötti molekuláris távolságon (*d*) alapul, mely pl. megegyezhet a két haplotípust elkülönítő mutációk számával. A short tandem repeatek sajátossága, hogy a repatek számából lehet következtetni a mutációs lépésekre. Az F_{ST} számolásánál ezért a repeatek számát is figyelembe vehetjük, mivel *d* értéke a két haplotípus repeatszáma közötti különbségek négyzetének összege:

$$d_{xy}=\sum_{i=1}^{L}(a_{xi}-a_{yi})^2$$

[Slatkin 1995].

Ebből a távolságmátrixból molekuláris varianciaanalízist (AMOVA) lehet végezni. Az AMOVA (Analysis of MOlecular VAriance) a populációszerkezet hierarchiáját figyelembevevő módszer. Távolságmátrixból összvarianciát számolunk, majd ezt az összvarianciát különböző hierarchiaszempontok alapján szétbontjuk varianciakomponensekre. Ezekből a varianciakomponensekből adjuk meg a fixációs index (F_{ST}) értékét.

Nem homogén populációban az $F_{ST}=H_T-H_S/H_T$ [Wright 1951]

H_S: heterozigócia aránya a legalacsonyabb hierarchia-szintű populációban

H_T: össz-heterozigócia

Ez egy lókuszra vonatkoztatott F_{ST}. A több lókuszra általánosított verziója az F_{ST}-k súlyozott átlagát figyelembe véve a varianciakomponensekkel számol [Excoffier 1995]. A fixációs index mértékének kifejezésére a Φ_{ST} szolgál.

Az F_{ST} érték átkonvertálható genetikai távolsággá a koalescens idő (a közös ős populációba lépése óta eltelt idő) bevonásával:

$F_{ST}=\tau / \tau+N$ τ: generációk száma

[Slatkin 1995].

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Mintavétel

Előzetes felvilágosítást és beleegyezést követően, az alapellátásban dolgozó orvosok segítségével mintát biztosítottunk korondi (99 férfi) izolált székely populációból, valamint Magyarországon munkát vállalt, egymással rokonságban nem álló mongol (51 férfi, 38 nő) személyektől. Szeged és környéke lakosságának vérmintáit (100 férfi, 101 nő) a szegedi Véradó és Vérellátó Központ szolgáltatta. Minden esetben könyökvénából biztosítottunk alvadásgátolt vért, melyet vászonanyagra felvíve beszárítottunk és tároltuk, az extrakció a korondi és mongol minták esetében e tárolt mintákból történt, míg a szegedi mintáknál folyékony vérből végeztük az extrakciót.

2.2. DNS-izolálás

2.2.1. DNS izolálása folyékony vérből

Az EDTA-s (alvadásgátolt) vérből a DNS kinyerését kisózásos módszerrel végezzük [Miller 1998].

Vörösvértestek hemolízise:

Az EDTA-s vért 0,05 M KCl oldattal háromszor mossuk. A vér és a KCl oldat aránya 1:4. A mosás után hemoglobintól mentes, leukocitákat és vörösvértest membránt tartalmazó üledékhez jutunk.

Leukociták és leukocita sejtmagok lízise:

Proteináz K enzim segítségével elbontjuk a fehérjéket, többek között a nukleázokat is. A Proteináz K enzim működéséhez szükséges az SDS (sodium-dodecil-szulfát) jelenléte, mely a membrán kettős lipidrétegét emulgeálja, ezáltal aktiválja az enzim működését. Az emésztés folyamata lízispuffer jelenlétében megy végbe, melynek összetétele:

10mM TRIS/HCl pH:8

10mM NaCl

10mM EDTA-Na

A leukociták lízisét egy éjszakán át 37°C-os vízfürdőn 250 µl Prot-K-t (2mg/ml) és 100 µl 21 %-os SDS-t tartalmazó 2 ml lízispufferben történő inkubációval végezzük.

Fehérje-mentesítés (kicsapás):

Az inkubációt követően az oldatban levő fehérjéket 1 ml 6M-os NaCl oldattal megkötjük, majd 20 percig 3600 fordulaton centrifugáljuk. A DNS a felülúszóban marad.

DNS kicsapása:

A felülúszót egy másik centrifugacsőbe átszívjuk. Ehhez 96 %-os hideg etanolt adunk. A csövet néhányszor óvatosan megdöntögetjük, a DNS az etanolban összecsapódva látható.

A DNS-t kiemelve mossuk 70 %-os etanolban, majd szobahőmérsékleten szárítjuk, és TE pufferben (10mM TRIS, 1 mM EDTA) oldjuk.

2.2.2.DNS izolálása vérfoltból

2.2.2.1. Chelex módszer [Walsh 1991]*:*

A Chelex 100 (Biorad) iminodiacetát csoportokat tartalmazó sztirol gyanta, mely a többértékű fémionokkal kelátokat képez. A fémionok (vér esetében Fe-ion) magas hőfokon katalizálják a DNS széttöredezését, a Chelex 100 ezeket a fémionokat köti le [Singer-Sam 1989].

Első lépésben a vérfoltból egy kb 3x3 mm-es darabot Eppendorf csőbe teszünk és 1 ml steril ioncserélt vízben szobahőmérsékleten 30 percig inkubáljuk, közben többször keverjük (vortexeljük), ezzel a hordozó anyagról a hemoglobin leoldódását elősegítjük. Az inkubációt követően 5 percig 13000 fordulaton centrifugáljuk, a felülúszót 50 µl kivételével leszívjuk, majd 150 µl 5 %-os Chelex oldatot adunk hozzá. 30 perces 56 ^{o}C-os vízfürdőn történő inkubációt követően a sejtek lízisének fokozására a mintát 8 percig forraljuk. Centrifugálás után a felülúszó a PCR reakcióhoz felhasználható.

2.2.2.2. Fenol-kloroformos extrakció

Első lépésben a vérfoltból egy kb 3x3 mm-es darabot Eppendorf csőbe teszünk. Ehhez 500 µl lízis puppert rakunk. A lízis puffer összetétele:

10 mM TRIS/HCl pH:8

250 mM NaCl

0,5 M EDTA-Na

Az 500 µl lízis pufferhez 40 µl 20 %-os SDS-t és 20 µl Prot-K enzimet (20 mg/ml) adunk. Éjszakán át 37 ^{o}C-on vagy 2 órán át 56 ^{o}C-on inkubáljuk. Inkubálás után 500 µl fenol-kloroform-izoamil alkoholt (25:24:1) adunk a mintához, majd erős vortexelés után centrifugáljuk 13000 rpm-en 10 percig. A felső vizes fázist, amiben a DNS van, átszívjuk egy új Eppendorf csőbe. Ismét adunk 500 µl fenolt, majd újabb vortexelés és centrifugálás után ismét átszívjuk a felülúszót újabb Eppendorf csőbe. Harmadik lépésben 500 µl kloroform-izoamil alkoholt (24:1) adunk hozzá, majd vortexelés és centrifugálás után a felülúszót új Eppendorf csőbe átszívjuk, és tizedtérfogat 3 M-os Na-acetát hozzáadása mellett, azonos térfogatú hideg absz. etanollal kicsapjuk a DNS-t. Egy órán át inkubáljuk -20 ^{o}C-on. Ezután centrifugáljuk a mintákat 13000 rpm-mel 15 percig. A felülúszót leöntjük, a pelletet 70 %-os alkohollal mossuk, majd megvárjuk, míg a pellet kiszárad. A pellett nagyságától függően 20-30 ul TE pufferben vesszük fel a mintát. TE puffer összetétele:

10 mM TRIS/HCl pH:7,5

1mM EDTA-Na

2.3. A DNS koncentráció mérése:

A kinyert DNS koncentrációját DyNA Quant 2000 Fluorometer (Hoefer) segítségével határoztuk meg. Ez a műszer a kétszálú DNS mérésére alkalmas, ugyanis egy fluorszcens festék koncentrációját méri, mely a DNS két szála közötti hidrogén-híd kötésekhez kapcsolódik. Csak a kötött festékmolekulákban játszódik le a színreakció.

A multiplex kitek alkalmazásánál elengedhetetlen volt a koncentrációk mérése, ugyanis ezek a kitek rendkívül érzékenyek, a PCR reakcióelegyben 5-10 ng DNS-nél magasabb mennyiség már akadályozta az amplifikációt.

2.4. Autoszómális markerek vizsgálata

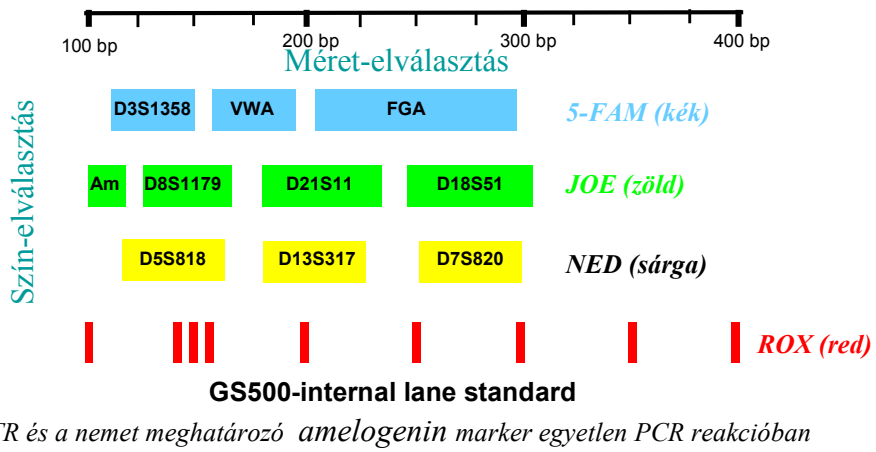
2.4.1. A vizsgált szomatikus STR redszerek jellemzői (2. táblázat)

Lokusz	Lokalizáció	repeat	Repeatek száma	Allélek száma	Allélek mérete (bp)
CSF1PO	5q33.3-34	$[AGAT]_n$	6-16	16	281-321
D3S1358	3p21	$TCTA[TCTG]_{1-2}[TCTA]_{n-1,\ n-2}$	8-20	20	97-145
D5S818	5q21-q31	$[AGAT]_n$	7-16	10	134-170
D7S820	7q	$[GATA]_n$	5-15	22	253-293
D8S1179	8q24.1-24.2	$[TCTA]_n$	7-19	13	203-251
D13S317	13q22-q31	$[TATC]_n$	5-16	14	193-237
D16S539	16q22-24	$[GATA]_n$	5-15	10	233-273
D18S51	18q21.3	$[AGAA]_n$	7-27	42	264-344
D21S11	21p11.1	$[TCTA]_4$ $[TCTG]_6$ $[TCTA]_3$ TA $[TCTA]_3$ TCA $[TCTA]_2$ TCCATA $[TCTA]_6$	24-38.2	70	186-244
FGA	4q28	$[TTTC]_3$TTTT TTCT$[CTTT]_7$CTCC$[TTCC]_2$	12.2-51.2	68	196-352
TH01	11p15-15.5	$[AATG]_n$	3-14	20	160-204
TPOX	2p23-2pter	$[AATG]_n$	5-14	10	213-249
VWA	12p12-pter	TCTA TCTG TCTA $[TCTG]_4[TCTA]_3$	10-25	26	152-212
D2S1338	2q35-37.1	$[TGCC]_6[TTCC]_{n-6}$	15-28	14	316-368
D19S433	19q12-13.1	$[AAGG]_n$	9-17.2	14	102-136

2. táblázat: a vizsgált szomatikus STR redszerek jellemzői.

2.4.2. Multiplex kitek

A szomatikus csoportok vizsgálatához a DNS STR szakaszokat multiplex reakcióban, fluoreszcens festékkel jelölt primerekkel Profiler Plus (Applied Biosystems), illetve AmpFlSTR Identifiler (Applied Biosystems) kitek (12. és 13. ábra) segítségével amplifikáltuk az előállító utasításai szerint.



12. ábra: az AmplFlSTR Profiler Plus multiplex kit markerei.

Profiler Plus kit amplifikációs körülményei:

95 °C 11 min

---

94 °C 1 min

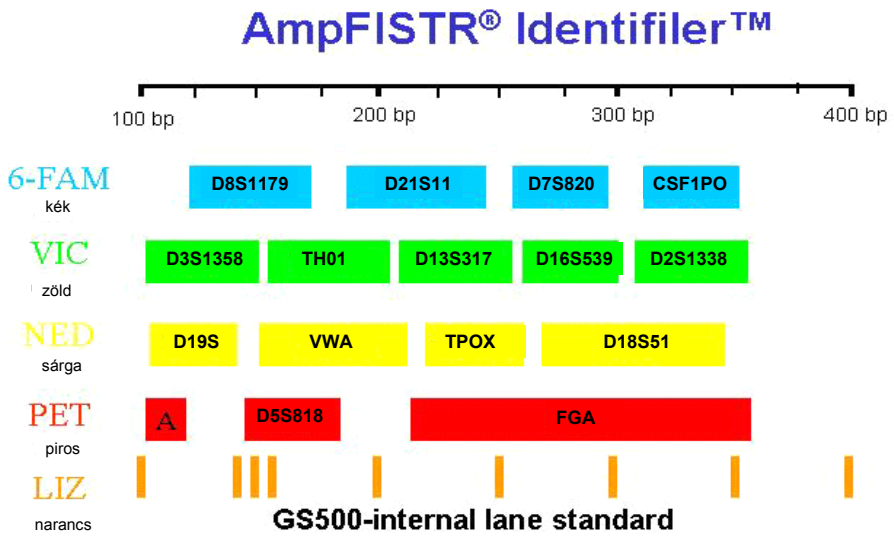
59 °C 1 min 30 ciklus

72 °C 1 min

---

60 °C 45 min

Valamennyi Szeged környéki valamint korondi minta szomatikus markerei ezzel a kittel lettek sokszorozva.



13. ábra: az AmplFlSTR Identifiler multiplex kit markerei.

Az Identifiler kit amplifikációs paraméterei:

95 °C	11 min	
94 °C	1 min	
59 °C	1 min	28 ciklus
72 °C	1 min	
60 °C	60 min	

Ezzel a kittel lettek sokszorozva a mongol populációból származó minták a strasbourgi labor munkatársai által.

2.5. Y-kromoszóma markerek vizsgálata

Az Y-kromoszómán lokalizálódó STR tulajdonságok vizsgálatához a kinyert DNS-t részben külön-külön amplifikáltuk, részben multiplex reakcióként fluoreszcens festékkel jelzett kiteket – Y-PLEX^{TM}6 (Reliagene), DYSplex-1, DYSplex-2 (Serac) - alkalmaztunk.

2.5.1. A vizsgált Y-kromoszóma STR rendszerek jellemzése (3. táblázat)

Lokusz	**repeat**	**Repeatek szama**	**Allélek száma**	**Allélek mérete (bp)**
DYS19	$(GATA)_n$	10-19	10	174-210
DYS389/I	$(GATA)_n$ $(GACA)_n$	9-17	9	235-267
DYS389/II	$(GATA)_n$ $(GACA)_n$	25-35	11	351-391
DYS390	$(GATA)_n$ $(GACA)_n$	17-28	12	187-231
DYS391	$(GATA)_n$	7-14	8	271-299
DYS392	$(ATT)_n$	6-16	11	233-263
DYS393	$(GATA)_n$	9-17	9	108-140
DYS385	$(GAAA)_n$	7-23	85	352-416
YCA II	$[CA]_n$	11-25	10	135-163

3. táblázat: a vizsgált Y-kromoszóma STR rendszerek jellemzése.

2.5.2. Singleplex vizsgálatok

A singleplex vizsgálatokat azokban az esetekben végeztük el, amikor a multiplex PCR eredménye nem volt teljes, valamelyik STR rendszer allélje hiányzott. DYS385 és DYS389 markerek esetében az egyrendszeres PCR reakciót jelölt primerekkel vizsgáltuk, a többi marker esetében jelöletlen primereket alkalmaztunk.

Amplifikációs körülmények:

DYS385:
[B.M. Dupuy 2001]

95 °C 2 min

94 °C 20 sec
58 °C 45 sec 28 ciklus
72 °C 1 min

72 °C 10 min

DYS389:
[P. de Knijff 1998]

94 °C	2 min	
94 °C	15 sec	
58 °C	15 sec	30 ciklus
72 °C	20 sec	
72 °C	2 min	

DYS390:

[Csete 1999]

94 °C	1 min	
55 °C	1 min	30 ciklus
72 °C	1 min 30 sec	

DYS393:
[P. de Knijff 1998]

94 °C	1 min	
94 °C	45 sec	
55 °C	30 sec	30 ciklus
72 °C	30 sec	
72 °C	4 min	

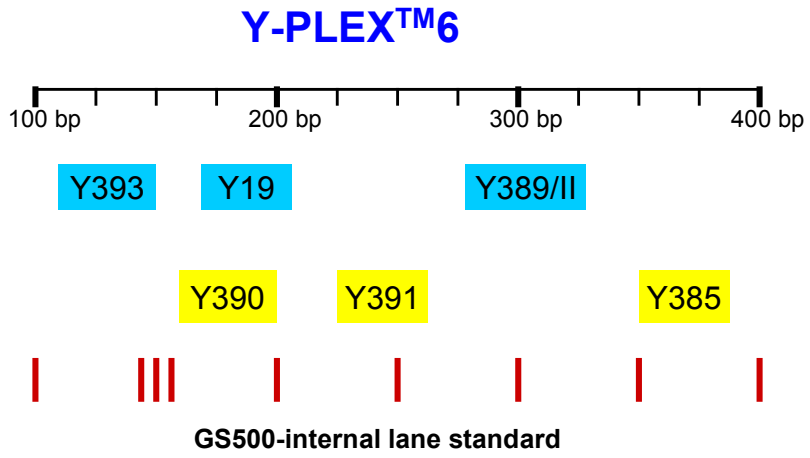
DYS391:
[P. de Knijff 1998]

95 °C	4 min	
94 °C	1 min	
59 °C	1 min	28 ciklus
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

DYS392:	94 °C	45 sec	
[P. de Knijff 1998]	55 °C	30 sec	30 ciklus
	72 °C	30 sec	
	72 °C	4 min	
DYS19:	94 °C	1 min	
[Csete 1999]	56 °C	1 min	30 ciklus
	72 °C	1 min	

2.5.3. Multiplex vizsgálatok

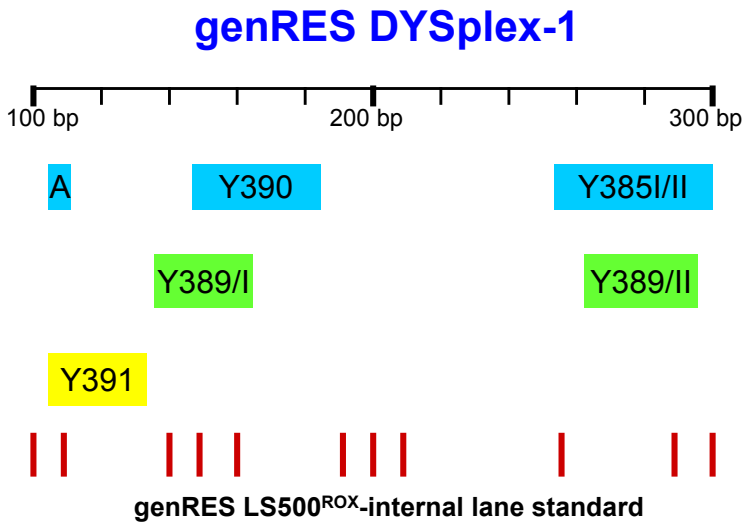
A székely minták felénél valamint a mongol minták esetében az Y-PLEX™6 kitet (Reliagene) alkalmaztuk (14. ábra). Ez nem tartalmazza mind a nyolc Y-STR markert, ezért ezeket a vizsgálatokat singleplex PCR reakciókkal egészítettük ki. A székely minták másik felénél a genRES DYSplex-1 és genRES DYSplex-2 kiteket (Serac) használtuk (15. és 16. ábra).



14. ábra: az Y-PLEX™6 kit markerei

Y-PLEX™6 kit amplifikációs körülményei:

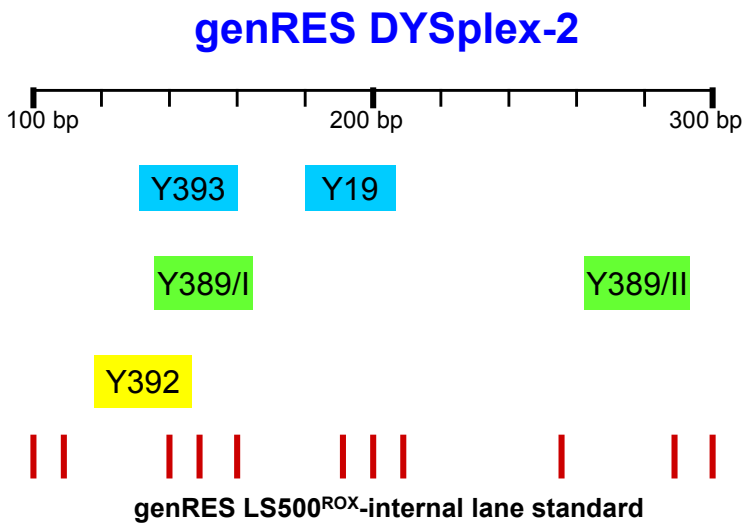
95 °C	10 min	
94 °C	30sec	
59 °C	1min	30 ciklus
70 °C	1min	
60 °C	60min	



15. ábra: a genRES DYSplex-1 kit markerei

genRES DYSplex-1 kit amplifikációs körülményei:

94 °C	12 min	
94 °C	1 min	
56 °C	1 min	30 ciklus
72 °C	1,5 min	
60 °C	45 min	



16. ábra: a genRES DYSplex-2 kit markerei

genRES DYSplex-2 kit amplifikációs körülményei:

94 °C	12 min	
94 °C	1 min	
56 °C	1 min	30 ciklus
72 °C	1,5 min	
60 °C	45 min	

2.6. Allélszeparáció és allélmeghatározás

Az allélek elválasztása poliakrilamid gélen történt. Horizontális gélen végeztük azon allélek szeparációját, melyek felamplifikálása jelöletlen primerekkel történt. A jelölt primerekkel sokszorozott fragmenteket kapilláris gélelektroforézis segítségével választottuk el.

2.6.1. Horizontális gélelektroforézis

A horizontális poliakrilamid gélelektroforézist (PAGE) azon esetekben alkalmaztuk, amikor nem jelölt primerekkel dolgoztunk.

Az elektroforézishez a következő oldatok szükségesek:

29,1 % Akrilamid (SERVA)

0,9 % Piperazin diakrilamid (PDA, SIGMA)

0,28 M Tris/Formiát pH:9,0

0,35 M Tris/Szulfát pH:9,0

A gél polimerizációját ammónium peroxidiszulfát (APS) és N,N,N',N'-tetrametildiamin (TEMED) hatása eredményezi. A PCR terméket először egy 8 %-os gélen ellenőriztük, melynek 10 cm a futási távolsága, a vastagsága 0,45 mm. Az elektroforézis 0,05% (w/v) brómfenolkéket tartalmazó 0,28 M Tris/Bórsav jelenlétében történt. Az elektródák és a gél közötti kapcsolatot egy 230 mm x 10 mm x 5 mm méretű, az elektroforetikus pufferben áztatott 2%-os agaróz gél tartotta.

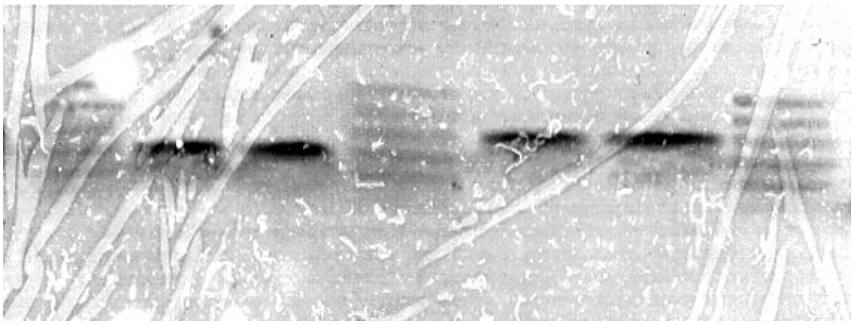
Az elektroforézis felső elektródás, hűtőlapos multiphore-2 elektroforetikus kád (Pharmacia) használatával történt 100V és 20 mA körülményei között, míg a brómfenolkék elérte az anódot. A mintákat a katódtól 2 cm-re vittük föl Schleiher és Shuell 2013 típusú filterpapírra. A genotípus meghatározásához 6%-os, 0,75 mm vastagságú 20 cm-es futási távolságú poliakrilamid gélt alkalmaztunk. Az elektroforézis paraméterei: 90 perc 5W, majd 90 perc 10W, végül 15W, amíg a brómfenolkék elérte az anódot.

Mivel a DNS negatív töltésű, így a pozitív töltés felé mozog. A kisebb méretű fragmentek gyorsabban mozognak, mint a nagyobb méretűek, így ezek közelebb voltak az anódhoz.

Ezüstfestés:

Az elválasztott fragmenteket ezüstfestéssel tettük láthatóvá [Allen és mtsai, 1989] (17. ábra). A DNS fragmenteket 1% (v/v)-os HNO_3-mal fixáltuk 5 percig, majd háromszor

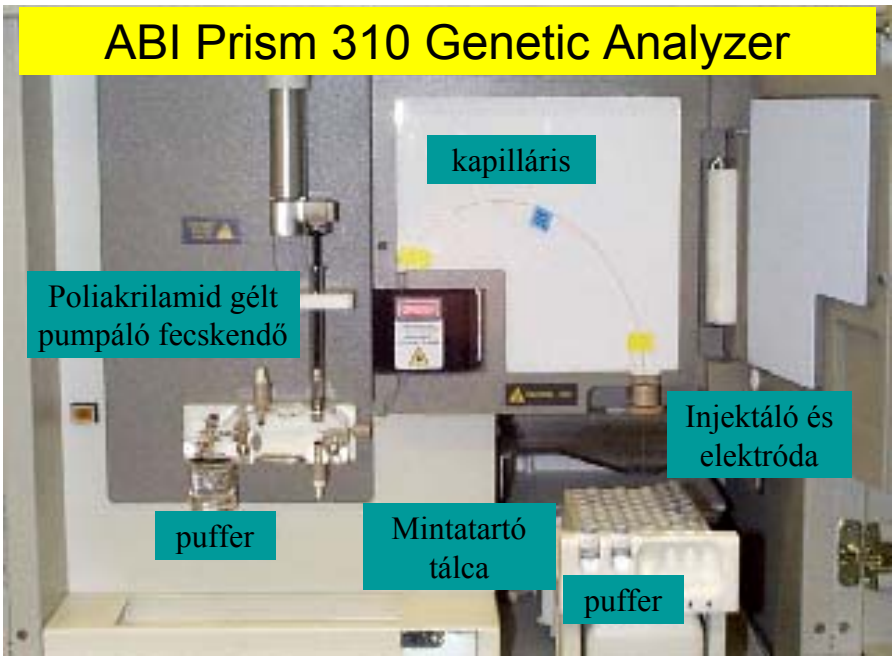
mostuk deionizált vízzel. A festést 30 percig végeztük 0,2 %(m/v)-os $AgNO_3$-tal, folyamatos rázás mellett, majd 0,05%(m/v)-os formaldehidet tartalmazó 0,28 M Na_2CO_3 oldattal öblítettük. Ezt a lépést addig ismételtük, míg a DNS fragmentek láthatóvá váltak. A gélt 10%(v/v)-os ecetsavval fixáltuk 3 percig, majd deionizált vízzel mostuk. A levegőn való szárítás előtt 5%(v/v)-os glicerollal kezeltük 5 percig.



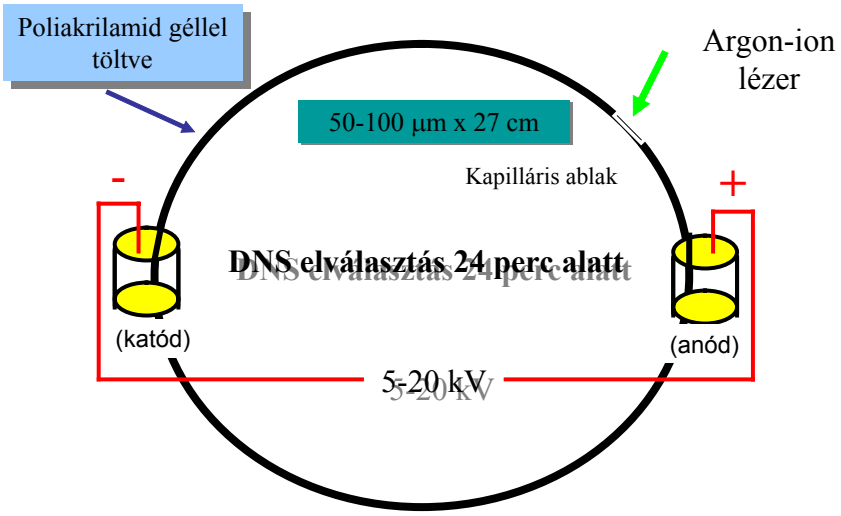
17. ábra: ezüsfestéseel előhívott STR fragmentek és a meghatározásukat segítő alléllétrák.

2.6.2. Kapilláris gélelektroforézis

Az allélszeparáció jelölt primerek alkalmazása esetében kapilláris elektroforézissel történt ABI Prism 310 (18. ábra), illetve a mongol minták szomatikus markereinek vizsgálata ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) segítségével.

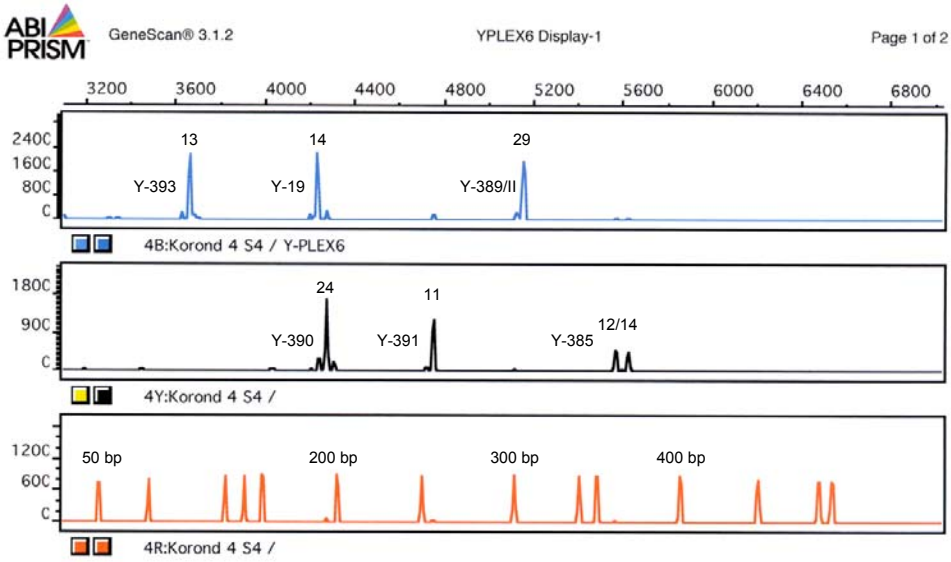


A PCR termékből 1,5 µl-t 24 µl formamidba tettünk, mely elősegíti, hogy a DNS egyszálú legyen. Minden mintához tettünk 1 µl belső standardot (ROX-500 size standard). Kapilláris gélelektroforézis esetén minden minta külön fut és minden minta után a műszer friss géllel tölti föl a kapillárist. A fluoreszcensen jelölt fragmenteket lézerfény világítja meg, amint azok a kapilláris „ablakához" érnek, majd egy prizmán keresztül CCD kamerába vetül a kép (19. ábra).



19. ábra: a kapilláris elektroforézis működési elve.

A számítógép feldolgozza az információt, és elraktározza, hogy az adott szín mennyi idő elteltével érte el a kapilláris ablakát. Ezeket az adatokat a továbbiakban a GeneScan Analysis Software 3.2.1. értékeli (20. ábra).



20. ábra: egy minta Y-STR markereinek ferogramja.

2.7. Eredmények feldolgozása

Az eredményekből a populáció általános jellemzésére kiszámoltuk az allélgyakorisági értékeket, a diszkriminációs erőt (PD), a kizárási hatékonyságot (PE) és a polimorfizmusra jellemző értéket (PIC). Az értékek kiszámításához a PowerStatsV12. programot alkalmaztuk [www.promega.com/geneticidtools/powerstats].

A populációk struktúrájának meghatározásához AMOVA elemzést végeztünk ARLEQUIN Software 2.000 program segítségével [Schneider 2000].

A vizsgálatok alkalmával nyert adatokat az irodalomban közölt kevert német és japán allélgyakorisági értékekkel hasonlítottuk össze, illetve számítottuk ki a populációk között fennálló genetikai távolságot [Slatkin 1995].

Az összehasonlítást az ARLEQUIN Software 2.000 programmal valamint az interneten található európai és ázsiai Y-STR haplotípus adatbázis segítségével végeztük el.

A populációk páronkénti F_{ST} értékeiből Phylip program segítségével neighbor joiningot végeztünk, mely alapján fát rajzoltunk az összehasonlításban résztvevő populációk kapcsolatának szemléltetése céljából.

Az általunk vizsgált populációk haplotípusait egyeztettük mind az európai, mind az ázsiai adatbázisban szereplő adatokkal, mivel arra voltunk kíváncsiak, fellelhető-e kapcsolat a magyar, székely populációk és az ázsiai populációk között. Az adatbázisban történő egyezések száma azonban csak támpontként szolgál, figyelembe vettük, hogy a találatok számát erősen befolyásolja az adatbázisban szereplő populációk egyedszáma [Roewer 2001].

A populációk összehasonlításából nyert Φ_{ST} értékeket a Phylip program segítségével dolgoztuk fel, mely a populációk kapcsolatait bemutató fát rajzolt [http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html].

3. EREDMÉNYEK

3.1. A magyar populáció jellemző értékei

3.1.1. Szomatikus STR markerek

3.1.1.1. Allélgyakorisági értékek

4. táblázat: szomatikus STR rendszerek allélgyakorisági értékei a vizsgált magyar populációjában(N=201)

Allél	D3S1358	VWA	FGA	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818	D13S317	D7S820
6									0,005
7									0,017
8				0,010				0,147	0,142
9				0,010			0,087	0,085	0,114
10				0,097		0,002	0,052	0,045	0,286
11				0,080		0,007	0,318	0,348	0,256
12				0,159		0,129	0,386	0,224	0,149
13	0,002	0,002		0,303		0,112	0,137	0,107	0,030
14	0,104	0,129		0,184		0,144	0,020	0,045	
14,2						0,002			
15	0,226	0,090		0,119		0,179			
16	0,229	0,179		0,030		0,134			
17	0,236	0,261	0,002	0,005		0,139			
18	0,192	0,236	0,0,15	0,002		0,047			
19	0,010	0,092	0,090			0,045			
20		0,010	0,149			0,022			
20,2			0,002						
21			0,172			0,020			
21,2			0,005						
22			0,184			0,007			
22,2			0,020						
23			0,137			0,002			
23,2			0,002						
24			0,102			0,005			
25			0,090		0,002				
25,2			0,002						
26			0,025						
27			0,002		0,025				
28					0,162				
28,2					0,002				
29					0,229				
30					0,184				
30,2					0,047				
31					0,087				
31,2					0,087				
32					0,012				
32,2					0,117				
33,2					0,037				
34,2					0,005				
36					0,002				
PE	0,648	0,648	0,786	0,786	0,648	0,677	0,520	0,638	0,677
PD	0,917	0,931	0,963	0,930	0,961	0,967	0,857	0,921	0,921
PIC	0,76	0,78	0,85	0,79	0,84	0,86	0,68	0,76	0,77
OH	0,826	0,826	0,896	0,896	0,826	0,841	0,756	0,821	0,841
EH	0,797	0,813	0,87	0,82	0,857	0,878	0,722	0,785	0,798
P	0,50	0,02	0,75	0,07	0,57	0,01	0,14	0,55	0,38

OH: várható heterozigócia; EH: észlelt heterocigócia; P: permutációs teszt során kapott P-érték; PD: diszkriminációs hatékonyság; PE: kizárási hatékonyság; PIC: polymorphism informed content

A szomatikus STR markerek közül a populációban a következő allélek a leggyakoribbak: D3S1358: 17-es allél (23,6%), VWA: 17-es allél (26,1%), FGA: 22-es allél (18,4%), D8S1179: 13-as allél (30,3%), D21S11: 29-es allél (22,9%), D18S51: 15-ös allél (17,9%), D5S818: 12-es allél (38,6%), D13S317: 11-es allél (34,8%), D7S820: 10-es allél (28,6%).

3.1.1.2. Genotípusok

A magyar populációban észlelt szomatikus STR genotípusokat az 5.táblázat tartalmazza.

3.1.2. Y-kromoszóma STR markerek

3.1.2.1. Allélgyakorisági értékek

6. táblázat: Y-kromoszóma STR allélgyakorisági értékei a magyar populációban

Allél	DYS19	DYS385	DYS389/I	DYS389/II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393
9		0,045				0,020		
10		0,040				0,540		
11		0,130	0,010			0,360	0,780	0,010
12		0,065	0,170			0,050	0,050	0,200
13	0,080	0,105	0,710			0,020	0,120	0,650
14	0,330	0,250	0,100				0,040	0,140
15	0,280	0,140	0,010			0,010	0,010	
16	0,230	0,100						
17	0,080	0,050						
17,2		0,005						
18		0,045						
19		0,025						
22					0,100			
23					0,210			
24					0,370			
25					0,310			
26					0,010			
27				0,010				
28				0,140				
29				0,260				
30				0,310				
31				0,190				
32				0,060				
33				0,030				

A leggyakoribb allélek a magyar populációban Y kromoszóma STR rendszerekre a következőek: DYS19: 14-es allél (33%), DYS385: 14-es allél (25%), DYS389/I: 13-as allél (71%), DYS389/II: 30-as allél (31%), DYS390: 24-es allél (37%), DYS391: a populáció több, mint felében,10-es allél (54%), DYS392: egészen magas számban 11-es allél (78%) és DYS393: 13-as allél (65%).

3.1.2.2. Haplotípusok

A magyar populációban észlelt Y-STR haplotípusok a 7. táblázatban vannak feltűntetve.

3.2. A székely populáció jellemző értékei

3.2.1. Szomatikus STR markerek

3.2.1.1. Allélgyakorisági értékek

8. táblázat: szomatikus STR rendszerek allélgyakorisági értékei a korondi székely populációban(N=99)

Allél	D3S1358	VWA	FGA	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818	D13S317	D7S820
7	-	-	-	-	-	-	0,005	-	0,010
8	-	-	-	-	-	-	0,010	0,156	0,136
9	-	-	-	0,015	-	-	0,035	0,065	0,156
10	-	-	-	0,050	-	0,005	0,095	0,075	0,277
11	-	-	-	0,075	-	0,025	0,328	0,358	0,232
12	-	-	-	0,151	-	0,136	0,343	0,277	0,156
13	-	-	-	0,292	-	0,106	0,176	0,045	0,030
13,2	-	-	-	-	-	0,010	-	-	-
14	0,156	0,141	-	0,186	-	0,136	0,005	0,020	-
15	0,267	0,090	-	0,131	-	0,126	-	-	-
16	0,252	0,267	-	0,095	-	0,136	-	-	-
17	0,202	0,242	-	-	-	0,146	-	-	-
18	0,116	0,202	0,005	-	-	0,106	-	-	-
19	0,005	0,050	0,050	-	-	0,035	-	-	-
20	-	-	0,085	-	-	0,010	-	-	-
20,2	-	-	0,005	-	-	-	-	-	-
21	-	0,005	0,171	-	-	-	-	-	-
21,2	-	-	0,005	-	-	-	-	-	-
22	-	-	0,227	-	-	0,005	-	-	-
22,2	-	-	0,015	-	-	-	-	-	-
23	-	-	0,111	-	-	0,010	-	-	-
23,2	-	-	0,005	-	-	-	-	-	-
24	-	-	0,166	-	-	0,005	-	-	-
24,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	0,111	-	0,005	-	-	-	-
26	-	-	0,025	-	0,005	-	-	-	-
27	-	-	0,010	-	0,035	-	-	-	-
28	-	-	-	-	0,141	-	-	-	-
29	-	-	0,005	-	0,272	-	-	-	-
29,2	-	-	-	-	0,010	-	-	-	-
30	-	-	-	-	0,161	-	-	-	-
30,2	-	-	-	-	0,020	-	-	-	-
31	-	-	-	-	0,070	-	-	-	-
31,2	-	-	-	-	0,126	-	-	-	-
32	-	-	-	-	0,005	-	-	-	-
32,2	-	-	-	-	0,116	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33,2	-	-	-	-	0,025	-	-	-	-
35,2	-	-	-	-	0,005	-	-	-	-
PE	0,523	0,653	0,653	0,633	0,692	0,814	0,455	0,558	0,662
PD	0,916	0,916	0,916	0,936	0,954	0,966	0,886	0,893	0,934
PIC	0,75	0,77	0,84	0,80	0,82	0,87	0,69	0,72	0,80
OH	0,75	0,87	0,86	0,80	0,84	0,88	0,68	0,75	0,78
EH	0,79	0,80	0,86	0,82	0,84	0,88	0,73	0,75	0,81
P	0,3780	0,5154	0,7808	0,2274	0,7358	0,4545	0,4545	0,0872	0,0004

OH: várható heterozigócia; EH: észlelt heterocigócia; P: permutációs teszt során kapott P-érték; PD: diszkriminációs hatékonyság; PE: kizárási hatékonyság; PIC: polymorphism informed content

A szomatikus STR markerek közül a székely populációban a következő allélek a leggyakoribbak: D3S1358: 15-ös allél (26,7%), VWA: 16-os allél (26,7%), FGA: 22-es allél (22,7%), D8S1179: 13-as allél (29,2%), D21S11: 29-es allél (27,2%),

D18S51: 17-es allél (14,6%), D5S820: 12-es allél (34,6%), D13S317: 11-es allél (35,8%), D7S820: 11-es allél (23,2%).

3.2.1.3. Genotípusok

A székely populációban előforduló genotípusokat autoszomális markerekre a 9. táblázat foglalja össze.

3.2.2. Y-kromoszóma markerek

3.2.2.1. Allélgyakorisági értékek

10. táblázat: Y kromoszóma STR allélgyakorisági értékek a székely populációban

Allél	DYS19	DYS385	DYS389/I	DYS389/II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393
9		0.010				0.040		
10		0,005				0.727	0.363	
11		0.161	0,010			0.313	0.404	
12		0.040	0,111			0.020	0.101	0.232
13	0.161	0.196	0,464				0.111	0.636
14	0.333	0.257	0,373				0.010	0.121
15	0.252	0.126	0,404					0,010
16	0.222	0.101					0,010	
17	0.030	0.045					0,010	
18		0.025						
19		0.030						
22					0.080			
23					0.363			
24					0.323			
25					0.202			
26					0.030			
27				0.010				
28				0.252				
29				0.282				
30				0.252				
31				0.131				
32				0.070				

A székely populációban leggyakrabban előforduló Y-STR allélek: DYS19: 14-es allél (33,3%), DYS385: 14-es allél (25,75%), DYS389/I: 13-as allél (46,4%), DYS389/II: 29-es allél (28%), DYS390: 23-as allél (28%), DYS391: 10-es allél nagyon magas arányban(72,7%), DYS392: 11-es allél (40,4%), DYS393: 13-as allél (63,6%).

3.2.2.2. Haplotípusok

A székely populációban észlelt Y-STR haplotípusok a 11. táblázatban vannak feltűntetve.

3.3. A mongol populáció jellemző értékei

3.3.1. Szomatikus STR markerek

3.3.1.1. Allélgyakorisági értékek

12.táblázat: szomatikus STR rendszerek allélgyakorisági értékei a mongol populációban(N=104)

allél	D8S1179	D7S820	CSF1PO	TH01	D13S317	D16S539	TPOX	D5S818
6				0,140				
7				0,255				0,024
8		0,25		0,101	0,183	0,014	0,520	
9		0,086	0,062	0,365	0,163	0,279	0,130	0,053
9.3				0,125				
10	0,101	0,0192	0,284	0,014	0,163	0,110	0,038	0,12
11	0,091	0,284	0,260		0,230	0,221	0,264	0,428
12	0,043	0,168	0,307		0,197	0,245	0,048	0,24
13	0,342	0,020	0,077		0,038	0,106		0,134
14	0,173		0,010		0,024	0,024		
15	0,168							
16	0,067							
17	0,010							
18	0,005							

	D21S11	D3S1358	D2S1338	D19S433	VWA	D18S51	FGA
10						0,005	
11				0,010		0,014	
12				0,043		0,029	
12.2				0,010			
13				0,250		0,154	
13.2				0,034			
14		0,040		0,240	0,150	0,308	
14.2				0,082			
15		0,389		0,053	0,029	0,110	
15.2				0,159			
16		0,289	0,005	0,029	0,188	0,077	
16.2				0,067			
17		0,202	0,043		0,274	0,086	0,005
17.2				0,014			
18		0,077	0,120	0,010	0,216	0,058	0,014
19		0,005	0,178		0,140	0,033	0,020
20			0,120		0,005	0,033	0,038
21			0,020			0,020	0,110
22			0,048			0,020	0,154
22.2							0,005
23			0,211			0,033	0,245
24			0,150			0,014	0,221
25			0,062			0,005	0,130
26			0,029				0,038
27							0,002
28	0,020		0,014				
28.2	0,010						
29	0,264						
29.2	0,005						
30	0,365						
30.2	0,024						
31	0,106						

31.2	0,062
32	0,020
32.2	0,082
33	0,005
33.2	0,033
34.2	0,005

A szomatikus STR markerek közül a mongol populációban a következő allélek a leggyakoribbak: D3S1358: 15-ös allél (39%), VWA: 17-es allél (27,4%), FGA: 23-as allél (24,5%), D8S1179: 13-as allél (34,2%), D21S11: 30-as allél (36%), D18S51: 14-es allél (31%), D5S820: 11-es allél (42%), D13S317: 11-es allél (23%), D7S820: 11-es allél (28,4%), CSF1PO: 12-es allél (30%), TH01: 9-es alél (36,5%), D16S539: 9-es allél (28%), TPOX: 8-as allél (52%), D2S1338: 23-as allé (21%), D19S433 (25%).

3.3.1.2. Diszkriminációs értékek

13. táblázat: a vizsgált mongol populáció polimorfizmusára vonatkozó értékei szomatikus STR makerekre

	PD	PE	PIC	OH	EH	P
D8S1179	0.930	0.570	0.78	0.78431	0.80783	0.42720
D21S11	0.913	0.570	0.74	0.78431	0.77523	0.44613
D7S820	0.931	0.629	0.78	0.77451	0.78552	0.85146
CSF1PO	0.882	0.481	0.71	0.73529	0.75191	0.05546
D3S1358	0.860	0.469	0.67	0.72549	0.72274	0.02853
TH01	0.900	0.501	0.72	0.74510	0.75978	0.33209
D13S317	0.926	0.860	0.79	0.93137	0.82459	0.30018
D16S539	0.926	0.469	0.76	0.72549	0.79431	0.38535
D2S1338	0.960	0.681	0.85	0.84314	0.86555	0.39464
D19S433	0.949	0.553	0.82	0.77451	0.83879	0.37850
VWA	0.926	0.606	0.77	0.80392	0.80252	0.83899
TPOX	0.788	0.313	0.58	0.61765	0.63986	0.02564
D18S51	0.956	0.701	0.83	0.84314	0.84951	0.20945
D5S818	0.879	0.422	0.68	0.69608	0.72365	0.65298
FGA	0.947	0.625	0.81	0.81373	0.83923	0.51469

OH: várható heterozigócia; EH: észlelt heterocigócia; P: permutációs teszt során kapott P-érték; PD: diszkriminációs hatékonyság; PE: kizárási hatékonyság; PIC: polymorphism informed content

3.3.1.3. Genootípusok

A vizsgált mongol populáció szomatikus STR genotípusait a 14. táblázat tartalmazza.

3.3.2. Y-kromoszóma STR markerek

3.3.2.1. Allélgyakorisági értékek

15. táblázat: A vizsgált mongol populáció Y-STR alléljeinek gyakorisága

Allél	DYS19	DYS390	DYS389/I	DYS389/II	DYS392	DYS391	DYS393	YCA-II
8					0,02	0,04		
9					0,53	0,24		
10					0,02	0,64		
11					0,22	0,06		
12					0,15		0,11	
13	0,08		0,15		0,02		0,62	
14	0,22		0,6		0,02		0,26	
15	0,18		0,24					
16	0,34							
17	0,16							0,013
18								0,07
19								0,11
22		0,04						0,013
23		0,4						0,05
24		0,33						0,43
25		0,22						0,23
26								0,07
27				0,04				
28				0,24				
29				0,31				
30				0,22				
31				0,13				
32				0,04				

A mongol populációban leggyakrabban előforduló Y-STR allélek: DYS19: 14-es allél (33,3%), DYS385: 14-es allél (25,75%), DYS389/I: 13-as allél (46,4%), DYS389/II: 29-es allél (28%), DYS390: 23-as allél (28%), DYS391: 10-es allél nagyon magas arányban(72,7%), DYS392: 11-es allél (40,4%), DYS393: 13-as allél (63,6%).

3.3.2.2. Haplotípusok

16. táblázat: Y kromoszóma STR haplotípusok a mongol populációban (N=45)

Hapl.	DYS19	DYS390	DYS389	DYS393	DYS392	DYS391	YCA-II	gyakoriság
1	13	22	13/32	13	15	10	19/23	0,0243
2	13	23	13/30	13	13	9	22/23	0,0243
3	13	24	13/29	13	14	10	19/22	0,0243
4	13	25	13/29	13	13	10	22/23	0,0243
5	14	23	12/28	12	14	10		0,0243
6	14	23	13/28	13	14	10		0,0243
7	14	23	13/28	13	14	10	18/18	0,0243
8	14	23	13/29	13	13	10	18/19	0,0243
9	14	23	13/30	13	14	10		0,0243
10	14	23	13/30	13	16	11	19/21	0,0243
11	14	23	14/30	14	14	11	18/20	0,0243
12	14	25	12/27	12	13	10	19/23	0,0487
13	14	25	13/29	13	11	10	22/23	0,0243
14	14	25	14/30	13	13	10	22/23	0,0243
15	15	22	12/28	12	12	10	22/22	0,0243
16	15	23	12/28	12	14	10	19/19	0,0243
17	15	23	13/28	13	13	10	22/24	0,0243
18	15	23	13/28	14	11	10	22/24	0,0487
19	15	23	13/29	14	11	10	22/24	0,0243
20	15	23	13/29	14	11	10		0,0243
21	15	24	14/31	14	13	9	22/22	0,0243
22	15	24	14/31	14	13	9		0,0243
23	15	25	14/30	13	8	10	17/18	0,0243
24	16	23	13/28	14	11	10		0,0243
25	16	23	13/29	14	11	10	22/22	0,0487
26	16	23	13/30	13	11	10	22/22	0,0243
27	16	24	12/28	13	11	9	22/23	0,0243
28	16	24	13/29	13	11	9		0,0243
29	16	24	13/29	13	11	9	22/23	0,0243
30	16	24	13/31	13	11	11	21/22	0,0243
31	16	24	13/30	13	11	9	22/23	0,0243
32	16	25	12/28	13	13	10	22/23	0,0243
33	16	25	13/29	13	11	10	22/23	0,0243
34	16	25	13/29	13	11	10	22/24	0,0243
35	16/17	24	14/30	13	11	8	22/23	0,0487
36	16/17	24	14/31	13	11	9	22/23	0,0243
37	16/17	24	14/31	13	11	9		0,0243
38	16/17	24	14/32	13	11	9		0,0243
39	17	24	13/29	14	11	10	22/23	0,0243
40	17	24	14/31	14	11	9	21/21	0,0243
41	17	25	13/29	13	11	10	22/23	0,0243

A 45 minta 41 különböző haplotípust adott. A leggyakrabban előforduló haplotípusok (12, 18, 25, 36) gyakorisága: 0,04. A DYS19 rendszerre adott kettős allél a 5 egyednél (11%) fordult elő.

3.4. Populációk közötti genetikai távolság

3.4.1. Autoszomális STR markerek alapján

A populációk összehasonlító vizsgálatánál azt tapasztaltuk, hogy az összvariancia nagy részét a populációkon belüli variancia teszi ki (97,88%), a populációk közötti variancia mindössze 2,12%-a volt az összvarianciának. A nagy számú polimorf marker vizsgálata ugyanis azt eredményezte, hogy a populációkon belül minden egyed különbözött, tehát nem volt két egyforma genotípus. Ennek köszönhető az, hogy az F_{ST} értékek viszonylag alacsonyak, de ennek ellenére szignifikáns a különbség a populációk között ($P<0,001$). Az összesített F_{ST} értéke szomatikus markerek alapján: 0,021. A 17. táblázat tartalmazza a páronkénti összehasonlítás eredményéül kapott Φ_{ST} értékeket.

17.táblázat: a vizsgált populációk páronkénti összehasonlításával kapott Φ_{ST} értékek szomatikus STR markerek alapján

	székely (N=99)	mongol (N=104)
mongol	0,01442**	
magyar (N=201)	0,00825*	0,03608***

*0,01<P<0,05

** 0,01>P>0,001

*** P<0,001

Ezekből a Φ_{ST} értékekből kiszámított genetikai távolságokat a 18. táblázat tartalmazza.

18. táblázat: Slatkin féle genetikai távolság

	székely (N=99)	mongol (N=104)
mongol	0,01463	
magyar (N=201)	0,00832	0,03743

3.4.2. Y kromoszóma STR markerek alapján

Y markerek esetében a különböző populációkat Y-STR haplotípussal szokás jellemezni. A populációk összehasonlításához viszonyítási alapként felhasználtuk az irodalomban megjelent haplotípus adatokat is. A vizsgálatba német, román és japán populációkat vontunk be [Sasaki 2000, Barbarii 2003].

Az AMOVA módszerrel végzett összehasonlításkor eredményként azt kaptuk, hogy az összvariancia 6,21%-át adja a populációk közötti komponens. Az összesített F_{ST} értéke: 0,06213. A populációk között szignifikáns különbség van (P<0,001).

Elvégeztük a populációk páronkénti összehasonlítását is. A 19. táblázat mutatja az egyes populációk közötti Φ_{ST} értékeket.

19. táblázat: a populációk páronkénti összehasonlításából nyert Φ_{ST} értékek - haplotípusok alapján.

	román	székely	japán	mongol	német
román (N=104)	-				
székely (N=99)	0,00042	-			
japán (N=200)	0,10578***	0,00518	-		
mongol (N=45)	0,12103***	0,08843***	0,17276***	-	
német (N=111)	0,02194***	0,00081	0,07047***	0,12303***	-
magyar (N=100)	0,00308	0,00921	0,00423	0,08043*	0,00127

*0,01<P<0,05

** 0,01>P>0,001

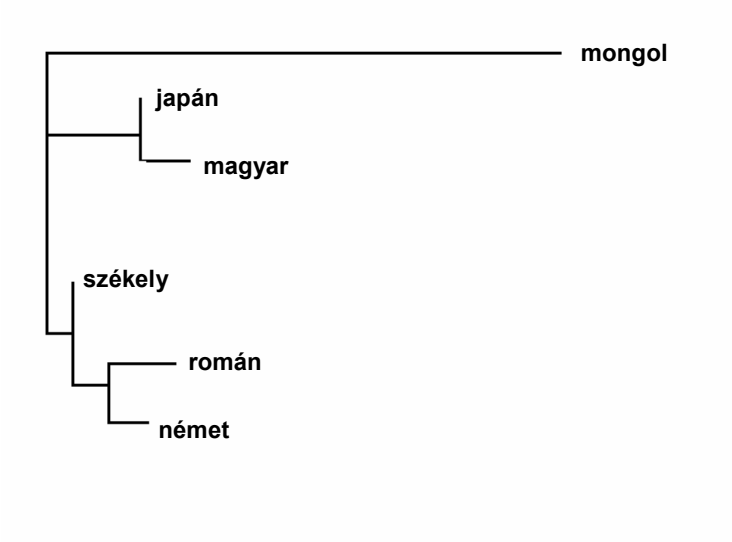
*** P<0,001

Ezekből a Φ_{ST} értékekből kiszámított genetikai távolságokat a 20. táblázat tartalmazza.

20. táblázat: Slatkin féle genetikai távolság

	román	székely	japán	mongol	német
román (N=104)	-				
székely (N=99)	0	-			
japán (N=200)	0,11829	0	-		
mongol (N=45)	0,13770	0,09701	0,20884	-	
német (N=111)	0,02243	0	0,7581	0,14030	-
magyar (N=100)	0,00309	0	0	0,08747	0,00127

Phylip program segítségével a Φ_{ST} adatok alapján neighbor joiningot végeztünk el, melynek eredményeként kaptuk a következő fát (21. ábra):



21. ábra: Neighbor joining eredményeként kapott fa.

3.5. A populációk összehasonlítása adatbázisban

3.5.1. Tipikus európai haplotípusok

Európában vannak olyan haplotípusok, melyek adott népcsoportra jellemzőek, számuk ezekben a populációkban igen magas. Megkülönböztetünk nyugati, észak-keleti, finn és ibériai hapotípust. Ezen haplotípusok előfordulását a vizsgált populációkban a 21. táblázat tartalmazza.

Európa tipikus haplotípusai közül a szegedi magyar populációban mind a nyugati, mind az észak-keleti haplotípus előfordult. A székely és a mongol populációban csak az észak-keleti haplotípus volt megtalálható. Minden egyezés csak egyszer fordult elő a vizsgált populációkban.

3.5.2. A magyar populáció

Európai adatbázis

A szegedi magyar populáció 96 haplotípusából 59 mutatott egyezést az európai adatbázissal. Ezek közül a legmagasabb számú találatot adó haplotípusokat a 22. táblázat mutatja.

Az európai adatbázisban legnagyobb egyedszámot a német, spanyol, lengyel és olasz populációk esetében találunk, így a leggyakrabban ezekben a populációkban találtunk egyezést. A legtöbb találatot a 32. haplotípus adta, összesen 443 egyezést mutatott a keresés, ebből 107 találat volt Spanyolországban, 80 találat Németországban. A második legtöbb találatot a 31. haplotípus adta, 190 egyezést, ezekből is a legtöbb a spanyol illetve német populációkban fordult elő. A 80. és 93. haplotípus azért érdekes, mert ezek gyakorisága a szegedi populációban kétszer akkora, mint a többi haplotípusnak, és ezek is viszonylag magas számban fordulnak elő az európai populációkban. Ezek a haplotípusok a lengyel és a balti populációk egyedeiben is viszonylag nagy számban előfordultak.

Ázsiai adatbázis

Az ázsiai adatbázisban 4 haplotípus mutatott egyezést ázsiai populációkkal. Az általunk vizsgált mongol populációval is összevetettük az adatokat. Mivel nincs adatunk a DYS385 rendszerre vonatkozóan, ezért a haplotípusokat e rendszer kihagyásával elemeztük. A 80. haplotípus kétszer is előfordult a vizsgált mongol populációban, mely azért is jelentős, mert ez a haplotípus a magyar populációban a gyakoribbak közé tartozik, illetve mert a mongol populációnak viszonylag alacsony az egyedszáma. A DYS385 rendszer kihagyásával a 80. haplotípus az adatbázisban további 10 egyezést adott, melyek mindegyike mongol populációból származik. A haplotípusokat és a találatok számát a 23. táblázat mutatja.

3.5.3. Székely populáció

Európai adatbázis

A székely populációban összesen 90 haplotípust különítettünk el nyolc Y-STR markerre vonatkozóan. Az európai adatbázisban a haplotípusok nagy része mutatott egyezést. Ezek közül a leggyakoribbakat a 24. táblázat foglalja össze.

A találatok magas száma a populációk nagy számával illetve a populációk magas egyedszámával magyarázhatóak. A 75. haplotípus 106, a 16. haplotípus 104 egyezést adott. Elsősorban német és lengyel populációkban találtunk a székely népcsoporttal egyező haplotípusokat, de jelentős a finn és svéd populációval való egyezés is, bár a találatokat adó székely haplotípusok az általunk vizsgált populációban csak egyszer fordultak elő.

Ázsiai adatbázis

A székely populáció Y-STR haplotípusainak összevetése az ázsiai populációkkal a 25. táblázatban látható eredményt adta.

Ebben az összehasonlításban azt látjuk, hogy a székely populáció szoros kapcsolatot mutat a török populációval. Ez az V. századi török kapcsolatnak, az együtt vándorlásnak köszönhető. A 10. haplotípus a székely populációban gyakori, háromszor is előfordult a 99 egyedben (3%), s ez a haplotípus a bolgár-török populációban is előfordult.

Az általunk vizsgált mongol populáció 45 egyedében 2 haplotípust találtunk, mely a székely populáció egy-egy haplotípusával megegyezett. Ezek a székely populáció 24. és 29. haplotípusai voltak.

3.5.4. Mongol populáció

Az általunk elemzett mongol populáció haplotípusainak összehasonlítását szintén elvégeztük az európai és ázsiai az adatbázisokban szereplő populációkkal.

Európai adatbázis

A vizsgált mongol populáció európai populációkkal a következő a 26. táblázatban látható egyezéseket adta.

Azok közül a haplotípusok közül, amelyek a YCAII marker alléljeit is tartalmazzák, mindössze egy (8. haplotípus) mutatott egyezést az európai populációkkal. Amennyiben csak 7 Y-STR markerre vonatkozó haplotípussal kerestünk egyezést, itt is nagy számban voltak találatok. A 33. haplotípus 172, a 30. haplotípus 104 találatot adott. Itt is elsősorban a nagy egyedszámú populációkban fordultak elő magas számban a mongol populációban is előforduló haplotípusok. A 30. és 33. haplotípus a magyar populációban (Budapest és Szeged) is előfordult. A 30. haplotípus 17-szer (3,9%-ban) fordult elő a balti népeknél, míg a 30. haplotípus a macedón népességben gyakori

Ázsiai adatbázis

Az ázsiai adatbázisssal való összevetés során elsősorban a mongol populációkkal találtunk egyezést. Amennyiben a 8 markert tartalmazó haplotípusokat vizsgáltuk, kizárólag a mongol népcsoportokban találtunk azonos haplotípust. Az YCAII marker hiányában azonban egyéb populációkban is volt találat. Az összehasonlítás eredményeit a 27. táblázat tartalmazza.

Az általunk vizsgált mongol populáció 41 haplotípusából négy teljes, nyolc Y-STR markert tartalmazó haplotípusa is mutatott egyezést az ázsiai adatbázisban szereplő adatokkal. Ezek mindegyike mongol populációban fordult elő. A 25. haplotípus a vizsgált populációban 4,4%. A hét Y-STR rendszert tartalmazó haplotípusok közül az 5. haplotípus adta a legtöbb egyezést az ázsiai adatbázisban, összesen 18-at, elsősorban Nyugat-Ázsiában előforduló populációkkal.

4. ÉRTÉKELÉS

4.1. Szomatikus markerek

A szomatikus STR markerek vizsgálata alapján megállapítható, hogy a vizsgált populációk megfeleltek a Hardy-Weinberg egyensúlynak. Kivételt képez a Korondról származó székely populáció egy STR tulajdonsága, a D7S820 STR marker. Az eltérés oka a vizsgált minta zártsága lehet, ami a random mintavételezés ellenére kis létszámú populációnál előfordulhat.

Munkám során meghatároztam kilenc szomatikus STR rendszer (D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D18S51, D21S11, FGA, VWA,) allél-, illetve genotípus-eloszlását a Szeged környéki magyar és a Korondon élő székely populációban. A Budapesten élő mongol populáció 14 szomatikus STR rendszereinek (D3S1358, CSF1PO, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D18S51, D21S11, FGA, VWA, D16S539, TH01, TPOX, D2S1338) allél- és genotípus-eloszlását együttműködésben a strasbourgi Louis Pasteur Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetének munkacsoportjával mértük fel

A Szeged környéki magyar populációra jellemző allélgyakorisági értékek, melyeket az autoszomális STR rendszereknél tapasztaltunk, általánosan jellemzőek egész Európában. Apasági és kriminalisztikai vizsgálatok során a valószínűségszámításnál azonban a helyi populáció allélgyakorisági értékeivel, azaz a Szeged környéki ügyek esetében az általunk elvégzett vizsgálat eredményéül kapott értékekkel célszerű számolni.

A kilenc szomatikus STR marker közül négy rendszer (D3S1358, VWA, D18S51, D7S820) mutatott különbséget a magyar és a székely populáció között abban a tekintetben, hogy melyik allél a leggyakoribb a populációban. A mongol szomatikus markerek mindössze 3-3 rendszerben egyeztek meg a magyar, illetve székely populációval a leggyakoribb alléltípus szempontjából (magyar:D8S1179, D13S317, VWA; székely: D8S1179, D7S820, D3S317).

A vizsgált magyar, székely és mongol populációk haplotípusait összehasonlító elemzésnek vetettem alá, hogy kiderítsem, milyen a genetikai kapcsolat, mekkora a genetikai távolság e populációk között.

A populációk összehasonlító elemzésénél szomatikus markerek vizsgálata azt mutatta, hogy az egymástól függetlenül öröklődő, polimorf jellegek alapján a vizsgált magyar-székely illetve székely-mongol populációk között szignifikáns különbség mutatható ki. A populáción belüli variancia aránya sokkal nagyobb a populációk közötti varianciához (2,12%) viszonyítva, ennek köszönhetően a populációk közötti F_{ST} értékek viszonylag alacsonyak, mint ahogy azt már korábban, más európai populációk között is tapasztalták szomatikus STR markerek alapján való összehasonlításánál [Budowle 2001]. A magyar és a mongol populáció között nagyobb mértékű differenciálódást tapasztaltunk, mint a mongol és székely populációk között. Az eredmények alapján a két legközelebb álló csoport a magyar és a székely populáció.

4.2. Y-kromoszóma markerek

Munkám során meghatároztam 8 Y kromoszóma STR rendszer (DYS19, DYS385, DYS389/I, DYS389/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393) allélelosztását a Szeged környéki magyar és a Korondon élő székely populációban. A mongol populációban 8 Y-STR rendszer (DYS19, DYS389/I, DYS389/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 YCAII) allélelosztását a francia kutatócsoporttal közösen határoztuk meg.

A nyolc Y-STR markerből két rendszer esetében (DYS389/II, DYS390) különbözött a leggyakoribb alléltípus a magyar és a székely populáció között. Jelentős különbséget tapasztalunk a DYS389/I és DYS389/II markerek esetében, ahol az eltérés több mint egy allél, ami nagyobb különbségre utal a két populáció között. Lényeges eltérés még a DYS391 és DYS392 STR rendszerek esetében az, hogy ugyan egyezik a leggyakoribb allél típusa, viszont ezek aránya a populációban eltérő. A DYS391 marker esetében a magyar populációban a 10-es allél a populáció 59,48%-ában fordult elő, addig a székely populációban ez az arány lényegesen magasabb, több mint 72%-os volt. A DYS392 STR rendszer esetében pedig, ennek ellenkezőjét tapasztaltuk, vagyis a 11-es allél a magyar populációban igen gyakori, a férfi lakosság 71,5%-ára jellemző, míg a székely populációban ez a 70% megoszlik a 10-es és a 11-es alléllal rendelkező egyének között.

Mind a magyar, mind a székely populációban három-három rendszer esetében más volt a leggyakoribb alléltípus, mint a mongol populációban (magyar: DYS19,

DYS389/I, DYS389/II; székely: DYS19, DYS389/I, DYS30). A DYS19 és DYS389/I markerek esetében a különbség 2 repeat egységnyi, vagyis jelentős.

A vizsgált magyar, székely és mongol populációk haplotípusait összehasonlító elemzésnek vetettem alá, hogy kiderítsem, milyen a genetikai kapcsolat közöttük. Az összehasonlító elemzésnél kontrolpopulációkat (német, román, japán) is bevontam, melyek adatait megjelent közleményekből merítettem. Meghatároztam mekkora a genetikai távolság e populációk között. Az Y kromoszóma 3 STR markerével korábban elvégzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a Szeged környéki magyar populáció elkülönül más kaukázoid népességektől [Csete 1999].

Az Y-kromoszómán elhelyezkedő STR lokuszok molekuláris varianciaelemzésével mi is szignifikáns eltérést tapasztaltunk a vizsgált populációk között. A populációkon belüli különbség aránya itt is lényegesen magasabb volt a populációk közötti különbséghez viszonyítva. Az összvariancia 6,21%-át adta a populációk közötti komponens, ami lényegesen nagyobb érték, mint amit a szomatikus markerek esetében tapasztaltunk, tehát az Y-STR haplotípus alapján a populációk jobban elkülönültek egymástól, mint szomatikus markerek alapján.

A mongol populáció mindegyik vizsgált népcsoporttól szignifikánsan elkülöníthető, de ezek közül a magyar populációhoz áll a legközelebb, ezt követően pedig a székely populációhoz. A japán és mongol populációk szignifikánsan eltérnek és a Φ_{ST} értéke is viszonylag magas. Ez valószínűleg az összehasonlításban résztvevő populációk eltérő egyedszáma miatt tapasztalható. A székely, magyar, román és német populációk nem különülnek el egymástól. A székely populáció a román populációval mutat szoros genetikai kapcsolatot, és a német populációhoz is közelebb áll, mint a magyar népcsoporthoz. Az értékelést megnehezíti, hogy azok az adatok, melyeket a vizsgálat során felhasználtunk, olyan populációkból származtak, melyek nem tekinthetők ún. „tiszta” populációnak, tehát jelentős mértékű keveredés valószínűsíthető. A román populáció mintái például Bukarestből származnak, ahol jelentős mértékű a magyar lakosság aránya. Izolált román populációból származó adat azonban nem állt rendelkezésre.

A populációk páronkénti összehasonlításából eredményül kapott Φst értékekből számolt genetikai távolság alapján elmondható, hogy a magyar illetve székely populáció közelebbi kapcsolatban van a keleti népekkel, mint a német populációval. Ezt az eredményt támasztják alá finn kutatók által elvégzett vizsgálatok is [Lahermo

1999]. Különböző Y-STR tulajdonságok, illetve izoenzimek vizsgálata során a magyar populációban olyan jellegzetességeket találtak, melyek a távol-keleti népességben gyakoriak.

A magyar és az erdélyi székely népcsoportok között fennálló szomatikus és az Y-kromoszóma DNS-STR rendszerei között fennálló különbség pontosabb értékeléséhez genetikailag tiszta magyar népesség vizsgálata szükséges. Ehhez a marosvásárhelyi egyetemmel fennálló együttműködés segítségével Erdélyben élő izolált magyar népességből származó minták vizsgálatát kívánjuk elvégezni.

Az Y-STR adatbázis adataival való összehasonlítás eredményeként megállapítható, hogy az általunk vizsgált populációk egyike sem hordoz nagyobb számban olyan haplotípust, mely jellemző tipikus európai népcsoportokra. Mindhárom vizsgált csoportnál elsősorban német és lengyel populációk egyedeiben gyakori haplotípusokat találtunk. Ez annak köszönhető, hogy az adatbázisban ezek a populációk nagy egyedszámban vannak jelen. Ezenkívül a vizsgált populációk balti és török népcsoportokkal közös haplotípusokat is hordoztak. Figyelemre méltó, hogy a székely populáció egyik haplotípusa viszonylag nagy számban előfordul a finn lakosságban is, annak ellenére, hogy más vizsgálatok azt mutatták, nincs genetikai kapcsolat a finnek és a magyar populáció között [Lahermo 1999].

Vizsgálatunk eredményei alapján elmondható, hogy a polimorf STR rendszerek ugyan differenciálttá teszik a populációkat, de szerkezetükből, öröklődési és mutációs sajátságaikból adódóan mégis alkalmasak arra, hogy segítségükkel követhessük a rövid távú evolúciós lépéseket.

Eredményeinkből közleményben megjelent a székely populáció nyolc Y kromoszóma STR rendszerre vonatkozó elemzése, valamint a mongol populáció szomatikus és Y-STR vizsgálatának eredményei.
Sikeresen elvégeztük az Y-STR adatbázis által kért minőségi kontrolt, így magyar és székely populáció Y kromoszóma haplotípusai felkerültek az interneten mások számára is hozzáférhető Y-STR adatbázisba.

5. HIVATKOZÁSOK

Allen R.C., Graves G., Budowle B. (1989) Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamid gels and stained with silver. BioTechniques 7: 736-744.

Ayub, Q. et al. (2000) Identification and characterisation of novel human Y chromosomal microsatellites from sequence database information.
Nucl. Acids Res. 28, e8.

Barbarii LE, Rolf B, Dermengiu D.(2003) Y-chromosomal STR haplotypes in a Romanian population sample.
Int J Legal Med 117(5): 312-5.

Brenner C. and J. Morris (1989) Paternity index calculations in single locus hypervariable DNA probes: validation and other studies, p.21-53.
In Proceedings for the International Symposium on Human Identification 1989. Promega Corporation, Madison, WI.

Brinkmann B., Klintschar M., Neuhuber F., Hühne J., Burkhard R. (1998) Mutation rate in human microsatellietes: Influence of structure and length of repeat.
Am J Hum Genet 62: 1408-1415.

Budowle B., Chakraborty R. (2001) Population variation at the CODIS core short tandem repeat loci in Europeans.
Legal Med 3: 29-33.

Csete K., Schürenkamp M., Varga T. (1996)The STR systems HumVWA and Hum ACTBP2 in a Hungarian population.
Int J Legal Med 108:316-317

Csete K., Szabó A., Varga T. (1999) The Y-STRs DYS19 and DYS390 in South-East Hungarian (Szeged area) population.
Int J Legal Med 112:207-209

B. M. Dupuy, R. Andreassen, A- G. Flones, K. Tomassen, T. Egeland, M. Brion, A. Carracedo, B. Olaisen (2001) Y-chromosome variation ina Norwagian population sample.

J. Edelmann, R. Szibor (2003) The X-linked STRs DXS7130 és DXS6803
For Sci Int 136, 73-75

Excoffier L., Slatkin M. (1995) Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population.
Mol Biol Evol 12: 921-927

Füredi S., Woller J., Pádár Z. (1995) Hungarian population data for the STR systems TH01 and VWA.
Int J Legal Med 108: 48-49

Füredi S., Budowle B., Woller J., Pádár Z. (1996) Hungarian population data on six STR loci – HumVWF31, HumTH01, HumCSF1PO, HumFES/FPS, HumTPOX and HumHPRTB – derived ising multiplex PCR amplification and manual typing.
In J Legal Med 109: 100-101

Füredi S., Woller J., Pádár Z. (1997) A population study of the STR loci Hum LPL, HumF13B and HumF13A01 in Hungary.
Int J Legal Med 110: 107-108

Furedi S., Woller J., Padar Z., Angyal M. (1999)Y-STR haplotyping in two Hungarian populations.
Int J Legal Med. 113(1):38-42.

Gill, P. et al. (2001) DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs.
Intl. J. Legal Med. 114, 305–9.

L. Gusmao, A. Carracedo (2003) Y-Chromosome-Specific STRs.
Profiles in DNA Vol.6 No.1, 3-6.

Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985) Individual-specific finger-prints of human DNA.
Nature 316:76-79

Jobling M.A., Pandya A., Tyler-Smith C. (1997) The Y-chromosome in forensic analysis and paternity testing.
Int J Legal Med 110:118-124

http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html

Iida, R. Tsubota E., Matsuki T. (2001) Identification and characterization of two novel human polymorphic STRs on the Y chromosome.
Intl. J. Legal Med. 115, 54–6.

Iida, R. Tsubota E., Sawazaki K., Masuyama M., Matsuki T., Yasuda T., Kishi K. (2002) Characterization and haplotype analysis of the polymorphic Y-STRs DYS443, DYS444 and DYS445 in a Japanese population.
Intl. J. Legal Med. 116, 191–4.

Kayser M., Sajantila A. (2001) Mutations at Y-STR loci: implications for paternity testing and forensic analysis.
For Sci Int 118: 116-121.

C. Keyser-Tracqui, D. Montagnon, P. Blandin, Z. Beer, H. Pamjav, E. Crubézy and B. Ludes (2002) A comparison of Y-chromosomal and autosomal STR data in past and present-day Mongolian populations
III. International Forensic Y-User Workshop, 2002. november 7-9. Porto, Portugalia

De Knijff P (1998): www.medfac.leidenuniv.nl/fldo

Kozma Z., Wiegand P. (1994) Investigation of the STR systems Hum ACTBP2 (SE33), HumTH01(TC11) and Hum VWA in Hungarian population.
Zentrelblatt Rechtsmedizin 42:423

Kozma Z., Bajnoczky I., Nishi K. (1997) Allele frequency distribution of the STR systems Hum Vwa, HumFES/FPS and Hum F13A01 in two racial groups: Hungarian and Japanese population data.
Advances in Legal Medicine 3:578-583

Lahermo P., Savontaus M.L., Sistonen P., Knijff P., Aula P., Sajantila A. (1999) Y chromosomeal polymorphisms reveal founding lineages in the finns and the saami. Eur J Hum Genet 7:447-458

Lahr M.M. and Foley RA. (1994) Multiple dispersals and modern human origins.
Evol. Anthropol. 3, 48-60

Laszik A., Weisser H.-J., Keresztury L., Pollak S. (1999) Allele frequencies for the VNTR locus D17S5 (YNZ22) in Hungary.
Int J Legal Med 112:336

Laszik A., Sotonyi P., Rand S., Hohoff C. (2001) Frequency data for the STR locus ACTBP2 (SE33) in eight populations.
Int J Legal Med 115:94-96

László Gyula: Hunor és magyar nyomában Gondolat, Bp 1967

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1998) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
Nucleic Acids Res 16: 1215

For Sci Int 117; 163-173

Nei M: Molecular Evolution Genetics. Columbia University Press, New York 1987.

Ridley M.: Evolution, Oxford University Press, Oxford 1998

Roewer L., Kayser M., de Knijff P., Anslinger K., Betz A., Caglir A., Corach D., Füredi S., Henke L., Hidding M., Kargel HJ., Lessig R., Nagy M., Pascali VL., Parson

W., Rolf B., Schmitt C., Szibor R., Teifel-Greding J., Krawczak M (2000) A new method for the evaluation of matches in non-recombining genomes: application to Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes in European males.
For Sci Int 114:31-43

Roewer L, Krawczak M, Willuweit S, Nagy M, Alves C, Amorim A, Anslinger K, Augustin C, Betz A, Bosch E, Cagli A, Carracedo A, Corach D, Dekairelle A-F, Dobosz T, Dupuy BM, F|redi S, Gehrig C, Gusmao L, Henke J, Henke L, Hidding M, Hohoff C, Hoste B, Jobling MA, Krgel H-J, De Knijff P, Lessig R, Liebeherr E, Lorente M, MartPascali VL, Penacino G, Ploski R, Rolf B, Sala A, Schmidt U, Schmitt C, Schneider PM, Szibor R, Teifel-Greding J, Kayser M (2001) Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes.
For Sci Int 118 (2-3): 106-113

Sasaki M., Dahiya R. (2000) The polymorphisms of various short tandem repeats on the Y chromosome in Japanese and German populations
Int J Leg Med 113:181-188

Singer-Sam J., Tanguay R.L., Riggs A.D. (1989) Use of chelex to improve the PCR signal from a small number of cells.
Amplifications 3: 11

Slatkin M. (1995) A measure of population of subdivision based on microsatellite allele frequencies
Genetics 139:457-462

S. Schneider, D. Roessli, and L. Excoffier (2000) Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland

J. Y. Son, Y. S. Lee, C. M. Choung and S. D. L. (2002) Polymorphism of nine X chromosomal STR loci in Koreans.
Int J Legal Med 116 (6): 317-21

Stoneking, M. (1993) DNA and recent hman evolution.
Evol. Antropol. 2, 60-73.

Szabo A., Schuremkamp M., Huhne J. (1996) Hungarian population data for six STR loci.
Int J Legal Med 108:316-317

Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material.
BioTechniques 10: 506-513

White, PS., Tatum OL., Deaven LL., Longmire JL. et al. (1999) New, male-specific microsatellite markers from the human Y chromosome.
Genomics 57, 433–7.

Wright S. (1951) The genetic structure of populations
Ann Eugen 15:323-354

www.promega.com/geneticidtools/powerstats

www.ystr.org

Zerjal T., Xue Y., Bertorelle G., Wells R., Bao W., Zhu S., Quamar R., Ayub Q., Mohyuddin A., Fu S., Li p., Yuldasheva N., Ruzibakiev R., Xu J., Shu Q., Du R., Yang H., Hurles M., Robinson E., Gerelsaikhan T., Dashnyam B., Mehdi Q., Tyler-Smith S (2003) The Genetic Legacy of the Mongols.
Am J Hum Genet 72: 717-721

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Prof. Dr. Varga Tibor tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette számomra az SZTE ÁOK Igazságügyi orvostani Intézetében PhD munkám elkészítését, és köszönöm a munkám során nyújtott elméleti és gyakorlati tanácsait.

Köszönetet mondok Dr. Csete Klára egyetemi docensnek a szakmai munkámban nyújtott odaadó segítségét.

Köszönöm Balásné Déri Máriának és Molnárné Lauly Emesének gyakorlati munkámban nyújtott segítségüket, továbbá Dr. Pénzes Zsoltnak, a populációgenetikai számítások terén nyújtott elméleti és gyakorlati tanácsait.

Köszönettel tartozom a vizsgálatokhoz szükséges minták gyűjtéséért Dr. Farkas-Hegyi Évának, Korond családorvosának, Dr. Csete Klárának, valamint Dr. Pamzsav Horolmának.

Köszönet illeti a strasbourgi Louis Pasteur Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetének munkacsoportját, akikkel együttműködve határoztuk meg a mongol populáció eredményeit.

Végül köszönetet mondok intézetünk valamennyi dolgozójának tanácsaikért, támogatásaikért.

ÖSSZEFOGLALÓ

1. Bevezetés

A manapság történészeink által leginkább elfogadott elmélet a magyart a finnugor nyelvek közé, a magyar népet pedig a finnugorok közé sorolja. Az ősmagyarok a Nyugat-Szibériai őshazából az i.e. II. évezredben kezdték meg vándorlásukat dél-nyugati irányba, s vándorlásuk során más népekkel, törökökkel, mongolokkal találkoztak. Egy ideig együtt vándoroltak, közben keveredtek is egymással. Végül i.sz. IX. sz.-ban letelepedtek a Kárpát-medencében. Általánosan elfogadott az a nézet, miszerint a magyarok a székely népcsoporttal együtt vándorolt és együtt telepedett le.

A kettős honfoglalás elmélet szerint viszont a székelyek néhány száz évvel korábban, tehát még a magyarok előtt megérkeztek a Kárpát-medencébe és telepedtek le. Ma a székelyeket magyaroknak tekintjük, mivel magyarul beszélnek, de szokásaikban, kultúrájukban különböznek a magyaroktól. Ők magukat nem Árpád népétől, hanem Attilától eredeztetik, de valódi eredetük a mai napig tisztázatlan.

A különböző népcsoportok, populációk eredetének genetikai vizsgálata már több mint egy évtizede foglalkoztatja a tudósokat. Különböző genetikai markerek alapján számos eredményt értek már el. Leginkább olyan markerek vizsgálata alkalmas a kis mértékű evolúcionáris lépések elemzésére, melyek változásai fennmaradnak a genomban, nincsenek kitéve a természetes szelekciónak, de viszonylag magas a mutációs rátájuk, így változásaik jól követhetőek. Ilyenek például a mitokondriális DNS (mtDNS) hipervariábilis régiói, illetve a sejtmagi DNS short tandem repeat (STR) rendszerei. Az STR-ek, olyan tandem repeatek, melyeknél 2-6 bp ismétlődik 6-40-szer egymás után. Egy adott STR marker egyes alléljei az ismétlődések számában különböznek egymástól. Minden kromoszómán van short tandem repeateket tartalmazó régió, a gének közötti, illetve a génen belüli nem-kódoló szakaszokban. Az igazságügyi gyakorlatban szükségessé vált olyan STR markerek alkalmazása, melyek megfelelően polimorfak, tehát lehetőleg több alléllel rendelkeznek és ezek eloszlása a populációban sokféleséget eredményez. A szomatikus kromoszómákon található STR-ek gyakori rekombinációnak vannak kitéve, ennél fogva elsősorban a populációk

polimorfizmusának vizsgálatára, illetve az igazságügyi gyakorlatban rendkívül fontos személyazonosításra alkalmasak. Ez utóbbihoz pedig szükséges a populációk polimorfizmusának felmérése. Az Y kromoszóma STR markerei a szomatikus STR rendszereknél alkalmasabbak a populációk közötti kapcsolatok vizsgálatára, mivel nincsenek kitéve rekombinációnak, illetve kapcsoltan öröklődnek. Az STR markerek mutációja alkalmával a repeat egységek száma nő vagy csökken. Ezt a sajátosságot a genetikai távolság felmérésénél figyelembe lehet venni, így pontosabb értéket kapunk.

Munkám célja az volt, hogy felmérjem kilenc szomatikus STR rendszer (D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D18S51, D21S11, FGA, VWA,) valamint 8 Y kromoszóma STR rendszer (DYS19, DYS385, DYS389/I,II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393) allélelosztlását a magyar és székely populációban, valamint ezen populációk összehasonlítása és genetikai távolságának meghatározása. Az összehasonlító vizsgálatokhoz szükséges volt, hogy más európai népcsoportok adataival is elvégezzük az összehasonlítást. Mivel a korábbi vizsgálatok is azt igazolták, hogy a magyar populáció az ázsiai populációkkal közelebbi kapcsolatot mutat, mint más európai populációk, célszerű volt felmérést végezni a mai mongol populációban is.
További célunk az volt, hogy a vizsgálataink során eredményül kapott Y-STR haplotípusok felkerüljenek az Y-STR adatbázisba, ahol a világ különböző populációinak haplotípusadatai szerepelnek.

2. Anyagok és módszerek

Vizsgálatainkhoz mintát biztosítottunk magyar populációból (100 férfi, 101 nő) Szegedről és környékéről, korondi (99 férfi) izolált székely populációból, valamint Magyarországon munkát vállalt, egymással rokonságban nem álló mongol (56 férfi, 48 nő) személyektől. Könyökvénából biztosítottunk alvadásgátolt vért, melyet vászonanyagra felvíve beszárítottunk és tároltuk. Az extrakció a korondi és mongol minták esetében e tárolt mintákból történt, míg a szegedi mintáknál folyékony vérből végeztük az extrakciót.
Az EDTA-s (alvadásgátolt) vérből a DNS kinyerését kisózásos módszerrel/Miller és mtsai alapján/végeztük. A vérfoltok egy részét Chelex 100 segítségével, másik részét

fenol-kloroformos extrakcióval végeztük. A kinyert DNS koncentrációját DyNA Quant 2000 Fluorometer (Hoefer) segítségével határoztuk meg.

A szomatikus csoportok vizsgálatához a DNS STR szakaszokat multiplex reakcióban, fluoreszcens festékkel jelölt primerekkel Profiler Plus (Applied Biosystems), illetve AmpFlSTR Identifiler (Applied Biosystems) kitek segítségével amplifikáltuk az előállító utasításai szerint. Az Y-kromoszómán lokalizálódó STR tulajdonságok vizsgálatához a kinyert DNS-t részben külön-külön amplifikáltuk, részben multiplex reakcióként fluoreszcens festékkel jelzett kiteket – Y-PLEX^{TM}6 (Reliagene), DYSplex-1, DYSplex-2 (Serac) - alkalmaztunk.

Az allélek elválasztása poliakrilamid gélen történt. Horizontális gélen végeztük azon allélek szeparációját, melyek felamplifikálása jelöletlen primerekkel történt. A jelölt primerekkel felsokszorozott fragmenteket kapilláris gélelektroforézis (ABI Prism 310 és 3100 Genetic Analyzer) segítségével választottuk el. A ferogramokat GeneScan ver. 2.1. szoftver segítségével dolgoztuk fel.

Az eredményekből a populációk általános jellemzésére kiszámoltuk az allélgyakorisági értékeket, a diszkriminációs erőt (PD), a kizárási hatékonyságot (PE) és a polimorfizmusra jellemző értéket (PIC). Az értékek kiszámításához a PowerStatsV12.xls programot alkalmaztuk. A populációk szerkezetének felmérésére AMOVA elemzést végeztünk el ARLEQUIN szoftverrel, mind a szomatikus, mind az Y-STR rendszerekre vonatkozóan. A páronkénti F_{ST} értékekből genetikai távolságot számoltunk a vizsgált populációk között, felhasználva az irodalomban megjelent német, román és japán populációk adatait is. A Phylip program segítségével a populációk közötti genetikai kapcsolatot jellemző fát rajzoltunk.

Az Y-STR haplotípus adatainkat összevetettük az európai és ázsiai adatbázisban szereplő populációk adataival.

2. Eredmények és értékelés

A vizsgált populációk allélgyakorisági értékei megfeleltek a Hardy-Weinberg egyensúlynak, kivéve a Korondról származó székely populáció egy szomatikus STR tulajdonságát (D7S820). Az eltérés oka a vizsgált minta zártsága lehet, ami a random mintavételezés ellenére kis létszámú populációnál előfordulhat.

A Szeged környéki magyar populációra jellemző allélgyakorisági értékek, melyeket az autoszomális STR rendszereknél tapasztaltunk, általánosan jellemzőek egész Európában.

A kilenc szomatikus STR marker közül négy rendszer mutatott különbséget a magyar és a székely populáció között abban a tekintetben, hogy melyik allél a leggyakoribb a populációban. A mongol szomatikus markerek mindössze 3-3 rendszerben egyeztek meg a magyar illetve székely populációval a leggyakoribb alléltípus szempontjából.
A populációk összehasonlító elemzésénél szomatikus markerek vizsgálata azt mutatta hogy az egymástól függetlenül öröklődő, polimorf jellegek alapján a vizsgált magyar-székely illetve székely-mongol populációk között szignifikáns különbség mutatható ki, bár a populáción belüli variancia sokkal nagyobb a populációk közötti varianciához (2,12%) viszonyítva. A magyar és a mongol populáció között nagyobb mértékű a differenciálódás, mint a mongol és székely populációk között. A magyar és székely populáció genetikai távolsága minimális (F_{ST}=0,008).

A nyolc Y-STR markerből két rendszer esetében (DYS389/II, DYS390) különbözik a leggyakoribb alléltípus a magyar és a székely populáció között. Jelentős különbséget tapasztalunk a DYS389/I és DYS389/II markerek esetében, ahol az eltérés több mint egy allél, ami nagyobb különbségre utal a két populáció között.
Az Y-kromoszómán elhelyezkedő STR markerek molekuláris varianciaelemzésével szignifikáns eltérést tapasztaltunk a populációk között, annak ellenére, hogy a populációkon belüli különbség aránya itt is lényegesen magasabb volt a populációk közötti különbséghez viszonyítva. Az összvariancia 6,21%-át adja a populációk közötti komponens, tehát az Y-STR haplotípus alapján a populációk jobban elkülönülnek egymástól, mint szomatikus markerek alapján.
A mongol populáció mindegyik vizsgált népcsoporttól szignifikánsan elkülöníthető, de ezek közül a magyar populációhoz áll a legközelebb, ezt követően pedig a székely populációhoz. A japán és mongol populációk szignifikánsan eltérnek és az Φ_{ST} értéke is viszonylag magas. Ez valószínűleg az összehasonlításban résztvevő populációk eltérő egyedszáma miatt tapasztalható. A székely, magyar, román és német populációk nem különülnek el egymástól. A székely populáció a román populációval mutat szoros genetikai kapcsolatot, és a német populációhoz is közelebb áll, mint a magyar népcsoporthoz.
A populációk páronkénti összehasonlításából eredményül kapott Φst értékekből számolt genetikai távolság alapján elmondható, hogy a magyar illetve székely populáció közelebbi kapcsolatban van a keleti népekkel, mint a német populációval.

Az Y-STR adatbázis adataival való összehasonlítás eredményeként megállapítható, hogy az általunk vizsgált populációk egyike sem hordoz nagyobb számban olyan haplotípust, mely jellemző tipikus európai népcsoportokra. Mindhárom vizsgált csoportnál elsősorban német és lengyel populációk egyedeiben gyakori haplotípusokat találtunk. Ez annak köszönhető, hogy az adatbázisban ezek a populációk nagy egyedszámban vannak jelen. Ezenkívül a vizsgált populációk balti és török népcsoportokkal közös haplotípusokat is hordoztak.

Vizsgálatunk eredményei alapján elmondható, hogy a polimorf STR rendszerek ugyan differenciálttá teszik a populációkat, de szerkezetükből, öröklődési és mutációs sajátságaikból adódóan mégis alkalmasak arra, hogy segítségükkel követhessük a rövid távú evolúciós lépéseket.

Eredményeinkből közleményben megjelent a székely populáció nyolc Y kromoszóma STR rendszerre vonatkozó elemzése, valamint a mongol populáció szomatikus és Y-STR vizsgálatának eredményei.
Sikeresen elvégeztük az Y-STR adatbázis által kért minőségi kontrolt, így magyar és székely populáció Y kromoszóma haplotípusai felkerültek az interneten mások számára is hozzáférhető Y-STR adatbázisba.

ABSTRACT

1. Introduction

The early home of ancient Hungarians was in West Siberia. In the II. millennia before Christ ancient Hungarians started to move towards Southwest direction. During migration they met other people (Mongolians, Turkish people) and mixed with them. After centuries of migration they settled down in the Karpathian-basin in the IX. century after Christ. It is generally admitted that Szekely people were migrated together with ancient Hungarians and they settled down together with them. The hypothesis of double conquest of Hungary says that Szekely people arrived at the Karpathian-basin some hundred years before the Hungarians. Nowadays Szekelys are known as a Hungarian people but their customs and subculture makes them a little bit different from other Hungarian populations. Szekelys think that they are originated not from the people of Arpad but from people of Attila.

The origin of different populations has been the field of intense research for more decades. The examinations of different genetic markers have already given some results. Markers which has high mutation rate but are not impressed by natural selection so they stay with their changes in the genome are useful for examining the evolution in short period of time. These markers are the hypervariable region of mitochondrial DNA (mtDNA) and short tandem repeats (STR) of nuclear DNA. In STRs the 2-6 bp long repeat units are present in 6-40 tandem copies. Alleles of STR markers differ from each other in the number of repeat units. STRs are present on every chromosome in the non-coding region of inter- and intragenic sequences. In the practise of forensic genetics polymorphic markers are used which have several alleles and the distribution of alleles causes diversity in the population. Though somatic STR markers are usually under recombination they are useful for detection of personal identification. In forensic genetic practice it is necessary to establish the polymorphism of populations in somatic and Y chromosome STR markers. Y-STR markers are more useful for examination of relationships of different populations because they don’t have recombination and they are linked. Mutation of STR systems causes changes in the number of repeat units. This speciality can be used for the calculation of genetic distance between populations.

The aim of my work was to determine the allele distribution of nine somatic (D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D18S51, D21S11, FGA, VWA) and eight Y chromosome (DYS19, DYS385, DYS389/I,II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393) STR systems in Hungarian and Szekely populations and to establish the genetic distance between these populations. For the comparison it was necessary to use the data of other European populations. Earlier results showed that Hungarian population is genetically closer to Asian populations than other European populations we decided to examine the present Mongolian people.

The other important aim was for our result to be involved to the Y-STR Haplotype Reference Database where data of other populations from all over the world are reachable for everyone.

1. Materials and methods

Blood samples were collected from Hungarian population (100 males, 101 females) from Szeged and its environment; from isolated Szekely population (99 males) populated Coround in Transylvania and from Mongolians (56 males, 48 females) living in Hungary but originated from Mongolia. Blood samples were transferred to cotton swab for storing. DNA extraction was performed from the whole blood in case of Hungarian samples and from bloodstains in case of Szekely and Mongolian samples.

From whole blood samples DNA extraction was performed with the salting out method of Miller et al. From bloodstain samples DNA was extracted partly with Chelex 100 solution and partly with phenol-chloroform methodology. Concentration of DNA was measured by DyNA Quant 2000 Fluorometer (Hoefer).

DNA fragments of somatic STR markers were amplified in multiplex PCR reaction with fluorescently labelled primers using Profiler Plus (Applied Biosystems) and AmpFlSTR Identifiler (Applied Biosystems) kits. Y-STR markers were amplified either by singleplex or multiplex reactions. For multiplex PCR fluorescently labelled primers were used in kits of Y-PLEX^{TM}6 (Reliagene), DYSplex-1, DYSplex-2 (Serac) kits.

Allele separation was performed in polyacrylamid gel. Non-labelled fragments were separated with horizontal gel electrophoresis and fluorescently labelled fragments were separated with capillary gel electrophoresis (ABI Prism 310 and 3100 Genetic Analyzer). Pherograms were analysed by GeneScan software ver. 2.1..

For describing the examined populations, allele frequencies, power of discrimination (PD), power of exclusion (PE) and polymorphism informed concern (PIC) were determined by PowerStatsV12.xls program. Determination of population structures were performed with AMOVA analysis by ARLEQUIN software. Genetic distances between populations were calculated from pairwise F_{ST} values involving published data of German, Romanian and Japanese populations. A tree was constructed by Phylip program to illustrate the genetic relationship between populations.

Our haplotype data were compared to other European and Asian data in the Y-STR Haplotype Reference Database.

2. Results and discussion

The examined populations were in Hardy-Weinberg equilibrium for all markers except one somatic marker in Székely population (D7S820) which could be due to isolation of populations.

The allele frequency values of somatic markers in Hungarian population are usually in all Europe.

The most frequent allele was different in four from the nine somatic STR markers between Hungarian and Szekely populations and only 3 were the same in Hungarian-Mongolian and Szekely-Mongolian comparison.

AMOVA analysis showed that although variance within populations was much higher than variance between populations there is significant difference between Hungarian-Szekely and Szekely-Mongolian populations. Differentiation between Hungarians and Mongolians is higher than between Mongolians and Szekelys by somatic STR markers. Genetic distance of Hungarian-Szekely populations is very low.

The most frequent allele was different in two Y chromosome STR markers between Hungarian and Szekely populations. There is meaningful difference between these populations in DYS389/I and DYS389/II markers where the difference between the most frequent alleles were two repeat units.

The analysis of molecular variance by Y-STR markers showed that there is significant difference between the examined populations. The variance within populations was very low but the value was higher than in case of somatic markers which means that Y-STR markers can differentiate the populations more than somatic markers.

The F_{ST} values showed that Mongolians differ from every of the examined populations in the highest level, but the Hungarian and Szekely populations are the closest to them. Japanese and Mongolian populations are significantly different with a quite high Φ_{ST} value. This value could be due to the big difference between sample number in the populations. The genetic distance between Szekely, Hungarian, Romanian and German populations are close to zero. The Hungarian and Szekely population is genetically closer to Asian people than to German population.

The results of the comparison in Y-STR database shows that the haplotypes of the examined populations are different from the typical European haplotypes. The haplotypes were frequent in German and Polish populations due to the fact that large numbers of samples of these populations are present in the database. Also Baltic and Turkish populations had the same haplotypes like the examined Hungarian and Szekely populations.

The results of our examination indicate that although polymorphic STR systems can make the populations being differentiated because of their structure and speciality of their inheritance and mutation, they are useful in analysis of short period evolution.

Description of Szekely population by eight Y chromosome STR markers and Mongolian population by somatic and Y-STR markers have already published.

After our laboratory successfully made quality control for Y chromosome STR markers the haplotypes of Hungarian and Szekely populations have been deposited in the Y-STR Haplotype Reference Database.

Az értekezés témájában konferenciákon való részvétel:

Előadás:

Beer Zs., Csete K., Varga T.
Comparison of two isolated "Hungarian" populations to Szegedian (mixed) population by somatic- and Y-chromosomes
Allpe-Adria-Pannonia Congress, Croatia, Opatija, 2001. június 23-26

Beer Zs., Pénzes Zs., Farkas-Hegyi., Csete K., Varga T.
Analysis of nine STR loci in an isolated Szekely population
Alpe-Adria-Pannonia Congress, Visegrád, 2002. május 3-5.

Varga T., Keyser C., **Beer Zs**., Pénzes Zs., Pamzsav H., Csete K., Ludes B
STR data analyses in Mongolian population
Alpe-Adria-Pannonia Congress, Visegrád, 2002. május 3-5.

T. Varga, C. Keyser, **Zs. Beer** , Zsolt Penzes, H. Pamzsav, K. Csete, B. Ludes
STR data analysis in Mongolian population
Fifth International Symposium on Advances in Legal Medicine, 2002. Okt. 1-4 Takayama, Japán.

K. Csete, **Zs. Beer**, T. Varga
DNA Untersuchungen in Ungarischen Paternitätsfälle
Alpe-Adria-Pannonia Congress, Visegrád, 2002. május 3-5.

C. Keyser-Tracqui, D. Montagnon, P. Blandin, **Z. Beer**, H. Pamjav, E. Crubézy and B. Ludes
A comparison of Y-chromosomal and autosomal STR data in past and present-day Mongolian populations
III. International Forensic Y-User Workshop, 2002. november 7-9.
Porto, Portugalia

K. Csete, **Zs. Beer**, T. Varga
Prenatal and newborn paternity testing with DNA analysis
Alpe-Adria-Pannonia Congress, Rogaska Slatina, Slovenia, 2003

Zs. Beer, E. Frakas-Hegyi, K. Csete, T. Varga
Y-chromosome STR analysis in a Szekely population
Alpe-Adria-Pannonia Congress, Rogaska Slatina, Slovenia, 2003

Poszter:

Beer Zs., Pénzes Zs., Csete K., Varga T.
Comparison of two isolated „Hungarian" populations to Szegedian (mixed) population by Y-chromosomes
ISFG Congress, Germany, Muenster, 2001. aug. 28-szeptember 1.

Beer Zs., Csete K., Varga T.
Examination of the genetic distance between a mixed Hungarian and two isolated Szekely population by Y-chromosome STR systems
The second European-American training course in Forensic Genetics Croatia, Dubrovnik, 2001. szept. 3-14

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

Beer Zs., Csete K., Varga T.
Comparison of two isolated „Hungarian" populations to Szegedian (mixed) population by somatic- and Y-chromosomes
Croatian Medical Association 2001, 115-119

Beer Zs., Pénzes Zs., Farkas-Hegyi., Csete K., Varga T.
Analysis of nine STR loci in an isolated Szekely population
11th International meeting on Forensic Medicine Alpe-Adria-Pannonia Proceedings, 2002, 17-20

Varga T., Keyser C., **Beer Zs**., Pénzes Zs., Pamzsav H., Csete K., Ludes B
STR data analyses in Mongolian population
11th International meeting on Forensic Medicine Alpe-Adria-Pannonia Proceedings, 2002, 21-24

Beer Zs., Pénzes Zs., Csete K., Varga T.
Comparison of two isolated „Hungarian" populations to Szegedian (mixed) population by Y-chromosomes
International Congress Series (in press)

Beer Zs., Pénzes Zs., Farkas-Hegyi É., Csete K., Varga T
Population genetics of nine STR loci – D3S1358, VWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317 AND D7S820 – in a Szekely population from Transsylvania
Forensic Science International (submitted for publication)

Zs. Beer, K. Csete, T. Varga
Y-chromosomal STR haplotype in Szekely population
Forensic Science International (2004) 139(2-3):155-158

T. Varga, C. Keyser, **Zs. Beer** , Zs. Penzes, H. Pamzsav, K. Csete, B. Ludes
STR data analysis in Mongolian population

Legal Medicine 5 (2003) S156-159

Zs. Pénzes, Gy. Csanádi, G. M. Kovács, **Zs. Beer**
Molecular markers in ecology
Tiscia 33:9-30 (2002))