

**Populációgenetikai és diagnosztikai célú mitokondriális DNS és autoszómális marker vizsgálatok Magyarországon feltárt régészeti csontleletekből és modern mintákból**

**Bogácsi-Szabó Erika**

Ph.D. értekezés tézisei

Témavezető: Prof. Dr. Raskó István

Szegedi Tudományegyetem, Molekuláris és sejtbiológiai Ph.D. program

MTA Szegedi Biológiai Központ  
Genetikai Intézet

Szeged

2006

## BEVEZETÉS

Magyarország Európa szívében, a Kárpát-medencében fekszik. A vidék a civilizáció hajnalától fogva emberlakta hely és kultúrák keveredésének színtere. A magyarság sok népnek az ötvözete, amelyek az őskőkortól napjainkig telepedtek le a Kárpát-medencében. Egy ilyen csoportot alkottak a kunok is. A kunokról folyamatos történelmi feljegyzések a 10. századtól vannak. Ennek oka az lehet, hogy nagyjából ebben az időben érték el Európa határát. A kunok a 12-13. században telepedtek le Magyarországon. Régészeti elemzések szerint ez a népcsoport valószínűleg ázsiai eredetű, antropológiai jellegeik alapján a kunok főként a mongoloid embertani típusba sorolhatók, azonban genetikai eredetük mindezülig nem ismert (Horváth, 2001).

Populációk eredetének vizsgálatára kétféle lehetőség van. Egyrészt, a ma élő populációk genetikai szerkezetének tanulmányozása, másrészt történelmi populációk maradványainak genetikai analízise. A kunok mára genetikailag és kulturálisan teljesen beolvadtak a magyarországi népességbe, ezért ha genetikai eredetüket, rokonsági viszonyukat akarjuk tanulmányozni, az csakis archaikus leletek vizsgálatával lehetséges. Olyan ősi kun leletek vizsgálatára van szükség, akik a Magyarországra való betelepülés után még azelőtt haláloztak el, mielőtt genetikailag beolvadhattak volna a korai magyarországi népességbe.

Munkánk első részében egy középkori kun csoport, valamint a mai magyar populáció genetikai eredetét és anyai rokonsági viszonyait tanulmányoztuk mitokondriális markerek vizsgálatával.

A mitokondriális genom anyai ágon öröklődik (Giles et al., 1980). A hisztonok vagy más fehérjék által nem védett mitokondriális DNS-ben (mtDNS) a mitokondrium működése során képződött nagy mennyiségű szabad oxigén-gyök oxidatív károsodásokat idéz elő. A mitokondriális genom mutációs rátája közel 10-szerese a nukleáris genomra jellemző értéknek (Richards and Macaulay, 2001). A filogenetikai szempontból fontos pozíciók nyalábokat, haplocsoportokat határoznak meg. A haplocsoportok jellegzetes földrajzi megoszlást mutatnak (Torroni and Wallace, 1995). Ezért a mtDNS mutációi alapján nyomon követhetjük az anyai vonalak geográfiai elterjedését, az emberi vándorlási vonalakat. Vizsgálatával populációk rokonsági viszonyaira következtethetünk (Vigilant et al., 1991). A mtDNS több száz, ezer kópiában van jelen egyetlen sejtben, ezért ősi leletekben nagyobb az esélye annak, hogy épen maradt, molekuláris biológiai módszerekkel vizsgálható mitokondriális DNS szakaszokat találjunk, a sejtenként csupán két kópiában jelenlévő kromoszómális markerekkel szemben. Munkánk első részében ezért a mitokondriális DNS analízisére koncentráltunk.

Az ősi DNS (aDNS) vizsgálatokhoz szükséges örökítőanyagot csöves csontokból nyertük. Ásatag biológiai csontmaradványokban általában csekély mennyiségű, erősen töredezett DNS marad meg, bázisai gyakran oxidatív vagy hidrolitikus károsodásokat szenvednek (Paabo et al., 2004). Eredményeink hitelességének érdekében nagy gondot kell fordítanunk arra, hogy elkerüljük a nem endogén DNS-sel való kontaminációt. Ezért a vizsgálatokat erre a célra elkülönített laboratóriumi helyiségekben végezzük. A csontleleteket DNS mentes körülmények között dolgozzuk fel, minden kísérleti lépésnél a szükséges kontrollok felhasználásával.

Vizsgálataink során elsőként tanulmányoztuk az egyik olyan keleti lovas nomád népcsoportot az aDNS alapján, amely több, más pásztor nomád népcsoportéhoz hasonlóan a 13. század folyamán érkezett Európába –jelen esetben a Kárpát-medencébe. Magyarországon elsőként alkalmaztunk archaeogenetikai vizsgálatokat régészeti csontleletek tanulmányozásához.

Munkánk második részében egy autoszómális SNP marker ásatag leleteken történő vizsgálati módszerét dolgoztuk ki. Olyan SNP markert tanulmányoztunk, amely szisztematikus földrajzi tagozódást mutató állapottal hozható összefüggésbe. Linkage disequilibrium és haplotípus analízissel finn családokban egy, a laktáz géntől 5' irányban 13910 bázispárryira azonosítottak egy olyan genetikai variánst, amely szoros kapcsoltságot mutatott az öröklött laktáz hiánnyal/perzisztenciával (Enattah et al., 2002). A felnőtt-típusú laktóz intolerancia kialakulásáért felelős génvariánst vizsgáltuk (–13910C/T polimorfizmus).

A laktóz érzékeny felnőttek homozigóták egy autoszómális recesszív allélra nézve. A –13910T mutáns allél domináns a vad típusú C variáns fölött. A felnőtt-típusú laktóz intolerancia széleskörű etnikai variációt mutat, előfordulási gyakorisága az európai populációban 3-70%; Kelet- és Dél-Kelet Ázsiában közel 100% (Swallow, 2003). A laktóz intolerancia különböző életkorban alakul ki az egyes népcsoportokban.

A felnőtt-típusú laktóz emésztő képességgel kapcsoltságot mutató variáns (-13910C/T) vizsgálatát a balatonújlaki temetőből származó csontleletek esetében kíséreltük meg elvégezni.

Meghatároztuk a polimorfizmus előfordulási gyakoriságát a mai magyar populációban.

Az SZTE Gyermekgyógyászati Klinikával együttműködve tanulmányoztuk az általunk kidolgozott vizsgálati módszer alkalmazhatóságát a felnőtt-típusú laktóz intolerancia diagnosztizálására gyermekkorban.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### I. Mitokondriális DNS vizsgálatok

#### *minták:*

- két, régészetileg jól dokumentált temetkezési helyről származó, a kun etnikumhoz tartozó 11 emberi csontmaradvány (a leletek a 14-15. századból származtak)
- a mai modern magyar populációt reprezentáló, az ország különböző régióiból származó, 74 magát magyarnak valló személy haj és vérmintája

#### *módszerek:*

- 1, DNS izolálás az ásatag csontleletekből (Kalmar et al., 2000), valamint modern hajsál és vérmintákból (Walsh et al., 1991)
- 2, a mitokondrium kontroll és kódoló régiójának vizsgálata PCR módszerrel
- 3, poliakrilamid gélelektroforézis
- 4, a PCR termékek tisztítása, és direkt szekvenálása
- 5, a PCR termékek klónozása és szekvenálása
- 6, a PCR termékek restriktív emésztése
- 6, a modern DNS-sel való kontamináció lehetőségének kizárása
- 7, a populációk közötti genetikai távolság becslése

### II. Laktóz intolerancia vizsgálatok

#### (a –13910C/T variáns tanulmányozása)

#### *minták:*

- a balatonújlaki temetőből származó öt csontlelet  
A leletek a 10. századból származnak, régészeti interpretáció alapján „klasszikus” honfoglaló leletanyaggal voltak eltemetve
- a mai magyar populációt reprezentáló, 110 random kiválasztott egyén szájüregi kenet mintája
- 149 hasi panaszokkal rendelkező gyerek szájüregi kenet/ hajsál mintája

### ***módszerek:***

- 1, DNS izolálás az ásatag csontleletekből (Qiagen, Dneasy Tissue Kit), valamint modern szájúregi kenet/hajszál mintákból (Walsh et al., 1991).
- 2, teljes genom előamplifikáció (PEP-Primer Extension Preamplification)(Zhang et al., 1992)
- 3, a –13910 polimorfizmust hordozó régió amplifikációja dCAPs-PCR módszerrel (Neff et al., 1998)
- 4, poliaklilamid gélelektroforézis
- 5, a PCR termékek restrikciós emésztése
- 6, a restrikciós emésztés eredményének megállapítása Automatizált lézer fluorescens (ALF) fragment analízáló rendszerrel az ásatag minták esetében

### **EREDMÉNYEK, KÖVETKEZTETÉSEK:**

A kun minták hat különböző haplocsoportba tartoznak. A tizenegy minta közül négy tartozik a H csoportba, kettő az U\* nyaláb, kettő a V klaszter, egy-egy pedig a JT, U3 és a D haplocsoport képviselője. A D haplocsoport jellegzetesen kelet-ázsiai elterjedésű, előfordulása az európai népcsoportokban nagyon ritka. Az általunk tanulmányozott modern magyar minták között nem fordul elő. Az összes többi haplocsoport (H, V, U\*, U3, JT), amely előfordul a kun leletek esetében nyugat-eurázsiai kialakulású és elterjedésű.

Összegezve tehát elmondható, hogy a csengelei kun populáció genetikailag nem volt egységes. Alapvetően két fajta genetikai elemet lehet elkülöníteni ebben a csoportban. Egyrészt ázsiai eredetű elemet, amely nagy valószínűséggel a kunok genetikai származására utal, másrészt európai eredetű genetikai elemeket, amelyek a vándorlásaik során olvadhattak a populációba. Eredményeink alapján elmondható, hogy a vizsgált csengelei kunok mitokondriális mintázata leginkább a kun populáció más populációkkal való keveredését tükrözi, és csak egy lelet esetében (Kun26) találtunk olyan markert, amely a kun népcsoport genetikai eredetére utalhat. A vizsgált populációk genetikai távolságát tekintve a csengelei kunok legkisebb genetikai távolságot a mai finn, komi és a török népcsoportokkal mutatják.

A vizsgált 74 modern magyar minta 15 különböző haplocsoportba tartozik. A modern mintákban előforduló F haplocsoport kelet-ázsiai, míg az összes többi megfigyelt klaszter nyugat-eurázsiai kialakulású és elterjedésű. Az F haplocsoport szinte teljesen hiányzik a mai európai lakosság mitokondriális típusából. Négy olyan haplocsoportot találtunk (H, V, U\*,

JT), amely mind az archaikus, mind a modern magyar mintákban jelen volt. Azonban csak a H és a V haplocsoportok esetén találtunk megegyező haplotípusú szekvenciákat. Az U3 és a D haplocsoport csak az ásatag mintákban fordult elő, 11 haplocsoport (HV, U4, U5, K, J, J1A, T, T1, T2, W és F) pedig csak a modern magyar mintákra volt jellemző.

A modern magyar populációban megfigyelhető haplocsoport gyakorisági adatok nagyon hasonló képet mutatnak a legtöbb közép-európai népcsoportban megfigyelt adatokkal. A kelet-ázsiai F haplocsoport jelenléte a mai magyar populáció múltbéli ázsiai genetikai kapcsolatait tükrözheti. A haplocsoport gyakorisági adatok alapján elmondható, hogy az általunk vizsgált magyar minták legnagyobb részének anyai ági gyökerei azokra a vadászgyűjtögetőkre vezethetők vissza, akik már az utolsó jégkorszak idején, a paleolitikumban Európában éltek. Az általunk vizsgált magyar mintákban 8,2% a közel-keleti, neolitik földművesekkel érkező J klaszter aránya, valamint 4,1% az ázsiai eredetű anyai vonal jelenléte.

A felnőtt-típusú laktóz emésztő képességgel kapcsoltságot mutató -13910 variáns vizsgálatát 2 csontlelet esetében sikerült kiviteleznünk (1 lelet CC, 1 lelet TT genotípusú).

A felnőtt-típusú laktóz intoleranciára utaló -13910CC genotípus előfordulási gyakorisága 37%-nak bizonyult az általunk vizsgált, random módon kiválasztott felnőtt magyar csoportban.

A vizsgált, emésztési zavaroktól szenvedő betegek közül 100 a laktóz intoleranciára utaló CC, 49 pedig a laktóz toleranciára utaló CT, illetve TT genotípussal rendelkezett. Eredményeinket a klinikai kivizsgálások eredményeivel összevetve megállapítható, hogy a felnőtt-típusú laktóz intolerancia 5 éves kor alatt nem manifesztálódik. A 6-11 éves korcsoportban a CC genotípusú gyerekek 87%-ában, 12 éves kor fölött 90%-ában alakult ki a betegség. 13 éves kor fölött egy kivétellel (16 éves) az összes vizsgált CC genotípusú beteg laktóz intoleráns volt.

A 49 vizsgált CT, illetve TT genotípussal rendelkező egyén közül 10 a laktóz intolerancia tüneteit mutatta. Nyolc esetben az egyéneknek más, a vékonybél nyálkahártyáját érintő betegségük is volt. Ezekben az esetekben a tejcukorbontás képességének hiánya egyéb megbetegedés következtében fejlődhetett ki másodlagosan.

Az általunk kidolgozott vizsgálati módszer alkalmasnak bizonyult autoszómális SNP marker tanulmányozására ásatag leletek esetében. Meghatároztuk a felnőtt-típusú laktóz intolerancia kialakulásáért felelős genotípus gyakoriságát a mai magyar populációban. Tanulmányunkban igazoltuk, hogy a -13910 polimorfizmus genetikai vizsgálata alkalmazható

a felnőtt-típusú laktóz intolerancia diagnosztizálására, illetve a primer és a szekunder típusú laktáz deficiencia elkülönítésére 13 éves kor fölött.

## Irodalomjegyzék

Enattah N S, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger J D, Peltonen L, Jarvela I; Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet* 2002. (30): 233-237.

Giles R E, Blanc H, Cann H M, Wallace D C; Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980. (77): 6715-6719.

Horváth F. A csengelei kunok ura és népe. Archaeolingua Kiadó, Budapest, 2001.

Kalmar T, Bachrati C Z, Marcsik A, Rasko I; A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Res* 2000. (28): E67.

Neff M M, Neff J D, Chory J, Pepper A E; dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J* 1998. (14): 387-392.

Paabo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M; Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet* 2004. (38): 645-679.

Richards M, Macaulay V; The mitochondrial gene tree comes of age. *Am J Hum Genet* 2001. (68): 1315-1320.

Swallow D M; Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu Rev Genet* 2003. (37): 197-219.

Torroni A, Wallace D C; MtDNA haplogroups in Native Americans. *Am J Hum Genet* 1995. (56): 1234-1238.

Vigilant L, Stoneking M, Harpending H, Hawkes K, Wilson A C; African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 1991. (253): 1503-1507.

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

Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N; Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992. (89): 5847-5851.

## **Közlemények jegyzéke:**

### **Az értekezés témakörébe tartozó közlemények:**

**Erika Bogácsi-Szabó**, Tibor Kalmár, Bernadett Csányi, Gyöngyvér Tömöry, Ágnes Czibula, Katalin Priskin, Ferenc Horváth, Christopher Stephen Downes, István Raskó; Mitochondrial DNA of ancient Cumanians: culturally Asian steppe nomadic immigrants with substantially more Western Eurasian mitochondrial DNA lineages. *Human Biology* 2005. October 77(5). 639-662.

**Szabó Erika**, Kalmár Tibor, Horváth Ferenc, Raskó István; Régészeti leletek molekuláris biológiai vizsgálata (a kunok populáció-genetikai tanulmányozása). *A GENOM* 2003. 161-170. oldal, Szerkesztő: Dr. Hídvégi Egon, Széphalom Könyvműhely

**Erika Szabó**; Genetic polymorphism in Cumanian population determined by analyses of ancient bone samples. *Acta Biologica Szegediensis* 2003. 47(1-4):87.

**E. Szabo**, F. Horvath, I. Rasko, T. Kalmar; Genetic polymorphism in Cumanian population determined by analysis of ancient bone samples. *Eur. J. Hum. Genet.* 2002. May; Vol. 10, Suppl 1: 178. (Abstract)

**Erika Bogácsi-Szabó**, Ágnes Várkonyi, Bernadett Csányi, Ágnes Czibula, Beáta Tari, István Raskó; Molecular genetic screening of lactase persistence polymorphism in children compared with the result of hydrogen breath test and in random population of Hungary with dCaps PCR-RFLP technique. (Beküldve, *EJGH*)

**Bogácsi-Szabó Erika**, Nagy Dóra, Tari Beáta, Várkonyi Ágnes Raskó István; A felnőtt típusú laktóz intolerancia előfordulási gyakoriságának diagnosztikai célú molekuláris genetikai vizsgálata gyermek és felnőtt magyar populációban. (közlésre elfogadva, *Gyermekgyógyászat*)



## Egyéb közlemények

**Erika Bogácsi-Szabó**, Bernadett Csányi, Gyöngyvér Tömöry, Katalin Priskin, Ágnes Czibula, Aranka Csósz, Balázs Mende, Péter Langó and István Raskó; Maternal and paternal lineages in ancient and modern Hungarians., *Eur. J. Hum. Genet.* 2005. May; Vol. 13, Suppl 1: 346. (Abstract)

Ágnes Czibula, Mónika Mórocz, Csanád Z. Bachrati, Ágnes Csiszár, László Szappanos, **Erika B. Szabó**, Edit Tóth, Ferenc Szeszák, Éva Morava, Tamás Illés, István Raskó;. Hunt for Genetic Susceptibility in a Complex Disease. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* 2003. 666-667:681-686.

Gyöngyvér Tömöry, Bernadett Csányi, **Erika Bogácsi-Szabó**, Tibor Kalmár, Ágnes Czibula, Aranka Csósz, Katalin Priskin, Balázs Mende, Péter Langó, C. Stephen Downes, István Raskó; Comparison of maternal lineages and phylogenetic analysis of ancient and modern Hungarian populations. (beküldve, *MBE*)

## Előadások:

**Bogácsi-Szabó Erika**, Várkonyi Ágnes, Tari Beáta, Raskó István; A laktáz enzim cisz-aktivátorának mutáció vizsgálata random populációban és laktóz intolerancia esetén. *Magyar Gyermekorvosok Társasága 2005. évi Naggyűlése*, Balatonszárszó (2005. szeptember 29-október 1.)

Csányi Bernadett, **Bogácsi-Szabó Erika**, Tömöry Gyöngyvér, Priskin Katalin, Kalmár Tibor, Csósz Aranka, Blaszó Péter, Mende Balázs, Langó Péter, Németh István, Raskó István; Populáció eredetvizsgálat régészeti anyagból. *VI. Magyar Genetikai Kongresszus*, Eger (2005. április 10-12.)

**Bogácsi-Szabó Erika**, Csányi Bernadett, Tömöry Gyöngyvér, Kalmár Tibor, Priskin Katalin, Blaszó Péter, Csósz Aranka, Mende Balázs, Langó Péter, Raskó István; “Látjátuk feleim

szümtükkel, mik vagyunk:”, avagy genetikai vizsgálatok honfoglalás kori mintákból. *Magyar Humángenetikai Társaság V. Munkakonferenciája*, Szeged (2004. november 12.)

Csányi Bernadett, **Bogácsi-Szabó Erika**, Tömöry Gyöngyvér, Kalmár Tibor, Csósz Aranka, Priskin Katalin, Mende Balázs, Langó Péter, Németh István, Raskó István; Anyáink, apáink és lovaink. Újabb eredmények a honfoglalás kori leletek vizsgálatából. *Straub napok*, Szeged (2003. november 25.)

**Szabó Erika**, Tömöry Gyöngyvér, Csányi Bernadett, Kalmár Tibor, Csósz Aranka, Mende Balázs, Langó Péter, Raskó István; A korai Magyarország lakosságának molekuláris genetikai vizsgálata. *V. Magyar Genetikai Kongresszus*, Siófok (2003. április 13-15.)

Tömöry Gyöngyvér, Csányi Bernadett, **Szabó Erika**, Kalmár Tibor, Mende Balázs és Raskó István; Genetikai eredetvizsgálat honfoglalás kori csontokon. *Straub napok*, Szeged (2002. december 5.)

**Szabó Erika**, Kalmár Tibor, Horváth Ferenc, Raskó István; XIII-XIV. századi kun csontleletek populáció-genetikai vizsgálata molekuláris biológiai módszerekkel. *Straub napok*, Szeged (2001. november 20.)

**Szabó Erika**, Kalmár Tibor, Horváth Ferenc, Raskó István; XIII-XIV. századból származó kun csontleletek genetikai analízise. *Magyar Humangenetikusok Konferenciája*, Debrecen (2001. június 8-9.)

### **Poszterek:**

**Erika Bogácsi-Szabó**, Bernadett Csányi, Gyöngyvér Tömöry, Katalin Priskin, Ágnes Czibula, Aranka Csósz, Balázs Mende, Péter Langó and István Raskó; 2005. Maternal and paternal lineages in ancient and modern Hungarians. *European Human Genetics Conference*, Prague, Czech Republic. (2005. május 7-10)

**E. Szabo**, F. Horvath, I. Rasko, T. Kalmar. Genetic polymorphism in Cumanian population determined by analysis of ancient bone samples. *European Human Genetics Conference*, Strasbourg, France. (2002. május 25-28)