

Szegedi Tudományegyetem

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

Ph.D. értekezés

Bogácsi-Szabó Erika

Témavezető: Prof. Dr. Raskó István

**MTA Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intézet**

Szeged

2006

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Raskó Istvánnak, aki megtisztelt bizalmával és lehetővé tette számomra, hogy a Genetikai Intézet Humángenetikai Csoportjában tanuljak és dolgozzak. Szakmai ismereteinek átadásával gazdagította tudásomat.

Szeretnék köszönetet mondani csoportunk minden tagjának, akik figyelmükkel, segítségükkel tüntettek ki munkám során. Külön köszönetemet szeretném kifejezni Csányi Bernadettnek és Czibula Ágnesnek, akikkel mindenkor megvitathattam szakmai jellegű problémáimat.

Köszönettel tartozom Édesanyámnak, akinek segítsége nélkül nem tanulhattam volna közel 20 éven át. Hálával tartozom férjemnek türelméért és lelkes támogatásáért.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani a Genetikai Intézet munkatársainak, akik érdeklődésükkel, figyelmükkel tüntettek ki munkám során.

TARTALOMJEGYZÉK

ELŐSZÓ	5
I. BEVEZETÉS	6
I.1. A KÁRPÁT-MEDENCE LAKOSSÁGÁNAK ALAKULÁSA AZ ÓKORTÓL NAPJAINKIG	6
I.2. A KUNOK EREDETE, ÚTJA MAGYARORSZÁGIG	7
I.3. A CSENGELEI KUNOK	9
I.4. A DNS KÁROSODÁSA AZ ELHALT SEJTEKBEN, AZ ŐSI DNS VIZSGÁLATÁNAK NEHÉZSÉGEI	12
I.5. AZ ŐSI DNS VIZSGÁLATÁNAK KEZDETEI, ALKALMAZHATÓSÁGA	15
I.6. A MITOKONDRIUMOK ÉS ÖRÖKÍTŐANYAGUK	17
I.7. A MITOKONDRIÁLIS HAPLOCSOPORTOK	19
I.8. A MODERN EMBER EREDETÉNEK VIZSGÁLATA A MITOKONDRIÁLIS DNS ALAPJÁN ..	20
I.9. A FÖLD MODERN EMBEREK ÁLTALI BENÉPESÍTÉSE A MITOKONDRIÁLIS DNS ALAPJÁN	23
I.9.1 Paleolit és neolit származási vonalak Európában	25
I.10. A FELNŐTT TÍPUSÚ LAKTÓZ INTOLERANCIA	29
II. CÉLKITŰZÉSEK	33
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	34
III.1. MITOKONDRIÁLIS DNS VIZSGÁLATOK	34
III.1.1. A Vizsgált minták	34
III.1.2. DNS extrakció modern mintákból	35
III.1.2.1. DNS preparálás hajszálból	35
III.1.2.2. DNS preparálása vérből	36
III.1.3. A kun csontmaradványokból történő DNS extrahálás	37
III.1.3.1. A csontminták előkészítése, porítása	37
III.1.3.2. A DNS extrahálás folyamata	37
III.1.4. A mitokondrium kontroll régiójának amplifikációja	38
III.1.5. Célzott haplocsoport specifikus pozíciók vizsgálata	39
III.1.6. Az amplifikált termékek tisztítása és szekvenálása	41
III.1.7. Az amplifikált termékek klónozása	42
III.1.8. A kontamináció lehetőségének kizárása	42
III.1.9. Genetikai távolság becslése a DNS szekvenciák között	44
III.1.9.1. Tamura-Nei modell	44
III.1.9.2. Statisztikai analízis	45

III.2. LAKTÓZ INTOLERANCIA VIZSGÁLATOK	47
III.2.1. A vizsgált minták	47
III.2.2. Laktóz hidrogén kilélegzési teszt	47
III.2.3. DNS izolálás a 10. századi csontmintákból	48
III.2.4. DNS preparálás szájúregi kenetből	48
III.2.5. Teljes genom előamplifikáció	49
III.2.6. A –13910C/T polimorf régió amplifikációja	50
III.2.7. A laktáz genotípusok megállapítása restriktív emésztéssel	51
IV. EREDMÉNYEK	53
IV.1 MITOKONDRIÁLIS DNS VIZSGÁLATOK	53
IV.1.1. Az eredmények hitelességének vizsgálata	53
IV.1.2. A direkt szekvenálás és a klónozás utáni szekvenálás eredményeinek összehasonlítása	54
IV.1.3. A haplocsoportok azonosítás	55
IV.1.4. Statisztikai analízis	65
IV.2. A LAKTÓZ INTOLERANCIÁRA UTALÓ POLIMORFIZMUS VIZSGÁLATA	67
V. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE, DISZKUSSZIÓ	70
FELHASZNÁLT IRODALOM	77
ÖSSZEFOGLALÁS	86
SUMMARY	91

„Az emberi vér minden cseppje egy-egy olyan történelemkönyv, amelyik a génjeink nyelvén íródott”

Spencer Wells

ELŐSZÓ

Ki vagyok én és honnan származom? Ki ne gondolkodott volna már ezen a kérdésen. Gyerekként egyszerűnek tűnik a válasz; a szüleim gyereke vagyok. Legtöbbször ismerjük szüleinket, nagyszüleinket és a szerencsésebbek még a dédszüleiket is, de hol keresendők távolabbi felmenőink? Honnan és hogyan szerezhetünk információkat a távoli múltból, és vajon mennyit tudhatunk meg régvolt őseinkről? Szerencsére szervezetünk minden egyes sejtjében őrizzük elődeink emlékét, a nemzedékről nemzedékre öröklődő DNS molekulában.

Mai ismereteink szerint a világegyetem folyamatosan változik, zajlik az evolúció. A változásokat a fizika, a kémia, a biológia tudománya, illetve a társadalomtudományok sora vizsgálja. E tudományok szükségszerűen összefüggenek, kölcsönösen feltételezik, és egyben kiegészítik egymást. Sok esetben ahhoz, hogy régészeti és történelmi kérdésekre hiteles választ adhassunk, történészeknek, régészeknek, nyelvészeknek, antropológusoknak és genetikusoknak kell egységes elméletbe foglalni a kutatási eredményeiket. Hogyan kapcsolhatóak össze ezek az ismeretek a molekuláris genetikai eredményekkel és hogyan illeszkednek a jelenleg elfogadott történelmi és régészeti elképzelésekhez? A molekuláris genetika segítséget nyújthat az egyes népek rokonsági viszonyainak, vándorlási útvonalának azonosításában, és ezáltal a népelemek történetének más források által fel nem tárt időszakairól kaphatunk összefüggő képet.

I. BEVEZETÉS

I.1. A KÁRPÁT-MEDENCE LAKOSSÁGÁNAK ALAKULÁSA AZ ÓKORTÓL NAPJAINKIG

Magyarország Európa szívében, a Kárpátok hegylánca, az Alpok és a délszláv hegyek övezte Kárpát-medencében fekszik. A vidék a civilizáció hajnalától fogva emberlakta hely és kultúrák keveredésének színtere.

A Kr. e. 1. évezred folyamán többé-kevésbé megtelepedett életmódot folytató indoeurópai (kelta, illír, trák) törzsek váltották egymást a Kárpát-medencében. A vaskorban, Kr. e. 6. század közepe táján az iráni eredetű, lovas nomád szkíta törzsszövetség a Fekete-tenger északi partjáról észak-nyugati irányba terjeszkedett, s körülbelül egy évszázad múltán birtokba vette az Alföldet. A késő bronzkori lakosság (Kr.e 1500-Kr. e 800) egy része tovább élt térségünkben. Erre a kevert lakosságra terjesztette ki uralmát a szkíta törzsszövetség. Kr. u. 9-ben a rómaiak a Dunántúlt Pannónia néven a Római Birodalom önálló tartományává szervezték. Az Alföldre és a Duna-Tisza közének északi részére a szarmaták egyik törzse telepedett le, a Tiszántúl pedig a dákok uralma alá került. A római birodalom terjeszkedésének utolsó időszakában a Kárpát-medence egy időre a mediterrán, görög-római civilizáció körébe tartozott. A 3. század elejétől a vidéken germán és keletről támadó nomád népek (hun és avar) jelentek meg. A 3. században a gótok elől menekülő gepidák települtek a Kárpát-medencébe. A 4. században gótok jelentek meg e földrajzi régióban. Róma 430 körül a hunok ostromainak engedve végképp feladta kárpát-medencei provinciáját, Pannóniát. A híres hun király, Attila halála után a hun birodalom szétesett és a területen ismét germán törzsek osztoztak. A Kárpát-medence fő hatalmává a gepidák váltak. Az 5. században az osztrogótok, majd a szkírek, rugaiak, szvébek, herulok nyomultak be a térségbe. 509-ben a longobárdok legyőzték a herulokat, ezt követően a Duna mentén és Észak-Pannóniában telepedtek le. Hegemóniájukat hamarosan az avarok érkezése törte meg. 568-ban az egész Kárpát-medence az avarok uralma alá került. Így megszűnt a germán törzsek hatszáz éves folyamatos beáramlása és másfél évszázados uralma.

Az avarokat a frank uralkodó, Nagy Károly seregei 791-ben legyőzték, de országukat nem foglalták el. Az avar birodalmat végül a dunai bolgárok támadásai semmisítették meg, akik a Tisza völgyébe nyomultak, majd később elfoglalták a Szerémséget és Szlavóniát is. A 9. század elejére a Kárpát-medence dunántúli területe a frank birodalom keleti tartományává vált. A kisalföldi és felvidéki részeket a morvák foglalták el. Majd 895 és 902 között sor került a magyarok "honfoglalására". 895-ben Árpád vezér, seregei élén, a vereckei hágón át bevonult a magyarok új hazájába. A honfoglalás után és a magyar államalapítás közötti időszakban főleg keleti nomád népelemeket fogadtak be, így besenyőket, úzokat. A kereszténység felvétele után főleg német lovagok jöttek be, de ismeretes az észak-iráni származású kálizok és varsányok betelepítése is. A tatárjárás után IV. Béla király (1235-1270) a megfogyatkozott népességet a környező országokból származó betelepülőkkel próbálta pótolni (szászok, németek, szlovákok, románok, ruszinok). A kunok, jászok, rácok pedig a tatárok támadásai elől menekültek Magyarországra. A török hódoltság korában (1541-1686) a magyarországi lakosság jelentősen lecsökkent, majd a másfél évszázados török uralom megszűnésével a visszaszerzett területeken spontán népmozgások (belső népvándorlás) és tudatos betelepítések (svábföldi németek, szlovákok) kezdődtek meg. A görög kereskedők a 16. századtól mind nagyobb számban jelentek meg Magyarországon, a 19. század elején pedig az askenázi zsidók nagy tömegei érkeztek [1-4]. A be- és kivándorlás folyamata azóta sem állt meg, sőt az országhatárok is megváltoztak.

I.2. A KUNOK EREDETE, ÚTJA MAGYARORSZÁGIG

Mint annyi keleti lovasnomád „birodalom”, a kun törzsszövetség is különböző eredetű néptörzsekből tevődött össze. A nyelvészek megfejtése szerint a kumán elnevezés a török qu, quba, azaz fehér, világos, sápadt, sárgás, fakó jelentésű szóból ered [5]. Az orosz Polovci, bizánci Komanoi, latin Cumani alakok a kuman népnév megfelelői, a keleti (arab, perzsa, kínai, mongol) források Kipcsak néven említik őket. Írásos források hiányában nem követhető az a hosszan tartó vándorlás, melynek során a kunok ősei a 11. századra eljutottak a dél-oroszországi sztyeppékre. Egyes kutatók szerint a szövetség magvát adó qun

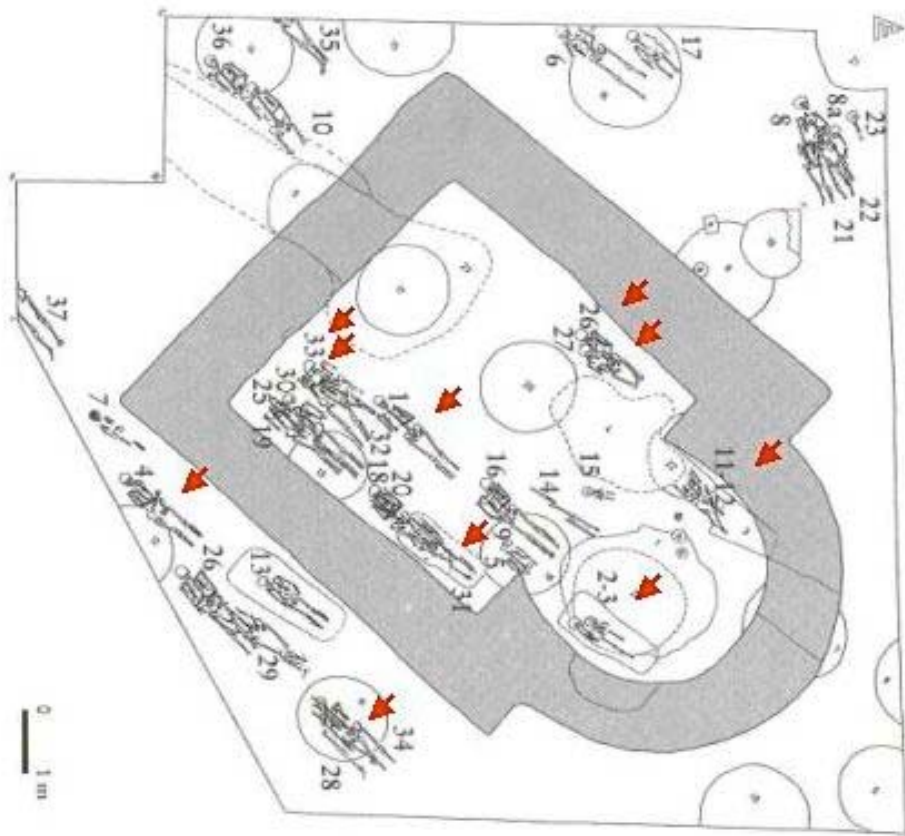
nép eredetileg a Hoangho folyó mentén, a mai Mongólia és Kína határvidékén élt. Innen a kitajok terjeszkedése űzte el őket. Ekkor kezdték meg vándorlásukat nyugat felé, maguk előtt nyomva az úzokat és a besenyőket. 1054-ben tűntek fel Európában és 1068-ig uralmuk alá vonták a Fekete-tengertől északra, egészen az Al-Dunáig húzódó sztyeppevidéket [6, 7]. Feltételezhető, hogy a Dnyeper folyótól nyugatra terült el az előkelőbb „Fehér Kumánia”, mely a szövetséget vezető, kun-sari törzsekből állt. A kipcsak „Fekete Kumánia” tőlük keletre eshetett, talán a Volgán is túlnyúlt. A törzsek meghatározott útvonalakhoz és területekhez kötött, ciklikus téli-nyári szállásváltó, félnomád életmódot folytattak. A kunok rendszeresen vezettek hadjáratokat az orosz fejedelemségek és Bizánc balkáni tartományai ellen, olykor felkért szövetségesként. A kunok első kalandozásai Magyarországot sem kerülték el. Hazánkat 1091-ben támadták először kun portyázók. Szent László király (1077–95) serege azonban megsemmisítette őket. A kunok megtorló hadjárata az Al-Dunánál fulladt vérbe. 1099-ben viszont a kunok vágta vissza addigi kudarcaikért, szétverve Kálmán király (1096-1116) lovagi seregét. A pogány kunok terjeszkedése egyre inkább sértette az egész keresztény Európa érdekeit, ezért még a tatárjárás előtt több misszió indult a kunok keresztény hitre térítésére [5]. A 13. század elején, a közelítő mongol hadak hírére a kunok tömegesen menekültek nyugati irányba, a Dnyeszteren túlra. A mongolok elől menekülő kunok jelentős része Köteny vezérük vezetésével 1239-ben telepedett be IV. Béla király (1235-1270) Magyarországra. A betelepülők új lakhelye valahol az ország belsejében lehetett. IV. Béla célja a mongolok ellen bevethető nomád íjászsereg biztosítása volt. Az 1240-ben létrejött megegyezésük szerint a kunok elfogadták a magyar vezetőséget, a keresztény, letelepült életmódot és hadi szolgálataik fejében részben a vendégnépeket, részben a várnépeket megillető jogokat (részleges adómentesség, beléletüket függetlenül, saját törvényeik szerint élhették) kaptak. A Magyarországra beköltöző kunok nem adták fel azonnal nomadizáló életmódjukat. Ez eleinte súlyos összecsapásokhoz vezetett a már letelepedett, földművelő magyarsággal. 1241 tavaszán a mongol betörés hírére elhatalmasodó pánik véres leszámolóshoz vezetett. Futótűzként terjedt a rémhír, hogy a (tatárokhoz hasonló megjelenésű) kunok a mongolok kémei. Ezért a pesti nép megölte Köteny vezért és kíséretét. Köteny népe pedig, értesülve ura haláláról, szinte mindent felégetve, pusztítva, gyilkolva kivonult az országból, éppen mikor a legnagyobb szükség lett volna erejükre. IV. Béla 1246-

ban újra behívta a kunokat, akik akkor Észak-Bulgáriában, a Duna déli, part menti síkságain táboroztak. A kunok újra elfoglalták korábban lakott területeiket és beilleszkedésüket privilégiumokkal próbálták meg elősegíteni. A visszaköltözött kunok a keresztény hitre csak lassan, eleinte csak látszólag tértek át. IV. Kun László király (1262-1290) 1279-ben két törvényben rögzítette a kunok kötelességeit és jogait. A törvény pontosan körülírta a kunok számára kijelölt területek határait a Duna-Tisza közén, a későbbi Kiskunságon, a Tiszántúlon, a majdani Nagykunságon, a Maros és a Temes folyó között és Fejér vármegyében. A kunok kezdetben zárt településtömbjei a járványok, költözések miatt fokozatosan összezsugorodtak. A 14. század folyamán a kunok beilleszkedtek a feudális társadalomba, a 15. századra a korábbi katonáskodási kötelezettségük megszűnt. A 16. században a kunok lakta terület nagy része török uralom alá került [8]. A korábbi kun függetlenség megszűnt, a településeken alig maradtak lakosok. A magyarországi kunok nyelvi beolvadását a török kori pusztítások és a nagymértékű migráció siettette. A török uralom után a kormányzat és a kincstár eladta a Jászkun kerületet a Német Lovagrendnek. Ezzel az addig szabad, kiváltságokat élvező kunok földesúri függés alá, azaz jobbágyi sorba kerültek. 1745-ben Mária Terézia engedélyezte a Jászkunság földjének és az itt élők szabadságjogainak visszaváltását, azaz a jászkun *redemptiót* [9]. A török hódoltság utáni időkre már igen nagy volt a kun és a nem kun lakosság keveredése. A kun kerületekbe beköltöztek aránya helyenként 50% fölé emelkedett. A kunok története végképp egybeolvadt a magyar történelemmel.

I.3. A CSENGELEI KUNOK

Mezőgazdasági munkák folyamán 1975-ben emberi csontmaradványokat találtak a Szegedtől kb. 40 km-re lévő Csengele település melletti dombon. A régészeti feltárás során egy középkori templom maradványaira bukkantak. Az alig 10×7 méter nagyságú, patkóíves alaprajzú szentéllyel épült templomból és közvetlen környezetéből 37 sír került elő (1. ábra).





1. ábra A csengelei templom maradványai az eltemetett kunokkal. (A piros nyilak azokat az általunk vizsgált leleteket jelölik, amelyek megőrizték az archaikus DNS-t vizsgálható formában.)

A temetés rendje az élők társadalmában elfoglalt helye szerint történt. A

legrangosabbak a szentélyben, a kevésbé tehetősek a hajóban, a szegényebbek pedig a templomon kívül kaptak helyet. A sírokban talált leletekből ítélve a holttesteket a 14-15. század folyamán helyezték örök nyugalomra. Az ide temetetteket kunoknak vélték az előkerült sírmellékletek és történelmi adatok alapján. A templom belsejében lévő sírok halottjai gazdag, ünnepi viseletben, velük temetett ruhadíszekkel, ékszerekkel nyugodtak (ellentétben az ebben az időben egyszerű halotti öltözetben temetkező magyarokkal). Ékszer, ruhadísz kislányok és fiatal nők viseltek (aranyozott, ezüsttel bevont övek, bronz díszlemezek, csatok, szíjvégek, csontból faragott csatok, ezüst pitykével kivarrt párta, gyöngysor). Az egyik sírban két állatcsontot is találtak (szarvasmarha lábközépcsont, halcsont). A gyászolók a keresztény temetkezés ellenére pogány szokás szerint ételt is adtak a másvilági útra. A felnőtt férfiak sírjából viszont semmiféle tárgy nem került elő. A kunokra utaló leletek az egyik sírban megmaradt, a keleti, úgynevezett „táblácskás” szövés technikával készített szövetdarabok. Ez a szövés technika a kunokkal érkezett hozzánk, és több száz esztendőn át fennmaradt háziiparuk gyakorlatában. Szintén a kunokra utal az a bronzból öntött csillag alakú, tizenkéttüskés buzogány, amelyet a templom közelében találtak. Több sírgödör alját sűrűn faszén, illetve hamu borította, amit a tűzáldozatos pogány temetkezési szokásokkal hoztak kapcsolatba [10–12].

1999-ben folytatódtek a feltárási munkák az M5 autópálya Csongrád megyét átszelő nyomvonalán. A templomot hármass körárok vette körül és a középső körárokban igen értékes leletet találtak. A középkori templom romjaitól alig 50 méternyire előkerült az első, régészek által feltárt, hiteles, magyarországi kun vezéri sír. Ez a felfedezés megerősítette a régészek feltevését a korábban feltárt leletcsoport eredetére vonatkozóan. A vezért ritka, igen értékes, arab lovával együtt helyezték örök nyugalomra valamikor a 13. század közepén (1246-1259 között), pogány szokás szerint [5]. A sírban vassisakot, nyakvédő sodronypáncélt, vas és csont nyílhegyeket, vaskést és több tízezer karikából összefűzött, egybeszegecsezt lánc-páncélinget is találtak, amelyek az elhunyt személy tekintélyes társadalmi helyzetét mutatják (2. ábra).



2. ábra A kun vezér lovas sírja

I.4. A DNS KÁROSODÁSA AZ ELHALT SEJTEKBEN, AZ ŐSI DNS VIZSGÁLATÁNAK NEHÉZSÉGEI

Az élő sejtekben a DNS épségét enzimatikus javító folyamatok tartják fenn [13]. Az elhalálozás után azonban a sejtekben lévő sejtservecskék szétesnek, belőlük kiszabadulnak a lebontási enzimek (pl.: lizoszómális nukleázok), aminek következtében gyorsan elkezdődik a DNS enzimatikus degradációja. A sejtekben lévő DNS darabolódik, mennyisége csökken (1. Táblázat). Tovább károsítják a DNS-t a degradált makromolekulákkal táplálkozó baktériumok, gombák és rovarok [14]. Az enzimatikus és mikrobiális lebontási folyamatokon túl további kémiai degradációs hatások érik a DNS-t, amelyek ugyan lassabban fejtik ki hatásukat az előzőeknél, mégis igen jelentősek a DNS károsításában.

1. Táblázat Az ősi DNS károsodásának típusai és a vizsgálatára alkalmazott módszerek

A károsodás típusa	Kiváltó okok	DNS-re gyakorolt hatás	Lehetséges módszer
Száltörések	<ul style="list-style-type: none"> • mikroorganizmusok okozta károsodás • nukleázok a sejtben a halál után • egyéb kémiai folyamatok 	lecsökken a DNS mennyisége, a DNS feldarabolódik	átfedő, rövid DNS darabok amplifikációja
Oxidatív károsodások	<ul style="list-style-type: none"> • bázisok károsodása • deoxyribóz molekula károsodása 	bázisok szétesnek, cukormolekula szétesik, nukleotid módosulások	átfedő, rövid DNS darabok amplifikációja, több, független PCR reakció, klónozás, több klón szekvenálása
DNS keresztkötések	keresztkötések a DNS-ben, ill a DNS és egyéb biomolekulák között	Pl. Maillard termékek	PTB (N-fenilacil-tiazólium-bromid) kezelés
Hidrolitikus ➤ károsodások	aminó-csoport veszteség <ol style="list-style-type: none"> 1. adenin hypoxantin 2. citozin uracil 3. 5-metil-citozin timin 4. guanin xantin 	megváltozik a leolvasható DNS kód	több, független PCR reakció, klónozás, több klón szekvenálása

Ezek hasonló folyamatok, mint amelyek az élő sejtekben is hatnak az örökítőanyagra, de a halálozás után ezeket nem javítják a sejt hiba javító mechanizmusai. A DNS láncban a károsodások felhalmozódnak, és az örökítőanyagban tárolt információ elveszhet.

A nem-enzimatis, hidrolitikus folyamatok a cukor-foszfát láncban a foszfo-diészter kötések felbomlását eredményezik, ezáltal egyszálú törések keletkeznek a DNS láncon [15–17]. Ezek a kémiai folyamatok károsítják a bázisok és a cukor-foszfát lánc közötti glükózid kötést is, amelyek a bázisok elvesztését eredményezik. Hidrolitikus hatásra a DNS megmaradó bázisai kémiai átalakuláson mehetnek keresztül, miközben elveszíthetik amino-csoportjukat, és ezáltal az adenin- hipoxantinná, a citozin- uracillá, az 5-metilcitozin- timinné, a guanin pedig xantinná alakulhat. Ennek következtében megváltozik a leolvasható DNS kód.

A háttérsugárzás hatására keletkező szabadgyökök (peroxid ($\cdot O_2$), hidrogén-peroxid (H_2O_2), és hidroxil gyökök ($\cdot OH$)) oxidáló hatásukkal szintén károsítják a DNS molekulát. Oxidatív hatásra a purinokban, pirimidinokban és a cukor molekulákban lévő kötések felbomlanak, ami a molekulagyűrűk széteséséhez [13], ezáltal a nukleotidok átalakulhatnak.

Az elhalálozás utáni DNS károsodások másik lehetséges típusa a keresztkötések kialakulása. A keresztkötések létrejöhetnek a DNS-en belül, illetve a DNS és egyéb biomolekulák (fehérjék) között. A keresztkötések következményeként alakulnak ki az u.n. Maillard termékek, amelyek a DNS-ben lévő cukrok, valamint a fehérjék és a nukleinsavak elsődleges amino-csoportjai közötti kondenzációs reakció eredményeként képződnek [18].

A fentebb vázolt DNS módosulások közül a lánctörések, oxidatív károsodások és keresztkötések az ősi DNS kísérletes vizsgálatakor megakasztják a DNS polimerázt, és gátolják az ősi DNS felsokszorozását. A hidrolitikus károsodások hatására átalakult bázisok esetében viszont a PCR reakció nem akad el, hanem az amplifikáció során az eredeti szállal nem komplementer bázisok épülnek be a keletkező DNS láncba. Ezért az ősi DNS vizsgálatakor mindig legalább két független PCR reakcióra van szükség [19]. Ha a felsokszorozás nagyon kevés számú DNS szállról indul el és a károsodások miatt bekövetkező hibás bázisbeépülés az amplifikáció korai ciklusában következik be, akkor a hibás beépülés miatti különbséget polimorfizmusnak észlelheti a kutató [20].

Az előzőekben ismertetett hatások miatt az ősi mintákban általában csekély mennyiségű, erősen töredezett, oxidatív és hidrolitikus hatások által károsított DNS marad meg. Az ősi mintákban megmaradó DNS minősége és mennyisége ezért nagyon eltérő lehet. Ez nem elsősorban a lelet korától, hanem a lelőhely mikro- és makrokörnyezeti viszonyaitól függ [21]. Néha nemcsak néhány száz, de akár 1 kilóbázisos darabok is megmaradhatnak [22]. Ritkán előfordul, hogy a szövetek gyorsan kiszáradnak az elhalálozás után, ami megvédi a DNS-t az enzimatis és mikrobiális lebontástól. Csontleletek esetében az ősi DNS vizsgálhatóságát nehezítik a talajból, illetve a biológiai anyag bomlásából származó termékek, amelyek az ősi DNS izolálása folyamán azzal együtt tisztíthatóak, és gátló hatású anyagként jelentkeznek a DNS felsokszorozása folyamán. A környezetből származó gátlóanyagok a humuszsavak, a fulvosav, hidroxipatit, tannin és a lelet környezetéből származó más DNS molekulák (mikroorganizmus, gomba, rovar, humán DNS stb.). A nem-endogén DNS molekulák a leletekből származó örökítőanyag kompetitorai lehetnek a PCR reakcióban [23].

A csont és a fog szöveteinek bomlása során keletkező inhibítorok az I. típusú kollagén és a Maillard termékek. A natív kollagén mellett a részlegesen lebomlott kollagén is inhibítorként viselkedik [24].

I.5. AZ ŐSI DNS VIZSGÁLATÁNAK KEZDETEI, ALKALMAZHATÓSÁGA

A tudományos irodalomban több mint húsz évvel ezelőtt jelent meg az első, az ősi DNS genetikai vizsgálatával foglalkozó közlemény.

Először Higuchi és munkatársai számoltak be arról, hogy mitokondriális DNS-t klónoztak egy múzeumban őrzött, 140 éves zebrafaj (*Equus quagga*) kiszáradt izomzatából. Ez a faj 1883-ban halt ki. Két szekvenált klón alapján a kutatóknak sikerült egy 229 bázispáros (bp) mitokondriális DNS darab nukleotidsorrendjét meghatározniuk. Ezen a szakaszon 12 nukleotid különbséget találtak a vizsgált lelet és a hegyi zebra (*Equus zebra*) szekvenciája között. A vizsgálat segítségével helyezték el a quaggát a lófélék (*Equidae*) családjának törzsfáján, amely egyben rámutatott az aDNS vizsgálatok lehetséges felhasználására. Továbbá megállapították, hogy a két fajának a közös őse 3-4

millió évvel ezelőttre tehető, és ez összhangban van az *Equus genus fossilis* leletek alapján becsült korával [25].

Emberi maradványból legelőször Pääbo és munkatársainak izoláltak ősi DNS-t (aDNS). A kutatócsoport egy 2400 éves egyiptomi gyerekmúmia bőréből izolált örökítőanyagot. A több ezer éves múmia igen jó DNS megtartásának bizonyult. Sikeresen klónoztak, majd szekvenáltak egy közel 500 bázispáros DNS darabot, amely 77%-os azonosságot mutatott a humán Alu konszenzus szekvenciával. Vizsgálataik során megállapították, hogy a mumifikált leletek felszíni szövetei a belsőknél jobban megőrzik a DNS-t, valószínűleg a lúgos balzsamozó eljárás miatt. A testfelszín közvetlenül érintkezik a dehidratáló ágenssel, és még azelőtt kiszárad, mielőtt a DNS-t károsító hidrolitikus folyamatok elindulnának [26].

Pääbo és munkatársai 1988-ban használták elsőként a PCR reakciót az ősi DNS tanulmányozására. Egy 7000 éves egyiptomi múmia agyából izoláltak DNS-t, majd a PCR módszer segítségével sokszorozták fel mitokondriális DNS darabokat [27]. Ebben a közleményben írták le azt a tényt, amely a mai napig is az ősi DNS vizsgálat egyik alapigazságának számít, vagyis hogy az archaikus DNS esetében a felsokszorozott DNS szakaszok mérete és az amplifikáció hatékonysága között fordított arányosság van.

Golenberg és mtsai 1990-ben közölték az azóta is legrégebbinek számító leletet, amiből sikerült DNS-t izolálni. A lelet oxigéntől elzárt helyről, egy vulkáni tó mélyéről származott. Egy 17-20 millió éves angyalrózsa (*Magnolia latahensis*) leveléből vontak ki örökítőanyagot és sokszorozták a zöld színtestek DNS-ének 820 bp-os darabját [28]. A miocén korú angyalrózsa szekvenciát használták fel a magnóliák molekuláris filogenézisének vizsgálatára.

Sykes és munkacsoportja volt az első, akik sikeresen izoláltak aDNS-t emberi csontmaradványokból [21]. Több, mint ötezer éves volt az a legidősebb csontlelet, amelynek felszíni részéből nyertek örökítőanyagot, majd sokszoroztak egy 205, illetve egy 121 bázispáros DNS darabot.

Azóta számos kérdésre adott választ az aDNS vizsgálata. Ősi DNS vizsgálatával sikerült tisztázni az anatómiailag modern ember és a neandervölgyi ember származástani kapcsolatát, és közös őstől, a *Homo erectus*tól való elválás idejét [19], vagy akár az európai lakosság mitokondriális génkészletének

paleolitikus és neolitikus származástörténetét [29]. Szintén fontos szerepet kapott az aDNS igazságügyi alkalmazása is, így például II. Miklós orosz cár és családja maradványainak azonosításakor [30, 31].

I.6. A MITOKONDRIUMOK ÉS ÖRÖKÍTŐANYAGUK

A mitokondriumok gömbölyű vagy pálcikaszerűen megnyúlt sejt szervecskék, amelyek minden eukarióta sejtben megtalálhatóak. Nem a sejtmagban, hanem az azt körülvevő sejt plazmában foglalnak helyet. Feladatuk, hogy segítsék az oxigén felhasználását a sejt energiatermelésében. Átmérőjük 0,5-1,0 μm , hosszuk több μm . A mitokondriumok érzékenyen reagálnak a sejtet érő károsító hatásokra, élettartamuk átlagos felezési ideje 5-10 nap, vagyis a sejtekben lévő mitokondriumok fele 5-10 naponként kicserélődik [32]. Az anyagcserében aktívabb sejtek több mitokondriumot tartalmaznak (ideg-, izom-, agyszövet -akár 1000db/sejt).

A mitokondriumoknak saját örökítőanyaguk van, és ezek mindegyike hordoz 1-10 DNS molekulát, ezért a mitokondriális DNS (mtDNS) sejtenkénti száma a több ezret is elérheti. A mitokondriális DNS kettősszálú, kör alakú molekula, génjei a sejt lélegzésben fontos enzimeket kódolják. Az emberi genom kb. 1%-a a mitokondriális DNS-ben míg a többi a sejtmagban, a kromoszómákban található.

A mitokondriális genom mérete ember esetében 16569 bázispár, amely egy átlagos emberi kromoszómának körülbelül a nyolcezred része. A mitokondriális DNS két láncát (H =heavy és L = light) a guanin ill. citozin tartalmuk alapján választják el. A nehéz szál guaninban, a könnyű szál citozinban gazdag. A replikációs origó szálanként eltérő helyen van, a DNS szintézis az L szálról az óramutató járásával egyező, a másikról azzal ellentétes irányban történik. A mitokondriális genom összesen 37 gént tartalmaz, amelyek közül 2 rRNS, 22 tRNS és 13 polipeptid molekula kódolásáért felelős.

A génsűrűsége jóval nagyobb, mint a sejtmagi DNS esetében. A mitokondrium genomjának 93%-a kódoló szekvencia. Kevés ismétlődést tartalmaz, a gének vagy folyamatosan következnek egymás után, vagy csak 1-2 bázis van közöttük. A mtDNS-nek van azonban egy 1122 nukleotid hosszúságú

szakasza, amely nem tartalmaz géneket. Ezt a szakaszt nevezik D-huroknak, kontroll vagy hipervariábilis régióknak (HVR). A hipervariábilis régió két részből áll (HVR-1: nt 16024-16569, HVR-2: nt 1-576).

A mitokondriális DNS megkettőződése folyamán a régi lánc (főként a D-hurok régió) ki van téve a mitokondrium oxidoredukciós tevékenysége során nagy mennyiségben keletkező szabadgyököknek, amelyek elsősorban pontmutációt okozhatnak [33]. A mitokondriális genomhoz nem kapcsolódnak védőfehérjék, amelyek védelmet nyújtanának DNS-t érő mutagén hatásokkal szemben. Nincs jelen a DNS-t javító, kivágásos helyreállító rendszer, és ezért a hibás bázisok gyakrabban megmaradnak. Ha ezek a mutációk a pete vagy hímvarsejt képződéshez vezető csírapálya kiindulási sejtjeiben (az ősvarsejtben) fordulnak elő, akkor továbbadnak a következő nemzedékekbe.

Ezért a mitokondriális DNS (főleg a HVR régió) mutációs rátája többszöröse a nukleáris genomnak. Azok a mutációk, amelyek a mitokondriális DNS kódoló régióját érintik súlyos, nem egyszer halálos kimenetűek az egyénre nézve, ezért csak nagyon ritkán fordulnak elő a genomban. Az ilyen mutációk ezért általában a populációkból elvesznek. A D-hurok szakaszon keletkezett mutációk azonban nem okoznak fenotípusos változást, ezért nem kerül sor szelekcióra és az új változat "mitokondriális DNS polimorfizmusként" kimutatható az utódokban.

Az emberek származásának vizsgálata szempontjából nagy a jelentősége annak, hogy mitokondriumainkat kizárólag édesanyánktól örököljük, tehát nem játszódik le rekombináció az öröklődés során az apai és az anyai genom között [34, 35]. A petesejtben több százezer mitokondrium van, a spermiumban néhány száz. Azonban a megtermékenyülés során az apai mitokondriumok nem kerülnek be a petesejtbe, a zigótában csakis a petesejtből származó, anyai mitokondriumok vannak jelen. Ezért a mtDNS vizsgálatával az anyai öröklődési vonalakat követhetjük nyomon. A mitokondriális DNS tekintetében legközelebbi rokonságban a testvérek állnak egymással, az anya és a testvérek mitokondriális DNS-e között csak egy nemzedéknyi mutációs különbség lehet.

Általában egy szervezetben a mitokondriális DNS-ek több mint 99.9%-ban egyforma (homoplazmia). Ha egy új mutáció létrejön és elterjed a mitokondriális DNS populációban, akkor kétféle mitokondriális DNS genotípusa lesz az egyednek, és ez a heteroplazmia. A heteroplazmiának, eredete alapján, létezik egy sokkal ritkább változata is, amikor a spermiumból mitokondrium marad a

zigótában. Ha a mutáció a petesejt érésének korai szakaszán következett be, akkor a véletlen szegregáció, esetleg valamilyen szelekciós mechanizmussal is megerősítve, elvezethet ahhoz, hogy a mutáns jelenléte kizárólagossá válik egy sejtben.

A mitokondriális DNS a fentebb vázolt tulajdonságai miatt igen jól használható az emberi népességek leszármazásának, rokonságának, történeti keveredésének kutatásában, igazságügyi orvostani vizsgálatokban még ősi, ásatag leletek, sőt több ezer éves múmiák esetében is.

Archaikus leletek vizsgálata esetén nem elhanyagolható az a tény, hogy a mtDNS több száz, vagy ezer példányban 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 példányban jelenlévő kromoszómális DNS markerekkel szemben.

I.7. A MITOKONDRIÁLIS HAPLOCSOPORTOK

A mutációval kialakult DNS változat elterjedhet a populációkban, ha a hordozó egyén továbbörökíti azt a következő generációba. Az ember történetének vizsgálatakor a genetikusok azt próbálják megfejteni, hogy mikor és hol alakultak ki „különleges” mutációk és ezek miként terjedtek el a különböző népcsoportoknál. Az emberi populációkban évezredek során alakultak ki a törzsféjlődés szempontjából fontos mitokondriális mutációk. A populációk közös együttélése alatt kialakult mutációk megmaradnak a genomban, míg a csoportok szétválása és elszigetelődése után kialakult mutációk már csak az adott populációra lesznek jellemzőek. Így minden populáció hordozza a közösen kialakult, ősbibb mutációkat, illetve a szétválás után kialakult újabb és újabb mutációkat [36]. Az egyedi szekvenciák polimorf pozícióik alapján egy-egy haplotípust határoznak meg. Azok a szekvenciák megegyező haplotípusúak, amelyek ugyanazokat a mutációkat tartalmazzák.

A filogenetikai szempontból fontos pozíciók klasztereket, más szóval haplocsoportokat határoznak meg. Egy bizonyos haplocsoportba tartozó minden egyénre igaz, hogy meghatározott mtDNS pozícióban ugyanolyan típusú nukleotidot hordoz. Ezeken kívül azonban még lehetnek, sőt vannak egyéni

különbségek, hiszen az evolúció halad (a haplocsoportok száma időben változik). A kontinenseken jól behatárolható az egyes haplocsoportok elhelyezkedése [37–39]. A populációkban található haplotípusok és haplocsoportok vizsgálatával következtethetünk a népcsoportot alkotó egyének anyai vonalainak geográfiai eredetére, a populációk más népcsoportokkal való rokonsági viszonyaira, különválásuk lehetséges időpontjára.

A mitokondriális haplocsoportok jelölése az ABC nagy betűivel történik [40].

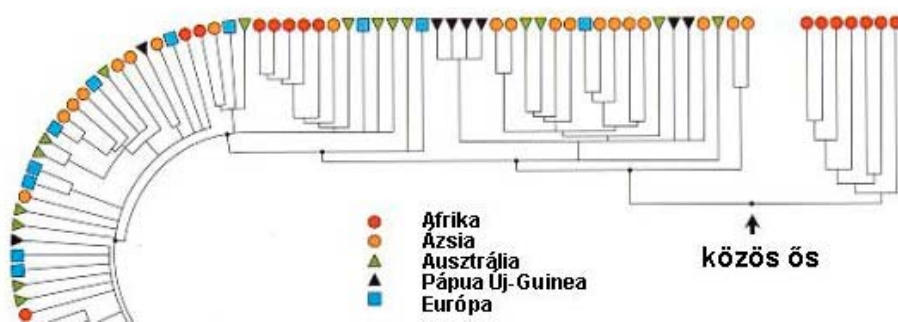
Az egyedi szekvenciák haplocsoportokba sorolását eredetileg egy 14 restrikciós enzimrendszeren alapuló eljárás szerint végezték [40]. Ennek a módszernek azonban hátránya, hogy kivitelezéséhez szükséges lenne a teljes, 16,5 kilobázisos mitokondriális genom amplifikációja. Egy másik alternatíva az egyedi szekvenciák haplocsoportokba sorolásához a D-hurok régió I. hipervariábilis szakaszának amplifikálása és szekvenálása, valamint a szekvencia ismeretében kiválasztott, olyan további haplocsoport specifikus egyedi pozíciók vizsgálata, amelyek feltétlenül szükségesek a kategorizáláshoz, vagy megerősítik a haplocsoportba sorolást.

I.8. A MODERN EMBER EREDETÉNEK VIZSGÁLATA A MITOKONDRIÁLIS DNS ALAPJÁN

Cann és munkatársai (mtsai) 1987-ben a Nature hasábjain publikálták felfedezésüket, miszerint minden ma élő ember legkorábbi anyai őse 140-290 ezer évvel ezelőtt élt az afrikai kontinensen [41]. Vizsgálataik során 147 személy mitokondriális DNS-ét tanulmányozták restrikciós analízissel. A vizsgálatban részt vevő személyek 5 különböző kontinensről származtak (Afrika, Pápua Új-Guinea, Ázsia, Ausztrália, Európa). Restrikciós polimorfizmusok alapján megbecsülték a nukleotid divergencia páronkénti értékét a vizsgált személyek között (átlag= 0,32 mutáció/100 bp; range: 0-1,3 mutáció/100bp). A restrikciós polimorfizmusok adataiból úgynevezett „új típusú” evolúciós fát építettek a takarékos (parsimony) modell alapján, középpont módszert alkalmazva. Az irodalomban korábban megjelenő evolúciós fákkal ellentétben a fa ágainak végpontjain lévő

szimbólumok egyéneket és nem csoportokat jelöltek. A lehetséges modellek közül a legrövidebb ághosszakkal rendelkező fákat választották ki, vagyis ahol a legkevesebb mutáció bekövetkezése kellett ahhoz, hogy egy mitokondriális típusból egy másik kialakuljon. Az összes lehetséges fa két elsődleges ágat tartalmazott. Az egyik ág kizárólag afrikai (afro-amerikai) egyéneket, míg a másik fő ág mind az 5 vizsgált földrésről származó egyéneket tartalmazott (3. ábra). Ez a megfigyelés az ember afrikai eredetére utal. A mitokondriális evolúciós fa nagy ágain, található egyének általában azonos földrésről származtak, de voltak kivételek, amikor afrikai vagy ázsiai, európaiakkal állt közelebbi rokonságban és fordítva. Az eddig végzett mtDNS-t felhasználó vizsgálatból az is kiderült, hogy egy adott népcsoportban számos mitokondriális típus előfordul, egyes esetekben, különösen a földrajzilag izolált populációkban azonban csak egy, vagy csak kevés számú származási ághoz tartozó egyének vannak többségben.

Minél régebbi egy populáció egy adott területen, annál több ideje „halmozódnak” a mutációk a mitokondriális DNS készletében. A populációkon belüli szekvencia divergencia értékét (δ_x) az afrikaiak között találták a legmagasabbnak ($\delta_x=0,47$). Az afrikai populáció tehát variábilisabb, mint bármely, nem-afrikai népcsoport. Kisebb a variabilitás az ázsiai populációban ($\delta_x=0,35$), kevésbé variábilisak az ausztrál és az új-guineai minták ($\delta_x=0,25$, $\delta_x=0,25$). A legkisebb genetikai variabilitást az európai populáció mutatta ($\delta_x=0,23$). Az afrikai populációban megfigyelt legmagasabb divergencia érték szintén alátámasztja az ember afrikai eredetét. A vizsgálatban szereplő populációk közül legfiatalabbnak az európai tekinthető. A mitokondriális haplotípusok jelenlegi eloszlása alapján arra következtethetünk, hogy csak kevés számú interkontinentális migráció következett be az afrikai és eurázsiai kontinens között. A genetikai fa azt mutatja, hogy az összes nem afrikai haplotípusnak egy közös őse van.



3. ábra Evolúciós fa 147 személy mitokondriális DNS-e alapján [41].

A *mitokondriális szekvencia divergencia ráta* meghatározása történhet egy adott földrészre specifikus klaszterek számának, valamint a földrész benépesülési idejének összevetésével (Új-Guinea- legalább 7 specifikus klaszter, benépesülés minimum harminc-ezer éve). Az új-guineai földrész mitokondriális markereit vizsgálva az ember mitokondriális DNS-ében egymillió év alatt 2-4%-os változás figyelhető meg, feltételezve azt, hogy a mitokondriális szekvencia divergencia konstans ráta szerint akkumulálódik az emberekben. Ebből Cann és munkatársai arra következtettek, hogy az összes ma élő ember közös anyai őse, „mitokondriális Éva” 140-290 ezer éve élhetett. Ez az Éva azonban nem az egyetlen nő volt, aki ekkor élt, de ő volt az egyetlen szerencsés, akinek ma is élnek utódai. (Azoknak az asszonyoknak a mtDNS öröksége nem maradt ránk, akik terméketlenek voltak, vagy akiknek csak fiaik születtek, vagy a született lánygyermekük utód nélkül halt meg). Az első olyan klaszter kora, amely képviselői elhagyták Afrikát 90-180 ezer évesre tehető.

Bár többen bírálták Cann és kutatócsoportja munkáját, azonban más módszerekkel is bizonyították az ember afrikai eredetét, valamint a közös anyai őst korát szintén kb. 200 ezer évre becsülték. Vigilant és mtsai a mitokondriális DNS hipervariábilis régiójának szekvenálásával jutott hasonló következtetésre [42]. Megfigyelték, hogy a kontroll régió alapján meghatározott mitokondriális típusok (haplotípusok) erős geográfiai specifitást mutatnak. Az általuk vizsgált 189 egyén adatai alapján genetikai fát szerkesztettek egy külső csoport (Pan troglodytes: közönséges csimpánz) alkalmazásával. Ennél a módszernél nem szükséges feltétel, hogy a mtDNS evolúciós rátája minden vonalon belül állandó legyen.

Csimpánz szekvenciát használtak fel ahhoz, hogy kijelöljék a közös mitokondriális őst a genetikai fán. Az összes lehetséges modell közül csak az afrikai eredetet alátámasztó szerkezetű fák bizonyultak lehetségesnek, hiszen létrehozásukhoz szignifikánsan kevesebb mutációs eseménynek kellett bekövetkeznie, mint a nem-afrikai eredetet mutató fák létrehozásához. A mitokondriális kontroll régióban megfigyelt szekvencia különbségek szintén Afrikában mutatják a legnagyobb értékeket.

Az ember és a csimpánz mitokondriális kontroll régiója között megfigyelhető átlagos nukleotid különbség 15,1%. Azonban ettől lényegesen több mutációs esemény bekövetkeztével kell számolnunk, mert a nukleotid pozíciók többször mutálódhatnak. A transzverziók bekövetkezésének esélye 1:15 a tranzíciókhoz képest. Átlagosan 26,4 transzverziós különbséget figyelhetünk meg az ember és a csimpánz szekvenciájában, ennek alapján 396 tranzícióval számolhatunk. A két faj mitokondriális kontroll régiója között lévő átlagos különbség ez alapján 69,2%-ra tehető. Az ember és a csimpánz vonalának szétválása 4-6 millió éve következett be [43]. Ennek alapján a mitokondriális DNS hipervariábilis régiójában körülbelül minden tízezredik évben rögzül egy mutáció. Minden ma élő ember közös anyai ősének kora 166-249 ezer évre tehető. Ez bizonyítja, hogy Afrika kellett legyen a modern emberré válás egyetlen színtere, valamint, hogy az Afrikából kb. 1 millió éve kivándorolt Homo erectus későbbi leszármazottainak nincs nyoma a mai ember mitokondriális DNS-ében.

I.9. A FÖLD MODERN EMBEREK ÁLTALI BENÉPESÍTÉSE A mtDNS ALAPJÁN

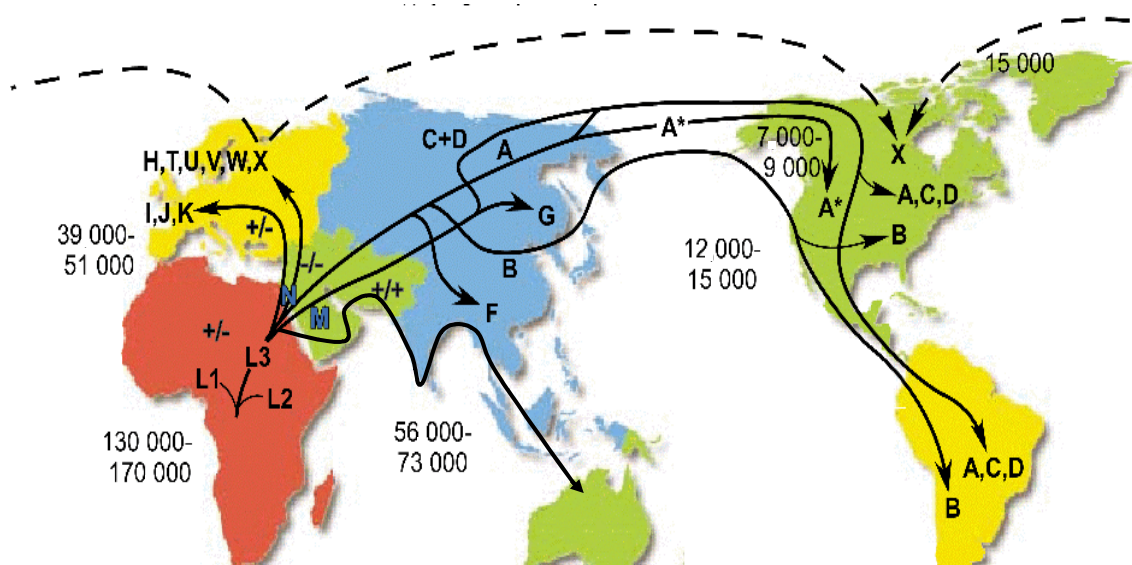
Minden ma élő ember anyai vonala „mitokondriális Évában” fut össze, aki Dél-, vagy Kelet Afrikában született több mint 130 ezer évvel ezelőtt. Az Ő leszármazottai terjedtek el az afrikai kontinensen (L1-L3 haplocsoportok) [44] (4. ábra).

Őseink egy kis csoportja 65-80 000 évvel ezelőtt elhagyta Afrikát [45]. Afrikából az első kivándorlás a Közel-Keletre történt. Ezek a kivándorlók legfeljebb pár ezren lehettek, ma a nem afrikai emberek mindegyike az ő markereiket (is) hordozza. A Közel-Keleten körülbelül 55-60 000 évvel ezelőtt kialakult két fontos

szuper-haplocsoport, az M és az N, melyből az összes többi, nem afrikai klaszter származtatható [46]. Az M szuper-haplocsoport leszármazottai elterjedtek Ázsiában, Ausztráliában és Amerikában, míg az N klaszter képviselői leginkább Európát népesítették be. Ausztráliába a tengerparti “gyorsúton” kb. 60 000 évvel ezelőtt érkezett meg az anatómiailag modern ember [47]. Bár az Afrikából Ausztráliába történő vándorlásnak nem maradt kézzelfogható nyoma a jégkorszak után megemelkedő tengerszint miatt, azonban az ősi mitokondriális leszármazási vonal az Andamán-szigetek, Malajzia és Pápua Új-Guinea egyes őslakosainál, valamint minden ausztrál bennszülöttnél föllelhető [46]. A neandervölgyi emberfaj lakta Európába mintegy 50 000 évvel ezelőtt érkeztek meg *Homo sapiens* őseink. A neandervölgyiek mind kisebb területre szorultak vissza, míg kb. 26 000 éve teljesen eltűntek. (Fosszilis leletek mitokondriális DNS vizsgálata alapján a neandervölgyieknek genetikai nyomai a *Homo sapiens sapiens* utódaiban nem lelhetők fel. Azonban máig megválaszolatlan kérdés, hogy a kétféle embertípus párosodott-e egymással, születtek-e utódaik, és azok termékenyek voltak-e [19]?)

Őseink a Közel-Keletről induló több bevándorlási hullámban vették birtokba Európa tájait, mind a paleolitikum, mind a neolitikum idején. Közép- és Kelet Ázsiába a modern emberek első hulláma kb. 30-50 000 évvel ezelőtt érkezett [46]. Az Újvilágot az akkor még járható Bering-szoroson keresztül 15-25 000 éve népesítették be [48].

Az eddigi vizsgálatok szerint az Y kromoszóma alapvetően ugyanazt a történetet hordozza, mint a mitokondriális DNS. A férfiak genetikai története kisebb eltérésekkel illeszkedik a nők történetével [49].



4. ábra A Föld modern emberek általi benépesítése a mitokondriális DNS alapján

I.9.1 Paleolit és neolit származási vonalak Európában

A jelenkori európaiak mtDNS vizsgálata alapján 7 fő (és két alacsony (1-2%) gyakorisággal előforduló) haplocsoport azonosítható az európaiak között (2. Táblázat) [50]. Az egyes haplocsoportokon belül a DNS szekvenciák vagy azonosak, vagy igen hasonlóak egymáshoz. A mai európaiak több mint 95%-a beleillik a kilenc európai klaszter valamelyikébe (5. ábra). Az egyes haplocsoportok gyökerénél az alapító szekvenciát egyetlen "nő" hordozza minden esetben. Egy klán földrajzi eredéspontja nem szükségképpen az a hely, ahol ma előfordulása a leggyakoribb, hanem ahol a haplocsoporton belül az egyes típusok a legnagyobb változatosságot mutatják [29]. Az európai lakosság igen kevert, ez azt jelenti, hogy majdnem mind a 9 európai haplocsoport képviselői jelen vannak Európa minden országában, illetve populációjában [50].

A haplocsoportok kora megbecsülhető a mitokondriális mutációs ráta felhasználásával a csoporton belül előforduló haplotípusok, valamint a csoport alapító haplotípusa között megfigyelhető átlagos mutációs különbségek alapján [48]. Az európai haplocsoportok kora 50 000 és 10 000 év közé tehető [40, 50, 51]. Az anatómiailag modern ember első települései az európai kontinensen 40-50 000 évesek lehetnek. Az első betelepülők az U5 haplocsoportba tartoztak. Valószínűleg ez a klaszter volt az egyetlen, amelynek képviselői az első betelepülési hullámban érkeztek Európába, valószínűleg a Közel-Keletről. Ebbe a haplocsoportba tartozik a mai európaiak 7%-a [50].

Az T, I, X, H, W, K haplocsoport és az U további alcsoportjai a paleolitikumban, az utolsó jégkorszak tetőpontjának idején már jelen voltak Európában. A jégkorszak tetőpontján Közép-Európa elnéptelenedett, az emberek a Pireneusok és a mai Ukrajna területe között lévő refugiális zónákba és talán a mediterrán partvidékre húzódva vészelték át az eljegesedést [46, 52]. A modern emberi népesség számát tekintve relatív kevés maradt egészen a 15 000 évvel ezelőtti bekövetkezett felmelegedésig. A felmelegedést követően drasztikus népességrobbanás következett be. Az emberek a déli melegebb vidékekről elvándorolva benépesítették Európa északi részeit is. A V haplocsoport megjelenése mintegy 12 500 évvel ezelőttre tehető. A legfiatalabb haplocsoport Európában a J. Beáramlása mintegy 10 000 évvel ezelőtt kezdődött meg a Közel-Keletről érkező korai földművesekkel [50, 53].

Az európai populáció génkészletének lehetséges származására három modellt dolgoztak ki.

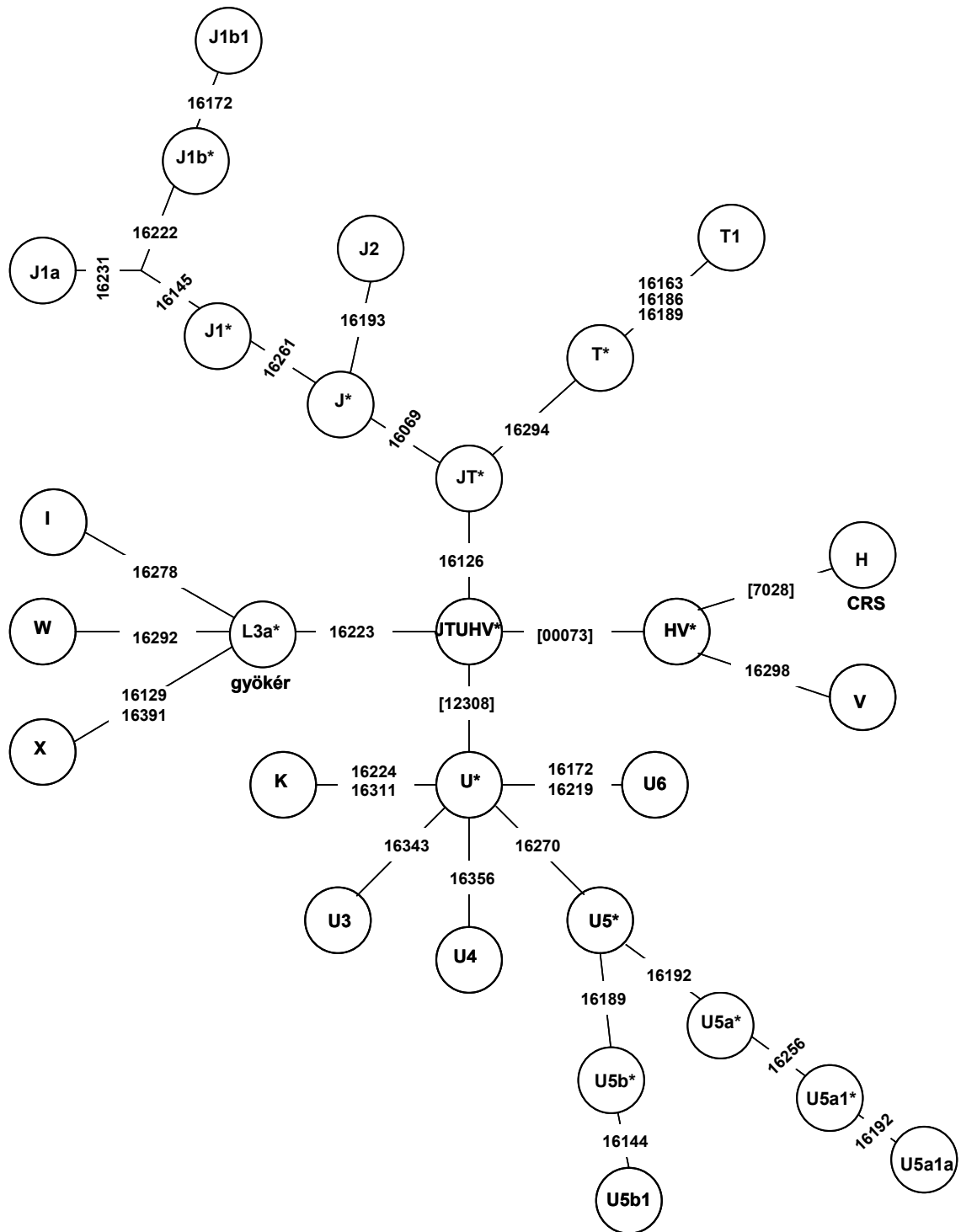
1. *Démikus szétterjedés modell:* A ma élő európaiak elsősorban a neolitikum idején a Közel-Keletről érkező földművelők utódai. A jégkorszak utáni bevándorlással többségbe kerültek Európában a neolit, Közel-Keletről bevándorló földművelők és kiszorították, illetve beolvasztották a kis számú vadászó-gyűjtögető alaplakosságot. Tehát a földművelés a Közel-Keletről Európa többi részébe populációk mozgásával terjedt el [54].
2. *Kulturális diffúzió modell:* Csak minimális számú bevándorló érkezett Európába a Közel-Keletről a neolitikum idején, a mezőgazdaság technikája kulturális érintkezéssel terjedt el [55].
3. *Úttörő gyarmatosítás modell:* Csak kis csoportok vándoroltak be a Közel-Keletről, létszámukat tekintve nem kerültek fölénybe a paleolitikumtól Európában élő őslakossággal szemben [56, 57].

2. Táblázat A kilenc európai mitokondriális haplocsoport keletkezésének ideje és gyakorisága Európában [40, 50, 53].

	Haplocsoport	Keletkezés ideje (évvel ezelőtt)	Gyakorisága a mai európaikban (%)

paleolitikum	U5	~ 50 000	~ 7
	T	~ 47 000	~ 8
	I	~ 35 000	~ 1-2
	X	~ 24 000	~ 2
	H	~ 21 000	~ 50
	W	~ 18 500	~ 1
	K	~ 16 000	~ 7
mezolitikum	V	~ 12 500	~ 4
neolitikum	J	~ 10 000	11-20

Modern minták vizsgálatával megállapítható, hogy a közel-keleti populációk (szíriai, iraki, törökországi, iráni szekvenciák) több mint 50%-ban a J haplocsoportra jellemző mutációs mintázatot hordozzák, míg az európai lakosság csupán ~20%-a tartozik a fiatal haplocsoportba, tehát valójában 80%-ban a vadászó gyűjtögető európaiak leszármazottai, akik csupán átvették a mezőgazdaság technikáját. A fiatal haplocsoport földrajzi elhelyezkedése megfelel az első gazdálkodók régészek szerinti útvonalának. A J haplocsoport két enyhén különböző mutációs készletű ágra válik szét. Az egyik a Balkánról a Kárpát-medencén át és a közép-európai folyóvölgyek mentén halad a Balti-tenger felé (J1b).



4. **ábra** Az európai mitokondriális variációk sematikus filogenetikai fája. A fa ágain a HVR-1 régió mutációs pozíciói láthatóak. Szögletes zárójelben a HVR-2 régió, illetve a kódoló régió mutációi vannak feltüntetve. Az L3a* afrikai klaszter az összes európai klaszter (valamint ázsiai, ausztrál, amerikai és az afrikai szub-klaszterek) ősének tekinthető.

A másik szigorúan a mediterrán partvidéket követve Spanyolországig, majd a portugál atlanti parton halad Nagy-Britannia nyugati feléig (J1a). Csak a Közel-Keleten élők körében sikerült azonosítani olyan mitokondriális típust, amely mindkét európai típus (J1a, J1b) ősének tekinthető [58]. Ezek alapján a J klaszter a Közel-Keletről eredeztethető, legalább két különböző vonal képviselői vándoroltak be Európába, kialakítva a nyugat- és közép-európai klasztereket. A J haplocsoport gyakorisága 2-22% közötti Európa népcsoportjaiban. Legkisebb gyakoriságot a baszkoknál mutatja, leggyakoribb a cornwalli populációban (Egyesült Királyság) [58].

A vizsgálatok tehát az *úttörő gyarmatosítás modellt* igazolták. Európa genetikai történetének fő meghatározói azok a vadászó-gyűjtögetők, akik a paleolitikumtól jelen vannak a kontinensen. Európa melegebb tájaira húzódva túléltek a jégkorszakot (2 fő refugium: atlanti és nyugat mediterrán zóna; Ukrajna környéki, jég körüli zóna [52], és újranepepítették a földrészt a földművelők előtt.

I.10. A FELNŐTT TÍPUSÚ LAKTÓZ INTOLERANCIA

Az előzőekben leírtuk hogyan rögzülnek és öröklődnek az egyes populációkra jellemző mitokondriális DNS változatok. A sejtmagi DNS populációkra jellemző változatai közül kiemelkedően érdekes néhány mutációs jelleg genetikai szelekciója.

Vannak olyan emberi tulajdonságok, amelyek szisztematikus földrajzi eloszlást mutatnak, mint például a bőrszín, az arcforma vagy a táplálékemésztéssel kapcsolatos jellegzetességek. Ezek a tulajdonságok általában környezeti szelekciós hatásokra alakultak ki és maradtak fenn a különböző populációkban. Földrajzi tagozódást mutat például a tejalapú táplálékok emésztésének képessége is.

A tejcukor (laktóz) a tejben és egyes tejtermékekben előforduló természetes összetett cukor, amely a tápcsatornából nem képes közvetlenül felszívódni. A vékonybél bolyhainak csúcsán található laktáz phlorizin hidroláz (LPH, laktáz) enzim katalizálja a laktóz $\beta(1-4)$ glükózid kötésének hidrolízisét, aminek eredményeként felszívódásra képes egyszerű cukrok, glükóz és galaktóz

keletkeznek [59]. A szervezet ezeket a monoszacharidokat felszívódás után energiaforrásként használja fel. Megfelelő mennyiségű laktáz enzim hiányában a laktóz változatlanul halad keresztül a tápcsatornán és a vastagbélbe jutva nagy koncentrációja következtében, ozmózis-hatás eredményeként akadályozza a széklet víztartalmának reszorpcióját. A meg nem emésztett és fel nem szívódott laktózt a különféle szimbiota bélbaktériumok erjesztik, mely során gázok és szerves savak keletkeznek. A savak fokozzák a bél perisztaltikáját, a gázok felfúvódást okoznak. A széklet híg lesz, görcsök, hasmenés alakul ki a tejcukrot tartalmazó táplálék elfogyasztása után.

A születést követően a laktáz enzim magas szinten termelődik, majd a populáció egy részében az eredeti funkcionális kapacitásának 5-10%-ára csökken a felnőtté válás során [60]. A világ lakosságának nagyobb részénél a laktáz enzim aktivitása az életkor előre haladtával fokozatosan csökken, esetleg meg is szűnik [61]. Ennek a folyamatnak a molekuláris mechanizmusa még nem tisztázott. Annyi azonban már ismeretes, hogy főként a transzkripció szintjén szabályozódik [62–64].

A felnőtt típusú laktóz intolerancia széleskörű etnikai variációt mutat. Az laktóz intolerancia előfordulási gyakorisága az európai kaukázusi populációban 3-70%. A felnőtt típusú laktóz emésztő képesség leggyakoribb Észak-Nyugat Európában, legmagasabb gyakoriságot mutatva a svédeknel és a dánoknál. Délkelet felé haladva az alacsony laktóz emésztési képesség az általános állapot; bizonyos ázsiai ill. közép-afrikai országokban a tejcukor-érzékenyek aránya akár a 100%-ot is elérheti. Afrika, Ázsia lakói, valamint az észak-amerikai indiánok esetében a felnőtt lakosság döntő része laktóz intoleranciában szenved. A trópusi Afrikában nagy különbségek vannak az egyes népcsoportok között a felnőttkori tejemésztés képességét illetően. Afrika némely népcsoportjainál (tuareg, fulani és tutsi) csak 7–22%-ban, míg másoknál (bantu) több mint 90%-ban fordul elő a laktóz intolerancia felnőtt korban [61, 65, 66]. A tejcukorbontás képességének hiánya lehet időszakos is, általában valamilyen fertőzés, megbetegedés következtében másodlagosan alakulhat ki.

Az emlősállatok felnőtt korukban nem képesek a tejcukor emésztésére, erre nincs is szükségük, mivel az nem képezi táplálékukat. Az ember esetében csak az állattartás elterjedése után nyílt lehetőség a felnőttkori tejfogyasztásra. A

felnőttkori laktóz emésztő képesség tipikusan olyan mutáció eredménye, amely a mezőgazdasági kultúra elterjedésével szelektálódott. Elsősorban azoknál a népeknél alakult ki, ahol a teljes tejtermékek adják a táplálék fehérje forrásának nagyobb részét [65, 67].

A felnőttkori tejemésztésre képesek bizonyos földrajzi tényezők esetén szelekciós előnyhöz jutottak a laktózt nem emésztőkkel szemben. A kalcium az emberi test számára elengedhetetlenül fontos ásványi anyag, és többek között csontjaink fő alkotója. A kalcium felszívódásához és a csontokba való beépüléséhez D-vitamin is szükséges. A tej az egyik legfontosabb D vitamin és kalcium forrás. D vitamin napsugárzás hatására a bőrben is keletkezik előanyagaiból. Észak-Európában a kevés napfény miatt gyakoribb volt a D vitamin hiány, amely csontváz fejlődési zavarokhoz és az angol kórhoz vezetett, amely a medence torzulását okozva negatívan befolyásolta a reprodukciós képességet.

Sahi és munkatársai már 1973-ben leírták a laktóz érzékenység öröklődését, és kimutatták, hogy a laktóz érzékeny felnőttek homozigóták egy autoszómális recesszív allélra nézve [68]. A laktóz érzékenységet betegségnek tekintjük, pedig a laktóz érzékenységet okozó allél valójában a gén eredeti formája. A mutáns allél domináns az eredeti, vad típussal szemben, és már heterozigóta formában is elegendő a megfelelő laktáz enzim szint fenntartásához. A laktáz gén a 2. kromoszóma q21-es régiójában helyezkedik el. 17 exont tartalmaz, amely egy 6274 nt hosszúságú mRNS-t kódol, és erről egy közel 200 aminosav hosszú protein keletkezik.

A laktóz intolerancia különböző életkorban alakul ki az egyes népcsoportokban. Az etnikai különbségek hátterében álló regulációs mechanizmus nem ismert. A laktáz aktivitás csökkenése az afrikai gyerekeknél hamarabb következik be, mint a finn gyerekeknél [69].

A 60-as évek végétől a laktóz intolerancia diagnózisa a laktóz tolerancia teszten és a hidrogén kilélegzési teszten alapul [70, 71]. Ezeknek a teszteknek az eredménye olyan egyéb faktoroktól is függ, mint a vastagbél baktériumok metabolizmusa, az egyén fizikai aktivitása és glükóz metabolizmusa [72]. Éppen ezért a téves negatív tesztek előfordulási gyakorisága elérheti a 20 %-ot is. Téves pozitív tesztet okozhat a másodlagos laktóz intolerancia és különböző gasztrointesztinális betegségek [73]. Laktóz emésztési nehézség alakulhat ki

gyulladás vagy a bélnyálkahártya károsodásának következtében [74], például a Crohn betegségben, bakteriális és parazita fertőzéseknel [75], lisztérzékenység esetén [61, 76].

A fenotípusbeli különbséget okozó variánst 2002-ben sikerült DNS szinten azonosítani. Linkage disequilibrium (kapcsolt kiegyensúlyozatlanság) és haplotípus analízissel finn családokban, a laktáz gén start kodonjától 5' irányban 13910 bázispárnyira azonosítottak egy olyan genetikai variánst (-13910C/T), amely szoros kapcsoltságot mutatott az öröklött laktáz hiánnyal. A laktáz génben nem sikerült olyan polimorfizmust kimutatni, amely összefüggésbe hozható lett volna a laktáz-fenotípusos különbséggel [77]. A -13910T mutáns allél domináns a vad típusú C variáns fölött. 2003-ban két független kísérletben bizonyították, hogy a -13910 régió klónozási kísérletekben erős transzkripcionális enhanszerként viselkedik, aktiválja a riporter gén expresszióját hely- és orientáció függetlenül, valamint aktiválja az LPH promóter által szabályozott transzkripciót. [63]. Mindkét variáns enhanszer aktivitással rendelkezik, de a -13910T variáns esetében négyszer erősebb az erősítő hatás, mint a -13910C allél esetében [63, 78].

II. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérletsorozatunk egyik célja, hogy tanulmányozzuk a kunok genetikai eredetét, rokonsági viszonyait. A mai magyarországi lakosság egy részének a kunok az ősei. Ez a csoport mára genetikailag és kulturálisan teljesen beolvadt a magyarországi népességbe, ezért genetikai vizsgálatuk csak ásatag leletek tanulmányozásával lehetséges. A csengelei temetkezésből származó kun leletek csontjainak molekuláris genetikai feldolgozásával azokra a kérdésekre kívántunk választ kapni, hogy

- mennyire volt genetikailag egységes a csengelei kun csoport,
- a vizsgált minták milyen arányban hordoznak ázsiai, európai, esetleg más típusú mitokondriális genetikai elemeket

Továbbá összehasonlítást kívántunk végezni, hogy a mai magyar lakosság körében megtalálhatóak-e a kunokra jellemző szekvenciatípusok és haplocsoportok.

Munkánk másik célja, hogy meghatározzuk a ma élő magyarországi magyar populáció anyai eredetű genetikai szerkezetét, valamint kapcsolatrendszerét más eurázsiai populációkkal a mitokondriális DNS vizsgálata alapján.

Terveink között szerepelt autoszómális SNP marker ásatag leleteken történő tanulmányozási módszerének kidolgozása, valamint a polimorfizmus előfordulási gyakoriságának meghatározása a mai magyar populációban. Olyan SNP markert tanulmányoztunk, amely szisztematikus földrajzi tagozódást mutató betegséggel/állapottal hozható összefüggésbe. A felnőtt típusú laktóz intolerancia kialakulásáért felelős génvariánst vizsgáltuk. A vizsgálatok kapcsán az SZTE Gyermekgyógyászati Klinika kérésére hasi panaszokkal rendelkező gyerekek DNS mintáinak felhasználásával tanulmányoztuk az általunk kidolgozott vizsgálati módszer alkalmazhatóságát a felnőtt típusú laktóz intolerancia diagnosztizálására gyermekkorban.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1. MITOKONDRIÁLIS DNS VIZSGÁLATOK

III.1.1. A vizsgált minták

Az 1975-ös ásatás 14 leletéből, a kun vezér maradványaiból, valamint lovából kíséreltünk meg DNS-t izolálni. Az 1975-ös ásatás leletei közül azokat választottuk ki, amelyek makroszkópos struktúrájuk alapján, előzetes tapasztalataink szerint, alkalmasak voltak a genetikai vizsgálat elvégzésére. Az ősi DNS-t 11 lelet őrizte meg vizsgálható formában, melyek archaeológiai és antropológiai adatait a 3. Táblázat tartalmazza.

A mitokondriális DNS vizsgálatokhoz a mai magyar populációt reprezentáló hajsza, illetve vérminták 74 különböző, anyai ágon nem rokon, Magyarország különböző földrajzi régióiban élő, magát magyarnak valló személytől származtak.

3. Táblázat Az archaikus DNS-t tartalmazó kun leletek archeológiai és antropológiai adatai

ANTROPOLÓGIAI TULAJDONSÁGOK			
MINTA	CSONT	NEM ÉS KOR	TÍPUS
Kun1	Jobb felkarcsont	Férfi >55 év	mongolid
Kun3	Bal sípcsont	Gyerek 5-6 év	?
Kun4	Jobb felkarcsont	Felnőtt nő	mongolid
Kun12	Jobb combcsont	Fiatal nő	?
Kun26	Jobb sípcsont	Férfi >40 év	mongolid
Kun27	Jobb combcsont	Gyerek 10-12 év	?
Kun28	Jobb sípcsont	Férfi >40 év	mongolid
Kun30	Bal sípcsont	Férfi >60 év	mongolid
Kun31	Bal combcsont	Fiatal (nő) 12-13 év	?
Kun33	Jobb felkarcsont	Fiatal (nő) 12-13 év	?
Kun112 (vezér)	Jobb combcsont	Férfi >30 év	europid vonásokat mutató mongolid

III.1.2. DNS extrakció modern mintákból

A DNS preparálást hajszálból, vérből és szájüregi kenetből Walsh és munkatársai által kidolgozott módszer alapján hajtottuk végre [79].

III.1.2.1. DNS preparálás hajszálból

- A mintavétel során lehetőség szerint a hajszál hajhagymát tartalmazó 0,5 - 1 cm hosszú szakaszát használjuk (ha a hajhagyma nem áll

rendelkezésünkre, akkor 3-4 darab kb. 1 cm-es hajszáldarabot használunk).

- Az eljárás előtt a hajszálat megtisztítjuk steril, deionizált vízzel történő többszöri öblítéses, áztatásos mosással.
- A hajszál darabot 200 µl 5%-os Chelex-100 oldatot tartalmazó 1,5 ml-es csőbe helyezük úgy, hogy hajszál darab teljesen elmerüljön az oldatban.
- 56^oC-on egy éjszakán át inkubáljuk.
- Nagy sebességgel vortexeljük 5-10 másodpercig.
- Gondosan ellenőrizzük, hogy a hajszáldarab elmerüljön a Chelex-oldatban, majd pontosan 8 percig forrásban lévő vízben inkubáljuk.
- 10000-15000 x g-vel 2-3 percig centrifugáljuk.
- A felülúszót egy új csőbe pipettázzuk és 6-10 µl-ét adjuk templátként a 40 µl végtérfogatú PCR reakcióhoz.
- A maradék minta –20^oC-on 3 hónapig tárolható.

III.1.2.2. DNS preparálása vérből

- A kísérleti személy ujjbegyét 70%-os alkohollal letisztítjuk majd 3 µl perifériás vért veszünk és 1 ml steril, deionizált desztillált vizet tartalmazó 1,5 ml-es csőbe tesszük.
- Buktatva keverjük a cső tartalmát, majd 30 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.
- 10000-15000 x g-vel 2-3 percig centrifugáljuk.
- A felülúszót óvatosan eltávolítjuk az alsó 20-30 µl kivételével.
- Feltöltjük az elegyet 200 µl végtérfogatra 5%-os Chelex-100 oldattal.
- 56^oC-on minimum 40 percig inkubáljuk.
- Nagy sebességgel vortexeljük 5-10 másodpercig.
- Forrásban lévő vízben inkubáljuk pontosan 8 percig.
- 10000-15000 x g-vel 2-3 percig centrifugáljuk.
- A felülúszót egy új csőbe rakjuk és 6-10 µl-ét használjuk templátként a 40 µl végtérfogatú PCR reakcióhoz.
- A maradék minta –20^oC-on 3 hónapig tárolható.

III.1.3. A kun csontmaradványokból történő DNS extrahálás

III.1.3.1. A csontminták előkészítése, porítása

A csont felszíni szennyeződéseit steril, deionizált vízzel és hígított háztartási hypoval eltávolítjuk. A csont diafizisének kb. 2 x 4 cm-es részét fűrészsel kivágjuk, majd a csontdarab összes felszínét UV-C fénnel dekontaminált csiszolókoronggal távolítjuk el legalább 2-3 mm mélységig. A csiszolt csontdarabot 30 percen át 1 J/cm² intenzitású UV-C fénnel megvilágítjuk az esetleges maradék modern DNS eltávolítása érdekében. A csontdarabot steril mozsárban porrá zúzzuk.

III.1.3.2. A DNS extrahálás folyamata

Az ásatag kun csontokból történő DNS izolálást Kalmár és munkatársai által kidolgozott módszer részben módosított változatával végeztem [80].

1. 250 mg csontport 500 µl extrakciós pufferben [0,1 M EDTA, 0,5% N-laurylsarcosine-Na só, 100 mg/ml proteináz K] oldunk fel, majd intenzív vortexelés után 37⁰C-on, folyamatos vertikális forgatással egy éjszakán át inkubáljuk.
2. A mintát 12000 rpm-en 10 percig centrifugáljuk, majd 250 µl felülúszót egy 1,5 ml-es csőbe teszünk.
3. A felülúszóhoz adunk 3,5 µl 1 µg/µl-es Dextran Blue oldatot (Sigma), 250 µl 4M NH₄-acetátot, 500µl 96% etanolt és 2-3 másodpercig vortexeljük.
4. A DNS-t precipitáljuk -70⁰C-on történő 10 perces inkubálással.
5. A képződött csapadékot 15 perces 4⁰C-on végrehajtott 18000 rpm-n történő centrifugálással szeparáljuk.
6. A felülúszót maradéktalanul eltávolítjuk és a csapadékot 20 µl deionizált, steril, kétszer desztillált vízben oldjuk vissza.

7. Az izolált DNS és a maradék extraktum -20°C -on tárolható.

III.1.4. A mitokondrium kontroll régiójának amplifikációja

A PCR reakciót minden esetben 40 μl -es végtérfogatban végeztük 1 \times Ex Taq Puffer (Takara Shuzo Co.), 250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA (Boehringer), 6-6 μM primer, 200 μM ΣdNTP (Takara Shuzo Co.), 2,5 mM MgCl_2 , 7-11 μl csont DNS extraktum, vagy 6-10 μl haj/vér DNS extraktum, valamint 1U Takara Ex Taq Polimeráz (Takara Shuzo Co.) felhasználásával. Az amplifikáció a következő lépésekből állt: denaturálás 93°C -on 90 másodpercig, amplifikáció 35 cikluson keresztül 93°C -on 45 másodpercig, 56°C -on 1 percig és 72°C -on 1,5 percig, a végső extenzió 72°C -on 5 percig történt. A csontminták esetében 2 primer párt használtunk a HVR-1 régió amplifikálására. Az ősi DNS töredezettsége miatt a csontminták esetében egymástól független reakciókban sokszoroztunk két, viszonylag rövid (266bp és 239 bp), részlegesen átfedő DNS szakaszt (L15996-H16221 és L16182-H16401 (4. Táblázat)). A haj, illetve a vér DNS extraktumok esetében a két külső primert (L15996-H16401) használtuk és egy reakcióban amplifikáltuk a vizsgálni kívánt DNS szakaszt. (A számozás a Cambridge-i referencia szekvenciára (CRS) utal [81]).

A PCR termék 10 μl -ét megfutattuk 8%-os natív poliakrilamid gélen és ethidium-bromid festés után ellenőriztük a reakció sikerességét UV transzilluminátor segítségével. A PCR termékek méreteit GelBase gél dokumentációs rendszer felhasználásával határoztuk meg (UVP). Csak abban az esetben vetettük alá további vizsgálatnak a csontmintákból származó PCR terméket, ha a vártnak megfelelő volt a fragmentméret, valamint a használt amplifikációs és extrakciós kontroll mintákban nem volt termék látható.

4. Táblázat A mitokondriális HVR-1 amplifikálásához használt primerek

Primer neve	Szekvencia
L15996	5'-CTCCACCATTAGCACCCAAAGC-3'
L16182	5'-AACCCCCTCCCCATGCTTAC-3'
H16221	5'-TTGATGTGTGATAGTTGAGGG-3'
H16401	5'-TGATTTACGGAGGATGGTG-3'

III.1.5. Célzott haplocsoport specifikus pozíciók vizsgálata

Azokban az esetekben, amikor a HVR-1 szekvencia nem tartalmaz diagnosztikus haplocsoport meghatározó motívumokat (U* és H klaszterek), ahhoz, hogy haplocsoportokba tudjuk sorolni a DNS szekvenciákat, szükség van a HVR-2, illetve a kódoló régió bizonyos, filogenetikai szempontból fontos polimorfikus pozícióinak vizsgálatára is [82–84]. Nyolc PCR primerpárt terveztünk és alkalmaztunk a vizsgálni kívánt polimorf régiók amplifikálására, majd hat esetben restriktions analízissel, két esetben pedig direkt szekvenálással határoztuk meg a haplocsoport specifikus pozíciók allélikus állapotát (5. Táblázat). A 10873. polimorf nukleotid pozíciót minden minta esetében megvizsgáltuk, hogy elkülönítsük az N és az M szuper-haplocsoportokat (N szuper-haplocsoport +10871 MnlI). Az analízis során a következő haplocsoportokat meghatározó polimorf pozíciókat vizsgáltuk: H haplocsoport (-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnlI, -14766MseI (a számok a restriktions enzim felismerőhelyének első nukleotidjára utalnak; +/- jelölés: van/nincs felismerő helye a feltüntetett restriktions enzimnek a szekvenciában)), HV haplocsoport (-73ApaLI, +4580NheI, +7025AluI, +10871MnlI, -14766MseI), V haplocsoport (-73ApaLI, -4580NheI, +10871MnlI, -14766MseI), U* és K haplocsoport (+10871 MnlI, 12308G-direkt szekvenálással), D haplocsoport (-10871 MnlI, -5178 AluI és 10400T direkt szekvenálással).

5. Táblázat A HVR-2 és a kódoló régió vizsgált fragmentumai a haplocsoport specifikus pozíciók és a primer szekvenciák feltüntetésével

Amplifikált régió	Polimorf hely^a	Primer szekvencia	Haplocsoport specifitás
18-274	73 (73 ApaI)	L39: 5'-CCTATTAACCACTCAGGGAGC-3' H253: 5'-TGTGTGAAAGTGGCTGTGCAG-3'	HV, H, V
4502-4679	4580 (4580 NheI)	L4521: 5'-TACCACTCTTTCAGGCACAC-3' H4660: 5'-AAGGATTAATGGATGCGGTTG-3'	V
5124-5273	5178 (5176 AluI)	L5147: 5'-TTATCCTAACTACTACCGCATTCC-3' H5254: 5'-GTGGCTATGATGGTGGGATG-3'	D
6943-7146	7028 (7025 AluI)	L6962: 5'-TTTTTCACCGTAGGTGGCCTG-3' H7126: 5'-TGAAATGGATTTTGGCGTAGG-3'	H
10271-10489	*10400	L10292: 5'-CCTTTTACCCCTACCATGAGCC-3' H10466: 5'-TTATGTAAATGAGGGCATTGG-3'	M szuper-haplocsoport
10743-10986	10873 (10871 MnlI)	L10767: 5'-AACCTAAACCTACTCCAATGCTAAA-3' H10965: 5'-GTGAGGGTAGGAGTCAGGTAG-3'	N szuper-haplocsoport
12194-12419	*12308	L12214: 5'-CCCCTTATTACCGAGAAAAGC-3' H12398: 5'-TTGTTAGGTTAACGAGGGTGG-3'	U
14619-14856	14766 (14766 MneI)	L14638: 5'-ACCCACAAACCCCATTTACT-3' H14856: 5'-AGGAGTGAGCCGAAAGTTTCA-3'	HV, H, V

^a A zárójelben lévő számok a feltüntetett restriktions enzim felismerő helyének első nukleotidjára utalnak.

A haplocsoport specifikus helyeket restriktions emésztéssel vagy direkt szekvenálással (*-gal jelölve a táblázatban) azonosítottuk.

III.1.6. Az amplifikált termékek tisztítása és szekvenálása

Az amplifikáció után 20 µl PCR terméket futtattunk 1,5%-os agaróz gélen, 80 V feszültségen, 90 percig, 1 × Tris-acetát-EDTA bufferben (40 mM Tris, 4 mM nátrium-acetát, 1 mM EDTA pH=7,7-8). A megfelelő méretű terméket kivágtuk a gélből. A DNS visszanyerésére GenElute Agaróz Centrifuga oszlopokat használtunk követve a gyártó utasításait (Supelco Inc). A pelletet 20-30 µl deionizált, desztillált vízben oldottuk fel.

A PCR terméket mindkét irányból direkt szekvenáltuk ABI Prism 310 szekvenátorral (Perkin Elmer) az "ABI Prism BigDye Terminator v. 3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction" kit felhasználásával. A szekvenáláshoz és az amplifikációhoz használt primerek megegyeztek. A szekvenáló reakciót 20 µl-es végtérfogatban végeztük 90-120 ng PCR termék, 15 pmol primer és 8 µl reakció kit mix felhasználásával. A szekvenáló reakció lépései a következők voltak: denaturálás 93°C-on 45 másodpercig, amplifikáció 1 cikluson keresztül 96°C-on 15 másodpercig, 52°C-on 15 másodpercig, 60°C-on 4 percig, majd amplifikáció 30 cikluson keresztül 93°C-on 15 másodpercig, 52°C-on 15 másodpercig, 60°C-on 4 percig. A szekvenáló reakcióelegyből a be nem épült fluoreszcensen jelölt nukleotidokat eltávolítottuk. A tisztítás lépései a következők:

- 20 µl reakcióelegyhez adunk 2,0 µl 3M Na-acetátot (pH 4.6) és 50 µl 95% etanolt
- 5-10 másodpercig vortexeljük
- 1-2 óráig állni hagyjuk szobahőmérsékleten
- 20 percig centrifugáljuk 14000 rpm-en
- a teljes felülúszót eltávolítjuk
- 250 µl 70% -os etanollal mossuk a pelletet
- óvatosan vortexeljük 2-3 másodpercig
- 5 percig centrifugáljuk 12000 rpm-en
- eltávolítjuk a felülúszót és a DNS-t szárítjuk 3-5 percig

A minták kapilláris gél elektroforézisét a szekvenáló labor végezte.

III.1.7. Az amplifikált termékek klónozása

Ahhoz, hogy minimalizálni tudjuk az esetleges kontaminációból adódó téves eredmény előfordulását, 4 csontleletből származó PCR terméket klónoztunk. A klónozási reakcióhoz az “Invitrogen PCR 2.1 Topo” klónozó kit-et használtuk mindenben követve a gyártó utasításait. A klónozott csontleletek esetében a direkt szekvenáláson túl (minták: Kun 1, Kun12, Kun 26, Kun 112) 8-8 klónt szekvenáltunk a rövidebb és a hosszabb kontroll régiós fragmentből is az előzőekben ismertetett módszer alkalmazásával. A négy archaikus minta közül kettőt véletlenszerűen választottunk ki klónozásra (minták: Kun1 és Kun12). A kun vezérből származó (Kun112 minta) PCR terméket azért klónoztuk, mert ennek a leletnek a haplotípusa különösen érdekes archaeológiai szempontból. A Kun26-os minta klónozását az indokolta, hogy a direkt szekvenálás eredménye szerint a hosszabb HVR-1 fragment mutációt tartalmaz a 16223 nukleotid pozícióban, azonban ez a pozíció nem vizsgálható a rövid fragment esetében, mert ez a pozíció a H16221 primer felismerő szekvenciájában található. Továbbá a direkt szekvenálás eredménye szerint a Kun26 ásatag minta az egyetlen, ami ázsiai haplotípust hordozott.

III.1.8. A kontamináció lehetőségének kizárása

Annak érdekében, hogy a modern DNS-sel való kontamináció minden lehetőségét kizárjuk, fizikailag elkülönítettük az “ősi DNS” és “modern DNS” laboratóriumokat, valamint a “pre- és post-PCR” munkahelyeket. Minden vizsgálati lépés, a munka minden fázisa steril körülmények között zajlott, steril kesztyű, védőruházat, szájmászk, hajháló és plexi arcmászk használata mellett. Az összes felhasznált eszközt, a tárolóeszközöket és a munkaterületeket (a lamináris fülke és a PCR fülke) a munka megkezdése előtt, illetve a munka befejezésével sterilre tisztítottuk 50%-os háztartási hypo felhasználásával és legalább 60 percen keresztül 1 J/cm^2 UV-C fényel sugaroztuk be a modern DNS eliminálása érdekében.

A DNS extrakcióhoz és precipitációhoz használt vegyszereket $0,22 \mu\text{m}$ Millex

GS Filter Unit (Millipore) felhasználásával átszűrtük és 30 percig besugaraztuk 1.0 J/cm^2 UV-C fénnel (a proteináz-K kivételével). Pipettázáshoz a kereszt-kontaminációt kizáró, szűrős, steril Universal Fit Filter mikrotippeket (Corning Inc.) használtuk. A csont őrlése és az extrakció lépései 254 nm germicid lámpával ellátott lamináris fülke alatt történtek (DEFI). Az amplifikációs reakciót beépített ultraibolya csövekkel ellátott PCR fülkékben állítottuk össze (UVC/T Cleaner box, BioSan Ltd.). Az "ősi DNS" laboratóriumok levegőjét belső UV csővel felszerelt levegő cirkulátorokkal (UV Air Flow Cleaner-Recirculator UVR-M (BioSan Ltd)) kontamináció mentesítettük.

Mind a DNS extrakciós, mind pedig az amplifikációs lépésnél negatív kontroll mintákat alkalmaztunk, amelyek nem tartalmaztak csontport, illetve templátot.

Minden csontlelet esetében legalább két extrakciót és extrakciónként két amplifikációt hajtottunk végre mind a hosszabb, mind a rövidebb kontroll régiós fragment esetében. Az amplifikációt akkor értékeltük sikeresnek és ismételhetőnek, ha legalább három esetben kaptunk terméket az amplifikációs reakció eredményeként és az alkalmazott negatív kontrollokban termék nem volt látható. A PCR termékeket direkt szekvenáltuk mindkét irányból. Ahhoz, hogy a HVR-2 és a kódoló régió haplocsoport specifikus pozícióit vizsgáljuk, újabb extrakciós reakciókat végeztünk. Minden vizsgált marker esetében egy PCR terméket analizáltunk restriktív emésztéssel, vagy direkt szekvenálással.

A kontamináció kizárása érdekében meghatároztuk minden olyan személy mitokondriális HVR-1 szekvenciáját, aki érintkezésbe került a csontleletekkel.

Ahhoz, hogy teszteljük az aDNS megmaradását a csontokban, minden lelet esetében megpróbáltuk a külső HVR-1 primerekkel (L15996-H16401) is elvégezni az amplifikációt.

Annak érdekében, hogy információkat szerezhessünk az aDNS megmaradásáról a leletek temetkezési helyén, DNS-t izoláltunk a kun vezérrel közös sírba temetett ló ugrócsontjából. A mitokondriális kontroll régió részlegesen átfedő darabjait sokszoroztuk (nt 15717-15893 és nt 15539-15763), majd szekvenáltuk az amplifikációhoz is használt primerek felhasználásával (L15736: 5'-ACAGCCCATGTTCCACGAGC-3', H15875: 5'-AAAGAATGGGCGAGGTTGG-3' és L15560: 5'-CACCATACCCACCTGACATGCA-3'- H15742: 5'-GCTGATTTCCCGCGGCTTGGTG-3'). A nukleotid pozíciók számozásakor Xu és

Arnason számozását követtük [85]. Elkülönített reakciókban humán HVR-1 specifikus primereket is használtunk az ásatag ló DNS templát tisztaságának vizsgálatára.

III.1.9. Genetikai távolság becslése a DNS szekvenciák között

A DNS szekvenciák közötti genetikai távolságon az egy nukleotidra eső átlagos eltérések számát értjük. Minél nagyobb a két egyéni szekvencia (populáció) közötti genetikai távolság, őseik annál régebben váltak el a fejlődés során. Ez az érték csak a teljes vizsgált DNS szakaszon bekövetkezett mutációk számától és a szakasz hosszától függ. Egy adott szakaszon megfigyelhető mutációk száma nem egyenlő az ezen a szakaszon bekövetkezett összes mutáció számával. Ennek oka, hogy a vizsgált DNS szakaszok különböző típusú nukleotidjainak gyakorisága, G+C tartalma, purin- és pirimidin bázisokon bekövetkező transzverziók/tranzíciók aránya rendszerint nem egyenlő. Nagyon gyakran a tranzicionális szubsztitúciók rátája magasabb, mint a transzverziónális szubsztitúcióké. Ez az eset áll fenn a magasabbrendű állatok és az ember mtDNS-ének esetében is.

Ezért kell megbecsülni az adott DNS szakaszon lezajlott összes nukleotid szubsztitúció számát a megfigyelhető nukleotid szubsztitúciók száma alapján. A humán mitokondriális DNS hipervariábilis régiójának evolúciós folyamatát legjobban a Tamura-Nei modell írja le [86], ezért mitokondriális szekvenciák genetikai távolságának számítására ez a modell a legalkalmasabb.

III.1.9.1. Tamura-Nei modell

Ez a matematikai modell korigálja a transzverzió és a tranzíció rátája közötti különbséget, de figyelembe veszi a purin és pirimidin bázisok eltérő tranzíciós rátáját is. A Tamura-Nei modell használata esetében szükség van egy Gamma paraméterrel való korrekcióra, mert a HVS I régión belül az egyes pozíciók között igen nagy a mutációs ráta heterogenitása. Ezt a heterogenitást a Gamma disztribúció α alakú paramétere adja meg. Az α paraméter értéke fordítottan

arányos az egyes pozíciók közötti heterogenitási ráta nagyságával ($\alpha=0,26$ az emberi mitokondriális DNS HVR-1 régiója esetében) [86].

III.1.9.2. Statisztikai analízis

Az NCBI adatbázisból összegyűjtöttünk 2615 előzőleg publikált mitokondriális HVR-1 adatot. A szekvencia adatok 34 modern eurázsiai populációból származtak (10 populáció -3 különböző ázsiai geográfiai régióból, 1 Európa-Ázsia határán élő populáció, 2 populáció az uráli régióból és 21 populáció 5 különböző európai földrajzi régióból) (6. Táblázat). A DNS szekvenciákat nukleotid pozíciók szerint illesztettük és 360 bp-os szakaszaikat (nt 16024-16383; ez a szakasz tartalmazza a filogenetikai szempontból fontos polimorf pozíciókat) használtuk az összehasonlító elemzéshez. Az adatbázisunkba beillesztettük az általunk vizsgált 74 modern magyar és 11 középkori kun minta szekvenciáit is.

Az adatbázis szekvenciáinak összehasonlítására az Arlequin szoftver 2.001 verzióját használtuk [87]. Tamura-Nei modellt és $\gamma=0.26$ Gamma paraméter értéket használva határoztuk meg a populációk közötti genetikai távolságot (F_{ST} érték). A szekvenciák között páronkénti összehasonlítást végeztünk, tehát minden szekvenciát összehasonlítottunk minden szekvenciával. Az egyes populációk közötti genetikai távolság értékeit egy távolság mátrixban kaptuk meg. A populációk közötti páronkénti genetikai távolság értékeit tartalmazó mátrix adatait kétdimenziós térben ábráztuk sokdimenziós skálázás (multidimensional scaling-MDS) eljárással, XLSTAT 7,1 program felhasználásával (Microsoft Office).

6. Táblázat Az általunk összeállított adatbázisban szereplő populációk

Régió	Népcsoport/ Ország	Esetszám	Irodalom
Kelet-Ázsia	burját/ Oroszország	134	Shimada és mtsai. ¹
	koreai/ Korea	290	[88]
	mongol/ Mongólia	103	[89]
Közép-Ázsia	kazah/ Kazahsztán	55	[90]
	kirgiz (<i>hegyvidéki</i>)/ Kirgizisztán	47	[90]
	kirgiz (<i>alföldi</i>)/ Kirgizisztán	48	[90]
	ujgur/ Kazahsztán	55	[90]
Nyugat-Ázsia	grúz/ Grúzia	45	[91]
	kurd/ Grúzia	29	[91]
	török/ Törökország	74	[92, 93]
Európa/Ázsia	oroszl/ Oroszország	50	[94]
Uráli	komi/ Oroszország	16	Voevoda és mtsai. ¹
	moksa/ Oroszország	21	[95]
Közép-Kelet Európa	bolgár/ Bulgária	30	[92]
	székely/ Románia	25	Kalmár és mtsai. ¹
	szlovák/ Szlovákia	129	Metspalu és mtsai. ¹
	ukrán/ Ukrajna	18	[94]
Nyugat-Európa	osztrák/ Ausztria	101	[96]
	boszko-gurin/ Svájc	14	[97]
	rétoromán/ Svájc	16	[97]
Észak-Nyugat Európa	brit/ Nagy-Britannia	100	[98]
Észak-Európa	észt/ Észtország	48	[95, 99]
	finn/ Finnország	50	[95]
	izlandi/ Izland	39	[95]
	karéli/ Oroszország	83	[95]
	lapp/ Norvégia	176	[95, 100]
	svéd/ Svédország	32	[99]
	Dél-Európa	baszk/ Spanyolország	151
bosnyák/ Bosznia		180	Harvey és mtsai. ¹
kanári szgk-i/ Tenerife-Spanyolország		54	[103]
horvát/ Horvátország		64	Harvey és mtsai. ¹
görög/ Kréta- Görögország		186	Villems és mtsai. ¹
szardíniai/ Olaszország		69	[104]
szerb/ Szerbia		67	Harvey és mtsai. ¹

Megjegyzés: ¹A szekvenciaadatok a génbankban érhetők el

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

III.2. LAKTÓZ INTOLERANCIA VIZSGÁLATOK

III.2.1. A vizsgált minták

A laktáz genotípus magyarországi gyakorisági adatainak megállapításához szájkaparékot gyűjtöttünk 110, különböző nemű, anonim magyar felnőttől, akik dél-kelet Magyarországon élnek.

A laktáz genotípus vizsgálatát (csoportunkban jelenleg folyó honfoglalás kori leletek vizsgálata kapcsán) a balatonújlaki temetőből származó öt csontlelet (sírszám 6, 9, 14, 15, 17) esetében kíséreltük meg elvégezni. A leletek a 10. századból származnak, régészeti interpretáció alapján „klasszikus” honfoglaló leletanyaggal voltak eltemetve.

A magyarországi populációban a laktóz intolerancia életkor szerinti kialakulási idejét 149, 2-22 éves gyerek, illetve fiatal felnőtt egyén szájkaparék vagy hajsál mintája alapján határoztuk meg, akiknél a hidrogén kilégzési tesztet előzőleg elvégezték. A vizsgált egyének emésztési zavaroktól szenvedtek. A mintákat az SZTE, Gyermekgyógyászati Klinika és Gyermekegészségügyi Központ bocsátotta rendelkezésünkre.

III.2.2. Laktóz hidrogén kilégzési teszt

A vizsgálatot az SZTE Gyermekgyógyászati Klinikán, kora reggel, üres gyomorral végezték, 1,5 g laktóz/ testsúly kilogramm (max. 50 g) szájon át történő, 10%-os vizes oldatban való elfogyasztása után. A kilégzett levegőmintákat közvetlenül a vizsgálat előtt, majd 30-60-90 és 120 perccel a laktóz adása után analizálták gázkromatográfiával. A teszt eredményét 5%-os alveoláris szén-dioxid koncentrációra normalizálták, ha a szén-dioxid koncentráció ettől alacsonyabb volt [105]. Laktóz intoleranciára utaló pozitív tesztként fogadták el, ha a kilégzett levegő hidrogénkoncentrációja legalább 20 ppm-mel emelkedett 120 perccel a laktóz bevitel után.

III.2.3. DNS izolálás a 10. századi csontmintákból

A csontminták előkészítése, porítása a III.1.3.1. fejezetben leírtak szerint történt.

Dekalcifikálás:

1. 2 gramm csontport 50 ml-es Greiner csőbe teszünk.
2. Hozzáadunk 20 ml 0,5 M EDTA-t (pH=7,5).
3. Intenzíven vortexeljük az elegyet.
4. Folyamatos vertikális forgatás mellett egy napon keresztül inkubáljuk 4°C-on.
5. Centrifugáljuk a mintát 2000× g-vel 15 percig.
6. A felülúszót eltávolítjuk.
7. Ellenőrizzük a dekalifikálást a következő módon:
 - A felülúszó 10 ml-éhez 500 µl NH₄-oxalát (pH=3,0) túltelített oldatát adjuk.
 - Amennyiben a felülúszóban csapadék képződik, úgy a dekalifikálást ismételjük a 2. lépéstől.
8. A pellethez 20 ml steril desztillált vizet adunk.
9. Röviden vortexeljük.
10. Centrifugáljuk a mintát 2000g-n 15 percig.
11. A felülúszót kidobjuk.
12. A vizes mosást 3× ismételjük.

A 10. századi csontmintákból történő DNS izolálást a Qiagen DNeasy Tissue Kit felhasználásával végeztem 25 mg dekalifikált csontporból kiindulva, követve a gyártó utasításait (Quiagen Cat. no. 69504).

III.2.4. DNS preparálás szájüregi kenetből

A kísérleti személyek a mintavétel előtt legalább 1 óráig tartózkodtak a táplálkozástól, valamint a vizen kívüli bármilyen folyadék fogyasztásától.

- Steril mintavevő pálcával a szájüreg belsejét többször körbetöröljük.
- 1 ml steril, deionizált, desztillált vizet 2 ml-es csőbe teszünk.

- A mintavevő pálca kenetet tartalmazó végét belemerítjük a vízbe, abban többször megforgatjuk és szobahőmérsékleten inkubáljuk 40 percig.
- A csöveket becsukjuk és nagy sebességgel vortexeljük 5-10 másodpercig.
- A mintát 10000-15000 x g-vel 2-3 percig centrifugáljuk.
- Eltávolítjuk a felülúszót a maradék 20-30 µl kivételével.
- Az elegyhez adunk 180 µl 5%-os Chelex-100 oldatot.
- Nagy sebességgel vortexeljük 5-10 másodpercig.
- 56^oC-on minimum 40 percig inkubáljuk.
- Nagy sebességgel vortexeljük 5-10 másodpercig.
- Forrásban lévő vízben inkubáljuk pontosan 8 percig.
- 10000-15000 x g-vel 2-3 percig centrifugáljuk.
- A felülúszót átpipettázzuk egy tiszta csőbe és 6-10 µl-ét használjuk DNS templátként a 40 µl végtérfogatú PCR reakcióhoz.
- A maradék minta –20^oC-on 3 hónapig tárolható.

III.2.5. Teljes genom előamplifikáció

A laktóz intoleranciára utaló –13910C/T polimorfizmus vizsgálatát megelőzően a tanulmányozott csontmintákból származó DNS kivonatokon teljes genom előamplifikációt végeztünk (PEP-Primer extension preamplification method) random primerek felhasználásával. A módszer mintegy 30-szorosára emelheti a kiindulási DNS mennyiségét [106].

A reakciót 60 µl végtérfogatban végeztük 1× Ex Taq puffer (Takara Shuzo Co.), 1,9 mM MgCl₂, 33 µM 15 nukleotid hosszúságú random primer, 390 µM dNTP, 5 µl csont DNS extraktum és 5 U Takara Ex Taq Polimeráz enzim (Takara Shuzo Co.) felhasználásával. Az amplifikáció a következő lépésekből állt: 50 cikluson keresztül 90°C 1 perc, 37°C 2 perc, majd 38°C-tól 55°C-ig, 10 másodpercenként 1°C-kal emelve a hőmérsékletet összesen 3 perc, 55°C 4 perc. Negatív és pozitív kontrollokat is alkalmaztunk. Az előamplifikált minta 10 µl-ét használtuk a specifikus PCR amplifikációhoz.

Annak érdekében, hogy tanulmányozzuk, hogy a PEP módszer milyen mértékben torzítja a DNS nukleotid sorrendet, a PEP előkezelésen átesett és előkezelés nélküli DNS templátot használva sokszoroztuk a mitokondriális HVR-1 régió 266 bp-os szakaszát (nt 15975-16241 régió). (Az amplifikációhoz használt primerek szekvenciáit a 4. Táblázat tartalmazza). A PCR termékeket klónoztuk a III.1.7 fejezetben leírtak szerint. Nyolc klónt szekvenáltunk mind a PEP előkezelésen átesett, mind pedig a PEP előkezelés nélküli mintából. Az előkezelésen átesett klónok nem tartalmaztak szignifikánsan több eltérő bázist a kezeletlen mintához viszonyítva, a konszenzus szekvencia megegyezett.

III.2.6. A –13910C/T polimorf régió amplifikációja

A vizsgálni kívánt SNP markert hordozó DNS szakasz tanulmányozására dCAPS (derived cleaved amplified polymorphic sequence) módszert használtunk. A dCAPS Finder 2.0 program alkalmazásával a PCR reakciótermék forward primerének egy nukleotidját kicseréltük az eredeti DNS szállal nem komplementer nukleotidra [107, 108] (forward primer: 5'-GGCAATACAGATAAGATAATGGGAG-3'; reverz primer: 5'-CCTATCCTCGTGGAATGCAGG-3' (a nem komplementer nukleotidot aláhúztuk)). Csontminták esetében az 5' végen Cyber5 fluorofórral jelölt reverz primert alkalmaztunk.

Az SNP beépítésével két új restrikciós enzim felismerő helyet generáltunk a PCR termék szekvenciájába, amely segítségével a PCR reakció után független emésztési reakciókban detektálni tudtuk mind a vad típusú, mind pedig a mutáns allél jelenlétét. A módszer alkalmazására azért volt szükség, mert a vad típusú szekvenciát felismerő enzim az általunk detektálni kívánt genotípus közvetlen közelében is rendelkezik felismerő, illetve hasító hellyel, ezért az emésztés eredményeként keletkező DNS darabok alapján a genotípus elkülönítése nehézségekbe ütközne.

A PCR reakciót 40 µl-es végtérfogatban, 1× Ampli Taq Gold puffer (Applied Biosystems), 6-6 µM primer, 200 µM dNTP, 2,5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems), 6-10 µl haj/szájkaparék DNS extraktum vagy 10 µl random előamplifikált csont DNS extraktum és 1 egység Ampli Taq Gold Polimeráz enzim (Applied

Biosystems) felhasználásával végeztük. Az amplifikációs protokoll a következő volt: 94°C 6 perc; 35 ciklus: 93°C 45 másodperc, 54°C 45 másodperc, 72°C 1 perc; és a végső extenzió 72°C 5 perc.

III.2.7. A laktáz genotípusok megállapítása restriktív emésztéssel

A PCR terméket olyan restriktív enzimekkel kezeltük, amelyek allélspecifikusan hasítják a DNS fragmentet. Így az emésztés után kapott fragmentek méretéből a hordozott SNP allélek azonosíthatók (7. Táblázat). A keletkezett 119 bázispár hosszúságú, módosított PCR terméket NlaIV (Fermentas) és HinfI (Fermentas) restriktív enzimmel emésztettük, hogy kimutassuk a vad típusú C és a mutáns T allél variánsokat. 7 µl PCR terméket emésztettünk 5 egység restriktív enzimmel 1x reakció pufferben, 20 µl ösztérfogatban. Az NlaIV emésztéssel, a C allél jelenléte esetén egy 96 és egy 23 bázispár hosszú emésztési terméket kaptunk, míg a T allél megléte esetén az enzim nem hasított, de a HinfI emésztés egy 97 és egy 22 bázispár hosszú fragmentumot eredményezett. A C allél esetén a HinfI enzim nem emésztette a PCR terméket. Minden vizsgálatnál templát DNS-t nem tartalmazó negatív kontrollt és három különféle pozitív kontrollt (CC, CT, TT) is alkalmaztunk. Az összes vizsgált PCR terméket mindkét restriktív enzimmel emésztettük, elkülönített reakciókban.

Modern minták esetén 10 µl emésztés utáni terméket 8%-os natív poliakrilamid gélben futtattunk, majd etidium-bromiddal történő festés után UV fény alatt vizsgáltuk az eredményt. A fragmentumok méretét GelBase géldokumentációs rendszeren (UVP) határoztuk meg.

A csontminták esetében az emésztés után a DNS fragmentek detektálására az ALF (Automated Laser Fluorescent DNA Sequencer) automatizált számítógépes fragment analízáló és szekvenáló rendszert használtuk, amely igen kis mennyiségű (fentomol nagyságrendű) DNS jelenlétét is képes érzékelni. A detektáló rendszer lézer indukált fluoreszcencián alapul. Az 5' végen fluorofórral jelölt reverz oligonukleotid-primer alkalmazásával végrehajtott PCR reakcióban a keletkező PCR termék a reverz szálának 5' végén fluoreszcens jelölést hordoz. Ezáltal a kapott termék lézer fényvel megvilágítva a detektáló rendszer számára

érzékelhető jelet bocsát ki. A PCR termék 6 µl-ét, valamint az emésztések után kapott termékek 6 µl-ét futtattuk ALF detektáló rendszeren, 6%-os denaturáló poliakrilamid gél felhasználásával. A fragmentek méreteit külső standardként alkalmazott, 50-500 bázispáros molekulamarker létra alkalmazásával azonosítottuk. A kapott fragmentek méretéből megállapítottuk a hordozott SNP allélt/allélokot (7. Táblázat). Minden esetben alkalmaztunk negatív kontrollt és három különféle pozitív kontrollt (CC, CT, TT) is.

7. Táblázat A restrikciós emésztés után detektálható fragment méretek a genotípus függvényében

Restrikciós enzim	Allél	^a Restrikció utáni fragmentméret
NlaIV.	C	96bp*, 23bp
	T	119bp*
Hinfl.	C	119bp*
	T	97bp*, 22bp

Megjegyzés: ^aAz ALF rendszerrel detektálva a *-gal megjelölt méretű fragmenteket azonosíthatjuk.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1 MITOKONDRIÁLIS DNS VIZSGÁLATOK

IV.1.1. Az eredmények hitelességének vizsgálata

Annak érdekében, hogy megállapíthassuk a lehetséges aDNS szennyeződést, minden olyan személy mintájából DNS-t izoláltunk, aki kezelte a csontleleteket a múzeumi vagy a laboratóriumi vizsgálatok során. Amplifikáltuk majd szekvenáltuk e személyek esetén a mitokondriális HVR-1 régiót. Egy esetben sem találtunk a vizsgálatot végző személyek és a leletek között haplotípus egyezést (8. Táblázat).

A leletek tanulmányozása során minden esetben megpróbálkoztunk a hosszabb, 446 bázispár méretű régiót felsokszorozni a HVR-1 külső primerek (L15996-H16401) használatával. Ősi DNS esetében az amplifikált DNS szakaszok mérete és az amplifikáció hatékonysága között fordított arányosság van [27]. Az amplifikálás egy esetben sem vezetett eredményre, ami alátámasztja azt a megállapítást, hogy a rövidebb, sikerrel amplifikált DNS darabok az ásatag csontleletekből származnak.

DNS-t izoláltunk a kun vezér sírjába temettet ló maradványaiból. A lovak mitokondriális DNS-ére specifikus primerekkel sikeresen meghatároztuk az ásatag ló szekvenciáját a vizsgált szakaszon. A ló szekvenciája megegyezett az Equus caballus referencia szekvenciával (GenBank X79547) [85]. Humán specifikus primereket alkalmazva nem kaptunk terméket az ásatag ló DNS-ének vizsgálata során, ami azt jelenti, hogy az archaikus ló DNS izolátum nem tartalmazott humán DNS kontaminációt.

8. Táblázat A csontleleteket tanulmányozó személyek HVR-1 és RFLP haplotípusa

klaszter	kutató	HVR-1 haplotípus	RFLP Haplotípus^a
U5b	régész	189 192 270	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G
J1a	antropológus	69 126 145 231 261	+10871MnII
V	kutató1	240 298	-73ApaLI, -4580NheI, +10871MnII, -14766MseI
H	kutató2	274	-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
H	kutató 3	93 311	-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
J	kutató4	69 126	+10871MnII
K	technikus1	176 192 224 311	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G

Megjegyzések: A számozás a Cambridge-i referencia szekvenciára (CRS) utal [81]. A specifikus bázis jelölése hiányában a feltüntetett pozíciók tranzíciók. ^aA számok a restriktions enzim felismerő helyének első nukleotidpozícióját jelölik. A plusz (+) jel a felismerő hely meglétét, a mínusz (-) jel a felismerő hely hiányát jelöli

*a polimorf pozíciót direkt szekvenálással detektáltuk

IV.1.2. A direkt szekvenálás és a klónozás utáni szekvenálás eredményeinek összehasonlítása

Annak érdekében, hogy kizárjuk az ősi DNS modern DNS-sel való szennyeződésének lehetőségét 4 minta esetében a rövidebb, illetve a hosszabb mitokondriális HVR-1 fragment PCR termékeit klónoztuk, majd 8-8 egyedi klónt szekvenáltunk. A direkt szekvenálás és az egyedi klónok szekvenálása ugyanahhoz a konszenzus szekvenciához vezetett mind a négy esetben (9.

Táblázat). Az egyedi klónok szekvenciáiban találtunk néhány bázist, amely nem egyezett meg a konszenzus szekvenciával, azonban a többi 7 egyedi klón, valamint a direkt szekvenálásból származó eredmény a konszenzus szekvenciával megegyező nukleotidot tartalmazott az adott nukleotid pozícióban.

IV.1.3. A haplocsoportok azonosítása

A vizsgált 11 csontminta esetén az általunk vizsgálni kívánt mitokondriális HVR-1 szakaszt (nt 15975-16420) két, részlegesen átfedő DNS szekvencia összeillesztéséből kaptuk meg. A minták szekvenciái nyolc különböző haplotípusba tartoztak. A szekvenciaadatok, valamint az RFLP mintázatok alapján a minták hat haplocsoportot képviselnek (10. Táblázat). Öt haplocsoport nyugat-eurázsiai kialakulású és elterjedésű (H, V, U, U3 és JT). Ez az öt klán az N szuper-haplocsoport tagja, amelyet meghatározó mutáció közel-keleti kialakulású. Az N szuper-haplocsoport a legtöbb európai eredetű és elterjedésű haplocsoport őséneke, gyökerének tekinthető. A kun leleteknél egy kelet-ázsiai haplocsoport fordul elő (D), amely az M szuper-haplocsoport tagja. Az M szuper-haplocsoport közel-keleti eredetű és a legtöbb ázsiai haplocsoport gyökerének tekinthető (6. ábra).

A Kun26 minta mutációi alapján a D haplocsoportba tartozik. Ez a haplocsoport nagy gyakorisággal fordul elő az észak-kínai populációkban (mongol 33%, oroqen 31,8%, koreai 22,9%, evenk 25,25%, daur 15,6%) [109], közép-ázsiai népcsoportokban (kazah 29%, kirgiz (hegyvidéki) 29,7%, kirgiz (alföldi) 41,6%, ujjur 25,4%) [90] és a szibériai népcsoportokban (sojot 46,7%, burját 33% [110]; nganasan 37%, jukagir 33%, nivk 28%, eszkimó 20%, csukcs 17% [111]). A D haplocsoport előfordulása az európai népcsoportokban nagyon ritka. Kivételt képez ez alól a lapp népcsoport, ahol a D haplocsoport 5,11%-os előfordulású [112]. Az általunk tanulmányozott modern magyar minták között a D haplocsoport nem fordul elő.

9. Táblázat A 266 bázispáros (np 15975-16241) és a 239 bázispáros (np 16182-16420) fragmentek klónozás utáni szekvenálásának eredményei a Kun1, 12, 26, 112 minták esetében, összehasonlítva a CRS-sel [81], illetve a direkt szekvenálás eredményével

Minták	nt	CRS	Klón1	Klón2	Klón3	Klón4	Klón5	Klón6	Klón7	Klón8	Direct seq.
Kun1, nt 15975-16241	16037	A	.	.	G
	16163	A	G
	16298	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	16320	C	.	.	.	T
	16355	C	T	.
Kun12, nt 15975-16241	16013	A	G	.
	16090	T	C	.	.	.
	16134	C	T
	16209	T	C	.	.	.
Kun12, nt 16182-16420	16230	A	G
	16034	G	A	.	.	.
Kun26 nt 15975-16241	16111	C	.	T
	16114	C	.	T
	16171	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	16223	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	16276	T	C
	16311	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	16336	G
Kun26, nt 16182-16420	16362	T	C	C	C	C	C	C	A	C	C
	16363	C	.	T

9. Táblázat (folytatás)

Minták	nt	CRS	K1n1	K1n2	K1n3	K1n4	K1n5	K1n6	K1n7	K1n8	Direct seq.
Kun112, nt 15975-16241	16093	T	.	.	C
	16148	C	.	.	.	T
Kun112, nt 16182-16420	16209	T	.	C
	16343	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	16353	C	T	.	.

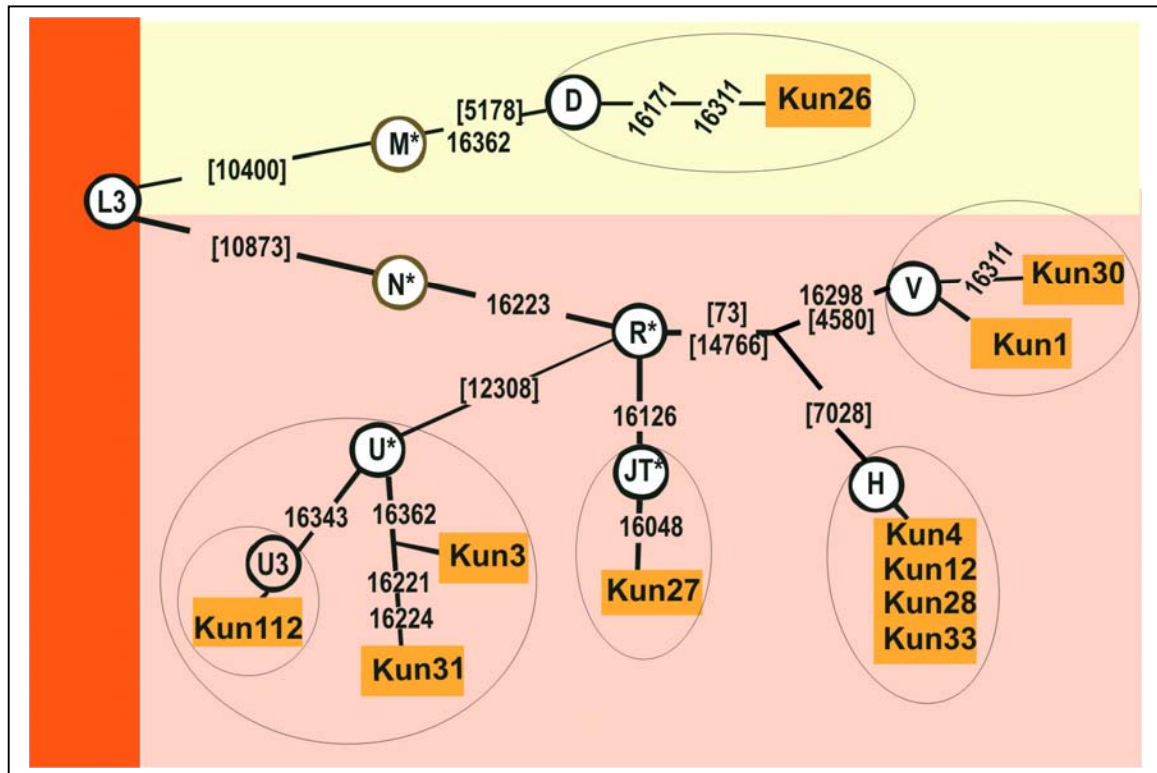
Megjegyzés: Csak a variábilis pozíciók vannak jelölve. A pontok a CRS-sel egyező típusú nukleotidot jelölik. A 16223 nukleotidpozícióban a tranzíció nem detektálható a rövidebb fragment esetén, mert ez a pozíció a H16221 primer felismerő szekvenciájában található.

Összehasonlítva a Kun26 lelet mutációs mintázatát az általunk szerkesztett eurázsiai modern adatbázis adataival 3 olyan egyént tudtunk azonosítani, akinek HVR-1 haplotípusa megegyezik a Kun26 leletével. Egy egyén a modern burját, egy a kirgiz (alföldi) és egy a kirgiz (hegyvidéki) populáció tagja.

A Kun1 és Kun30 minták különböző haplotípusúak, azonban mindkét minta hordozza a V haplocsoportot meghatározó mutációkat. A V haplocsoport leggyakoribb előfordulási területe Európa dél-nyugati és észak-nyugati része, azonban szinte minden európai népcsoportban megtalálható. Ez a haplocsoport legnagyobb gyakorisággal a lappok között fordul elő (39,8%) [113], aminek oka a lapp populációt érintő genetikai sodródásban keresendő. (Genetikai sodródás alakul ki, amikor egy populációban a szaporodó egyedek száma jelentősen csökken, és a populáció egyre távolabb kerül a Hardy–Weinberg féle egyensúlyi állapottól, és a géngyakoriság alakulását véletlen események módosítják. A ritkább allélok közül egyesek végleg ki is veszhetnek a populációból, vagy mások véglegesen megmaradhatnak. A finn populáció esetén valószínűleg az aránylag kis számú alapító egyed, a földrajzi és kulturális izoláció játszott szerepet a genetikai sodródás kialakulásában.) A V haplocsoport a modern magyar minták között is megfigyelhető. Öt magyar egyén tartozik a V csoportba, akik közül 4 mutációs mintázata azonos, egy egyénnek pedig az előzőektől egy mutációs pontban tér el a haplotípusa. Összehasonlítva az ásatag minták HVR-1 szekvenciáit a modern adatbázissal a következőket figyelhetjük meg. A Kun1 mintára jellemző mutációs mintázat leggyakrabban a lappok körében fordul elő, de jelen van 4 általunk tanulmányozott magyar mintában is. A Kun30 lelet haplotípusát eddig csupán egy ma élő, szerb egyénnél azonosították.

A Kun27 minta haplotípusa alapján nem sorolható be egyik fő európai klaszterbe sem. A minta által hordozott szekvenciatípus a JT* haplocsoportba tartozik, amelyet a 16126 nukleotid pozícióban bekövetkezett tranzíció határoz meg. Ennek a haplocsoportnak a jelenlétét Európa közép- és nyugat-mediterrán részén írták le [50]. Adatbázisunkban 4 népcsoportnál figyeltük meg a JT* haplocsoport jelenlétét. A finn, a karéli és a mongol populációban egy-egy, míg az általunk vizsgált magyaroknál két személyre volt jellemző. A Kun27 mintával megegyező haplotípust nem találtunk az adatbázisunkban.

Négy lelet mutációs mintázata megegyezett a Cambridge-i referencia szekvenciáéval. Ezek a minták a H haplocsoportba tartoznak, amely a leggyakoribb klaszter Európában, valamint nagy gyakorisággal fordul elő a Közel-Keleten is [114]. A H haplocsoport a leggyakoribb haplocsoport a modern magyarok között is (36%). A CRS-sel megegyező haplotípus 5 modern magyar mintánál található meg.



6. ábra A kun minták mitokondriális filogenetikai hálózata a HVR-1 szekvenciák és a kódoló régió, valamint a HVR-2 régió haplocsoport specifikus mutációi alapján. (Szögletes zárójelben a HVR-2 régió, illetve a kódoló régió mutációi vannak feltüntetve.)

A Kun3 és Kun31 minta az U* haplocsoportba tartozik. Ez a haplocsoport Dél-Kelet Európában elterjedt, legnagyobb gyakoriságát Bulgária környékén éri el [50]. Az U* klaszter jelenléte a modern magyar populációra is jellemző, azonban nem találtunk szekvencia szinten egyezést az ásatag és a modern minták között. A Kun3 mintára jellemző haplotípus adatbázisunkban az uráli komi populációban

fordul elő nagy gyakorisággal, azonban megfigyelhető számos észak- és dél-európai populációban is. A Kun31 mintával megegyező haplotípust nem találtunk az adatbázisunkban.

A kun vezér (Kun112) az U3 haplocsoportba sorolható mutációi alapján. Ez a haplocsoport egész Európában elterjedt [82], azonban a magyar minták között nem található meg. A kun vezér haplotípusának előfordulása a balkáni régióban gyakori, leggyakoribb a krétai görögök, a bolgárok és a bosnyákok között.

10. Táblázat A modern magyar és kun minták haplotípusai a HVR-1 szekvenciák, valamint a kódoló régió és a HVR-2 RFLP és szekvencia adatai alapján

klaszter	kun	magyar	HVS I haplotípus (-16000)	RFLP haplotípus ^b
H	4	5	CRS	-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
H		4	93 311	-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
H		2	274	-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
H		2	311	-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
H		1	93Y 169 311	-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
H		1	129	-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
H		1	114	-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
H		1	93 221	-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
H		1	261	-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
H		1	60	-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
H		1	239	-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
H		1	66 239	-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
H		1	278 293 311	-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
H		1	354	-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
H		1	51 162	-73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
H		1 ^a	CRS	+73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI, *12308A
H		2 ^a	51 162 304	+73ApaLI, -7025AluI, +10871MnII, -14766MseI, *12308A
HV		1	311	-73ApaLI, +4580NheI, +7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
HV		1	79 311	-73ApaLI, +4580NheI, +7025AluI, +10871MnII, -14766MseI
V	1	4	298	-73ApaLI, -4580NheI, +10871MnII, -14766MseI
V	1		298 311	-73ApaLI, -4580NheI, +10871MnII, -14766MseI
V		1	240 298	-73ApaLI, -4580NheI, +10871MnII, -14766MseI
U*	1		362	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G
U*	1		221 224 362	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G
U*		1	192 311 319	+10871MnII, *12308G
U3	1		343	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G
U4		2	134 356	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G
U5		1	51 270	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G
U5a		1	192 270	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G
U5a1		1	192 256 270	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G
U5a1		1	192 256 270 291	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G
U5a1a		1	256 270	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G
U5a1a		1	256 270 294	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G
U5b		1	189 192 270	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G
K		2	224 311	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G
K		1	93 224 311	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G
K		1	214 224 311	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G
K		1	176 192 224 311	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G
K		1	278 298 311	+73ApaLI, +10871MnII, *12308G

10. Táblázat (folytatás)

klaszter	kun	magyar	HVS I haplotípus (-16000)	RFLP haplotípus ^b
----------	-----	--------	------------------------------	------------------------------

JT	1	48 126	+10871MnII
JT	1	126 366	+10871MnII
JT	1	126 192	+10871MnII
J	5	69 126	+10871MnII
J1a	1	69 126 145 231 261	+10871MnII
T	1	126 294	+10871MnII
T	1	126 294 296 362	+10871MnII
T1	1	126 163 186 189 274 294	+10871MnII
T1	1 ^a	126 163 186 189 294C	+10871MnII
T2	2	126 294 296 304 305	+10871MnII
T2	1	126 294 304	+10871MnII
W	2	223 292	+10871MnII
W	2	223 292 295	+10871MnII
W	1	223 292 295 362	+10871MnII, +5176AluI
W	1	223 292 362	+10871MnII, +5176AluI
F	2	294 304	+73ApaLI, +10871MnII, *12308A
F	1	304 355	+73ApaLI, +10871MnII, *12308A
D	1	171 223 311 362	*10400T, -10871MnII, -5176AluI

Megjegyzések: A számozás a Cambridge-i referencia szekvenciára (CRS) utal [81]. A specifikus bázis jelölése hiányában a feltüntetett pozíciók tranzíciók. Az Y jelzés T-C heteroplazmikus helyet jelez. Az kun és magyar populációkban előforduló egyező haplotípusok árnyalva vannak.

^aA mintában többszörös mutációs esemény lejátszódása valószínűsíthető

^bA pozíciók a restriktációs enzim felismerő helyének első pozícióját. A plusz (+) jel a felismerő hely meglétét, a mínusz (-) jel a felismerő hely hiányát jelölik

*a polimorf pozíciót direkt szekvenálással detektáltuk

A vizsgált 74 modern magyarországi minta 51 különböző haplotípusba sorolható. Ezek a típusok 15 haplocsoportot képviselnek (10. Táblázat). Mindegyik haplocsoport az N szuper-haplocsoportba tartozik. Egy kivételével az összes

haplocsoport nyugat-eurázsiai, azonban egy kelet-ázsiai kialakulású és elterjedésű (F).

Négy klaszter (H, V, U*, JT), megtalálható mind az ásatag minták, mind pedig a modern magyar minták között, azonban a leleteknél előforduló U3 és a D haplocsoport jelenléte a modern magyar népcsoportban nem volt kimutatható. Mind az ásatag, mind a modern magyarországi minták esetében az Európában leggyakoribb H klaszter fordult elő legnagyobb gyakorisággal (~36% mindkét vizsgált csoportban).

Tizenegy olyan haplocsoportot találtunk (HV, U4, U5, K, J, J1a, T, T1, T2, W és F), amely csak a mai populációra volt jellemző. A mai magyar népcsoportban megfigyelhető haplocsoportok gyakorisági adatait a 11. Táblázat mutatja.

Az F haplocsoport 4,1%-os gyakorisága a mai magyaroknál igen érdekes, hiszen ez a haplocsoport szinte teljesen hiányzik a mai európai lakosság mitokondriális típusából. Ennek a haplocsoportnak a jelenléte a mai magyarok génállományában a népcsoport múltbéli ázsiai kapcsolataira utalhat. Az F haplocsoport 5,4%-os gyakorisággal fordul elő a dél-szibériai populációban, a burjátoknál viszonylag ritka, de a kakassiai és altáji népcsoportoknál magas gyakoriságot ér el (22,6%, 9,1%) [110]. Az F haplocsoport (beleértve az alhaplocsoportjait is) 8,4%-os gyakorisággal fordul elő a Kína déli részén élő mongol populációban [109].

A magyaroknál előforduló T, T1, U4 és K haplocsoportok széles körben elterjedtek Európa szerte. A J haplocsoport főként Európa mediterrán, közép és nyugati részére jellemző. A J1a alcsoport jelenlétét az alpesi régióban és Közép-Európa északi részén írták le [50]. Az U5 haplocsoport jelenléte főként Dél-Európára korlátozódik, azonban az ebből a klaszterből származtatható U5a1 alhaplocsoport észak-nyugat európai elterjedésű, az U5a1a alhaplocsoport pedig főként Észak-Nyugat és Észak-Közép Európára jellemző [50]. Egy magyar személy az U5b haplocsoportba sorolható [50, 115]. A haplocsoportot meghatározó mutációs mintázatnak az előfordulását az alpesi területeken és finnországi mintákban írták le [50]. A W és a T2 klaszterek csak nagyon kis gyakorisággal találhatók meg Európában. A W csoport előfordulási aránya az európai populációkban 2,5% alatt van (kivéve az összevontan vizsgált finn-észt mintában, ahol 5,45%, és a bolgár-török csoportban, ahol 3,92% gyakorisági

értéket mutatott) [112]. A T2 haplocsoport gyakorisága Európa szerte 1% alatt van (kivételt képez az Oroszország európai részén élő népcsoport (1,86%) és az izlandi népcsoport (2,57%)) [112]. A magyaroknál a W haplocsoport 8,1%-os, a T2 pedig 4,1%-os gyakorisággal van jelen.

11. Táblázat A mitokondriális haplocsoportok megoszlása a modern magyar populációban

Haplocsoport	mintaszám (74)	gyakoriság (%)
H	27	36.5
HV	2	2.7
V	5	6.8
U*	1	1.4
U4	2	2.7
U5	1	1.4
U5a	1	1.4
U5a1	2	2.7
U5a1a	2	2.7
U5b	1	1.4
K	6	8.1
JT	2	2.7
J	5	6.8
J1a	1	1.4
T	2	2.7
T1	2	2.7
T2	3	4.1
W	6	8.1
F	3	4.1

IV.1.4. Statisztikai analízis

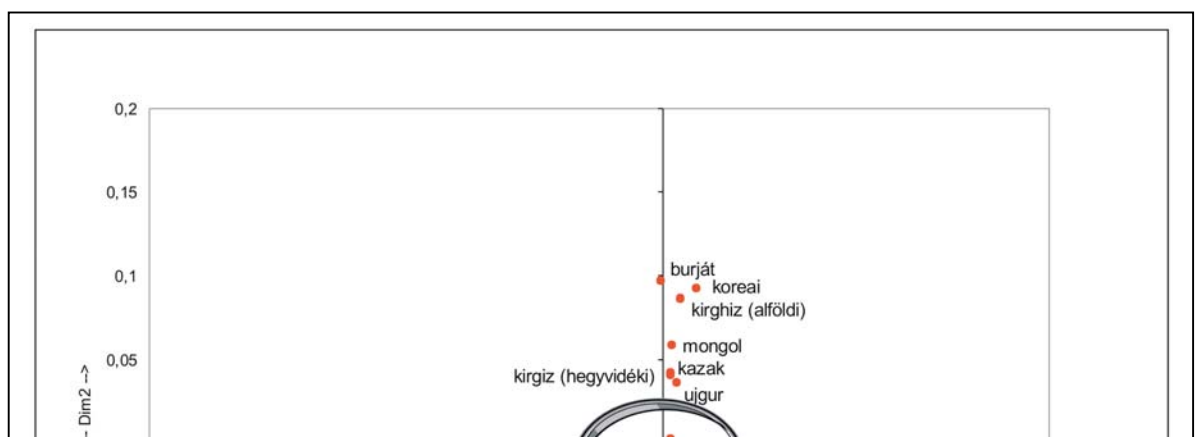
Az adatbázisunk 2700 szekvenciájának páronkénti összehasonlításával határoztuk meg a populációk közötti genetikai távolságot (F_{ST} values). A távolság

mátrixban két populáció közötti genetikai távolság értéke 0 és 1 közé eshet. A genetikai távolság meghatározása során két populáció között negatív távolságértéket kaptunk minden olyan esetben, amikor az egyik populáció szekvenciái között tapasztalható átlagos genetikai távolság meghaladta a két populáció között számított értéket. Ha a távolság értéke 5% alatt van, akkor a vizsgált populációk szekvenciái között nincs szignifikáns különbség, tehát genetikailag nem tekinthetők külön populációknak a vizsgált marker/ genetikai régió alapján. Minél nagyobb a genetikai távolság értéke, annál „távolabbi rokonok” a vizsgált populációk, annál régebben váltak el a fejlődés során.

A távolság mátrix adatai alapján a vizsgált európai populációk között (kivéve a lapp és a boszko-gurin) nem mutatható ki szignifikáns genetikai távolság a mitokondriális HVR-1 vizsgálata alapján. A boszko-gurin népcsoport szignifikáns genetikai távolságot mutat 10 európai (izlandi, észt, finn, lapp, karéli, baszk, szardíniai, kanári-szgek-i, rétoromán, székely) népcsoporttal. A lapp populáció minden vizsgált népcsoporttól szignifikáns genetikai távolságra helyezkedik el. A magyar populáció szignifikáns genetikai távolságot mutat az összes vizsgált kelet- és közép- ázsiai népcsoporttal, valamint a lapp populációval. A kunok szignifikáns genetikai távolságra helyezkedtek el a két kelet-ázsiai (burját, koreai), egy közép-ázsiai (kirgiz (alföldi)), valamint két európai populációtól (lapp, boszko-gurin).

A távolság mátrix adatait kétdimenziós térben ábrázoltuk sokdimenziós skálázás eljárással, ahol a populációkat jelző szimbólumok közötti lineáris távolság egyenesen arányos a népcsoportok közötti genetikai távolsággal (7. ábra).

A szimbólumok alapján a grafikonon két fő csoport különíthető el. Az egyik csoport az összes kelet- és közép-ázsiai populációt tartalmazza és két kisebb alcsoportra osztható. Az egyik alcsoport főként kelet-ázsiai (burját, koreai, kirgiz (alföldi)), a másik leginkább közép-ázsiai (mongol, kazak, ujjur, kirgiz (hegyvidéki)) népcsoportokat tartalmaz. A másik csoport a lappok és a boszko-gurinok kivételével az összes többi populációt tartalmazza.





← kun

7. ábra Kétdimenziós skálázás grafikon 35 eurázsiai populáció és a kunok HVR-1 szekvenciáinak páronkénti genetikai távolsága alapján

A lapp és a boszko-gurin populáció -valószínűleg a genetikai sodródás miatt- az összes többi eurázsiai populációtól távolabb helyezkedik el a grafikonon. A második csoporton belül bár belső struktúra nem mutatható ki a mitokondriális HVR-1 motívumok alapján, azonban a legtöbb európai populáció egymáshoz nagyon közeli rokonságot mutat. Ezen a halmazon belül található a modern

magyar populáció is. Az ősi kun populáció ezen a halmazon kívül helyezkedik el, a legkisebb genetikai távolságot a mai finn, komi és a török népcsoporttól mutatja. Ebben a főcsoportban az ősi kun populáció van a legkisebb genetikai távolságra a másik főcsoportba tartozó populációktól, nevezetesen a közép-és kelet-ázsiai népcsoportoktól.

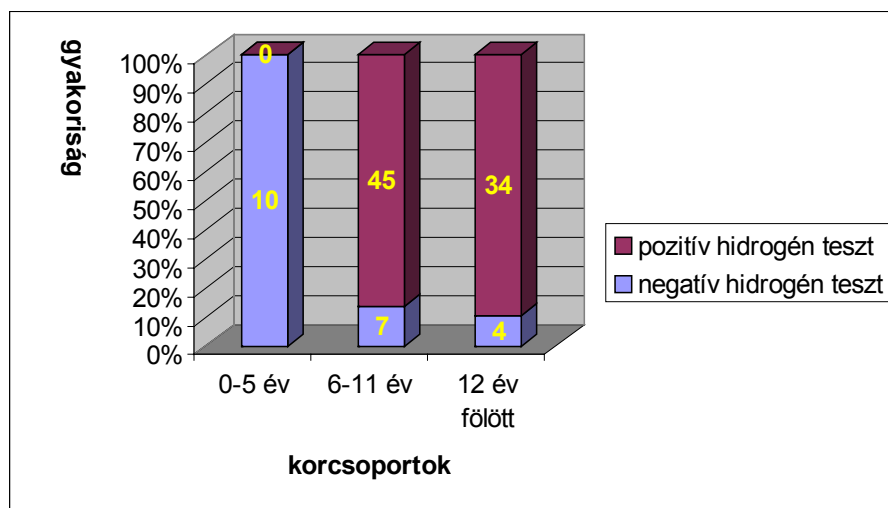
IV.2. A LAKTÓZ INTOLERANCIÁRA UTALÓ POLIMORFIZMUS VIZSGÁLATA

A random kiválasztott, anonim 110 magyar felnőtt egyéntől származó mintában 37% volt a felnőtt típusú laktóz intoleranciára utaló CC genotípus előfordulási gyakorisága. A vizsgált személyek 48%-a mutatott CT és 15%-a TT, laktóz toleranciára utaló genotípusokat.

A vizsgált csontleletek közül 2 minta esetében sikerült a laktáz genotípust meghatározni. A 15. sírszámú csontminta a felnőtt típusú laktóz intoleranciára hajlamosító CC, a 17. sírszámú csontminta a magyar populációban legritkább TT genotípust hordozta.

A vizsgált 149, hasi panaszokkal rendelkező gyerek, illetve fiatal közül 100 CC, 46 CT és 3 TT genotípust hordozott. Az 8. ábra a CC genotípusú gyerekek adatait tartalmazza korcsoportok szerint, összehasonlítva a H₂ kilégzési teszt eredményével.

Öt éves kor alatt mind a tíz CC genotípusú gyerek laktóz H₂ tesztje negatív volt. A 6-11 év közötti korcsoportba 52 CC genotípusú gyerek tartozott. Hét gyerekeknek (13%) negatív és 45 gyerekeknek (87%) pozitív volt a H₂ kilégzési tesztje. Tizenkét éves kor fölött a 38 vizsgált egyén közül 4 esetben (11%) volt negatív és 34 esetben (89%) pozitív a H₂ teszt (12. Táblázat). A négy negatív H₂ teszt eredményt mutató beteg közül kettő 12 éves, egy 13 és egy 16 éves volt. A három fiatalabb gyerek lisztérzékenységben, a 16 éves gyerek gyulladásoos bélbetegségben szenved.



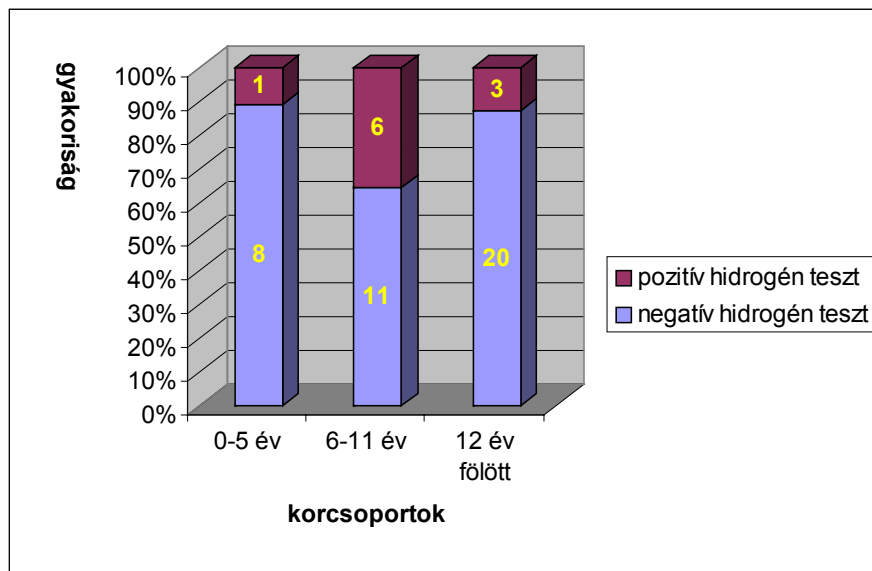
8. ábra A CC genotípusú gyerekek korcsoportok szerinti ábrázolása a H₂ kilégzési teszt eredményének százalékos megoszlása szerint. (Az oszlopokon feltüntettük az esetszámokat.)

12. Táblázat A 12 év feletti CC genotípusú gyerekek és fiatalok H₂ kilégzési teszt eredménye szerinti megoszlása (n-esetszám)

	negatív H ₂ teszt (n)	pozitív H ₂ teszt (n)	összes eset száma
≥12 év	4	34	38
12-13 év	3	12	15
14-15 év	0	9	9
≥ 16 év	1	13	14

A CT, illetve a TT genotípussal rendelkező betegek korcsoport szerinti eloszlását a 9. ábra tartalmazza a H₂ kilégzési teszt eredményének százalékos megoszlása szerint. Az 5 éves kor alatti korosztályba tartozó gyerekek közül 8 negatív, 1 pedig pozitív H₂ kilégzési teszt eredménnyel rendelkezett. Az utóbbi páciens 2 éves és lisztérzékenységben szenved. A 6-11 év közötti korcsoportban

a 17 vizsgált egyén közül 11 esetben negatív, 6 esetben pedig pozitív volt a laktóz H₂ teszt eredménye. Az utóbbi 6 gyerek közül 5-nek a laktóz intolerancia tüneteinek túl egyéb betegsége is volt: egy 6 éves és egy 7,5 éves lisztérzékenységben, két 7 éves és egy 8,5 éves gyerek pedig féregfertőzésben szenved. Egy hét éves gyerekek azonban nincs más ismert betegsége. A 12 év fölötti korosztályba 23 egyén tartozott. Közülük 20-nak negatív, 3-nak pozitív volt a H₂ teszt eredménye. Az utóbbi három gyerek közül kettő 12 éves, egy pedig 13 éves. Az egyik 12 éves és a 13 éves gyerek lisztérzékenységben szenved, azonban a másik 12 éves gyerekeknek nincs más ismert betegsége.



9. ábra A CT és TT genotípusú betegek korcsoport szerinti eloszlása a H₂ kilégzési teszt eredményének százalékos megoszlása szerint. (Az oszlopokon az esetszámokat feltüntettük.)

V. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE, DISZKUSSZIÓ

Munkánk első részében a középkori kun csoport, valamint a mai magyar populáció genetikai eredetét és anyai rokonsági viszonyait tanulmányoztuk mitokondriális markerek vizsgálatával. DNS-t izoláltunk két, régészeti jól dokumentált temetkezési helyről származó emberi csontmaradványokból.

Továbbá az ország különböző régióiból 74 magát magyarnak valló személy perifériás vér, illetve hajszál mintája alapján tanulmányoztuk a mai modern magyar populáció mitokondriális genetikai markereit.

Az emberi maradványok a 14-15. századból származtak. Az előkerült, sok esetben jellegzetesen kunokra utaló leletanyag alapján a maradványok egyértelműen elkülöníthetőek voltak a korabeli magyar népcsoport leletanyagától. A vizsgált 15 lelet közül 11 őrizte meg az aDNS-t vizsgálható formában.

A mitokondriális DNS mutációi alapján nyomon követhetjük az anyai vonalak földrajzi elterjedését, az emberi vándorlási vonalakat. A mtDNS vizsgálata alapján a populációk rokonsági viszonyaira következtethetünk [42].

Az aDNS vizsgálata hozzájárulhat ahhoz, hogy tanulmányozzuk az egyedi temetkezési helyek leleteit, és eredményeink alapján további információkkal szolgálhassunk a régi populációk történetét illetően. Feltehetjük a kérdést, hogy az emberiség eredetének, rokonsági viszonyainak megismerésére irányuló tudományos megközelítésben mikor van feltétlenül szükség -a jóval bonyolultabban kivitelezhető- ásatag leletek vizsgálatára? Olyan esetekben, amikor a modern populáció vizsgálata nem adhat eredményt, mert a vizsgált csoport a letelepedése óta eltelt idő alatt genetikailag keveredhetett más népcsoporttal (népcsoportokkal). Ezért válaszra csak az ősi leletek vizsgálata adhat lehetőséget.

Vizsgálataink során elsőként tanulmányoztuk aDNS alapján az egyik olyan keleti lovas nomád népcsoportot, amely több, más pásztor nomád népcsoporthoz hasonlóan a 13. század folyamán érkezett Európába –jelen esetben a Kárpát-medencébe. Magyarországon elsőként alkalmaztunk archaeogenetikai vizsgálatokat régészeti csontleletek tanulmányozására. A kun minták hat különböző haplocsoportba tartoznak. A tizenegy minta közül négy tartozik a H csoportba, kettő az U* haplocsoport, kettő a V klaszter, egy-egy pedig a JT, U3 és a D haplocsoport képviselője. A D haplocsoport a M szuper-haplocsoport egyik vonala. Jellegzetesen kelet-ázsiai elterjedésű, valamint a második leggyakrabban előforduló haplocsoport a dél-szibériai népcsoportokban is. A D haplocsoport előfordulása az európai népcsoportokban (a lappok kivételével) nagyon ritka [112]. 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 az N szuper-haplocsoport része és 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 populációban. 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 török népcsoportokkal mutatják. A kun csoport anyai vonala az európai népcsoportokhoz közelebb áll, mint az ázsiaiakhoz. Azonban a csengelei kunok a vizsgált európai népcsoportokhoz viszonyítva kisebb genetikai távolságot mutatnak a tanulmányozott kelet- és közép-ázsiai népcsoportokkal.

A nagy mértékű anyai ági keveredés okait talán a kunok szokásaiban kereshetjük. A sztyeppe lovasai az anyai leszármazástól vagy nyelvüktől függetlenül alkottak politikai egységet, vagyis törzsszövetséget [116].

A mondák szerint a kunok gyakran raboltak asszonyokat a meghódított területekről. Így tehát a kunok anyai vonalaiban azon populációk anyai vonalai is tükröződhetnek, akikkel földrajzi kapcsolatba kerültek vándorlásaik során. A kun vezér antropológiai vizsgálata alapján az europa-mongolid embertani típusba sorolható. A genetikai vizsgálatokból kiderül, hogy a vezér anyai vonala európai, pontosabban balkáni eredetű volt, míg mongolid vonásait apjától örökölhette. A kun népcsoport Magyarországra való betelepülésének idejére számos nyugat- európai mitokondriális genetikai elem olvadt génállományukba. Történelmi feljegyzések szerint a kunok a 10. században a Volga és az Urál folyó között telepedtek meg. A 10. században a szláv népek az Elbától a Volga felső folyásáig terjedő területet foglalták el, tőlük északra finnugor népek, délre pedig török népek éltek. A Volga és a Káma folyó találkozásánál terült el az akkori Nagy-Bolgárország. A 12. századig a kunok átvándoroltak e népcsoportok lakta területen, és egészen a Fekete-tengertől északra, a Kárpátokig nyomultak, majd a tatárjárást követően telepedtek le Magyarország területén [117]. Hazánkba való

betelepedésüket megelőző időkben tehát valószínűleg szláv, finnugor és török nyelvet beszélő népcsoportokkal keveredtek.

A csengelei templomban és a körülötte feltárt 37 sír közül meglehetősen sok a gyereksír (22), ami arról árulkodik, hogy a korszakban a gyermekhalandóság igen magas lehetett. A régészet a 11 és 12 sír leletei között rokonságot feltételez. Egy fiatal lány ölében legfeljebb másfél éves kislány nyugodott. Feltételezések szerint testvérek lehettek és valamilyen járvány együtt ragadta el őket. Sajnos a gyerekek csontvázainak megmaradása rosszabb a felnőttekéénél. Vékonyabb a kortikális réteg, ami az aDNS izolálást megnehezíti, sokszor lehetetlenné teszi. Sajnos a feltételezett testvérpár csupán egyik leletéből (Kun12) tudunk aDNS-t izolálni, így nem tudtuk cáfolni, vagy megerősíteni az anyai ági rokoni kapcsolatot.

A kunok csupán az egyik olyan keleti, lovas nomád népcsoport, akik a Kárpát-medence területén telepedtek le. Ilyen csoportok a kunok előtti időkben érkező hunok, avarok, a 10. századi magyarok, vagy a kunokat követő alánok is [118–122]. Lehetséges, hogy a kunokhoz hasonlóan, más betelepülő, esetleg politikai dominanciát is gyakorló népcsoportok az alap lakosságára erőteljesebb kulturális hatás gyakoroltak, mint genetikai hatást. Ezért úgy gondoljuk, hogy érdemes az ősi DNS vizsgálatokat a fentebb említett népcsoportokra is kiterjeszteni. Csoportunkban már jelenleg folyik a magyarországi késő avar kori, honfoglalás kori, és kora Árpád-kori temetők leleteinek genetikai vizsgálata.

A modern magyar minták 15 különböző haplocsoportba tartoznak. Mindegyik jelenlévő haplocsoport a N szuper-haplocsoport része. A modern mintákban előforduló F haplocsoport kelet-ázsiai, míg az összes többi megfigyelt klaszter nyugat-eurázsiai kialakulású és elterjedésű. 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.

Az európai populációk genetikai elemzése nem könnyű feladat, mivel a földrészen belüli migráció miatt ez a kontinens mutatja genetikailag a legnagyobb keveredést.

A modern magyar populációban megfigyelhető haplocsoport gyakorisági adatok nagyon hasonló képet mutatnak a legtöbb közép-európai népcsoport esetében megfigyelt adatokkal. Az európai népcsoportok mitokondriális markereik alapján, igen kevés kivételtől eltekintve (az izolált lapp és boszko-gurin népcsoport) nem tekinthetők külön populációknak. Az európai populációkon belüli genetikai távolság értéke számos esetben nagyobb, mint a populációk között mérhető genetikai távolság. Így van ez a magyarok esetében is. A magyar populáció csupán a lapp populációval mutat szignifikáns genetikai távolságot, az összes többi európai populációval nem.

Az F haplocsoport 4,1%-os gyakorisága mindenképpen figyelemre méltó a mai magyarok között, hiszen ez a klaszter szinte teljesen hiányzik az európai kontinens népcsoportjai esetében. A kelet-ázsiai F haplocsoport jelenléte a mai magyar populációban az ázsiai genetikai rokonságra utalhat.

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 magyarság valószínűleg azoknak a népeknek az ötvözete, amelyek a paleolitikumtól napjainkig telepedtek le a Kárpát-medencében.

Munkánk második részében a felnőtt típusú laktóz toleranciára/intoleranciára utaló, a sejtmagi DNS-ben található, olyan egy nukleinsav bázis polimorfizmust vizsgáltunk, amely eredményeképpen kialakult állapot szisztematikus földrajzi tagozódást mutat. A felnőtt típusú laktóz intolerancia egy autoszómális, recesszíven öröklődő állapot, amelynek előfordulási gyakorisága nagy variabilitást mutat az európai országokban, illetve népcsoportokban. Amíg az észak-európai lakosság körében csupán 2-3% a felnőtt típusú laktóz intolerancia előfordulási aránya, addig a dél-itáliai népcsoportban megközelítőleg 70% [65]. Dél-kelet felé haladva az alacsony laktóz emésztési képesség az általános állapot; szinte 100% Kelet- és Dél-Kelet Ázsiában és Amerika őslakosságában. Afrika némely népcsoportjainál (tuareg, fulani és tutsi) csak 7–22%-ban, míg másoknál (bantu) több mint 95%-ban fordul elő a laktóz intolerancia felnőtt korban [61, 65, 66]. Amíg a tejcukor lebontását végző enzimek

megtalálhatók Kelet- és Nyugat-Afrika pásztornépeinél felnőtt korban is, addig azok szinte teljesen hiányoznak Afrika azon részein, ahol a cecelegyek gyakorlatilag lehetetlenné teszik a szarvasmarhatartást, és így a tejfogyasztás minimális.

Ásatag leletek esetén az izolálható DNS csekély mennyiségén, valamint rossz minőségén túl az autoszómális markerek tanulmányozását bonyolultabbá teszi a mitokondriális DNS-hez képest, hogy a sejtmagi kromoszómákon elhelyezkedő autoszómális markerekből csupán 2 kópiát hordoz egy sejt, míg a mitokondriális DNS száma sejtenként több ezer is lehet. Ezért olyan vizsgálati módszer beállítására volt szükség, amely igen kevés kiindulási DNS templát felhasználásával is kivitelezhető.

A -13910C/T polimorfizmus vizsgálatát megelőzően a tanulmányozott csontmintákból származó DNS extraktumokon teljes genom előamplifikációt végeztünk, amely eljárás mintegy 30-szorosára emelheti a kiindulási DNS mennyiségét [106]. A specifikus PCR reakció, majd az emésztési reakciók elvégzése után az archaikus mintáknál az ALF fluoreszcens detektálási rendszert használtuk a genotípusok megállapítására, amely igen kis mennyiségű DNS jelenlétét is képes érzékelni.

A vizsgált 5 csontlelet közül, amelyek esetén előzőleg sikerrel amplifikáltuk a mitokondriális DNS 238 bázispáros darabját (a vizsgálat nem képezi a dolgozat anyagát), 2 csontminta esetében sikerült a laktáz genotípust is meghatározni. A 15. sorszámú csontminta a felnőtt típusú laktóz intoleranciára hajlamosító CC, a 17. sorszámú csontminta pedig a mai magyar populációban legritkább TT genotípust hordozta. A honfoglalók régészeti elemzések és történelmi feljegyzések szerint ázsiai eredetűek. A laktáz genotípus további vizsgálata indikációt adhat a honfoglaló magyar populáció összetételére vonatkozóan.

Egy korábbi tanulmányban Czeizel és mtsai 535 magyarországi felnőtt laktóz abszorpció kapacitását vizsgálták [123]. Tanulmányuk alapján a laktóz intolerancia átlagos gyakorisága a magyar populációban 37%-nak bizonyult. A -13910C/C genotípus előfordulási gyakoriságát- amely a felnőtt típusú laktóz intoleranciára utal- 37%-nak találtuk az általunk vizsgált, random módon kiválasztott felnőtt csoportban. A genetikai vizsgálat eredménye egyezést mutat a korábbi tanulmány eredményével.

A laktóz intolerancia különböző életkorban manifesztálódik az egyes népcsoportokban [69, 124–127]. Az etnikai különbségek háttérében álló regulációs mechanizmus nem ismert. Egy finn tanulmány szerint a laktáz aktivitás csökkenése a fekete populációban hamarabb következik be (1-8 éves kor között), mint a finn populációban, azonban 12 éves kor után a -13910C/C genotípusú gyerekeknél mindkét csoportban lecsökken a laktáz enzim aktivitás [69]. Ebben a tanulmányban a szerzők megállapították, hogy a -13910C/T genetikai variáns vizsgálata 12 éves kor fölött alkalmas a felnőtt típusú laktóz intolerancia diagnosztizálására.

Az általunk vizsgált gyerekek közül 100 a laktóz intoleranciára utaló CC, 49 pedig a laktóz toleranciára utaló CT, illetve TT genotípussal rendelkezett. Mind a 149 gyerek, illetve fiatal egyén emésztési zavaroktól szenvedett, ami a klinikai kivizsgálást indokolta.

Eredményeink azt mutatják, hogy a felnőtt típusú laktóz intolerancia 5 éves kor alatt nem nyilvánul meg. Amennyiben 5 éves kor alatt a laktóz intolerancia tüneteit tapasztaljuk a -13910 genotípustól, illetve a H₂ teszt eredményétől függetlenül egyéb okot kell keresni a tünetek háttérében. A 6-11 éves korcsoportban a CC genotípusú gyerekek 87%-ának pozitív volt a laktóz H₂ tesztje. A vizsgált CC genotípusú gyerekek közül 38 tartozott a 12-13 éves korosztályba. Közülük négynek a H₂ tesztje negatív volt. 13 éves kor fölött egy kivétellel (16 éves) az összes vizsgált CC genotípusú személy H₂ tesztje pozitív volt.

Eredményeink alátámasztják, hogy a laktáz -13910C/T polimorfizmus vizsgálata alkalmas a felnőtt típusú laktóz intolerancia klinikai szűrésére, bizonyos életkor fölött. Az általunk vizsgált minták alapján a magyar populációban 13 éves kor fölött közel 99%-os pontossággal alkalmazható a genetikai teszt a laktóz intolerancia klinikai diagnosztizálására.

Két, nemrég megjelent tanulmány eredményei szerint a -13910C/T variánson kívül létezhetnek még más, olyan polimorfizmusok a laktáz gén szabályozó régióiban, amelyek hatással lehetnek a laktáz gén expressziójára [63, 128]. Lehetséges, hogy ez az eset áll fenn, abban a négy 12-13 éves korú, illetve 16 éves gyerek esetében, akik CC genotípusúak és negatív H₂ tesztrel rendelkeznek. Másik lehetséges magyarázat, hogy esetükben a „betegség” későbbi életkorban fog kialakulni.

A 49 vizsgált CT, illetve TT genotípussal rendelkező egyén közül 10 esetben volt pozitív a H₂ teszt eredménye. A pozitív H₂ teszttel rendelkező gyerekek közül 5 lisztérzékenységben, 3 pedig féregfertőzésben szenvedett. Ezekben az esetekben a pozitív H₂ teszt eredményét egyéb betegség miatt kialakuló másodlagos laktóz deficiencia okozhatta. Másodlagos laktóz intolerancia alakulhat ki olyan betegségek hatására, amelyek a vékonybél nyálkahártyájának kiterjedt részét érintik. Két esetben azonban ellentmondást találtunk, amikor a betegek CT genotípussal, pozitív H₂ kilégzési teszttel rendelkeztek, és kizárólag a laktóz intolerancia tüneteit mutatták. Egy nemrégiben tanult szerinti kiváló összefüggés figyelhető meg a CC genotípus és a pozitív laktóz H₂ teszt között, azonban a CT, illetve TT genotípus előfordulása és a negatív H₂ teszt közötti korreláció kevésbé szoros [129].

Tanulmányunkban egy gyors és alacsony költségű módszert alkalmaztunk a felnőtt típusú laktóz intoleranciára utaló –13910 polimorfizmus vizsgálatára. dCAPs technikát alkalmazva két új restrikciós felismerő helyet hoztunk létre a PCR termékbe, amelyek segítségével lehetőségünk nyílt, hogy különböző restrikciós enzimeket használva, elkülönített reakciókban azonosítsuk mindkét allélt.

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.

Felhasznált irodalom

1. Ligeti L. A magyarság őstörténete. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1986.

2. Bartha A, Czeglédi K, Róna-Tas A. Magyar őstörténeti tanulmányok. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1977.
3. Székely Gy, Bartha A. Magyarország története. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1987.
4. Glatz F. Magyarok a Kárpát-medencében. 2.kiadás. Budapest: Pallas Lap- és Könyvkiadó Vállalat, 1989.
5. Horváth F. A csengelei kunok ura és népe. Budapest, Archaeolingua Kiadó, 2001.
6. Ferentz I. A kunok és püspökségük. Budapest, Hungary: Gondolat Könyvkiadó, 1981.
7. Kočkarov U.Y.: Burials of the variors fighting on horseback of the late Polovtsi period in Krasnodar territory. *Kratkie Soobšeniya* 217. 94-107. 2004.
8. Szakály F. Kiskunhalas a török uralom alatt.: szerk. Kovács JéSA. Kiskunhalas története 1. Kiskunhalas: Kiskunhalasi Múzeum, 2000: 303-79.
9. Langó P. A jászok korai történetének megítélése a 19-20. században.: A Jász Múzeum Évkönyve 1975-2000. Jászberény, Jász Múzeum, 2000: 151-76.
10. Horváth F. A Móra Ferenc Múzeum évkönyve. Szeged: Móra Ferenc Múzeum, 1978.
11. Kovács L. Les maussues étoilées des XI-XIV siècles conservées au Musée National Hongorois.: *Folia Arch.*: 1971: 165-81.
12. Sándor GM. Mittelaltarlische Knöcherne Gürtel im Ungarischen Nationalmuseum.: *Folia Arch*: 1959: 121.
13. Lindahl T.: Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362. 709-15. 1993.
14. Eglinton G., Logan G.A.: Molecular preservation. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 333. 315-27. 1991.
15. Lindahl T., Nyberg B.: Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 11. 3610-8. 1972.
16. Lindahl T., Karlstrom O.: Heat-induced depyrimidination of deoxyribonucleic acid in neutral solution. *Biochemistry* 12. 5151-4. 1973.
17. Ozawa T., Hayashi S., Mikhelson V.M.: Phylogenetic position of mammoth and Steller's sea cow within Tethytheria demonstrated by mitochondrial DNA sequences. *J.Mol.Evol.* 44. 406-13. 1997.
18. 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.* 38. 645-79. 2004.
19. Krings M., Stone A., Schmitz R.W., Krainitzki H., Stoneking M., Paabo S.: Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90. 19-30. 1997.

20. Handt O., Krings M., Ward R.H., Paabo S.: The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am.J.Hum.Genet.* 59. 368-76. 1996.
21. Hagelberg E., Sykes B., Hedges R.: Ancient bone DNA amplified. *Nature* 342. 485. 1989.
22. Lambert D.M., Ritchie P.A., Millar C.D., Holland B., Drummond A.J., Baroni C.: Rates of evolution in ancient DNA from Adelie penguins. *Science* 295. 2270-3. 2002.
23. Tuross N.: The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia* 50. 530-5. 1994.
24. Scholz M., Giddings I., Pusch C.M.: A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I. *Anal.Biochem.* 259. 283-6. 1998.
25. Higuchi R., Bowman B., Freiberger M., Ryder O.A., Wilson A.C.: DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312. 282-4. 1984.
26. Paabo S.: Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314. 644-5. 1985.
27. Paabo S., Gifford J.A., Wilson A.C.: Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res.* 16. 9775-87. 1988.
28. Golenberg E.M., Giannasi D.E., Clegg M.T., Smiley C.J., Durbin M., Henderson D., Zurawski G.: Chloroplast DNA sequence from a miocene Magnolia species. *Nature* 344. 656-8. 1990.
29. Sykes B. *Éva hét leánya*. Budapest: Európa Könyvkiadó, 2002.
30. Gill P., Ivanov P.L., Kimpton C., Piercy R., Benson N., Tully G., Evett I., Hagelberg E., Sullivan K.: Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat.Genet.* 6. 130-5. 1994.
31. Ivanov P.L., Wadhams M.J., Roby R.K., Holland M.M., Weedn V.W., Parsons T.J.: Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat.Genet.* 12. 417-20. 1996.
32. Fischer E. *A citoplazma belső membránjai és organellumai.: A funkcionális sejttan alapjai*. Budapest-Pécs: Dialógus Campus Kiadó, 1997: 117.
33. Shadel G.S., Clayton D.A.: Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu.Rev.Biochem.* 66. 409-35. 1997.
34. Giles R.E., Blanc H., Cann H.M., Wallace D.C.: Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77. 6715-9. 1980.
35. Olivo P.D., Van de Walle M.J., Laipis P.J., Hauswirth W.W.: Nucleotide sequence evidence for rapid genotypic shifts in the bovine mitochondrial DNA D-loop. *Nature* 306. 400-2. 1983.
36. Marjoram P., Donnelly P.: Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in subdivided populations and implications for early human evolution. *Genetics* 136. 673-83. 1994.

37. Chen J., Sokal R.R., Ruhlen M.: Worldwide analysis of genetic and linguistic relationships of human populations. *Hum.Biol.* 67. 595-612. 1995.
38. Chen Y.S., Torroni A., Excoffier L., Santachiara-Benerecetti A.S., Wallace D.C.: Analysis of mtDNA variation in African populations reveals the most ancient of all human continent-specific haplogroups. *Am.J.Hum.Genet.* 57. 133-49. 1995.
39. Torroni A., Wallace D.C.: MtDNA haplogroups in Native Americans. *Am.J.Hum.Genet.* 56. 1234-8. 1995.
40. Torroni A., Lott M.T., Cabell M.F., Chen Y.S., Lavergne L., Wallace D.C.: mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am.J.Hum.Genet.* 55. 760-76. 1994.
41. Cann R.L., Stoneking M., Wilson A.C.: Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325. 31-6. 1987.
42. Vigilant L., Stoneking M., Harpending H., Hawkes K., Wilson A.C.: African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 253. 1503-7. 1991.
43. Takahata N., Satta Y., Klein J.: Divergence time and population size in the lineage leading to modern humans. *Theor.Popul.Biol.* 48. 198-221. 1995.
44. Forster P.: Ice Ages and the mitochondrial DNA chronology of human dispersals: a review. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 359. 255-64. 2004.
45. Watson E., Forster P., Richards M., Bandelt H.J.: Mitochondrial footprints of human expansions in Africa. *Am.J.Hum.Genet.* 61. 691-704. 1997.
46. Forster P., Torroni A., Renfrew C., Rohl A.: Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. *Mol.Biol.Evol.* 18. 1864-81. 2001.
47. Thorne A., Grun R., Mortimer G., Spooner N.A., Simpson J.J., McCulloch M., Taylor L., Curnoe D.: Australia's oldest human remains: age of the Lake Mungo 3 skeleton. *J.Hum.Evol.* 36. 591-612. 1999.
48. Forster P., Harding R., Torroni A., Bandelt H.J.: Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal. *Am.J.Hum.Genet.* 59. 935-45. 1996.
49. Wells S. Az ember útja. Egy genetikai Odüsszeia. Budapest: Akkord Kiadó, 2006.
50. Richards M.B., Macaulay V.A., Bandelt H.J., Sykes B.C.: Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Ann.Hum.Genet.* 62 (Pt 3). 241-60. 1998.
51. Sykes B., Leifoff A., Low-Beer J., Tetzner S., Richards M.: The origins of the Polynesians: an interpretation from mitochondrial lineage analysis. *Am.J.Hum.Genet.* 57. 1463-75. 1995.
52. Torroni A., Bandelt H.J., Macaulay V., Richards M., Cruciani F., Rengo C., Martinez-Cabrera V., Villems R., Kivisild T., Metspalu E., Parik J., Tolk H.V., Tambets K., Forster P., Karger B., Francalacci P., Rudan P., Janicijevic B., Rickards O., Savontaus M.L., Huoponen K., Laitinen V., Koivumaki S., Sykes B., Hickey E., Novelletto A., Moral P., Sellitto D., Coppa A., Al-Zaheri N., Santachiara-

- Benerecetti A.S., Semino O., Scozzari R.: A signal, from human mtDNA, of postglacial recolonization in Europe. *Am.J.Hum.Genet.* 69. 844-52. 2001.
53. Sykes B.: The molecular genetics of European ancestry. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 354. 131-8. 1999.
 54. Ammerman A, Cavalli-Sforza LL. *The Neolithic Transition and Genetics of Populations in Europe.* Princeton: Princeton University Press, 1984.
 55. Dennel R. *European economic prehistory: a new approach.* London: Academic Press, 1983.
 56. van Andel T.H., Runnel C.N.: The earliest farmers in Europe. *Antiquity* 69. 481-500. 1995.
 57. Willis K.J., Bennett K.D.: The Neolithic transition- fact or fiction? *Palaeo-ecological evidence from the Balkans. Holocene* 4. 326-30. 1994.
 58. Richards M., Corte-Real H., Forster P., Macaulay V., Wilkinson-Herbots H., Demaine A., Papiha S., Hedges R., Bandelt H.J., Sykes B.: Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *Am.J.Hum.Genet.* 59. 185-203. 1996.
 59. Swallow DM, Hollox EJ. The genetic polymorphism of intestinal lactase activity in adult humans.: szerk. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.* New York: McGraw-Hill, 2000: 1651-63.
 60. Chao C.K., Sibley E.: PCR-RFLP genotyping assay for a lactase persistence polymorphism upstream of the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Genet.Test.* 8. 190-3. 2004.
 61. Gudmand-Hoyer E., Skovbjerg H.: Disaccharide digestion and maldigestion. *Scand.J.Gastroenterol.Suppl* 216. 111-21. 1996.
 62. Fajardo O., Naim H.Y., Lacey S.W.: The polymorphic expression of lactase in adults is regulated at the messenger RNA level. *Gastroenterology* 106. 1233-41. 1994.
 63. Troelsen J.T., Olsen J., Moller J., Sjostrom H.: An upstream polymorphism associated with lactase persistence has increased enhancer activity. *Gastroenterology* 125. 1686-94. 2003.
 64. Wang Y., Harvey C.B., Pratt W.S., Sams V.R., Sarner M., Rossi M., Auricchio S., Swallow D.M.: The lactase persistence/non-persistence polymorphism is controlled by a cis-acting element. *Hum.Mol.Genet.* 4. 657-62. 1995.
 65. Sahi T.: Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand.J.Gastroenterol.Suppl* 202. 7-20. 1994.
 66. Swallow D.M.: Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu.Rev.Genet.* 37. 197-219. 2003.
 67. Suarez F.L., Savaiano D.A.: Diet, genetics, and lactose intolerance. *Food Technol* 51. 74-6. 1997.

68. Sahi T., Isokoski M., Jussila J., Launiala K., Pyorala K.: Recessive inheritance of adult-type lactose malabsorption. *Lancet* 2. 823-6. 1973.
69. Rasinpera H., Savilahti E., Enattah N.S., Kuokkanen M., Totterman N., Lindahl H., Jarvela I., Kolho K.L.: A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut* 53. 1571-6. 2004.
70. Metz G., Jenkins D.J., Peters T.J., Newman A., Blendis L.M.: Breath hydrogen as a diagnostic method for hypolactasia. *Lancet* 1. 1155-7. 1975.
71. Newcomer A.D., McGill D.B., Thomas P.J., Hofmann A.F.: Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency. *N.Engl.J.Med.* 293. 1232-6. 1975.
72. Obermayer-Pietsch B.M., Bonelli C.M., Walter D.E., Kuhn R.J., Fahrleitner-Pammer A., Berghold A., Goessler W., Stepan V., Dobnig H., Leb G., Renner W.: Genetic predisposition for adult lactose intolerance and relation to diet, bone density, and bone fractures. *J.Bone Miner.Res.* 19. 42-7. 2004.
73. Hammer H.F., Fine K.D., Santa Ana C.A., Porter J.L., Schiller L.R., Fordtran J.S.: Carbohydrate malabsorption. Its measurement and its contribution to diarrhea. *J.Clin.Invest* 86. 1936-44. 1990.
74. Vesa T.H., Marteau P., Korpela R.: Lactose intolerance. *J.Am.Coll.Nutr.* 19. 165S-75S. 2000.
75. Adolfsson O., Meydani S.N., Russell R.M.: Yogurt and gut function. *Am.J.Clin.Nutr.* 80. 245-56. 2004.
76. Saavedra J.M., Perman J.A.: Current concepts in lactose malabsorption and intolerance. *Annu.Rev.Nutr.* 9. 475-502. 1989.
77. 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.* 30. 233-7. 2002.
78. Olds L.C., Sibley E.: Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element. *Hum.Mol.Genet.* 12. 2333-40. 2003.
79. 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* 10. 506-13. 1991.
80. 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.* 28. E67. 2000.
81. Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers R.N., Turnbull D.M., Howell N.: Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat.Genet.* 23. 147. 1999.
82. Macaulay V., Richards M., Hickey E., Vega E., Cruciani F., Guida V., Scozzari R., Bonne-Tamir B., Sykes B., Torroni A.: The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs. *Am.J.Hum.Genet.* 64. 232-49. 1999.

83. Quintana-Murci L., Semino O., Bandelt H.J., Passarino G., McElreavey K., Santachiara-Benerecetti A.S.: Genetic evidence of an early exit of Homo sapiens sapiens from Africa through eastern Africa. *Nat.Genet.* 23. 437-41. 1999.
84. Torroni A., Huoponen K., Francalacci P., Petrozzi M., Morelli L., Scozzari R., Obinu D., Savontaus M.L., Wallace D.C.: Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144. 1835-50. 1996.
85. Xu X., Arnason U.: The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene* 148. 357-62. 1994.
86. Meyer S., Weiss G., von Haeseler A.: Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. *Genetics* 152. 1103-10. 1999.
87. Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin version 2.000: a software for population genetic data analysis. 2000. Geneva, Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva. Ref Type: Computer Program
88. Lee S.D., Shin C.H., Kim K.B., Lee Y.S., Lee J.B.: Sequence variation of mitochondrial DNA control region in Koreans. *Forensic Sci.Int.* 87. 99-116. 1997.
89. Kolman C.J., Sambuughin N., Bermingham E.: Mitochondrial DNA analysis of Mongolian populations and implications for the origin of New World founders. *Genetics* 142. 1321-34. 1996.
90. Comas D., Calafell F., Mateu E., Perez-Lezaun A., Bosch E., Martinez-Arias R., Clarimon J., Facchini F., Fiori G., Luiselli D., Pettener D., Bertranpetit J.: Trading genes along the silk road: mtDNA sequences and the origin of central Asian populations. *Am.J.Hum.Genet.* 63. 1824-38. 1998.
91. Comas D., Calafell F., Bendukidze N., Fananas L., Bertranpetit J.: Georgian and kurd mtDNA sequence analysis shows a lack of correlation between languages and female genetic lineages. *Am.J.Phys.Anthropol.* 112. 5-16. 2000.
92. Calafell F., Underhill P., Tolun A., Angelicheva D., Kalaydjieva L.: From Asia to Europe: mitochondrial DNA sequence variability in Bulgarians and Turks. *Ann.Hum.Genet.* 60 (Pt 1). 35-49. 1996.
93. Comas D., Calafell F., Mateu E., Perez-Lezaun A., Bertranpetit J.: Geographic variation in human mitochondrial DNA control region sequence: the population history of Turkey and its relationship to the European populations. *Mol.Biol.Evol.* 13. 1067-77. 1996.
94. Malyarchuk B.A., Derenko M.V.: Mitochondrial DNA variability in Russians and Ukrainians: implication to the origin of the Eastern Slavs. *Ann.Hum.Genet.* 65. 63-78. 2001.
95. Sajantila A., Lahermo P., Anttinen T., Lukka M., Sistonen P., Savontaus M.L., Aula P., Beckman L., Tranebjaerg L., Gedde-Dahl T., Issel-Tarver L., DiRienzo A., Paabo S.: Genes and languages in Europe: an analysis of mitochondrial lineages. *Genome Res.* 5. 42-52. 1995.

96. Parson W., Parsons T.J., Scheithauer R., Holland M.M.: Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences: application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. *Int.J.Legal Med.* 111. 124-32. 1998.
97. Pult I., Sajantila A., Simanainen J., Georgiev O., Schaffner W., Paabo S.: Mitochondrial DNA sequences from Switzerland reveal striking homogeneity of European populations. *Biol.Chem.Hoppe Seyler* 375. 837-40. 1994.
98. Piercy R., Sullivan K.M., Benson N., Gill P.: The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian genetic identification. *Int.J.Legal Med.* 106. 85-90. 1993.
99. Sajantila A., Salem A.H., Savolainen P., Bauer K., Gierig C., Paabo S.: Paternal and maternal DNA lineages reveal a bottleneck in the founding of the Finnish population. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93. 12035-9. 1996.
100. Delghandi M., Utsi E., Krauss S.: Saami mitochondrial DNA reveals deep maternal lineage clusters. *Hum.Hered.* 48. 108-14. 1998.
101. Bertranpetit J., Sala J., Calafell F., Underhill P.A., Moral P., Comas D.: Human mitochondrial DNA variation and the origin of Basques. *Ann.Hum.Genet.* 59 (Pt 1). 63-81. 1995.
102. Corte-Real H.B., Macaulay V.A., Richards M.B., Hariti G., Issad M.S., Cambon-Thomsen A., Papiha S., Bertranpetit J., Sykes B.C.: Genetic diversity in the Iberian Peninsula determined from mitochondrial sequence analysis. *Ann.Hum.Genet.* 60 (Pt 4). 331-50. 1996.
103. Pinto F., Gonzalez A.M., Hernandez M., Larruga J.M., Cabrera V.M.: Genetic relationship between the Canary Islanders and their African and Spanish ancestors inferred from mitochondrial DNA sequences. *Ann.Hum.Genet.* 60 (Pt 4). 321-30. 1996.
104. Di Rienzo A., Wilson A.C.: Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88. 1597-601. 1991.
105. Niu H.C., Schoeller D.A., Klein P.D.: Improved gas chromatographic quantitation of breath hydrogen by normalization to respiratory carbon dioxide. *J.Lab Clin.Med.* 94. 755-63. 1979.
106. 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* 89. 5847-51. 1992.
107. 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.* 14. 387-92. 1998.
108. Neff M.M., Turk E., Kalishman M.: Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends Genet.* 18. 613-5. 2002.
109. Kong Q.P., Yao Y.G., Liu M., Shen S.P., Chen C., Zhu C.L., Palanichamy M.G., Zhang Y.P.: Mitochondrial DNA sequence polymorphisms of five ethnic populations from northern China. *Hum.Genet.* 113. 391-405. 2003.

110. Derenko M.V., Grzybowski T., Malyarchuk B.A., Dambueva I.K., Denisova G.A., Czarny J., Dorzhu C.M., Kakpakov V.T., Miscicka-Sliwka D., Wozniak M., Zakharov I.A.: Diversity of mitochondrial DNA lineages in South Siberia. *Ann.Hum.Genet.* 67. 391-411. 2003.
111. Torroni A., Sukernik R.I., Schurr T.G., Starikorskaya Y.B., Cabell M.F., Crawford M.H., Comuzzie A.G., Wallace D.C.: mtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans. *Am.J.Hum.Genet.* 53. 591-608. 1993.
112. Helgason A., Hickey E., Goodacre S., Bosnes V., Stefansson K., Ward R., Sykes B.: mtDNA and the islands of the North Atlantic: estimating the proportions of Norse and Gaelic ancestry. *Am.J.Hum.Genet.* 68. 723-37. 2001.
113. Derbeneva O.A., Starikovskaya E.B., Wallace D.C., Sukernik R.I.: Traces of early Eurasians in the Mansi of northwest Siberia revealed by mitochondrial DNA analysis. *Am.J.Hum.Genet.* 70. 1009-14. 2002.
114. Torroni A., Bandelt H.J., D'Urbano L., Lahermo P., Moral P., Sellitto D., Rengo C., Forster P., Savontaus M.L., Bonne-Tamir B., Scozzari R.: mtDNA analysis reveals a major late Paleolithic population expansion from southwestern to northeastern Europe. *Am.J.Hum.Genet.* 62. 1137-52. 1998.
115. Richards M., Macaulay V., Hickey E., Vega E., Sykes B., Guida V., Rengo C., Sellitto D., Cruciani F., Kivisild T., Villems R., Thomas M., Rychkov S., Rychkov O., Rychkov Y., Golge M., Dimitrov D., Hill E., Bradley D., Romano V., Cali F., Vona G., Demaine A., Papiha S., Triantaphyllidis C., Stefanescu G., Hatina J., Belledi M., Di Rienzo A., Novelletto A., Oppenheim A., Norby S., Al Zaheri N., Santachiara-Benerecetti S., Scozzari R., Torroni A., Bandelt H.J.: Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am.J.Hum.Genet.* 67. 1251-76. 2000.
116. Brather S. *Ethnische Interpretationen in der frühgeschichtlichen Archäologie.* Berlin-New York: Walter de Gruyter Verlag, 2004.
117. Marcali H. Nagy Képes Világtörténet. <http://mek.oszk.hu/01200/01267/html> . 2006.
118. Bachrach BS. *A History of the Alans in the west.* Minneapolis, USA: University of Minnesota Press, 1973.
119. Bálint Cs. *Die Archäologie der Steppe. Steppenvölker zwischen Volga und Donau vom 6. bis zum 10 Jahrhundert.* Wien, Austria: Böhlau Verlag, 1989.
120. Berend N. *At the Gate of Christendom.* Cambridge: Cambridge University Press, 2001.
121. Langó P. *A jászok etnogenezise és korai történetük.: szerk. Langó P. Szállástól a mezővárosig. Tanulmányok Jászfényszaru és a Jászság múltjáról. Jászfényszaru: Fényszaruért Baráti Egyesület, 2000: 83-109.*
122. Selmeczi L. *Régészeti-néprajzi tanulmányok a jászokról és a kunokról.: Folklor és etnográfia.* Debrecen: Debreceni Tudományegyetem Néprajzi Tanszék, 1992.
123. Czeizel A., Flatz G., Flatz S.D.: Prevalence of primary adult lactose malabsorption in Hungary. *Hum.Genet.* 64. 398-401. 1983.

124. Sahi T., Isokoski M., Jussila J., Launiala K.: Lactose malabsorption in Finnish children of school age. *Acta Paediatr.Scand.* 61. 11-6. 1972.
125. Simoons F.J.: Age of onset of lactose malabsorption. *Pediatrics* 66. 646-8. 1980.
126. Wang Y., Harvey C.B., Hollox E.J., Phillips A.D., Poulter M., Clay P., Walker-Smith J.A., Swallow D.M.: The genetically programmed down-regulation of lactase in children. *Gastroenterology* 114. 1230-6. 1998.
127. Welsh J.D., Poley J.R., Bhatia M., Stevenson D.E.: Intestinal disaccharidase activities in relation to age, race, and mucosal damage. *Gastroenterology* 75. 847-55. 1978.
128. Poulter M., Hollox E., Harvey C.B., Mulcare C., Peuhkuri K., Kajander K., Sarner M., Korpela R., Swallow D.M.: The causal element for the lactase persistence/non-persistence polymorphism is located in a 1 Mb region of linkage disequilibrium in Europeans. *Ann.Hum.Genet.* 67. 298-311. 2003.
129. Hogenauer C., Hammer H.F., Mellitzer K., Renner W., Krejs G.J., Toplak H.: Evaluation of a new DNA test compared with the lactose hydrogen breath test for the diagnosis of lactase non-persistence. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* 17. 371-6. 2005.

ÖSSZEFOGLALÁS

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 11. századtól vannak. Ennek oka az lehet, hogy nagyjából ebben az időben érték el Európa határát. A kunok a 13. században telepedtek le Magyarországon. Régészeti elemzések szerint ez a népcsoport valószínűleg ázsiai eredetű, antropológiai jellegeik alapján a kunok főként a mongolid embertani típusba sorolhatók, azonban genetikai eredetük mindezidáig nem ismert.

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 viszonyaikat 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 DNS markerek vizsgálatával. DNS-t izoláltunk két, régészeti jól dokumentált temetkezési helyről származó, 11 emberi csontmaradványból (aDNS). A leletek a 13-15. századból származtak. Továbbá az ország különböző régióiból 74 magát magyarnak valló személy perifériás vér, illetve hajszál mintája alapján tanulmányoztuk a mai modern magyar populáció mitokondriális genetikai markereit.

A mitokondriális genom anyai ágon öröklődik. A hisztonok vagy más fehérjék által nem védett mtDNS-ben 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. A filogenetikai szempontból fontos pozíciók klasztereket, haplocsoportokat határoznak meg. A haplocsoportok jellegzetes földrajzi megoszlást mutatnak. Ezért a mtDNS mutációi alapján nyomon követhetjük az anyai vonalak földrajzi elterjedését, az emberi vándorlási útvonalakat. A mtDNS vizsgálatával populációk rokonsági viszonyaira következtethetünk [42]. A mtDNS több száz, vagy 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.

Az ősi DNS vizsgálatokhoz szükséges DNS-t csöves csontokból nyertük. Ásatag biológiai csontmaradványokban általában csekély mennyiségű, erősen töredezett DNS marad meg, bázisai gyakran oxidatív vagy hidrolitikus károsodásokat szenvednek. 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 végeztük. 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 népcsoporthoz hasonlóan a 13. század folyamán érkezett Európába –jelen esetben a Kárpát-medencébe. Magyarországon elsőként alkalmaztunk archaeogenetikai vizsgálatokat régészeti csontleletek tanulmányozására. A kun minták hat különböző haplocsoportba tartoznak. A tizenegy minta közül négy tartozik a H haplocsoportba, kettő az U* haplocsoport, 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 vadász-gyűjtögetőkre 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.

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 bázispárra azonosítottak egy olyan genetikai variánst, amely szoros kapcsoltságot mutatott az öröklött laktáz hiánnyal/perzisztenciával. 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%. A laktóz intolerancia különböző életkorban alakul ki az egyes népcsoportokban.

A laktáz perzisztenciával kapcsoltságot mutató variáns (-13910C/T) vizsgálatát a balatonújlaki temetőből származó öt csontlelet esetében kíséreltük meg. A leletek a 10. századból származnak, régészeti adatok alapján „klasszikus” honfoglaló leletanyaggal voltak eltemetve. Ezzel párhuzamosan meghatároztuk a polimorfizmus előfordulási gyakoriságát a mai magyar populációban, 110 véletlenül kiválasztott egyén mintája alapján.

Az SZTE Gyermekgyógyászati Klinikával együttműködve tanulmányoztuk az általunk kidolgozott vizsgálati módszer alkalmazhatóságát a felnőtt típusú laktóz intolerancia gyermekkori diagnosztizálására. A klinikai kivizsgálást követően 149 hasi panaszokkal rendelkező gyerek DNS mintája alapján meghatároztuk a felnőtt típusú laktóz intolerancia életkor szerinti kialakulási idejét a magyar populációban.

A polimorfizmus vizsgálatára dCAPs technikát alkalmaztunk. Két új restrikciós felismerő helyet hoztunk létre a PCR termékben, amelyek segítségével lehetőségünk nyílt, hogy azonosítsuk mindkét allélt, különböző restrikciós enzimeket használva, elkülönített reakciókban.

A csontmintákból származó DNS extraktumokon teljes genom előamplifikációt végeztünk. A specifikus PCR reakció, majd az emésztési reakciók elvégzése után az archaikus minták esetében az ALF fluoreszcens detektálási rendszert használtuk a genotípusok megállapítására, amely igen kis mennyiségű DNS jelenlétét is képes érzékelni. A vizsgált 5 csontlelet közül 2 esetben sikerült a laktáz genotípust meghatározni.

A felnőtt típusú laktóz intoleranciára utaló -13910CC genotípus előfordulási gyakorisága 37%-nak bizonyult az általunk vizsgált, véletlenszerűen 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 jelentkezik. 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 más 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.

SUMMARY

Hungary is located in the heart of Europe, in the Carpathian Basin. Since the dawn of civilization this area has been inhabited by human beings, a meeting point where cultures blended together. Hungarians represent an amalgamation of

populations, which settled down into the Carpatian basin since the palaeolithic age to present time. Cumanians formed one of the settled groups. The name of Cumanians appears in Byzantine written history in the 11th century. According to historical data after the ravage of Hungary by Tartar hordes (1241-42) the Cumanians settled down on the area of the early Hungary. The ethnic origins of the Cumanians are uncertain, although their anthropological characteristics suggest that their geographical origin might be in Inner-Asia, or South-Siberia.

There are two possibilities to examine the origin of populations. First, to study the genetic structure of the recent populations and second, to examine the ancient genetic trace. Cumanians completely assimilated, both genetically and culturally into Hungarians. Analysis of ancient DNA from the remains of such a group of early settlers is the only reliable mean of study the genetic affinities and relationships of the Cumanians in Hungary.

In the first part of our study we examined a mediaeval Cumanian group and the modern Hungarian population in order to determine the genetic origin and relationships of these populations. We extracted DNA from 11 bone remains of two archeologically well-documented Hungarian excavations, representing members of a local population dating from the 13th to early 15th century. We also examined DNA extracted from single hairs or blood of 74 modern Hungarian.

The mitochondrial genome is maternally inherited. The high flux of oxygen radicals could cause substantial oxidative damage to mtDNA which is not protected by histones (or other proteins). The mutation rate of mtDNA is about 10 times higher than in the nuclear genome. Human mtDNA mutations have accumulated sequentially along radiating maternal lineages during and after the process of human colonization of different geographical regions of the world. Hence, groups of mitochondrial DNA types often show geographic specificity. Analysis of mtDNA in populations therefore allows reconstruction of their maternal lineages, making it possible to study the genetic traces of migration and admixture of different human communities, helping to estimate the degree of relationships within and between populations. Mitochondrial DNA is commonly used in aDNA studies, on account of its high copy number (up to 5,000–10,000 times that of single-copy nuclear sequences). In the first part of our study we concentrated on the analysis of mtDNA.

The quality and quantity of aDNA in fossils is usually very poor. The most obvious archaic DNA damage types are strand breaks, oxidative and hydrolytic lesions.

To prevent contamination from modern DNA drastic laboratory precautions and systematic controls were used. We applied rigorous physical separation of modern and ancient DNA laboratories and pre- and post-PCR laboratories.

Our paper is the first aDNA characterization of one of the many historically attested Eastern pastoral nomad populations that migrated into Europe; in this case, into the Carpathian basin during the 13th century.

Cumanian samples belong to 6 haplogroups. From the 11 ancient samples 4 belonged to H, 2 to U, 2 to V and one each to the JT, U3 and D haplogroups, respectively. Haplogroup D is characteristic for Eastern Asia. All of the others are West Eurasian haplogroups (H, V, U, U3 and JT).

Our results suggest that the Cumanians, as seen in the excavation at Csengele, were very far from genetic homogeneity. We conclude therefore that the mitochondrial motifs of Cumanians from Csengele show the genetic admixtures of the Cumanians with other populations rather than the ultimate genetic origins of the founders of Cumanian culture. So the maternal lineages of a large part of the group would reflect the maternal lineage of those populations that had geographic connection with Cumanians during their migrations. Nevertheless, the Asian mitochondrial haplotype in Kun26 may still reflect the Asian origins of the Cumanians of Csengele. Considering genetic distances Cumanians are nearest to the Finnish, Komi and Turkish populations.

Modern Hungarian samples represent 15 haplogroups. All but one is West Eurasian haplogroup, the remaining one is East Asian (F). Haplogroup F is almost absent in continental Europe. Four haplogroups, present in the ancient samples (H, V, U*, JT), can also be found in the modern Hungarians, but identical haplotypes only in the case of haplogroup H and V were found. U3 and D clades occur exclusively in ancient group and 11 haplogroups (HV, U4, U5, K, J, J1a, T, T1, T2, W and F) occur only in the modern Hungarian population.

Haplogroup frequency in the modern Hungarian population is very similar to other European populations. Although the presence of F haplogroup in the modern Hungarian population is interesting and can reflect some past contribution. According to haplogroup frequencies of Hungarians we concluded that the

ancestors of the majority of modern Hungarians are those paleolithic hunter-gatherers, who lived in Europe before the Last Glacial Maximum of Ice Age. The presence of Asian maternal lineage is 4.1% among the studied modern Hungarians. The neolithic source haplogroup J –associated with the spread of agriculture- occurs with 8.2% frequency.

In the second part of our work an autosomal SNP marker detecting method for ancient DNA analyses was established. The studied SNP marker is associated with a trait, which shows characteristic geographic pattern. Using linkage disequilibrium and haplotype analysis of Finnish families a genetic variant located –13,910 bp upstream of the start codon of the human lactase gene was identified which is strongly associated with hereditary lactase persistence/non-persistence. These genetic variants of this site (–13910C/T variant) were studied.

The adult-type lactose intolerance is inherited as an autosomal recessive trait.

The mutant –13910T allele is dominant. The adult-type hypolactasia varies widely among populations, both ethnically and geographically, the prevalence in adults is 3-70% among Caucasian population in Europe and it reaches approximately 100% in Asians. Wide ethnic variation in the age of onset has been reported in adult-type hypolactasia.

We tried to execute the –13910C/T genetic variant analyses in case of 5 ancient bone samples. Samples derived from the 10th century, cemetery of Balatonújlak. According to archaeological interpretation, remains were buried with grave artifacts typical to „classic” Hungarian conquerors.

We evaluated the prevalence of different lactase genotypes in the recent Hungarian population with random sampling. 110 anonymous Hungarian adults were tested.

In co-operation with Clinic of Pediatrics, University of Szeged we studied the applicability of our molecular genetic screening method for the -13910C/T variant detection as a diagnostic test for adult-type hypolactasia during childhood in Hungarian children. After clinical checkup the age of manifestation of adult-type hypolactasia in Hungarian population was determined based on DNA samples of 149 children and adolescents. The examined subjects suffered in abdominal complaints.

dCAPS method was used to analyse the -13910C/T polymorphic site. Two new restriction recognition sites were generated into the PCR products, which contained the 13,910 polymorphic site, hereby give the ability to detect the two different genotypes with different enzyme cleavages in separate reactions.

Prior specific PCR reaction, whole genom preamplification PCR was executed on aDNA samples. After restriction cleavages ALF (Automated Laser Fluorescent fragment analyser) system were used to determine different genotypes of ancient samples. This system can detect very small amount of DNA.

Out of the examined 5 ancient samples the lactase genotype determination was succesfully executed in two cases.

The prevalence of -13910CC genotype associated with lactose intolerance in the recent Hungarian population proved to be 37%.

Out of the 149 examined children and adolescents, who suffered in abdominal complains, 100 had CC genotype connected to lactose intolerance and 49 had CT or TT genotypes associated with lactose tolerance.

Our results suggest that the adult-type hypolactasia does not manifest under the age of five. The lactose intolerance has been manifested between the age of 6-11 years in 87%, above 12 years in 90% of the examined children with CC genotype. Over the age of 13 years all but one subjects with CC were lactose intolerant.

Ten of the 49 examined young persons with CT or TT genotype had lactose intolerance symptoms. In 8 cases the subjects suffered in other diseases affecting large areas of the small intestinal mucosa, which can cause secondary lactose malabsorption.

In our study the invented examination method is proved to be suitable for the analysis of autosomal SNP markers in case of ancient samples. We established the prevalence of different lactase genotypes in the recent Hungarian population. We confirmed that the genetic screening for the – 13,910 polymorphic variant could be a useful tool to diagnose the adult-type hypolactasia, especially over the age of 13 and to distinguish the primary and secondary lactase deficiency.

