

**Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

Kutya eredetű anyagmaradványok igazságügyi genetikai vizsgálata

PhD értekezés

Készítette:

Pádár Zsolt

2006

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....
Prof. Dr. Zöldág László CSc
SZIE, Állatorvos-tudományi Kar Budapest
Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet,
Állattenyésztési és Genetikai Osztály
témavezető

.....
Prof. Dr. Fekete Sándor MTA Doktor
SZIE, Állatorvos-tudományi Kar Budapest
Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet,
Laborállat-tudományi Osztály
témabizottsági tag

.....
Doc. Dr. habil. Veresegyházy Tamás CSc
SZIE, Állatorvos-tudományi Kar Budapest
Élettani és Biokémiai Tanszék, Biokémiai Osztály
témabizottsági tag

Készült 8 példányban.

.....
Pádár Zsolt

Tartalomjegyzék.....	3
1. ÖSSZEFOGLALÁS.....	7
2. BEVEZETÉS.....	9
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	13
3.1. Az igazságügyi genetika alapjai.....	13
3.1.1. A kriminalisztika és kihívásai.....	13
3.1.1.1. Azonosítás – származás – individualizáció.....	16
3.1.1.2. Alacsony kópiaszámú minták, transzfer, szennyezések.....	19
3.1.1.3. Degradáció.....	20
3.1.1.4. Minőségirányítás.....	22
3.1.2. A biológiai anyagmaradványok vizsgálatának áttekintése.....	25
3.1.2.1. Konvencionális vizsgálatok.....	25
3.1.2.2. DNS alapú vizsgálatok.....	26
3.1.2.3. Magyarországi alkalmazások.....	30
3.2. Az STR eszköztár.....	31
3.3. A <i>Canis familiaris</i> vizsgálata.....	33
3.3.1. <i>Canine Genome Project</i>	34
3.3.2. Azonosítás.....	36
3.3.3. Individualizáció.....	37
4. CÉLKITŰZÉSEK.....	39
4.1. A faj azonosítása.....	39
4.2. <i>Canine</i> specifikus STR markerek vizsgálata magyarországi populációban.....	39
4.2.1. Minták és markerek.....	40
4.2.2. A detektált tulajdonságok azonosítása, elnevezése, a lókuszek jellemzése.....	40
4.2.3. Alléllétrák készítése, a méretstandard kiválasztása.....	41
4.2.4. A félautomata kiértékelés.....	41
4.3. Populáció-statisztikai értékelés.....	41
4.3.1. Allélgyakoriságok meghatározása.....	42
4.3.2. Hardy–Weinberg és <i>linkage</i> egyensúly tesztelése.....	42
4.3.3. A genetikai strukturáltság megállapítása.....	42
4.4. Mintatípusok és a DNS extrakció vizsgálata.....	42
4.5. A PCR reakció érzékenyítése, <i>monoplex screening</i>	42
4.6. Eseti alkalmazás.....	43
5. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	44
5.1. Minták és populációk.....	44
5.2. A DNS kinyerése.....	44
5.3. A vizsgálandó szakaszok felsokszorozása.....	45
5.3.1. A <i>cytochrome b</i> génszakasz vizsgálata.....	46
5.3.2. Az STR lókuszek vizsgálata.....	46
5.4. A <i>cytochrome b</i> génszakasz szekvencia analízise.....	47
5.5. Az STR fragmensek genotipizálása.....	47
5.5.1. Alléllétrák készítése.....	47
5.5.1.1. Fragmensek elválasztása, detektálása, szelektálása.....	47
5.5.1.1.1. Belső méretstandard kiválasztása.....	48
5.5.1.2. A kiválasztott fragmensek szekvencia analízise.....	48
5.5.1.2.1. A fragmensek monoplex felsokszorozása, klónozása.....	48
5.5.1.2.2. Klónok szekvenálása, a szekvenciák összehasonlítása.....	50
5.5.1.3. A repetíciós struktúrák megállapítása, elnevezése.....	50
5.5.1.4. Allélkóktélok készítése, reamplifikálása.....	50
5.5.2. Az allélméret meghatározási pontosságának összehasonlítása.....	51
5.5.3. A tipizáló szoftver átalakítása.....	51

5.6.	A minták genotipizálása	51
5.7.	Populáció- és genetikai statisztikai analízisek	52
5.7.1.	Populáción belüli elemzések	52
5.7.1.1.	Populációgenetikai alapértékek	52
5.7.1.2.	Hardy-Weinberg (HWE) egyensúly tesztelése	53
5.7.1.3.	A <i>linkage disequilibrium</i> (LD) tesztelése.....	53
5.7.2.	Populációk összehasonlító elemzése	53
5.7.2.1.	Populáció párok vizsgálata G-statisztikával.....	54
5.7.2.2.	F-statisztika és AMOVA.....	54
5.8.	Vizsgálatok az eseti alkalmazás szempontjából	54
5.8.1.	Eltérő mintatípusok vizsgálata	55
5.8.2.	A PCR reakció érzékenysége	55
5.8.3.	Keveredések vizsgálata	55
5.8.4.	Esettanulmányok.....	55
5.8.4.1.	A faj azonosítása	55
5.8.4.2.	Az egyed azonossága	56
5.8.4.3.	Leszármazás vizsgálata.....	56
6.	EREDMÉNYEK.....	58
6.1.	Azonosítás – a faj azonosítása	58
6.1.1.	Vizsgálatok Anderson (CRS) szekvenciára illesztett primerekkel.....	58
6.1.2.	Vizsgálatok CRS szekvenciára illesztett módosított primerekkel	58
6.1.3.	Vizsgálatok degenerált primerekkel	59
6.1.4.	Szórásalak vizsgálata módosított és degenerált primerekkel.....	60
6.2.	Individualizáció – az STR polimorfizmusok vizsgálata	60
6.2.1.	Multiplex rendszer	60
6.2.2.	Genotipizálás	63
6.2.2.1.	Alléllétrák	63
6.2.2.1.1.	Monoplex vizsgálatok	64
6.2.2.1.2.	Szekvencia vizsgálatok.....	64
6.2.2.2.	Méretstandardok, méretmeghatározás.....	65
6.2.2.3.	Szemiautomata kiértékelés.....	65
6.2.3.	Lókuszok jellemzése.....	66
6.2.3.1.	Egyszerű ismétlődéseket tartalmazó lókuszok	66
6.2.3.2.	Összetett ismétlődéseket tartalmazó lókuszok	67
6.2.3.3.	Komplex ismétlődéseket tartalmazó lókuszok	69
6.2.4.	Populáció genetika és statisztika.....	69
6.2.4.1.	Allélgyakoriság, populációgenetikai alapértékek	69
6.2.4.2.	Genetikai egyensúly tesztelése.....	70
6.2.4.3.	Genetikai strukturáltság.....	71
6.3.	Eseti alkalmazással kapcsolatos vizsgálatok	73
6.3.1.	Eltérő típusú biológiai anyagmaradványok vizsgálata.....	73
6.3.2.	Kimutathatóság, érzékenységi vizsgálatok	74
6.3.3.	Faji eredet meghatározása – keveredések vizsgálata.....	75
6.3.3.1.	<i>Cytochrome b</i> génszakasz.....	76
6.3.3.2.	STR lókuszok.....	77
6.3.4.	Esetek mintáinak vizsgálati eredménye	78
6.3.4.1.	A „krematórium” eset	78
6.3.4.2.	Súlyos testi sértés.....	78
6.3.4.3.	Alomellenőrzés	79
7.	KÖVETKEZTETÉSEK	80
7.1.	A faji eredet meghatározása.....	80
7.2.	Az egyed azonosságának megállapítása	81

7.2.1.	Az alkalmazott markerek definiálása	81
7.2.2.	Technikai, módszertani jellemzők	82
7.2.3.	Populáció elemzések	84
7.3.	Törvényszéki alkalmazás	88
7.3.1.	Általános vonatkozások	88
7.3.2.	Eseti jellegzetességek	91
7.3.3.	Szakértői vélemények	92
8.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	94
9.	IRODALOM	96
10.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓ	111
11.	FÜGGELÉK	115
11.1.	Rövidítések jegyzéke	115
11.2.	Táblázatok, ábrák	116
12.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	165

*... Mi az „igazság” a biológus számára ...?
A hipotéziseknek kísérletileg cáfolhatóknak kell lenni.
Verifikációjukra addig gondolni sem szabad, amíg a cáfolatukra
irányuló minden elképzelhető erőfeszítésünk kudarcot nem vallott.
A kísérletileg nem cáfolható hipotéziseknek a „mi világunkban” nincs igazságértékük ...*

(G. Klein, 2001)

1. ÖSSZEFOGLALÁS

Talán senki nem gondolta, hogy a társadalom bűnözés elleni küzdelmében Sherlock Holmes régi axiómáját, miszerint „*the little things are infinitely the most important*”, egy valóban kicsi dolog, a DNS molekula fogja valóra váltani (Jobling, 2004). A humán mikroszatellita markerek használata a törvényszéki gyakorlatban ma már általánosnak mondható, ugyanakkor az előforduló, közvetve illetve közvetlenül állatfajok azonosítását, egyedazonosságának megállapítását érintő igazságügyi genetikai szakkérdésekben megkövetelt nemzetközi ajánlások kialakítása csak a közelmúltban kezdődött meg (Budowle, 2005). Az igazságügyi genetikai szakértői tevékenység Magyarországon jelenleg még mindig nem az akadémiai tudományterületeknek megfelelő kompetencia-mátrixok alapján létezik, így a kriminalisztikai vonatkozású állatgenetika sajátosságai, potenciális lehetőségei és hiányosságai mellett sem rendelkezik pontos meghatározottsággal. Munkám alapvető célja az volt, hogy a *Canis familiaris* példáján keresztül elindítsam azt a folyamatot, melynek segítségével a nem emberi eredetű biológiai anyagok individualizálása diszkrét karakterisztikával a törvényszéki genetika részévé válhat.

A hiányosságok integráció igényelte kiküszöböléséhez többek között elengedhetetlen a bűncselekményekkel kapcsolatba hozott illetve hozható, kutya eredetű biológiai anyagmaradványok faji eredetének megbízható azonosítása. Az ismeretlen faji eredetű minták törvényszéki azonosításához napjainkban sokszor a *cytochrome b* gén meghatározott szakaszát (Kocher, 1989) használják fel, annak viszonylag konzervatív szekvencia-intervallumára illesztett primer párok (Bartlett, 1992, Parson, 2000) alkalmazásával. Több faj – így pl. a *Canidae*– esetében a primerek kötési helyén előforduló nukleotid inkomplementaritások miatt a taxonokra jellemző pozicionális különbségek nem detektálhatók tisztán, így az azonosítást nem teszik lehetővé. A saját tervezésű degenerált primerek (Egyed és mtsai, 2003) és PCR kondíciók használatával a zavaros szekvenciák kiküszöbölhetők, és konfirmáló vélemény adható. A hagyományos primerek (Parson, 2000) az általunk módosított PCR körülmények között több kópiában előforduló, nukleáris pszeudogénként definiálható (Ishiguro, 2005) *cytochrome b* analóg szakaszokat – DQ309764 (GenBank, 2005) – eredményeztek, melyek eltérései alapján jelenleg a fajta-jellegzetesség nem zárható ki.

A tudományos bizonyítékok törvényszéki elfogadhatóságának szigorodását példázza a Frye-standard szignifikáns ambivalenciája – a szakértői módszernek releváns tudományos testület által általánosan elfogadottnak kell lennie, ugyanakkor mi, és főleg kik által definiált testület tekinthető releváns tudományos testületnek – miatt érvényre jutó, jóval alaposabban kidolgozott Daubert-féle kritériumrendszer (Walsh, 1999). A standardizálás és hitelesítés, a szakmai felülvizsgálat és érvényesítés valamint a potenciális hibaráták ismerete, tesztelése egyaránt hozzájárul a szakértői véleményének bírói mérlegeléséhez. Az egyed azonosságának megállapításához törvényszéki szempontból standardizált, validált marker szelekciók – a közelmúlt fejlesztései (Eichmann, 2004,

Halverson, 2005) ellenére – csak korlátozott mértékben állnak rendelkezésre, jelenleg nincs egységes kódrendszer, nevezéktan, a releváns populációkra vonatkozó STR allél- és profilgyakorisági adatbázisok nem, vagy csak igen nehezen hozzáférhetők.

A kutya-specifikus STR polimorfizmusok felhasználása érdekében a lókuszok repetíciós struktúrájának feltárása – AF454051, AF454052 (PEZ20), AY375154 (PEZ8), AY375155 (PEZ5), AY375153, AY375156 (PEZ6), AY536266 (PEZ3), AY672136 (PEZ1), AY758357, AY758358 (PEZ12), (GenBank, 2005) – és hitelesítése szekvencia analízissel történt, melyek segítségével a megfigyelt variánsok ismeretében nemzetközi használatra alkalmas nevezéktan ajánlható. A hitelesített referencia fragmensekből előállított alléllétrák standardizálásával, majd a méretezési pontosság tesztelését követő szemiautomata tipizálással a polimorfizmus mértéke a magyarországi kutyapopuláció adott állományában felmérhetővé vált. A megfigyelt allélgyakoriságokból kiinduló populáció statisztikai tesztek a fajták illetve fajtacsoportok között szignifikáns genetikai különbségeket tártak fel, melyek alapján egymásnak megfeleltethető csoportok nem valószínűsíthetők, referencia adatbázisként szolgáló mintacsoport nem nevesíthető. A kriminalisztikai (Pádár, 2002) és tenyésztői (Pádár, 2001) esetekben a különféle anyagmaradványból érzékeny szűrővizsgálatok segítségével sikeres profilmeghatározás végezhető, de a magyarországi populációk referencia adatbázisainak hiányosságából fakadóan jelenleg a vélemények valószínűségi kategóriája megalapozottan nem számszerűsíthető. Mivel a vizsgált állományok mintavételi korlátok miatt nem feltétlenül reprezentatívak, a genetikai fixálódás pontosítása a fajtapopulációk további, részletesebb vizsgálatát igényli, de ennek kialakítása aktív tenyésztői közreműködést tesz szükségessé.

Fentiek alapján a *Canis familiaris cytochrome b* génszakaszon alapuló azonosítása és az egyedek azonosságának STR-polimorfizmus vizsgálaton alapuló megállapítása a magyarországi törvényszéki gyakorlatba bevezethető, de a kezdeti lépéseket még további – pl. további lókuszok, mini-STR vizsgálatok, populációs analízisek, mutáció vizsgálatok, etc. – kutatásokkal kell kiegészíteni és teljessé tenni.

2. BEVEZETÉS

1904. június 11. A Spree folyóból (Németország) egy leánygyermek megcsonkított holttestét halásszák ki. Az orvosszakértő véleménye szerint a kislányt megerőszakolták és megölték, majd testét megcsonkítva vízbe dobták. Habár a személyazonosság gyorsan megállapítást nyert, a tanúkihallgatások során tett vallomások félrevezették a nyomozást. A későbbiekben gyanúba került, büntetett előéletű, prostituáltakat futtató férfi, Theodor Berger lakásán tartott házkutatás nem tárt fel a bűncselekménnyel kapcsolatba hozható bizonyítékokat, mígnem az egyik prostituált elmondta, hogy utazókosara eltűnt. A kosár nagy erővel történő felkutatása végül eredményre vezetett, és az alján talált vérszenyeződésről Uhlenhuth precipitációs szerológiai tesztjének segítségével – melyet akkor még csak néhány német és osztrák törvényszéki szakember alkalmazott – bebizonyosodott, hogy emberi eredetű. Theodor Bergert gyilkosságért 15 évi fegyházbüntetésre ítélték (Thorwald, 1973).

1983. november 21. Brutálisan megerőszakolt, majd megfojtott fiatal lány holttestére bukkannak Narborough (Anglia) közelében. Az ondószennyeződés szerológiai- és enzim-polimorfizmus vizsgálata a felnőtt férfi lakosság kb. 10%-ával megegyező tulajdonság-együttest mutatott ki, így a gyilkos utáni hajsza megrekedt.

1986. július 31. A három évvel korábbi bűncselekményhez rendkívül hasonló módon meggyilkolt fiatal lány holttestét találják meg Narborough közelében. A helyszín közelében elfogott és elsődlegesen meggyanúsított fiút a szakértői vizsgálatok tisztázták, megállapítva azt is, hogy mindkét gyilkosságot ugyanaz a személy követhette el. Mivel a lehetséges elkövetők körét nem lehetett nyomozati úton szűkíteni, a rendőrség a környékbeli települések férfi lakosságát tömegszűrésre kérte fel. A szűrő – egyszersmind azonosító – vizsgálatokat „DNA-fingerprint” (RFLP) módszerrel végezték. A szűrővizsgálatra szolgáló mintaadást egy fiatalember, Colin Pitchfork többször is megtagadta, majd hirtelen eleget tett a felszólításnak, ami mentesítette a gyanú alól. Az ondómaradványokkal egyező tulajdonságú elkövető azonban még 1987-ben sem került elő, de a késedelmeskedő fiatalember barátjának kérdésére – miszerint Pitchfork helyett ő adott vért a teszthez – a rendőrség tudomására jutott. Az új, immár biztosan azonosítható minta vizsgálata alapján Pitchfork-ot életfogytig tartó szabadságvesztésre ítélték (Forensic Science Service).

2000. március 19. Budapest egyik sporttelepén félig lemeztelenített fiúgyermek roncsolt sérülésekkel teli holttestét találják meg. A helyszíni szemle és az elsődleges szakértői vizsgálatok illetve vallomások alapján indított nyomozással ellentétben – mely különös kegyetlenséggel elkövetett, szexuális motivációjú emberölést valószínűsített –, a bonctermi orvosszakértői vizsgálatok után kutyák általi támadás ténye merült fel. A feltételezett egyedek azonosításával kapcsolatos, párhuzamosan zajló szakértői vizsgálatok tárgyát a holttest sérülései, nyomtani elváltozások és biológiai anyagmaradványok képezték. A fellelt szőrszálakból, nyál- és

vérfojtoltokból PCR-alapú DNS vizsgálatok történtek, melyek részben az emberi eredetű biológiai anyagok, részben kutya-specifikus STR lókuszok analízisével az állati eredetű maradványok azonosítására terjedtek ki. Az eredmények elkövetőként két kutya (rottweiler és német juhászkutya) hipotézisét támasztották alá. Az állatokat elaltatták, gazdájuk ellen gondatlanságból elkövetett emberölés vádjában folyik eljárás (Pádár és mtsai, 2002).

A bűnözés és a bűnözés elleni küzdelem egymás mellett létezik, civilizációkon ível át. A fajtársak értelmetlen elpusztításának biológiai szükségszerűtlenségét a genetikailag determinált ösztönös magatartásformák mellett már a prehisztorikus hitvilágok, a primitív társadalmak, korai vallások normái is szabályozták. Az államiság kialakulása, a várható büntetés fenyegetése illetve annak elkerülése-elkerülhetősége mindig új és újabb kihívásokat, ötleteket, módszereket és eszközöket realizált, melyek részben ki- és felhasználták az adott korszak ismereteit, de részben motiválták is a korszerű ismeretszerzést. A változások, a felgyorsuló és egyre globalizálódó társadalmi, gazdasági, tudományos-technikai fejlődés hatásainak érvényesülése és a „tökéletes bűntény” paradoxona egyaránt jellemzi azt a folyamatot és annak állomásait, melynek révén a XXI. század kezdetére a kriminalisztikai személyazonosítás (Bócz, 2004) a DNS-vizsgálatok révén új távlatokat nyert.

Napjainkban potenciálisan bármilyen foglalkozás, bármilyen hivatás vagy akár művészet szerephez juthat a törvényszéki arénában. A kriminalizálódó társadalmakat és azok pereskedő hajlamának növekedését látva egyre inkább megszokott dolog a szakértők bevonása a leginkább ezotérikusnak tűnő törekvésben – az igazság kiderítésében, a bírósági eljárásban. Amíg a szakértői területek diverzitásuknak köszönhetően gyakorolhatnak hatást a jogalkalmazásra, az egyes szakértők saját szakértelmük alapján nyilvánítanak véleményt, illetve alkalmazzák a természettudományt egy-egy bűncselekmény megoldása során. A tudomány gyakran tévesen értelmezve, számtalanszor kölcsönöz hitelességet annak az elképzelésnek, mintha a tudományos aura automatikusan ruházna fel korrektséggel, megbízhatósággal, szavahihetőséggel, ugyanakkor nem hagyva kétséget afelől sem, hogy a tudomány birodalmán kívül eső elmélet megalapozatlan. (Ezt tudományos alapon szakértő állapította meg, tehát igaz...?! – Ez nem tudományosan igazolt, tehát nem hihető el...?!). A klasszikus tudomány a hipotézis tesztelés fogalmával definiálható, a tudományos módszer nem más, mint egyféle keret a feltételezések vizsgálatára. A valósághoz így annak a felismerése és megértése vihet közelebb, hogy a tudomány csak eljárás, nem maga az igazság (Inman, 2001).

Habár az igazságügyi tudományok definíciója nem igazán egységes, és kritériumrendszere angolszász alapokon – Magyarországon jelenleg még gyerekcipőben – formálódik, a joghoz, törvényekhez fűződő viszonya egyértelmű. Jogrendszer hiányában a kriminalisztikának – és szakértőinek – nincs funkciója. Sajátosságait egyaránt befolyásolja a természettudományok műszaki, technológiai háttere, dogmatizmusa, a jogtudományok társadalmi, politikai háttere, konzervativizmusa valamint a két tudományterület eltérő gyorsaságú dinamizmusa és evolúciója. Az igazságügyi tudomá-

nyok alkalmazott tudományok, mivel az igazságügyi- és kriminalisztikai szakértői problémák megoldását szolgáló tudományos módszertant vegyészek, biológusok, genetikusok fejlesztik ki. Az új technológiák, módszerek természettudományos voltuknál fogva nemcsak saját elő-nyükre, hanem a régi modellek korlátaira és hátrányaira is rávilágítanak, mintegy ezen problémákra megoldást keresve jöttek létre. Elterjedésük egyéb területeken is széleskörű változást indukál, és egy bizonyos idő eltelte után ellehetetleníti, illetve kivitelezhetetlenné teszi a régiek alkalmazását.

Az igazságügyi szakértő és feladatának konkrét meghatározása a multidiszciplináris tudományterület kapcsán szintén nehezen definiálható. Általánosságban elmondható, hogy legfőbb szerepét a fizikai nyomok és anyagmaradványok vizsgálata jelenti orvos- és természettudományos technikák objektív alkalmazásával, ezáltal igazolva az adott bűncselekményt illetve az azzal fennálló kapcsolatot (Inman, 2001). A tudományos és a gyakorlati törvényszéki alkalmazás között azonban különbséget kell tenni. A kutatásban megfelelő és megbízhatónak tartott eljárásokat az óvatos, tartózkodó jogi szemléletmód nem minden esetben fogadja el törvényszéki szempontból is megbízhatóan alkalmazhatónak. Néha a DNS vizsgálatok eredménye is vitatható-vitatott a bíróságokon, általában – úgy tetszik – nem a technológia, sokkal inkább a gyakorló személy (szakember?) azon rátermettsége, képessége miatt, hogy a vizsgálatokat körültekintően és helyesen vitelezze ki (Butler, 2005).

A DNS alapú azonosítással foglalkozó igazságügyi genetikát kihívásai, probléma felvetései, módszertani és technikai fejlesztései, eredményei nemcsak passzív felhasználóként, hanem aktív közreműködőként kapcsolják a genetikához mint alaptudományhoz és a jogalkalmazáshoz egyaránt, ugyanakkor nem tekinthető a két alkotórész egyszerű összegződésének. Az igazságügyi genetika önálló tudományterületként működik, és használja fel a genetika – pl. molekuláris genetika – módszereit, tudományos eredményeit. Önálló voltát támasztja alá az is, hogy igazságügyi genetikai kutatások a genetika más területére vonatkozó információkat – pl. polimorfizmusok molekuláris struktúrája, új szekvencia adatok, populációgenetikai értékek, jellemzők, stb. – is szolgáltathatnak, melyek ugyanakkor önmagukban nem jelentik az igazságügyi genetika célját. Törvényszéki aspektusból a természettudomány – genetika – csak eszköz, melynek segítségével a kriminalisztikai hipotézisek megerősíthetők avagy elvethetők. A tudományterület önállósodása – más, korábban határ- vagy multidiszciplináris tudományágak evolúciójával analóg módon – bizonyos tudományos koncepciók, besorolások és dogmák megváltozásával jár. Habár a változások érvényre jutása eltérő lehet, az igazságügyi genetika mint az alkalmazott tudományok autonóm tudományterülete napjainkra szinte minden országban az igazságszolgáltatás részévé vált (Brinkmann, 2003), és számos vonatkozásában kiszélesítette a bűncselekmények felderítésének és bizonyításának lehetőségét. Helyszíni biológiai anyagmaradványok faji-, egyedi (személyi) eredetének meghatározása, helyszín-helyszín kapcsolatának vizsgálata, ismeretlen személyazonosságú holttestek,

maradványok azonosítása, leszármazási viszonyok elemzése mellett polgári jogi (pl. apasági teszt), történelmi, kegyeleti (pl. sír, tömegsír) vizsgálatok céljára használható fel. További lehetőségek körvonalazódnak a technológia fejlődésével a potenciális elkövető megnyilvánuló tulajdonságainak (pl. haj- és szemszín, stb.) hátrahagyott anyagmaradványából – akár egyetlen sejtjéből (Oorschot RAH, Jones MK, 1997) – történő kiderítésére, a megállapított adatok informatikai alapon történő rendszerezésére, adatbázissá szervezésére, a nem emberi eredetű anyagok azonosítására. Mindezek a médiák felelős partnerségével párosulva, felhasználva a korszerű ismeretterjesztést, generációkat átfogó, széleskörű társadalmi tudatosulást, a bűnözéssel szembeni visszatartó erőt indukálhat, ezzel is segítve a társadalom bűnmegelőzési stratégiáját (Adler, 1998).

Az alkalmazott genetika tudományterületén bevezetésre kerülő új és újabb kutatási eredmények néha még a kompetens szakemberek számára is vitathatóak, de hatással vannak a gazdasági, társadalmi fejlődésére éppúgy, ahogyan a közösségekre és a mindennapok emberére egyaránt (Cyranoski, 2004). A lehetőségek és kockázatok mérlegeléséhez konszenzusokra van szükség (National Commission of the Future of DNA Evidence, 2001), megelőzve, tompítva ezzel a potenciális vallási, társadalmi, politikai, gazdasági, tudományos, jogi és etikai vitákat (Guillen, 2000), melyeket napjainkban a genetikai módszerek más irányú áttörése is – pl. klónozás – eredményez.

A DNS polimorfizmus alapján történő igazságügyi és kriminalisztikai célú vizsgálatok az elmúlt két évtizedben a humán személyazonosításra koncentráálódtak, mely Magyarországon is több éves előzménnyel rendelkezik (Pádár és mtsai, 1993). Az esetek vizsgálati mintáit túlnyomó többségben humán eredetű biológiai anyagmaradványok jelentik, azonban a szakértői munka során rendszeresen előfordul olyan ügy is, melyekben állati eredetű anyagmaradványok játszanak szerepet, sőt az elkövetéssel állat – pl. kutya – gyanúsítható. A genetikai alap kutatások keretében zajló, eltérő szint *Genome Project*-ek – Lander és mtsai, (2001), Habár a kutyák DNS alapú származásellenőrzésére vonatkozóan már korábban is történtek kísérletek (Veres, 1998), az eredet és az egyed igazságügyi kritériumoknak megfelelő, validált definiálását a doktori munkát megelőzően nem tudtuk megtenni.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Az igazságügyi genetika alapjai

A „*Human Genome Project*” kihívásai forradalmasították a biotechnológia fejlődését, beleértve az igazságügyi felhasználásra alkalmas módszereket is, melyeket viszonylag gyors lépésekben követett a rutinszerű alkalmazás és a jogalkalmazói mérlegelésben indukált változások. Az új lehetőségek azonban újabb és újabb kihívásokat hordoznak magukban. Hogyan lehet a molekuláris genetika folyamatosan megújuló-elavuló dinamikus információözonét a jóval konzervatívabb igazságügyi körülményrendszerekben rutin szakértői módszertanként felhasználni? Hogyan lehet a „minél kevesebből – minél többet – minél biztosabban” jogalkalmazói elvárásnak „minél jobban” megfelelni? Hogyan kell ehhez értékelni, átértékelni, módosítani a helyszíni tevékenységet, a biológiai anyagok felkutatását, rögzítését, esetlegesen vizsgálati sorrendiségét? Hogyan lehet a természettudományos vizsgálatok eredményét a bíróságok előtt megfelelően interpretálni és bizonyítékként elfogadtatni? Hogyan lehet az egyed – személy – azonosítására szolgáló genetikai profil nyújtotta információt hasznosítani már a nyomozás során vagy akár bűnmegelőzési célzattal? A megválaszolandó kérdések további biztosítékot jelentenek arra nézve is, hogy a DNS technológia igazságügyi alkalmazásának fejezete még korántsem tekinthető lezártnak.

3.1.1. A kriminalisztika és kihívásai

A törvényszéki tudományok kezdetére sokszor a titokzatosság és/vagy az intrika valamint valószínűleg a legtöbb félreértelmezett illetve a legkevesebb megértett tudományos diszciplína volt jellemző. Mivel a spekuláció hajlamos az információhiány gyors és kézenfekvő pótlására, a szóbeszéd pótolta a bírák professzionalizmusát. Minden bizonnyal a törvényszéki gyakorlatot folytató szakemberek is hozzájárultak ahhoz a percepcióhoz, hogy egy kriminalisztikai esemény korlátozott számú nyomból, bizonyítékból történő rekonstruálása megvalósítható néhány, erre a feladatra megfelelő adottsággal, tehetséggel rendelkező személy közreműködésével. Még azok is, akik tudományosan igazolható módszereket alkalmaznak, sem tudnak ellenállni annak a cseppnyi hírnevet jelentő ösztönzésének, amit egy bonyolult bűncselekmény megoldása jelent. Bár a „csak én tudom” szakértést korunkban a jogelvárás az általános elfogadottság elvével ellensúlyozza, a laikus számára az igazi szakértők megkülönböztetése a sarlatán önjelölt „szakértők”-től nem mindig egyértelmű. Számos dokumentáció bizonyítja azt a túlbecsült alkalmasságot, ami korlátozott adatokból történt „katedrális következtetések” levonását idézte elő.

A szakértői vélemények törvényszéki elfogadásának kibontakozása a tudományos bizonyítás korábban kérdés nélkül elfogadott szakértői módszereinek alapos felülvizsgálatra ösztönöz. Léteznek olyan területek, ahol a kérdéses- illetve referenciaminta közötti

kapcsolatot egyszerűen egyediként definiálják, ami azt a látszatot kelti, hogy a bizonyítékok összehasonlítása olyan elsajátított szakmai jártasság és szakértői vélemény hatáskörébe esik, ahol a vizsgálatot végző az azonosságot számszerűleg alátámasztott, szisztematikus tudományos igazolást nem igénylő módon fejtheti ki, ugyanakkor a „DNS-szakértőktől” releváns populációk allélgyakorisági adatain alapuló genetikai profil közlését várják el. Az egyedi szakértelemre és tapasztalatra támaszkodó diszciplínák ilyen módon történő tudományos megközelítését nem mindenütt tartják célravezetőnek, de a vélemények statisztikai igazolását legalább a tárgyi bizonyítékokra ki kellene terjeszteni (Inman, 2001). A statisztikai módszerek illetve azok korlátai a bizonyítékok típusától és természetétől függően különbözhetnek.

A törvényszéki szakértésben kritikus szerepet játszik annak megértése, hogy a megválaszolendő kérdések a jogalkalmazó – nyomozó hatóság, vád, védelem, etc. – által közvetlenül megfogalmazott kérdések. A kérdéseket elsődlegesen az egyedi esetek speciális körülményei határozzák meg, de a vizsgáló képzettsége, ismerete és tapasztalata is befolyásoló tényező lehet. Ezeket a jogalkalmazói kérdéseket kell a szakértőnek lefordítania tudományos kérdésekre, mintegy kódolva azokat, majd a vizsgálati eredményei alapján levont következtetéseit dekódolnia kell. A tárgyi bizonyítékok – „*physical evidence*” – kriminalisztikai laborvizsgálata néha talán a „mikor?”, de leginkább a „ki?”, „mi?”, „hol?”, „hogyan?” megválaszolására alkalmas, de adekvát választ a „miért?”-re szinte soha nem ad. Mivel a megfelelő vizsgálati stratégia és módszer megtervezése illetve kiválasztása teljes mértékben a kiindulási hipotézistől függ, a nyomozás kezdeti szakaszában még inkább körültekintően kell eljárni (Inman, 2001).

Az ógörög tudósok alapértelmeben generalisták voltak, azon egyszerű oknál fogva, hogy nem volt elég tudományos ismeret a specializáció igényének illetve szükségszerűségének megteremtéséhez, amit azonban a progresszió a XX. századra elkerülhetetlenné tett. A konvergáló ismeretek felhalmozódása kapcsán az interdiszciplináris területek fokozott figyelmet nyertek. A tudományos evolúcióhoz hasonlóan a specializálódás a törvényszéki tudományok – így a törvényszéki genetika vonatkozásában is megfigyelhető. Habár ez az irányzat bizonyos mértékig mindkét irányban – a specialitástól a generalitás felé is – megnyilvánul, az akadémiai háttér hiánya az igazságügyi tudományok – igazságügyi genetika területén meglehetősen szembetűnő. A tudományos közvélemény általi elfogadás megköveteli a gyakorlati alkalmazáshoz szükséges egységes keret, átfogó paradigma kialakítását, mely segítségével a nyomkereszteződés, az azonosítás, az osztályozás illetve az azonosság megállapítása – individualizáció –, az összefüggések vizsgálata végül a bűncselekmény tér- és időbeli rekonstruálásához – bizonyítási eljárás – vezethet.

A biológiai egyedhez való kapcsolhatóság miatt a DNS-vizsgálatok elsősorban a személyi bizonyíték-bizonyítás eszközeként jelentek meg és tudatosultak a gyakorlatban. Habár a korábbi módszerekhez képest a DNS alapú vizsgálatok számos előnnyel rendelkeznek, a tulajdonságok átörökítés esetén illetve az élőlényből való kikerülés vagy a halál beállta után (Parsons, 1997) megváltozhatnak. Ez a viszonylagos állandóság teszi – többek között – az igazságügyi genetikát a genetikán belül is önálló területté. A DNS-molekula viszonylagos védettsége, stabilitása a technikai előnyökkel párosulva azonban sok esetben a természetes bomlási folyamatok (Montagna, 1996) és a tevőlegesen megváltoztatott állapot – pl. égetés – ellenére (Sweet, 1995) is megoldást jelenthet. A „nincs áldozat – nincs bűntény” logikát alkalmazó elkövetők holttest eltüntetésére irányuló törekvése többnyire már nem eredményes (Stout, 1991). A nemi kromoszómák markerei, így az Y-kromoszóma mint a humán genom kizárólag férfiakra jellemző szakasza (Corach, 2001) az erőszakos bűncselekmények – túlnyomó többségben férfiakat jelentő – elkövetőinek azonosítását tette még eredményesebbé. Ez leginkább azokban az eljárásokban nyilvánul meg, melyekben a kevert jellegű biológiai minták női eredetű sejtjeinek túlsúlya miatt a hagyományos autoszómás STR analízis nem informatív – pl. hüvelyváladékkal keveredett kis számú spermiumsejt –, és amelyet – pl. hiányzó hozzátartozók esetén – kiegészíthetnek az X-kromoszómás markerek (Szibor, 1995) is. Az extrémén kis mennyiségű DNS-t tartalmazó minták vizsgálhatósága a mikronyomok hagyományos kriminalisztikai értelmezését – fizikai- és kémiai mikronyomok – nemcsak számszerűleg, hanem kimutatási érzékenység és a származás vonatkozásában – kvázi egyediség – is szignifikánsan kiterjesztette (Gill és mtsai, 2000).

Kriminalisztikai konzekvenciái miatt a – bűncselekményekkel kapcsolatba hozható – biológiai anyagok és anyagmaradványok, mikronyomok abszolút- és relatív kora is igen sokszor áll a jogalkalmazói érdeklődés középpontjában, de azok bűncselekménnyel történő ténytzerű összefüggésének mérlegelése – az egyéb tárgyi bizonyítékokkal, pl. ujjnyomat, fizikai-, kémiai mikronyomok, etc. analóg módon – jogalkalmazói kompetenciába tartozik, így meghaladja a szakértői vélemény kategóriáját. A helyszínen fellelt biológiai anyagmaradványoknak a szervezet fiziológiás környezetéből való kikerülésének időpontja – tulajdonképpen kora – az eredő környezeti hatások komplexitásából fakadóan csupán egyszerűsített tényezők inercia-rendszerében végzett modellkísérletek és szakértői tapasztalat alapján becsülhető, valószínűsíthető. Habár az előzőekben említettek értelmében az abszolút kormeghatározás korlátozott, a vizsgálatok tárgyát képező felületek és anyagmaradvány-típusok homológiájára tekintettel adott esetben relatív valószínűsítés végezhető.

3.1.1.1. Azonosítás – származás – individualizáció

Az azonosság fogalma és annak megállapítása kriminalisztikai szempontból kettős jelentőséggel bír, ami egyrészt két dolog – pl. minta – azonos eredetének megállapítását, másrészt a minta természetének, lényegének, sajátosságainak meghatározását jelenti (Saferstein, 1990). Ez az értelmezés néha igen konfúzus, ami az „azonos” kifejezés, mint egyediséget jellemző, meghatározó jelentésű használata – vö. egyedazonosítás –, és a törvényszéki alkalmazásban egy objektum kategorizálásához szükséges jellegzetességek leíró értelmének keveredéséből fakad. Amíg az *azonosítás* a tárgyi bizonyítékok fizikai, kémiai, biológiai természetét definiálja, az *individualizáció* a minta eredetének konkludálására tesz kísérletet. A biológiai anyagmaradvány azonosítása – pl. szövettípusának meghatározása, csoportosítása – és az *azonosságának megállapítása* – mely egyedtől származik – között különbséget kell tennünk.

A filogenezis genetikai evolúciója a fajok között jelentős eltéréseket, míg egy fajon belül viszonylagos állandóságot fixált. Ennek köszönhetően az adott fajok jellemző eltéréseik alapján egymástól elkülöníthetők (Irwin, 1991). Önmagában egyetlen rövidebb lókuszt – fizikailag elhelyezhető DNS-szakasz – sem rendelkezik csak egyetlen egyedre vagy személyre jellemző markerrel – nukleotid szekvenciával –, azonban a megfelelő számú polimorf helyen megállapított allélok együttese – genotípus vagy genetikai profil – „genetikai személyi számként” feleltethető meg. A genetikai profil egyediségét az élőlények egy fajba tartozó egyedeinek szaporodásközösségen belüli rokonsága – részben közös genetikai állománya –, a genetikai lókusztok populációnként változó polimorfizmusa (Cavalli-Sforza, 1994) egyaránt befolyásolja. Az államigazgatási személyi számmal ellentétben a DNS-profil jogi-filozófiai vonatkozásban kategorikus bizonyosságként nem értelmezhető.

A megállapított DNS-profilok egyezésére – illetve egy biológiai nyom adott személytől való származásának mértékére – vonatkozó szakértői interpretációhoz populációgenetikai és genetika-statisztikai elemzések (Evett, 1998) szükségesek, melyeket a vérrokonság – mutációs események – illetve a profilkeveredés – a biológiai nyomot több egyed biológiai anyagának keveredése hozta létre – elemzése specializál. A DNS-bizonyíték statisztikai kiértékelésének elfogadott módszere a gyakoriságbecsléssel kombinált Bayes-elvű hipotézistesztelés (Garbolino, 2002, Evett és mtsai, 2002). A szakértői véleményben a valószínűségi hányadost – a hipotézis és az ellenhipotézis teljesülésének feltételezésével számított valószínűségek hányadosát – ti. „*Likelihood Ratio*” vagy „LR” érték – tüntetjük fel.

A gyakoriságbecslés esetünkben nem más, mint a genetikai profilokban közölt polimorf tulajdonságok – allélok adott populációban kalkulált előfordulási gyakorisága. A

hipotézistesztelésen alapuló valószínűségszámítás a legalább két lehetőség elvének statisztikai modelljére épül, ahol:

Hipotézis 1: A bizonyíték valódi eredete a feltételezett eredet.

Hipotézis 2: A bizonyíték valódi eredete egy másik, alternatív eredet.

A két valószínűség:

1. annak valószínűsége, hogy a bizonyíték a feltételezett eredettel közös eredetű, ha igazként fogadjuk el, hogy a feltételezett eredet a valódi eredet – általában a vádat jellemzi,
2. a bizonyíték közös eredetének valószínűsége az alternatív eredettel, ha igazként fogadjuk el, hogy egy alternatív eredet a valódi eredet – általában a védelmet jellemzi.

A valószínűségek hányadosa az „LR” érték.

A tárgyi bizonyíték vizsgálatakor azonban nem ismerjük a közös eredet valószínűségét, de kiszámíthatjuk a bizonyíték találati valószínűségét az előzetesen feltételezett igaz illetve hamis hipotézisek elfogadása esetén. A valószínűségi hányados több feltételezés összehasonlítására felhasználható anélkül, hogy bármelyiket is kitüntetett módon kezeljünk.

A Bayes-tétel esély (*odds*) formájú általános modelljének

$$\text{„Prior odds} \times \text{LR} = \text{Posterior odds}”$$

alapján megfogalmazható kérdés:

mennyire változtatja meg az ítéletet (posterior odds) a járulékos bizonyíték (LR) egy feltételezett állítás (prior odds) vonatkozásában?

Az „a priori” tényező egyszerűen előzetes információk alapján felállított hipotézis. Ezek egyaránt lehetnek számszerűen alátámasztottak, de spekulatívak is. Az LR számításával egy másik, új bizonyítékot hozunk létre, amely az elsődleges feltételezést módosíthatja, és a posterior tényezőt eredményezi.

A jogalkalmazó által az igazságügyi szakértőnek feltett alapkérdést – ti. „*Mekkora valószínűséggel származik a biológiai anyagmaradvány az adott egyedről?*” – mindig legalább egy másik, ún. ellenhipotézis – pl. „*Mekkora valószínűséggel származik a biológiai anyagmaradvány az adott népségből véletlenszerűen kiválasztott másik egyedről?*” – valószínűséghez kell viszonyítani. Mindkét, ún. posterior valószínűség kiszámításához a Bayes-elv alapján hipotézisenként két valószínűségi értéket kell kalkulálni, majd a kapott valószínűségeket egymással összeszorozni.

A két valószínűségi érték közül az egyik az ún. prior valószínűség, amely azt fejezi ki, hogy mekkora az adott hipotézis valószínűsége a genetikai tesztelésen kívüli, egyéb –

nyomozati, szemtanútól származó, más szakértői etc. – háttérinformációk alapján. Mivel ezen információk teljes köre az adott igazságügyi szakértő számára nem ismeretes, így a posterior valószínűség a prior valószínűség hiányában nem adható meg, tehát a fenti alapkérdésre választ adni „*a biológiai anyagmaradvány az egyedtől adott valószínűséggel származik*” módon helytelen. Az apasági vizsgálatok során a szakértők azért adnak meg mégis posterior valószínűséget, mert a prior valószínűséget – sokszor hallgatólagosan – 50%-nak veszik.

A posterior valószínűség kiszámításához szükséges másik valószínűségi érték azt fejezi ki, hogy mekkora a DNS-vizsgálat eredményének valószínűsége a felállított hipotézis – ellenhipotézis teljesülése esetén, tehát az LR-tag vonatkozik a genetikai tesztelésre. Például: „*Mekkora a valószínűsége annak, hogy éppen az anyagmaradványból kimutatott DNS-profil határozzuk meg akkor, ha feltesszük, hogy a biológiai anyagmaradvány az adott egyedtől származik?*” Ez a kérdésfeltevés, amelyre a genetikai tesztelés önmagában választ tud adni, nem arra vonatkozik, hogy mekkora valószínűséggel származik a szennyeződés az egyedtől, hiszen azt az egyik hipotézisre vonatkozó valószínűség kiszámításánál teljesültnek tekintjük. A hipotézis és ellenhipotézis teljesülésének feltételezésével számított, a genetikai tesztelés eredményére vonatkozó valószínűségek hányadosát [ún. valószínűségi hányados, *likelihood ratio* (LR)] lehet megadni a kriminalisztikai DNS-vizsgálatok statisztikai kiértékelése során. Az ellenhipotézis *likelihood* értékének számítása csak akkor helyes, ha a statisztikai kalkulációhoz felhasznált populációs gyakoriságot nem a gyanúsított egyed szubpopulációs – pl. fajta – hovatartozása, hanem az „a priori” információ – pl. tanúvallomás – határozza meg. Amennyiben a biológiai nyom csak egy személy genetikai anyagát tartalmazza, akkor a valószínűségi hányados – legegyszerűbb formájában – a DNS-profilegyezés valószínűségének reciprokával egyezik meg. A DNS-profilegyezési valószínűség azt mutatja meg, hogy mekkora a várható valószínűsége annak, hogy a populációban a biológiai nyom DNS-profilját az adott egyedén kívül még egyszer megfigyeljük. Az igazságügyi genetikai vizsgálatok Bayes-elvű hipotézis tesztelése során – különösen több egyedtől származó biológiai anyagmaradványok kapcsán – nemcsak kettő, hanem több hipotézis feltételezése is indokolt lehet. Ilyenkor a tesztelt hipotézis-pároknak megfelelően több valószínűségi hányados is megadható, de bizonyos esetekben célszerű más – pl. együttes kizárási valószínűség – érték kalkulálása is.

A statisztika segítségével egyedülálló módon lehetséges a biológiai anyagmaradványok származására rokonsági- és leszármazási szempontból nyilatkozni (Oz, 2003), figyelemmel a nemi-kromoszómás markerek – pl. férfiak közötti rokonsági kapcsolat megléte – sajátosságára is (Kayser, 2001).

Az adatbázisok létrehozásával és integrálásával megkezdődhetett az a folyamat, mely a DNS-vizsgálatok szerepvállalását – bár nem kritika nélkül (Johnson, 2003, Pascali, 2003) – a nyomozati eljárásra-segítségnyújtásra is kiterjesztette. A potenciális elkövetők, kapcsolatba hozható személyek és helyszínek genetikai profiljainak – pl. helyszín-helyszín ill. személy/egyed-helyszín, személy-személy vonatkozásában – összehasonlítására jelenleg magyarországi tapasztalatok még nem állnak rendelkezésre, nemzetközi adatok alapján mindazonáltal kategorikus megállapítások tehetők (Interpol handbook, 2001).

A DNS univerzális jellegéből fakadóan és a fentiekben foglaltaknak megfelelően rendkívül sokféle, kriminalisztikailag potens helyszíni anyagmaradvány származása vizsgálható akár rokonsági relációban is. Tekintettel a visszaeső bűnözés arányára, a mintaadásra kötelezett személyek körét a büntetett előélettel rendelkezőkre is érdemes kiterjeszteni (Howitt, 2003), és az adatbázis növelésével szignifikánsan növelhető a sikeres találatok száma (Ferrara, 2003). Nyomozati úton nehezen felderíthető ügýtípusok megoldásában az adatbázisok nemzetközi integrálása kitüntetett jelentőséggel bír.

3.1.1.2. Alacsony kópiaszámú minták, transzfer, szennyezések

A megnövekedett vizsgálati érzékenység és vizsgálati biztonság a helyszíni mintatípusok biztosításának gyakorlatát is átstrukturálta. Az azonosíthatóság bűnözői köztudatba kerülése különös elkövetési módokat (Karger, 2000) produkálhat, így szükségessé vált a korábbi DNS-alapú metodológiának kihívást jelentő, kis kópiaszámú – „LCN, *Low Copy Number*” – DNS-t tartalmazó nyomok – pl. tárggyal történő érintkezés által leképződő biológiai mikronyomok – analízise (Oorschot, 1997). A biológiai mikronyomokat személyi származtathatóságuk kiemeli a mikronyomok közül, de sok szempontból – pl. legtöbbször rendkívül nehéz a pontos lokalizálhatóság és mintabiztosítás, a többlépcsős elővizsgálatok korlátozottak, a nyomtranszfer- és kontaminációs problémák előfordulása, etc. – a konvencionális mikronyomokhoz hasonló jellegzetességgel bírnak.

Valamely tárgy felszínéről annak megérintése vagy megfogása után általában az azonosíthatóság küszöbértékét meghaladó mennyiségű DNS biztosítható. A vizsgálatok eredménye szerint az egyedről tárgyra történő DNS transzfer mennyisége elsősorban a nyomot hátrahagyó egyed fiziológiás tulajdonságától és higiéniés sajátosságaitól függ, kisebb mértékben függ az érintkezés időtartamától (Wickenheiser, 2002).

Az emberi bőrfelszínt többrétegű elszarusodó laphámszövet alkotja, melynek alsó rétegében a sejtek folyamatosan osztódnak, míg a felső rétegről a sejtek, sejtmarmadványok leválnak, lehámlanak. A hámlás mértéke, sebessége személyenként változó, megkülönböztetünk „erősen hámlókat” – kiknek bőrfelszínéről egységnyi idő alatt relatíve

több sejt válik le – valamint „gyengén hámlókat” – akiknek sejtmaradványai kisebb mértékben lökődnek le – (Lowe, 2002). Megfelelő körülményrendszerben – minőségellenőrzött laboratóriumban – elvégzett vizsgálatokkal mind az erősen mind a gyengén hámlók által hátrahagyott DNS nyomok azonosíthatóak, de az eredmények korrekt interpretálásához megfelelő szakértői jártasság, extrém elővigyázatosság és validált vizsgálati protokoll szükséges (Gill, 2001).

A minimális mennyiségű DNS nyomok sikeres azonosíthatósága a hordozófelülettől is függ (Wickenheiser, 2002). Általánosságban elmondható, hogy porózus, nedvszívó felületeken a sejtmaradványok nagyobb mennyiségben tapadhatnak meg, mint sima – pl. bizonyos fém- és műanyagfélék – felszínen. A természetes anyagok – pl. fa, pamutszövet, gumi – molekuláris szerkezetüktől fogva – polimerek – általában porózusak, így a DNS-kötő képességük is nagyobb.

Egy adott felületen a DNS-vizsgálatok nagy érzékenységének köszönhetően a vele érintkezésbe kerülők profilkeveredése sok esetben kimutatható. A DNS mennyiségét és a keveredési arányokat befolyásolja a biológiai anyag típusa, az egyes személyek hámló képessége valamint az eltelt idő és a környezeti tényezők is. A biológiai váladékok és anyagmaradványok keveredése, egymáshoz kerülése esetén a különböző eredetű DNS-molekulák relatív mennyiségében azonban nagymértékű eltérés lehetséges, ami PCR jellegéből fakadóan a kisebbségben jelenlévő tulajdonságok – minor komponens – részleges vagy teljes kimutathatlanságát eredményezheti.

A rendkívüli érzékenység lehetővé teszi a sejtmagi DNS-sel eredendően – pl. haj és szőrtöredékek – illetve már nem rendelkező – csont, fosszília, etc. – maradványok vizsgálatát. A nagy érzékenység azonban fokozott metodológiai és infrastrukturális körültekintést igényel (Wilson, 1993). Az egy pikogrammos határérték – egy diploid sejtben a DNS mennyisége kb. 6 pg – azt is jelenti, hogy akár egyetlen, nem az originális mintából származó, hanem azt szennyező, friss sejt DNS tartalma képes a kérdéses hajtöredék vagy fosszília mitotípusát elfedni, félrevezető, valótlan eredményt produkálni.

3.1.1.3. Degradáció

Az eseti munka szoros értelemben véve nem kísérleti természetű. Definíció szerint a tudományos kísérletek kivitelezési körülményei ellenőrzöttek, egy időben egy tényező változik, az eseti minták a valóságban azonban mindaddig teljességgel kontrollálatlanok, míg a megfelelő felismerésük és biztosításuk meg nem történik. Mindamelllett, hogy az eseti minták analízise ismert minták validált kísérleti körülményei között történik, a kapott eredmények vizsgálati, nem pedig kísérleti eredményként értékelendők (Inman, 2001).

A biológiai anyagok a szervezetből kikerülve fiziológiás háttérüket elveszítik. A különféle környezeti hatásoknak kitett biológiai anyagmaradványok – bennük a DNS – típusuktól illetőleg az őket ért hatásoktól függően ugyan – beleértve a látható fény UV tartományának hatását –, de mindenképpen károsodnak. A környezeti befolyásoló tényezők komplexitása – pl. nedvesség, hőmérséklet, mikrobiális háttér, etc. – következtében elszenvedett minőségromlás – degradálódás – megnyilvánulhat a DNS töredezettségében és/vagy szekvenciájának megváltozásában. Azon körülmények, amelyek a sejtek, szerves molekulák bomlási folyamatainak kedveznek – pl. magasabb hőmérséklet és nedvességi szint – a minta azonosíthatóságát negatív irányba befolyásolják. Nem hagyható figyelmen kívül az a tény sem, hogy az elhaló biológiai szövetek optimális körülmények között is autolízisen mennek keresztül, melynek során molekuláris szerkezetük felbomlik. Az erre irányuló felmérések szerint a különböző szövettípusok elhalása után analizálható mennyiségű DNS a biológiai szövet típusától függően eltérő időintervallumban mutatható ki (Bär, 1998), és ez az eredeti állapothoz képest korlátozott vizsgálati sikerességet feltételez. A kriminalisztikai minták sajátosságai előrevetítették azt a metodikai evolúciót, mely az elvárásokkal kapcsolatos adekvát megoldásokat érvényre juttatta.

Általánosságban elmondható, hogy amennyiben biológiai nyomot közvetlen módon csapadék, tartós nedvesség, relatíve magas hőmérséklet vagy ultraibolya sugárzás – pl. napsütés – ér, degradálódási folyamatok inicializálódnak. A degradálódási folyamat sebességét a degradálódást indukáló tényezők intenzitása és időtartama határozza meg. A degradálódás-megtartódás szövetspecificitása mellett analóg módon kvázi-hiperbolikus görbével jellemezhető. Azonos típusú biológiai anyagok görbéi szignifikáns eltérést nem mutatnak. Mivel minden analitikai vizsgálatot jellemez egy adott, vizsgálhatósági minimum-érték – esetünkben az ún. minimál-templát DNS –, belátható, hogy a degradálódási ráta – konzerváló tényezők, körülmények nélkül vagy ellenére akár rövid idő alatt is – a nyom vizsgálhatóságának ellehetetlenüléséhez illetve megsemmisüléséhez vezet. Az eredendően csekély biológiai anyagot – néhány tucat sejtet – tartalmazó nyomok – pl. érintés, megragadás – károsodása azonos ráta mellett hamarabb eredményezi a minimum érték elérését.

A biológiai anyagmaradványok DNS tartalmának esetenként eredendően csekély mennyisége tehát – a környezeti károsító hatások és az autolitikus degradáció eredményeképpen – állapotának romlása mellett tovább csökkenhet. Mivel a két folyamat gyakorlatilag együtt érvényesül, eredő hatásuk korlátozza a PCR-sokszorozás sikerességét meghatározó, épen maradt – kellő fizikai hosszal rendelkező – templátok, a felsokszorozandó, eredeti DNS kópiák számát. Az ilyen, eseti gyakorlatban gyakran előforduló minták informatív vizsgálhatósága a PCR-technika sajátosságainak megfelelően rövid – kb.

százötven bázispár – fizikai hosszon belül is polimorf, sok-kópiás – az épen maradt kópiák száma valószínűleg nagyobb – markerekkel (Balogh, 2003) vagy az amplikonok méretének redukálásával (Butler, 2003, Denise, 2004) növelhető.

Nem szabad megfeledkezni arról, hogy a bűncselekményekkel összefüggésbe hozható anyagmaradványok megváltozásának-megváltoztatásának lehetősége a laboratóriumi vizsgálatok megkezdése előtt – pl. az elkövetés ideje alatt, közvetlenül utána, az elkövetés és a feltalálás ideje között, a feltalálás során, a feltalálás és a helyszínbiztosítás között, a helyszínbiztosítás során, a helyszínbiztosítás és helyszínelés között, a helyszínelés alatt, a bűnjelbiztosítás-, csomagolás-, szállítás során – és a laboratóriumi vizsgálat során egyaránt fennáll. A szigorú laboratóriumi minőségirányítási előírások – a mintákkal, bűnjelekkel kapcsolatos megfelelő folyamatokra, a teljes bizonyítási láncolatra történő – kiterjesztése nélkül az egész eljárás sikere – pl. bűnjelek „keresztzennyezésével” – veszélybe sodorható (Gill, 2004).

3.1.1.4. Minőségirányítás

A technológiai határokon történő egyensúlyozás veszélyes, professzionalizmust megkövetelő tevékenység. A tudományt azonban kapitalizmus jellemzi, a kutatásokat nem biztos, hogy az ismeretek, a tudás keresése és az emberiség haszna, sokszor inkább tisztán a privát haszonszerzés vezérli.

Az ajánlott vizsgálat tudományos érvényességének ki kell terjednie a hitelesség, az alapos felülvizsgálatnak való alávetettség, az ismert és potenciális hibalehetőségek ellenőrizhetősége és a széleskörű tudományos elfogadás kritérium rendszerének. Fokozott jogalkalmazói felelősség azon nyitott kérdés mérlegelése, hogy az alkalmazott szakértői módszer a releváns és kompetens tudományterület által általánosan elfogadott-e (Walsh, 1999), ugyanakkor az eljáró szakértőnek minden rendőrségi és bírósági eljárásban részt vevő személy számára tisztáznia kell a DNS vizsgálatokkal kapcsolatos félreérthetőség és téves értelmezés lehetőségét (1st International DNA User's Conference, 1999).

A hibás mintakezelés vagy a vizsgálatokból levont helytelen szakértői megállapítások a törvényszéki genetikai tesztek téves pozitívítását eredményezhetik. Két minta azonos eredetére vonatkozó DNS vizsgálat bizonyító erejének értékelésénél két tényezőt kell figyelembe venni. A véletlen egyezés valószínűségét (P_{CM}), amikor is két különböző egyed rendelkezhet ugyanazzal a genetikai (rész)profilal, illetve a „téves pozitívítás” (P_{FP}) valószínűségét, ami akkor fordul elő, ha a szakértő két minta valójában eltérő genetikai profilját egyező profilként konkludálja. Habár mindkét faktor befolyásolja a véleményezett egyezés valódiságát és elfogadhatóságát, a jogalkalmazók – és ennek

megfelelően a szakértők is – sokkal inkább koncentrálnak a szilárd tudományos alapvetések segítségével kalkulálható P_{CM} -értékre, mint a Bayes-elvű hipotézisteszteléssel körülményesen becsülhető P_{FP} -értékekre. Habár a külső, „vak-jártassági-teszt”-ek a laboratóriumi hibalehetőségek feltárásának megfelelő eszközei lehetnek, a tesztekben detektált hibaráta nem szükségszerűen egyezik meg a P_{FP} -értékkel, mivel minden eset egyedi körülményrendszere az átlagostól többé-kevésbé eltérő, változó típusú hibákat produkálhat (Thompson, 2003).

A téves profil-meghatározásnak számos oka – pl. kontamináció, téves minta-adminisztráció, mintacsere, illetve mechanikai-, kémiai-, elektronikai-, informatikai-vizsgálati hibák és a vizsgálati eredmények hibás kiértékelése, interpretálása, etc. – lehetséges. Az ismételt vizsgálatok – melyekkel sok szakértő előszeretettel bizonygatja eredményeinek és véleményének helytálló voltát – nem zárnak ki minden – pl. vizsgálatok előtti kontamináció, téves interpretálás, etc. – hibalehetőséget. Vizsgálólaboratóriumokban történt felmérések alapján megállapítható, hogy hibákhoz, így ártatlanok elítéléséhez vezethet:

- a hiányos laboratóriumi biztonsági rendszer
- a minta-minta keresztszennyezés lehetősége
- az az analízist végző személy, aki nem alkalmaz megfelelő kontrollokat annak kiküszöbölésére, hogy a korábbi analízis DNS maradványa szennyezőként kizárható legyen,
- a hiányos és/vagy hibás vizsgálati dokumentáció,
- az a szakértő, aki nincs teljesen tisztában az eredmények megfelelő interpretálásával,
- az a vélemény, amely nem megfelelő és megalapozott statisztikai valószínűsítést tartalmaz,
- a téves adatbázis input.

A National Institute of Justice (NIJ, USA) 1996 évi adatai alapján nem zárható ki, hogy az amerikai elítéltek 10%-a (!) ártatlan (McVicker, 2004).

Két friss biológiai minta klinikai körülmények között, korszerű vizsgálati módszerekkel és megfelelő kompetenciával végzett összehasonlító DNS vizsgálata esetén a téves egyezés valószínűsége rendkívül csekély, ami azonban milliószor nagyobb, ha a profil adatbázis szintjén kerül összehasonlításra. Tovább bonyolítja a helyzetet, hogy a kriminalisztikai minták igen ritkán lelhetők fel klinikai környezetben, illetve meglehetősen ritka a klinikai mintákból végzett összehasonlító kriminalisztikai vizsgálat is. Adott személy téves DNS-profilja például „virtuális utód” profilját eredményezheti (1).

A tévesen – és részlegesen, kevés lókuszon – tipizált helyszíni minták adatbázisba kerülése téves gyanúsításhoz, a nyomozási eljárás redukciója helyett fölösleges és drága vakvágányra, nehezen kommunikálható, több mint kínos helyzetekhez vezet, melyeket súlyos kártérítési kötelezettség is terhelhet (2). A korábbi szakértői és jogalkalmazói tévedések miatt – melyek szignifikáns többségében játszott közre szemtanú által történt téves felismerés – (3) több demokráciában felmerült a már elítélt „elkövetők” ügyeinek kötelező DNS újvizsgálata (Connors, 1996) (4). A vizsgálati eljárás megbízhatóságának kérdése az állami intézményi háttér közreműködését preferálja a bizonyítékok vizsgálatának terén, mivel természetéből fakadóan, komolysága és jelentősége miatt igazságügyi laboratóriumi tevékenység tisztán profit-orientált privát körülmények között nem tartható fenn.

Ahogy arra nagy nemzetközi nyilvánosságot kapott esetek (5) is rávilágítottak, a DNS profil-meghatározás nem kriminalisztikai varázspálca, nem csalhatatlan törvényszéki eszköz, hanem egy összetett vizsgálati rendszer, mely ki van téve emberi hibáknak, és magában foglalja a mintakontamináció, mintacsere valamint a téves szakértői interpretáció lehetőségét is.(6)

A bizonyítási láncolat töretlen folyamatossága az ítélet meghozatala szempontjából kiemelt jelentőséggel bír. A jogalkotás általános szabályozását azonban sok esetben speciális szakmai – azonban szintén általános jellegű – szempontrendszerekkel kell kiegészíteni (MSZ EN ISO/IEC 17025).

A DNS vizsgálatok kezdeti szakaszában számos szakértői állásfoglalás bizonygatta a téves pozitív azonosítás lehetetlenségét. A rossz elvi megközelítés széleskörű felismerése a rossz gyakorlatot is bizonyította. A hibalehetőségek kiküszöbölésének céljából a bizonyítható – dokumentált – szakértés követelmény-rendszerének kidolgozása a '90-es évek közepére megtörtént (TWGDAM, 1995). A szakértői vizsgálat folyamatának áttekinthetősége, ellenőrizhetősége mind infrastrukturális mind személyi vonatkozásaiban garanciát kell nyújtson a fokozódó emberi- és személyiségjogi elvárásoknak. Amerika után Európa is saját – de meghatározó szempontjaiban teljesen kompatibilis – normarendszert (ILAC, 2002) dolgozott ki, melyet Uniós szervezetén (ENFSI-European Network of Forensic Science Institutes) keresztül – viszonylag rövid határidőn belül kötelezően kíván érvényre juttatni. A minőségirányítás igénye a DNS egyéb törvényszéki alkalmazására is kiterjed (Morling és mtsai, 2003, Jobling, 2004).

3.1.2. A biológiai anyagmaradványok vizsgálatának áttekintése

A bűncselekmények helyszínén vagy azokkal kapcsolatba hozhatóan (pl. elkövetői ruházaton) fellelt biológiai anyagmaradványok vizsgálati lehetőségeit alapvetően az adott korszak tudományos színvonala határozza meg, így érthető, hogy a kezdeti információkat a XIX. század végéig a fizikai- majd kémiai módszerekkel végzett analízisek (pl. morfológia, vérkimutatás, etc.) jelentették. A XX. század robbanásszerű tudományos-technikai fejlődése utat nyitott a biológiának, mely az informatikával együtt a századvég legdinamikusabb tudományágává vált.

Személyazonosításra azonban csak azok a biológiai tulajdonságok alkalmasak, amelyek az életkortól, a környezeti hatásoktól függetlenek, nem módosulnak és nem módosíthatók – nem hamisíthatók –, ugyanakkor kellő mértékű változatosságot mutatnak ahhoz, hogy a vizsgálatok alapján az egyedek között különbséget lehessen tenni. Habár a konvencionális vizsgálati módszerek hosszú utat tettek meg a kriminalisztika szolgálatában, a biológiai anyagmaradványok individualizációja sokáig csalóka cél maradt. Napjainkra azonban ezt a célt a DNS alapú vizsgálati módszerek elérhető közelségbe hozták, így jelentőségük a felderítés és a bizonyítás folyamatában rendkívüli mértékben megnőtt.

A DNS egyetemes jellege lehetővé teszi, hogy akár testi-, akár szaporítósejteket tartalmazó biológiai anyag vagy anyagmaradvány azonos elvi és gyakorlati alapokon legyen vizsgálható. A szövettípusoktól független vizsgálati lehetőség nemcsak kiszélesíti a potenciális forrásminták körét, hanem azokból teljes mértékben kompatibilis, összevethető – megkülönböztetésre és azonosításra egyaránt felhasználható információ – genetikai profil elérését biztosítja. Analóg módon, némi körütekintéssel az is belátható, hogy a genetikai örökítő anyag élővilágban betöltött univerzális szerepe milyen mértékben tágíthatja ki a szakértői bizonyítás illetve a hozzá kapcsolódó anyagmaradványok potenciális körét.

3.1.2.1. Konvencionális vizsgálatok

A törvénytudományi vizsgálatok a rendkívül sokféle formában előforduló biológiai eredetű anyagmaradványok közül elsőként a vérfoltokra koncentráálódtak. Bár a világhírű nyomozó, Mr S. Holmes már Arthur Conan Doyle 1887-ben írt regényében („*A Study in Scarlet*”) megtalálja az emberi haemoglobint precipitáló reagenst, a fajspecifikus fehérjék kimutatására szolgáló eljárást valójában később – Tchistovich (1899), Uhlenhuth (1901), Wassermann (1902) – sikerült csak kidolgozni. A membránstruktúr antigének felfedezése – Landsteiner (1901), Decastello (1902), Jansky (1906) – új elméleti alapokat teremtett, és a szekréumokból megvalósítható kimutatásuk – Yamakami (1926), Landsteiner és Levine (1928), Ignatova (1929) – a vizsgálhatóságot is kibővítette (Horváth, 1979). Mindezek

ellenére a beszáradt foltok vércsoport-meghatározása túlnyomó többséggel eredménytelennek bizonyult. Az abszorpciós-inhibíciós módszer kidolgozása – Holzer (1931) – kis mértékben javított ugyan a sikerességen, de hiába szaporodott meg az ismert vércsoport-rendszerek száma – M, N, P (Landsteiner és Levine 1926) Rh (Landsteiner és Wiener 1940), etc. – az eseti munkában a múlt század közepéig nem hoztak lényegi áttörést.

A korlátokat, melyeket szerológiai léptékkal mérve is nagyszámú antigének vizsgálhatósága jelentett, Coombs (1945) indirekt agglutinációs-, Kind (1960) kevertsejtes- illetve abszorpciós-elúciós eljárásai, a szérums csoport-rendszerek – Grubb (1956) – és a humán leukocita antigének – Dausset (1958) – felfedezése némiképp kitolták, de érzékeny és specifikus technológiát standard – automatizálható – módon a fluoreszcens jelölési technika – Hasebe (1962) – segítségével sem sikerült kifejleszteni (Lontainé, 1982).

A szerológiai és immunológiai módszerek viszonylag hosszú ideig jelentettek többé-kevésbé hatékony megoldást, mígnem a biokémiai és molekuláris biológiai módszerek standardizálásával a sejtszinten – antigének – történő vizsgálatok molekuláris – enzimek – szintre helyeződtek át. Az elektroforetikus technika segítségével – Hopkinson, Spencer, Harris (1963) – vizsgált vörösvérsejt-enzim allotípusok, hemoglobin variánsok – Culliford (1971) – a '70-es évekre széles körben elterjedtek, de megnyilvánuló előnyeiket a kriminalisztikában az instabil, aktivitásfüggő kimutathatóság időben korlátozta (Schleyer, 1995). A friss mintával rendelkező polgári peres eljárásokban – pl. vitatott szülőség – szerepüket csak a közelmúltban váltották fel teljes mértékben a szubmolekuláris – DNS szakaszok ti. lókuszek – szintjén végzett vizsgálatok.

3.1.2.2. DNS alapú vizsgálatok

Habár a DNS tulajdonképpen „felfedezése” már 1868-ban megtörtént, a tudósok csak jóval ez után és csak lassacskán ismerték fel alapvető szerepét az öröklődésben. Körültekintő kutatások során azonban sikerült bizonyítani szubsztanciális jellegét a genetikai információ generációról-generációra történő átadásában. A napjainkban is rendkívül dinamikusan fejlődő molekuláris biológia által feltárt genetikai alapvetések és a velük kapcsolatos információk a biotechnológiát és a diagnosztikát már korai stádiumban is ösztönözték, de az igazságügyi szakértés részéről csupán periférikus érdeklődést váltottak ki. Az 1980-as években azonban a DNS alapú technikák az első hipervariábilis DNS polimorfizmus (D14S1) restrikciós hosszpolimorfizmus technikával (RFLP) történő kimutatásával új távlatokat nyitottak a szakértői bizonyítás számára.

A következő néhány év kutatásai számos további, személyazonosításhoz felhasználható markert azonosítottak a humán genomban, melyek RFLP módszerrel

detektálva az eseti gyakorlatba is bekerültek. A legnagyobbbrészt miniszatellit régiókban jelenlévő polimorf szakaszok egyidejű vizsgálatával – multilókuszos próbák hibridizálásával – eredményként vonalkód-szerű mintázat volt nyerhető, melyről a személyazonosítási lehetőség – tulajdonképpen maga az eljárás – fejlesztőitől (Jeffreys és mtsai, 1985) „*DNA fingerprinting*”– DNS ujjlenyomat elnevezést nyert. A gyakorlatban a multilókuszos próbákat gyorsan felváltották az egylókuszos próbák, melyek a szakirodalomban VNTRs – „*Variable Number of Tandem Repeats*” néven váltak ismertté, és az igazságügyi gyakorlatban a '80-as évek végére terjedtek el (Gill, 1987). Köszönhető ez a multilókusz próbák nagyobb minta-DNS igényének, a degradációból és az egyéb technikai egyenetlenségekből fakadó hibridizációs hibáknak és nem utolsósorban a mintázat rendkívül bonyolult statisztikai interpretációjának. Az eredmények minősége, esetenkénti pontatlansága és laboratóriumok közötti összehasonlíthatatlansága már a módszer korai alkalmazásainál is felvetette a technikai és kiértékelési standardizálás, minőségbiztosítás kifejezettebb igényét. Habár ezek a régiók kellően informatív megkülönböztetési lehetőséggel – nagyfokú polimorfizmussal – rendelkeztek, és a származásellenőrzési – pl. vitatott szülőség – vizsgálatoknál igen hatékonynak bizonyultak, hiába uniformizálták a felhasznált restrikciós enzimeket, molekulaméret-standardokat, hiába dolgoztak ki a statisztikai interpretációra egységes elvet és csökkentették a vizsgálat idejét valamint veszélyességét a radiográfiás jelölés kiváltásával, az RFLP az ezredfordulóra csaknem teljes mértékben átadta helyét és szerepét egy másik eljárásnak, a polimeráz láncreakciónak (PCR).

Habár a PCR technikai megvalósítása néhány évvel később 1985-ben történt meg, törvénytörvényes felhasználására gyakorlatilag az RFLP-vel csaknem azonos időben, 1986-ban került sor. Az alaptudományok dinamikus fejlődésére jellemző, hogy a természetes DNS replikáció folyamatának kezdeti feltárása és *in vitro* folyamatban történő alkalmazása között alig egy évtized telt el. A párhuzamos alkalmazás kezdeti időszakában az RFLP dominanciája legfőképp az első PCR alapú vizsgálati tesztek alacsony kizárési valószínűségének volt köszönhető, de a gyors technológiai fejlesztések és azok kommercializálása megfordította ezt a trendet. A könnyű laboratóriumi adaptálhatóság párosulva a rendkívüli érzékenységgel, a degradált mintákon elérhető vizsgálati sikerességgel és a gyors kivitelezhetőséggel, a módszert Európa „meghódítása” után a világ igazságügyi laboratóriumaiban is uralkodóvá tette.

A PCR termékek – kópiák – az RFLP-től eltérően diszkrét tulajdonságtípusokként detektálhatók, és egyidejűleg akár többtucatnyi régió is felsokszorosítható – amplifikálható –, ami akár szekvencia-, akár hosszpolimorf lókuszok vizsgálatánál

felhasználható. A primerek megfelelő tervezésével – azonos annealing hőmérséklet, ne kapcsolódjanak egymáshoz, ne dimerizálódjanak, etc. – és a reakció optimalizálásával mindez bizonyos mértékig elérhető, ami a multifloreszcens detektálási technika fejlesztésével napjainkra olyan multiplex PCR-teszteket eredményezett, melyekkel az egyedi szintű azonosítás egyetlen vizsgálattal megtörténhet (Applied Biosystems, 2001).

A legelső, PCR módszerrel törvényszéki eljárásban is vizsgált lókuszt a szekvencia-polimorf HLA-DQA1 régió volt (Higuchi, 1988), melyet eredendően transzplantációs célokra dolgoztak ki. A különböző allélok eltérő szekvenciája allél-specifikus oligonukleotidok – ASO-próbák – hibridizálásával állapítható meg, melynek során az RFLP-től eltérően a specifikus próbákat fixáljuk membránra. A biotin-jelölt primerek segítségével amplifikált szakaszok az adekvát helyen (komplementer szekvenciák) enzimreakcióval láthatóvá tehetők. Ez a „*revers dot blot*” eljárás multiplex PCR-val kombinálva, kereskedelmileg forgalmazott terméként több – LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC – analóg polimorfizmus egyidejű kimutatását oldotta meg, elősegítve a módszer RFLP-sal szembeni versenyképességét.

Tekintettel a szekvencia-polimorf lókusztok viszonylag kis allélszámára – relatíve alacsony kizárási valószínűségére –, kísérletek történtek olyan RFLP alapú régiók PCR konvertálására, melyek kisebb méretű fragmensekkel rendelkeztek. Az AFLPs – „AmpFLP, vagy *Amplified Fragment Length Polymorphism*” által 1989-től vizsgálhatóvá vált VNTR-ek – APOB3’, D17S5, D1S80, COL2A1 – ismétlődő szakaszai 15-70 nukleotid hosszúak voltak, így LTRs – „*Large Tandem Repeats*” néven váltak ismertté (Kasai és mtsai, 1990).

A megnövekedett kutatási kedv hosszpolimorf repetíciók iránt számos további AFLP lókuszt feltárását eredményezte, de a hosszú fragmensek korlátozott amplifikálhatósága, technikai – degradáció, a templát minősége, preferenciális amplifikálódás, etc. – valamint a gélelektroforézissel történő elválasztás során tapasztalt tipizálási ambivalenciák az igazságügyi alkalmazást az egyre inkább feltérképezett STRs – „*Short Tandem Repeats*” (Polymeropoulos, 1991) analízis irányába vitték. Ezeknek a polimorf lókusztoknak viszonylag nagy száma (Staub és mtsai, 1993) flexibilisebb primertervezésre (Promega, 1993) adott módot. A multifloreszcens technika (Edwards és mtsai, 1991) – melynél a primer-mix adekvát primer párjait különböző emissziós hullámhosszal rendelkező festékmolekulával jelölik, így a sokszorozott fragmensek (amplikonok) különböző „színnel” jeleníthetők meg – az egyidejű detektálás lehetőségét szélesítette, és végül a multiplex vizsgálatok és automatizált berendezések elterjedését vonta maga után (Applied Biosystems, 1997, Promega, 1999).

A polimeráz enzim csúszásából eredő, legfőképp a di- és trinukleotid ismétlődések tipizálásánál jelentkező bizonytalanságok miatt (Walsh, 1996) az ezredfordulóra a 4-5 bázispáros repetíciókat tartalmazó lókuszek – 6-16 lókuszes együttes, multiplex analízisére alkalmas, az RFLP-okat is felülmúló megkülönböztetési valószínűséggel rendelkező – vizsgálati rendszerei váltak kereskedelmileg hozzáférhetővé. A standardizált, populációs háttérvizsgálatokkal alátámasztott STR polimorfizmusok lokalizációja magában foglalja az autoszómákat és az ivari kromoszómákat is, összességükben pedig alkalmassá váltak nemzeti- és nemzetközi adatbázisok kialakítására (Krenke és mtsai, 2002, Holt és mtsai, 2002).

Az analizálható kópiák felszorzásával megnyílt az út a mitokondriális DNS szekvencia polimorfizmusainak vizsgálata felé is (Anderson, 1981, Andrews, 1999). A törvényszéki alkalmazás szempontjából fontos megkülönböztetési – kizárási – esély részben maternális öröklés miatti információvesztését ebben az esetben a viszonylag stabilabb molekuláris szerkezet magas kópiaszáma ellensúlyozza. A rövid szakaszok nagyobb amplifikálhatósági sikerességét felhasználva, egymást átfedő amplikonokkal az extranukleáris DNS hipervariábilis szakaszainak kimutathatósági küszöbértékét a néhány pikogramm nagyságrendig csökkentették, és ezzel a DNS alapú azonosítást a biológiai anyagmaradványok szinte teljes körére kiterjesztették (Holland, 1999). A polimorf helyek kiterjesztésével (Parsons, 2001) jelentősége fokozódik (Parson, 2004), de a rendkívül érzékeny technika rendkívül nagy körültekintést igényel (Herrnstadt, 2003). A mitokondriális genom a leszármazási vonalakra (egyedekre) specifikus polimorf jellegek mellett egyéb specifikus szekvenciákat is hordoz. A kódoló szakaszon lokalizált *cytochrome b* gén egy jól körülhatárolt szakasza genetikailag jól fixálódott fajspecifikus szekvenciákat mutat, így az adott nukleotid pozíciókon tapasztalt eltérések elemzésével a biológiai nyom faji eredete megállapítható (Parson, 2000).

Az autoszómás és ivari kromoszómás hosszpolimorfizmusok, a mitokondriális DNS hipervariábilis régiójának szekvencia-polimorfizmusa után a figyelem középpontjába a genomban előforduló 3-6 millió pontmutáció SNPs – „*Single Nucleotide Polymorphisms*” analízise került (Phillips és mtsai, 2004). A SNP-ok a nukleáris- és mitokondriális DNS-ben (Coble és mtsai, 2004, Kline és mtsai, 2005), génekből, regulátor régiókban egyaránt előfordulnak, többféle módszerrel – pl. biochip technológia (Wang és mtsai, 1998) – azonosíthatók. Habár limitált polimorfizmusuk miatt a megfelelő kizárási valószínűség eléréséhez az STR lókuszekhez viszonyítva lényegesen több SNP egyidejű meghatározására van szükség (Chakraborty és mtsai, 1999) nagy számuknak és a rövid cél-DNS-fragmentsnek köszönhetően optimális megoldást jelenthetnek a kriminalisztikai

minták többségét kitevő, degradált anyagmaradványok vizsgálatában. További jövőbeli potenciális előnyükként említhető, hogy jól adaptálhatóak a legújabb automata vizsgálati platformokhoz, berendezésekhez. A szétszórt rövid szekvenciákkal (Primrose, 2003) SINEs – „*Short Interspersed Nuclear Elements*” együtt, melyek szintén igen magas kópiaszámban találhatók meg a genomban, az egyediség megállapítása mellett felderítést segítő részinformációk is – fenotípusos jellegek, etnikai- és területi hovatartozás – nyerhetők (Batzer, 1991, Bamshad és mtsai, 2003).

A '90-es évek közepének nagy nemzetközi publicitással bíró bűnügyei – pl. O. J. Simpson-ügy – tovább fokozták a már DNS-vizsgálatokkal szemben támasztott (Council of Europe, 1993) elvárásokat. A kihívásoknak megfelelően az alkalmazott kutatások és fejlesztések – vizsgálati érzékenység növelése, a vizsgálható biológiai anyagmaradványok körének kiszélesítése, a származási valószínűsítés tudományos statisztikai hátterének kiteljesítése, minőségirányítási rendszerek kiépítése – mellett megjelentek az első bűnügyi célú STR profilnyilvántartások – pl. Nagy-Britannia, USA – is. Az FBI által definiált 13 STR törzs-lókuszt nyilvántartó rendszerének (CODIS) elterjedése után megindult a nemzeti adatbázisok nemzetközi szerveződése (Interpol DNA Unit, 2003).

Az igazságügyi vizsgálatok jövőképe jelenlegi ismereteink alapján korántsem tűnik egyhangúnak. A „GATTACA” című sci-fi kézi DNS-analizátora ugyan már közel jár a megvalósításhoz (Goedecke, 2004), de a molekuláris igazságügyi patológia (Lunetta, 2002, Levo 2003) akárcsak a rendkívül csekély mintamennyiségből fakadó problémák (Schneider, 2004) még sokáig jelentenek kihívást a kutatók számára.

3.1.2.3. Magyarországi alkalmazások

Vérfoltokból vércsoport vizsgálatokat bűnügyekben Magyarországon először – Budvári (1958) – orvosszakértők végeztek. Az érzékenyebb módszerek nemzetközi tapasztalatok alapján történő bevezetése – Gerencsér (1966) – utat nyitott a nem vérből történő próbálkozásoknak – Harsányi (1971) – is. Kriminálisztikai jelentőségük a '80-as évek elejére teljesedett ki, mikor több vér- és szérumszoport-rendszer valamint a HLA antigének is rutinszerű meghatározásra kerültek (Lontainé, 1982). Habár a biokémiai polimorfizmusokat a származási ügyekben gyakran használták – Kósa (1981) –, az izoenzim-típusok – EAP, ESD, PGM, AK, etc. – gélelektrofókuszással megvalósítható, nagyobb felbontású analízise vérfoltokból csak igen korlátozott mértékben terjedt el. Ezt részben a szerológiai módszerek magyarországi tradíciója és prioritása, részben a biokémiai polimorfizmusok mintaignényének – mennyiségi és minőségi – sajátossága

illetve a vizsgálórendszer kiépítésének lassúsága okozta. Érthető tehát, hogy technikai alkalmazásuk viszonylag rövid időszakot ölelt fel.

A DNS vizsgálatokat a törvénytörvényes gyakorlatban néhány évvel később alkalmazó laboratóriumok többsége már bele sem fogott az RFLP vizsgálatokba, hanem kizárólag a PCR technika fejlesztésére tett lépéseket. Ennek főbb okai a laboratóriumi körülményrendszer és munkafolyamatok egyszerűsítése, az egészségre veszélyes tényezők – radioaktív jelölés – eliminálása, az egyre inkább felszínre kerülő technikai ambivalenciák, ugyanakkor a könnyen adaptálható új módszerek és a minőségellenőrzött, kereskedelmi forgalomban beszerezhető kemikáliák voltak. A Bűnügyi Szakértői és Kutatóintézet 1992-ben Magyarországon elsőként adott emberölés ügyében olyan igazságügyi szakértői véleményt, amely a konvencionális szerológiai markerek mellett PCR alapú, szekvencia- és hosszpolimorf lókuszek genetikai profilját tartalmazta (Pádár, 1993).

A következő tíz év fejlesztései a nemzetközi trendnek megfelelően, folyamatosan történtek. A több száz ügyben egyre inkább rutinszerűen alkalmazott, „*reverz dot blot*” eljárással vizsgált szekvencia-polimorf lókuszek – HLADQA1, LDLR, GYPA, HBG, D7S8, Gc – és a gélelektroforézissel tipizált hosszpolimorf VNTR-ek – LTR-ek, ApoB3', D1S80 – (Woller, 1995) valamint a nemi jelleg megállapítására szolgáló alphaszakaszok mellett 1994-ben az első STR-monoplexek – vWA, THO1 – is megjelentek (Füredi, 1995). Az 1995-96 évek a kezdeti STR-multiplexek jegyében teltek el, a további lókuszek – HPRTB, FES, TPOX, CSF1PO, LPL, F13B, F13A01 – triplex- és quadruplex formában történő vizsgálata (Füredi, 1996) a magyarországi népességhez képest rendkívüli mértékben megnövelte a megkülönböztetési valószínűséget. Az ezredfordulós évek a multifuoreszcens technika diadalmenetét jelentették (Egyed, 2000). Napjainkra a 6-, 10-, 16-plex rendszerek használatával tucatnyi autoszómás – D3S1358, FGA, D5S818, D13S317, D7S8220, D8S1179, D21S11, D18S51, D16S539, Penta D, Penta E, D2S1338, D19S433, SE33 – és nemi kromoszómás – DYS19, DYS385, DYS389, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 – lókuszek kerültek a szakértői gyakorlatba (Füredi, 2003), valamint a mitokondriális szekvencia-polimorfizmus is rutinvizsgálattá vált. Az 1999. évi LXXXV. törvényben a büntettek genetikai-profiljának nyilvántartásáról rendelkeztek.

3.2. Az STR eszköztár

A molekuláris biológiai technikák kidolgozásakor a genetikusok érdeklődésének középpontjában a fehérjeszintézis szabályozásában szerepet játszó DNS-szakaszok álltak. Ezek a „kódoló régiók” a teljes szekvenciának csupán a kisebb részét teszik ki, ugyanakkor a molekula

számos olyan régióval rendelkezik, amelyek több-kevesebb nukleotid különböző számú ismétlődéseit tartalmazzák (Edwards és mtsai, 1991). A hosszbeli változatokat kialakító „tandem-repetíciók” eredete, pontos funkciói érdemben ma még nem teljesen tisztázódtak, de eltéréseik és öröklődő jellegük az ún. DNS-tipizálás segítségével az egyedek megkülönböztetésére ad módot. A genetikai polimorfizmusok – így a hosszpolimorf szakaszok is – a nukleotid szekvencia szintjén nyilvánulnak meg, így mindazon eljárások melyek a lókuszok szekvenciális különbségeit detektálni tudják, potenciálisan igazságügyi alkalmazásba is bevonhatók (Edwards és mtsai, 1992).

Az eukarióta genomban nagyon sok helyen találhatók ismétlődő szekvenciák, melyeket gyakran szatellit-DNS-nek neveznek. A tulajdonképpeni, gradiens centrifugálással elkülöníthető szatellitek 100 bp hosszúságot meghaladó ismétlődő egységekből állnak, és a kromoszóma centromer régiója körül lokalizálódnak. A repetíció rövidülése alapján beszélünk mini- és mikroszatellit szakaszokról is. A közepesen hosszú miniszatellitek – melyeket VNTR-ként is referálnak – 10-100 bp hosszú egységei néhány tucatszor ismétlődhetnek, a rövid mikroszatellitákat STR-nek, esetenként SSR-nek – „*Simple Sequence Repeat*” nevezik (Butler, 2005).

Az STR-ek – mikroszatelliták vagy rövid tandem ismétlődések – olyan nem átíródó DNS-régiók, ahol 2-6 bázispárból (bp) álló szakaszok ismétlődnek egymás után, tandem módon (Weber, 1989). A humán genom kb. 3%-át kitevő mikroszatellit lókuszok átlagosan tízezer nukleotidonként figyelhetők meg (Edwards és mtsai, 1991, Butler, 2005). Kódoló szakaszokban intronok részeként és génen kívüli régiókban egyaránt megtalálhatók. Az egységek hosszának megfelelően di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-„*repeat*”-eket különböztetünk meg. Ezek a változó számú tandemszerű repetíciók 80-350 bp hosszú fragmensméretben nyilvánulnak meg, amelyekben a 2-6 bp-os motívumok egyszerű vagy összetett ismétlődése 2-50 kópiaszámban figyelhető meg. Az STR lókuszok ismétlődéseinek száma a személyek között nagy változatosságot mutat, és ez a polimorf tulajdonság alkalmassá teszi őket genetikai személyazonosítási célokra (Butler, 2001).

A hossz-polimorfizmusok közé sorolt STR polimorfizmusok hosszbeli különbözősége esetenként szekvencia variabilitással párosul, mely alapján többféleképpen is csoportosíthatók (Weber, 1990, Urquhart, 1994). Az azonos hosszúságú és szekvenciájú egységekből álló egyszerű *repeatek* mellett megkülönböztethetünk összetett, komplex, hipervariábilis szakaszokat. Az egyszerű repeatek egy csoportja tartalmazhat nem konszenzus allélokat is. Az összetett repeatek két vagy több különböző, egymással szomszédos egyszerű repeatet tartalmaznak. A komplex repeatekben a különböző, változó hosszúságú repeat-egységeket változó méretű közbeiktatott szekvencia szakítja meg. Nem minden STR allél mérete feleltethető meg a repeatek egész számú többszöröseként. A repeat- vagy a repeateket határoló régióban egy vagy több megváltozott nukleotidot hordozó mikrovariáns allélok a konszenzus allél méretétől eltérhetnek. A komplex hipervariábilis repeatek szekvenciájukban és méretükben is eltérő, nem konszenzus repeatek

sokaságát tartalmazzák (Butler, 2005). Az allélváltozatok időnkénti kialakulása (Ellegren, 2004) a molekuláris szinten egyetlen nukleotidot illetve az ismétlődések számát változtató mutációknak – DNS replikációs hibák, (pl. a DNS polimeráz csúszása), a javító mechanizmus nem tökéletes működése – köszönhető (Nadir, 1996).

Az STR markerek jelenleg kulcsszerepet töltenek be igazságügyi célú alkalmazás terén. Ezt nagy számuk és viszonylag magas fokú polimorfizmus fokuk mellett a degradált, töredezett, kis mennyiségű mintáknál tapasztalt vizsgálati eredményességüknek, a vizsgálatok technikai megvalósíthatóságának és viszonylag gyors kivitelezhetőségének, a megbízható és szigorú minőségbiztosítási követelményeknek is eleget tevő vizsgálati stabilitásuknak, általában egyértelmű azonosíthatóságuknak, megkülönböztethetőségüknek köszönhetik, melyek alapján váltak a személyazonosítás fő genetikai markerévé. Napjainkig igazságügyi célokra mintegy száz humán polimorf mikroszatellitát jellemeztek és hitelesítettek (Butler, 2005). Ezek közül jelenleg 16 marker képezi a különböző nemzetek bűnügyi DNS-profil nyilvántartásainak alapját, melyek között az Interpol, az ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes) és FBI vizsgálati markerei is megtalálhatók. Az STR lókuszok nemzetközileg kompatibilis vizsgálata és hitelesítése Magyarországon is több éve zajlik (Füredi, 2004).

Az igazságügyi célú vizsgálatoknál már a kezdetekben is megfogalmazódott az igény az ellenőrizhetőségre és az analízisek laboratóriumok közötti összevethetőségére, ami jelenleg, a nemzetközi szinten is működő „tettes-kereső” adatbázisok korában még inkább kritikus jelentőséggel bír. Mindez persze nemcsak a hasonló, analóg illetve homológ vizsgálorendszereket, hanem az információ pontos és félreérthetetlen kódoló-dekódoló rendszerét is feltételezi. Bár a fentebb leírtak alapján megállapítható az STR allélok megkülönböztetésre való alkalmassága, a meghatározáshoz elengedhetetlen az alkalmazott kontrolok és a detektált tulajdonságok pontos definiálása, ami nemzetközileg egységesített nevezéktan segítségével történik. A nevezéktan a Nemzetközi Igazságügyi Genetikai Társaság ajánlásaiban összegezte (Bär és mtsai, 1997; Olaisen és mtsai, 1998, Gill és mtsai, 2001, Daniels és mtsai, 2004).

3.3. A *Canis familiaris* vizsgálata

A bűncselekmények helyszínén a fizikai-, kémiai- és emberi eredetű nyomok mellett illetve között gyakran található növényi törmelék, állati szőrszál (D’Andrea, 1998), melyek vizsgálata a közelmúltig meglehetősen korlátozott információt nyújtott. A genetikai alapú kutatások napjainkra azonban olyan háttérrel biztosítanak (Lopez és mtsai 1996, Neff és mtsai 1999, Lindblad-Toh és mtsai, 2005), mely felhasználásával a törvényszéki alkalmazást segítő biológiai individualizáció az állati eredetű maradványok vonatkozásában is elérhetővé válhat (Menotti-Raymond, 1997).

A kutyák kriminalisztikai szerepe korábban csak közvetlen érintettségük – pl. kutyatámadások – során merült fel (Weiss, 1998). Sajnálatos módon – a nemzetközi tapasztalatokhoz (Overall, 2001, De Munnynck, 2002) hasonlóan – a tartási inkompetenciából és elégtelenségből fakadóan Magyarországon is megszorodtak azok a kutyatámadások, amelyek sokszor tragikus következményekkel járnak (Siegel, 2000). Fajspecifikus STR-ek alkalmazásával a harapásnyomok nyálszennyeződéseiből az egyedre jellemző genetikai profil mutatható ki (Pádár, 2003, Eichman, 2004). Habár a probléma sem mértéke, sem következményei miatt nem elhanyagolható (7, 8), a jelenlegi bűnüldözési gyakorlatban azonban mint átvihető, azonosítható biológiai nyomok- és mikronyomok leképzői, kedveltségük és nagy számuk miatt egyre fokozódó jelentőséggel bírnak. Különösen lényeges lehet ez olyan országok bűnügyi gyakorlatában – mint pl. Magyarország –, ahol a háztartások nagy részében előforduló házi kedvencek szőrszálaival potenciális nyomtranszfer következtében, mint közvetlenül egyedhez köthető elemi szálak játszhatnak szerepet a felderítésben és a bizonyításban. Napjainkban több olyan súlyos bűncselekmény felderítése van folyamatban, amelyekben például kutyaszőrök szolgálhatnak helyszínek és személyek kapcsolatának feltárására.

Érthető tehát, hogy a kutyák igazságügyi célú vizsgálatának nemzetközi igénye az utóbbi két-három évben nagymértékben megnőtt (Halverson, 2005), és különös jelentőséggel bírhat az eddig felderítetlen bűncselekmények megőrzött helyszíni mintáinak újvizsgálata során. Nem feledkezhetünk meg azonban arról, hogy a törvényszéki szakértéssel – igazságügyi genetikával – szemben támasztott követelmények nemcsak humán vonatkozásban érvényesülnek. A nemzetközi elvárások olyan kutatásokat ösztönöznek, melyek megvalósításával a kutyák igazságügyi szempontú azonosítása és individualizációja standard és kompatibilis módon, egységesített nevezéktan alapján történhet meg (Hellmann, 2003, Eichmann, 2004). A terület nemzetközi tudományos jelentőségének növekedése megnyilvánul az állati anyagmaradványok törvényszéki vizsgálatára vonatkozó első ajánlás megszületésében (Budowle, 2005).

3.3.1. *Canine Genome Project*

A kutyafajták kialakulásának, kialakításának története, a tenyésztési sajátosságokban mutatkozó különbségek a házikutya fajban olyan genetikai eltéréseket hoztak létre, melyek a fenotípusos, morfológia variációk és viselkedési jellegzetességek mellett a betegségekkel kapcsolatban fennálló fogékonyságban, ellenállóképességben is megnyilvánulnak. A nagymértékű faji diverzitás közepette megjelenő fajtaspecifikus betegségek genetikai hátterének analóg modellezési lehetősége a regisztrált tenyészállatok genealógiai kórtörténetének nyomonkövethetőségével párosulva a kutyagenom vizsgálatát az intenzíven kutatott humán-, csimpánz-, egér- és patkány „*genom project*”-ek közé emelte.

A 38 autoszóma – CFA1-38 – és két ivari – CFX és Y – kromoszóma napjainkban is folyó, diagnosztikai és evolúciós szempontból egyaránt jelentős szekvencia analízise mintegy két és fél gigabázist ölel fel. A vizsgálatok a tucatnyi, mendeli öröklésű mutációs defektus kimutatása mellett az Euarchontoglires taxon genomjaiban tapasztaltnál alacsonyabb inzerció-, az egérgenomban megfigyeltél alacsonyabb deléció-, és az emberi genomban kimutatottnál alacsonyabb nukleotid szubsztitúciós rátát tártak fel, egyúttal rávilágítottak a korai domesztikáció és a jelenlegi fajták kialakítása során bekövetkezett palacknyak – *bottleneck* – hatás érvényesülésére is (Lindblad-Toh és mtsai, 2005). Összehasonlító szintenikus térképen a kutyagenom hozzávetőleg 94%-a található meg a szintenikus régiókban. A töréspontok összesített száma jóval alatta marad az egér- illetve patkánygenom értékeinek, ugyanakkor a humán genetikai vonalét a kevesebb intrakromoszómális töréspontjával együtt is meghaladja. Az egér és az ember relatív törzsfejlődési közelsége ellenére a kutya-ember vonatkozásban mintegy hatszázötven megabázissal több „ősi szekvencia” figyelhető meg, ami a kutyagenom viszonylag alacsony deléció rátájából fakadhat. A humán genomnál kb. fél gigabázissal, az egérnél kb. százötven megabázissal kisebb, de konzerválódott „ősi” – az egérnél kb. fél gigabázissal több, a humánnál kb. kétszáz megabázissal kevesebb – szekvenciális elemeket tartalmazó euchromatikus genom méretét a specifikus *repeat*-, retrovirális- és transzpozon szekvenciák alacsonyabb száma valamint a SINE szekvenciák relatív rövidsége befolyásolja. A kevés transzpozonális eredetű elem között azonban igen aktív *Carnivora*-specifikus SINE-család – SINEC_Cf (Kirkness és mtsai, 2003) – is található, melynek nem fixálódott inzerciói polimorf jellegként szegregálódhatnak. Az egyedben belüli SINE_Cf heterozigotizáció a fajták között tovább bővül (Wang, 2005), hatékonyan hozzájárulva a szelektíven tenyésztett modern kutyafajták genetikai variációjához. A két alapvető populációs *bottleneck* – kb. hétezer-ötvenezer generációval illetve ötven-száz generációval ezelőtt – egyaránt jellegzetes mintázatot generált a fajtákon belüli és fajták közötti genetikai variancia tekintetében. A SNP régiók például részben szinte teljesen homozigóta, részben – a genom jóval kisebb tartományára kiterjedő – nagyfokú heterozigotizációt mutató haplotípus blokkokban található, melyek diverzitása az egy fajtán belül tapasztaltakhoz képest a fajták között jóval kifejezettebben jut érvényre (Lindblad-Toh és mtsai, 2005). Egyedek közötti összehasonlításban a jellemzően homozigotizációt mutató régiók lokalizációja variál. Eltérő fajtáknál a viszonylag nagy kiterjedésű – 100 kilobázist meghaladó hosszúságú – haplotípusok gyakorisága is széles tartományban változó lehet, ami a genetikai rizikófaktorok fajták közötti megoszlására utal. Az átlagosan tíz kilobázis – az embernél 25 kb körüli – hosszúságú, ún. ősi blokkok négy-öt jól elkülöníthető haplotípussal rendelkeznek, a nagyobb régióra kiterjedő haplotípusok között néhány fajtára jellemző is

előfordulhat. Habár a SNP vizsgálatokat az alacsonyabb hibaráta és a költséghatékonyság az egyed azonosságának megállapítása céljából a mikroszatellitáknál vonzóbbá teheti (Weller, 2006), az igazságügyi genetika sajátosságai – pl. a vizsgálandó anyag korlátozott mennyisége, keveredése, adatbázisok – az STR markerek jelentőségét fokozzák. A szekvenciális illesztéseknek köszönhetően a korábban nem térképezett STR lókuszok – pl. PEZ20 (Neff és mtsai 1999, Halverson, 2005) – lokalizálására is lehetőség nyílt.

A *Genom project* további eredményei akár a gyorsuló evolúciós események – pl. agyfejlődéssel kapcsolatba hozható gének – interpretálásához vagy a csontváz morfológiában megfigyelhető fenotípusos variabilitás genetikai alapjának megértéséhez is elvezethetnek, ugyanakkor kiszélesítik az igazságügyi genetikai aspektusból felhasználható markerek, polimorfizmusok körét.

3.3.2. Azonosítás

A bűncselekmények helyszínén talált vérszenyeződések faji eredetének megállapítására tett kísérletek a XX. század elejéig nem igazán hoztak eredményt, hiába alapoztak olyan „szakértők” empirikus képességére, mint a francia Barruel, aki a vérsavval történő főzésének „istálló szaga” vagy éppen „izzadság szaga” alapján vélte megkülönböztetni a marhavért az emberi vértől (Thorwald, 1973). Az alakos elemek morfológiai és méretbeli különbségeit – melyek friss vér esetén is nehézkesen és gyakran pontatlanul vizsgálhatók – a hosszadalmas próbálkozások ellenére sem sikerült megbízhatóan foltokból megállapítani, de a szérumfehérjék különbségét felhasználó immunológiai módszerek viszonylag hosszú ideig jelentettek – az antiszérumok specifikációjából, standardizálásából fakadóan – többé-kevésbé megbízható megoldást. Az immunológiai specifikációból adódó hátrány az, hogy a poliklonális immunglobulinok sokszor nem fajszintű, hanem csak magasabb rendű taxonok – genus, család – azonosítását teszik lehetővé, közeli rokonságban álló fajok pedig gyakran keresztreakciót adnak. A vizsgálatokhoz alkalmazott antitestek stabilitása az idő függvényében csökken, a monoklonális immunglobulinok specifikációja a környezeti hatások által módosított epitópok esetén variál, valamint a jó minőségű, poliklonális immunglobulinok kereskedelmi elérhetősége is nehézkes.

Habár a genetikai polimorfizmusok leggyakoribb vizsgálati szubsztanciája a vér, a kutyákkal kapcsolatos kriminalisztikai esetekben leginkább szőrszálak, nyálfoltok lelhetők fel, így immunológiai, szerológiai módszerek eredményesen nem használhatók. A morfológiai analízis – szőrszín és alak – azonban igen korlátozott mértékben alkalmas azonosításra. A szőrzet manifesztálódása összetett genetikai alapon történik (Zöldág, 1996), a fenotípusból bizonytalan következtetéseket lehet levonni a genotípusra nézve.

További problémát jelent, hogy a fenti mintatípusokból az eltérő degradálódás miatt a DNS is különböző mértékben és minőségben nyerhető. Különösen lényeges ez annak a tényszerű ismeretében, hogy a helyszíneken fellelt szőrszálak túlnyomó többségükben csak a természetes vedlés során elhullajtott, telogén fázisú, gyökérhüvelyi sejteket alig illetve egyáltalán nem tartalmazó szálak.

A mitokondriális DNS alternatív vizsgálati lehetőséget jelent, mivel igazságügyi szempontból jelentős előnye, hogy minimális mennyiségű, nagymértékben degradált mintákból is kivitelezhetővé teszi a vizsgálatot. Bár a *Canis familiaris* mitokondriális DNS szekvenciája annak leírása után (Kim, 1998) is nemzetközi tudományos-szakmai érdeklődéssel bír (Wetton, 2003), a szekvencia polimorfizmusai csak kevésbé ismertek. A referencia szekvencia – *GeneBank* NC 002008 – hossza 16727 bp, ebből a 15458-16727 bp közé eső szakasz a kontroll – nem kódoló régió, „*D-loop*” – régió, ami polimorf pontokat és tandem ismétlődő szekvenciát – GTACAGTNG – is tartalmaz (Pereira, 2004). Kódoló régiójának vizsgálata nemcsak funkciós, populációs és patológiai szempontból informatív. A *cytochrome b* gén – Cytb – az oxidatív foszforilációban résztvevő III. komplex proteinjét kódolja, így központi szerepet játszik a sejt energiaellátásában. A gén kódoló szakaszának hossza fajonként kissé változó, mintegy 1400 bp, azonban a génnek csak egy jól körülhatárolt szakasza mutat fajspecifikus szekvenciákat (Kocher, 1989, Bartlett, 1992). A fajta – populációk, szubpopulációk – azonosítására a polimorf markerek segítségével különböző sikerességgel tehető kísérlet (Brinkmann és mtsai, 1998, Vila és mtsai, 1999, Zhou, 1999, Landry, 2002, Füredi, 2003). Az STR markerekkel végzett becslések (Koskinen, 2003) mellett jelentős szerephez juthatnak a még részben feltárt nukleotid – SNPs – polimorfizmusok (Brouillette és mtsai, 2000, Parker és mtsai, 2004).

3.3.3. Individualizáció

A „*DNA-fingerprint*” tudományos megalapozását Sir Alec Jeffreys és munkatársai az ember illetve kutya vonatkozásában közel egyidőben végezték (Jeffreys, 1987), de az első – szintén dinukleotid ismétlődést tartalmazó – mikroszatellita lókuszt kissé később publikálták (Ostrander, 1993). A kutya-genom mikroszatellitáit kezdetben géntérképezési szempontból humán miniszatellita-próbákkal vizsgálták (Rothuizen, 1994, Joseph, 1994). Kezdetben feltételezték, hogy a beltenyésztés redukálhatja a mikroszatelliták variációját. A térképezési programok és a PCR technika fejlődése a tetramer repetíció leírását (Francisco, 1996) követően rövid időn belül számos hasonló mikroszatellita lókuszt feltárását eredményezte, melyek segítségével elkezdődött a kutyafajták genetikai variációjának felmérése (Zajc, 1997 és 1999, Koskinen, 2000), valamint genetikai térképek publikálása (Neff és mtsai, 1999,

Mellersh és mtsai, 2000). Az STR lókuszok kapcsoltági analizisével kísérletek folynak az eddig ismeretlen genetikai hátterű betegségek diagnosztizálásában (Todhunter, 2003).

A mikroszatellita lókuszok felhasználásával 1997-ben az Egyesült Államokban – AKC és UKC – indított származásellenőrzési vizsgálatokhoz a humán törvényszéki alkalmazások példájára fejlesztett markerek (Halverson, 1999) fluoreszcens multiplex formában – StockMarks[®] márkánévvel – kerültek kereskedelmi forgalomba (PE AgGen, Inc, 1999, Applied Biosystems, 2001). A populációs vizsgálatok során a nem megfelelő fokú polimorfizmust mutató, technikai szempontból problémás lókuszok szelektálásával napjainkra olyan tetramer repetíciós STR-eszköztár van kialakulóban, amely az egyedi azonosításhoz is megfelelő lehet (DeNise, 2004, Eichmann, 2004). A megfelelő szintű polimorfizmust mutató lókuszok különböző fajtáknál eltérő mértékben nyilvánulnak meg, ami igazságügyi vonatkozásai miatt szükségszerűvé teszi a helyi fajtapopulációk vizsgálatát (Halverson, 1999, Irion, 2003).

A mtDNS kontoll-régiójának hipervariábilis szakaszai az egyedek között mutatnak nagyfokú variabilitást, így a kutyaszőrszálak származás-megállapítására is kísérlet tehető (Savolainen, 1997, Schneider, 1999, Halverson, 2005). Meg kell ugyanakkor jegyeznünk, hogy a mtDNS vizsgálatok viszonylagosan magas idő- és költségigényük mellett a haploid, nem-mendeli öröklődés valamint az alacsonyabb fokú polimorfizmus miatt jóval alacsonyabb mértékű egyedazonosítást tesznek lehetővé, mint a több lókuszos STR-profil analizisek.

Habár tudományos témaként az általános tudományos közvélemény számára is hasznos információkat közöl, a szakirodalomban napjainkig viszonylag kevés publikáció született a kutyák igazságügyi célú azonosításával kapcsolatosan (Halverson, 2005).

4. CÉLKITŰZÉSEK

A humán mikroszatellita markerek használata a törvényszéki szakértői munkában általánosnak mondható, ugyanakkor – a gyakorlatban rendszeresen előforduló, közvetve illetve közvetlenül – a *Canis familiaris* egyedeit érintő igazságügyi genetikai szakértői terület Magyarországon nem létezik, a nemzetközi szintre is kezdeti állapot jellemző. Nem állnak rendelkezésre – az emberi individualizáláshoz hasonlóan – standardizált és validált marker szelekciók, nincs egységes kódrendszer, nevezéktan, a releváns populációkra vonatkozó STR allél- és profilgyakorisági adatbázisok igenhiányosak. Munkám alapvető célja:

- a bűncselekményekkel kapcsolatba hozott illetve hozható, kutya eredetű biológiai anyagmaradványok faji eredetének megbízható azonosítása,
- az egyed azonosságának megállapításához felhasználható STR polimorfizmusok genetikai analízisének megkezdése, hitelesítése,
- konkrét eseti alkalmazásra felhasználható vizsgálati stratégia, mintabiztosítási és analitikai eljárás kidolgozása,
- magyar populációs referencia adatbázis létrehozásának megkezdése, hitelesítése,

melynek segítségével a magyarországi kriminalisztikai gyakorlatba az STR-polimorfizmus vizsgálaton alapuló kutyaazonosítás bevezetése elkezdhető, és a magyarországi törvényszéki eljárások során a DNS-eredmények bizonyító ereje statisztikailag becsülhető.

4.1. A faj azonosítása

A törvényszéki gyakorlatban nem mindig szükséges az individualizáció, adott esetben elegendő az azonosítás is. Néha szakértői szempontból is fontos lehet – pl. negatív eredmény kontrolljaként – a minta DNS faji eredetének tisztázása.

Céljaim közt szerepelt a minta *Canidae sp.* eredetének meghatározása a homológ *cytochrome b* (Cytb) gén fajok között leginkább változatos szekvenciát mutató szakaszának – 14816-15173 pozíció (Anderson, 1981) – szekvencia analízisével (Parson, 2000, Egyed, 2003, Branicki, 2003), három különböző primer-pár alkalmazásával.

4.2. *Canine* specifikus STR markerek vizsgálata magyarországi populációban

A vizsgálatokat olyan STR polimorfizmusok analízisével szándékoztam elkezdni és lefolytatni, amelyek ugyan származás ellenőrzés céljából már alkalmazásba kerültek (AKC, 1996), de igazságügyi célú alkalmazhatóságukat korábban még nem tesztelték le. A lókuszok referencia szekvenciái csak kis részben és nem teljesen pontosan voltak ismertek, a kereskedelmi forgalomba került – gyártói standardizálással és minőségellenőrzéssel már rendelkező – StockMarks® Canine I Ver3 (Applied Biosystems, 2001) vizsgáló reagensek a belső méretstandardon kívül nem tartalmaz-

tak sem az allélok pontos azonosításához, sem pedig összehasonlításához szükséges allélokotélokot illetve referencia allélt.

Célom a Magyarországon eddig nem alkalmazott mikroszatellita markerek vizsgálata annak tükrében, hogy a beszerezhető multiplex PCR segítségével felsokszorozható lókusok magyarországi kutyapopulációban megnyilvánuló polimorfizmusa elegendő mértékű-e a hazai törvényszéki alkalmazáshoz.

4.2.1. Minták és markerek

Mivel a munka alapvetően igazságügyi, kriminalisztikai jellegű, a mintáknak alapvetően két szempontnak kell megfelelniük. Egyrészt reprezentálniuk kell az azonosítás megkövetelte heterogenitást, másrészt biztosítani kell származás megállapítás genetikai teszteléséhez szükséges statisztikai jellemezhetőséget.

Célom részben 10-10 többféle, kriminalisztikai szempontból számításba vehető mintatípus – pl. vérminta, nyálminta, szőrminta, ondóminta – egyedtől független gyűjtése, részben a minél nagyobb számú és minél több fajta nem rokon egyedeitől származó random mintagyűjtés volt. A minták polimorfizmusát 10 lókuszon terveztem megvizsgálni.

4.2.2. A detektált tulajdonságok azonosítása, elnevezése, a lókusok jellemzése

Az igazságügyi genetikai vizsgálatok egyik alapkövetelménye a genotípus pontos definiálása (Bär és mtsai, 1997; Olaisen és mtsai, 1998 Gill és mtsai, 2001). A nevezéktanhoz és a tipizáláshoz a már publikált, illetve a nyilvános adatbázisba először bejegyzett, 5'-3' irányban leolvasott szekvenciát kell felhasználni, és amennyiben lehetséges, egységes D#S# rendszer szerint katalogizáljuk.

Az elnevezés a teljes ismétlődési egységek – *repeats* – száma szerint történik, az allélokot a repeat-régióban található variáns és nem-variáns ismétlődési egységek együttes számának alapján kell elnevezni. Ha a szekvencia egy nem teljes repeatet is tartalmaz, a teljes egységek száma után egy ponttal elválasztva kell feltüntetni a hiányos repeat meglévő bázisainak számát. A „*flanking*” – határoló – régiók inszerciós vagy deléciós mutációjából fakadó köztes allélokot „+” illetve „-” jellel ajánlott jelölni, ahol a „+” jel inszercióra, a „-” pedig delécióra utal. A komplex, hipervariábilis STR-ek esetében, az elnevezés nehézkes és bonyolult lehet, a már elnevezetteket alapul véve kell kapcsolatot keresni az allélok hosszúsága között.

Célom az volt, hogy a repeat-struktúra és a pontos allélmeghatározás esetleges problémái alapján felmérjem az adott lókusok jellegzetességeit, melyek igazságügyi alkalmazásukra hatással lehetnek.

4.2.3. Alléllétrák készítése, a méretstandard kiválasztása

Az allélok pontos meghatározása az STR markerek esetében ún. referencia-allélok segítségével történik, melyek adott lókuszon kimutatható típusainak keverékét – alléllétra, allélkóktél – használjuk. Amennyiben egy ismeretlen allél egyetlen referencia-allélnak sem felel meg, azt szekvenálással kell jellemezni. Nyilvánvaló, hogy a detektált allélok méretkülönbözősége nem fakadhat genetikai analízis során alkalmazott elektroforetikus rendszerek allélméret-meghatározási precizitásából, melyet a kivitelező laboratóriumoknak biztosítaniuk kell (NRC, 1997).

Céljaim között szerepelt, hogy az esetlegesen komplex motívumokat is tartalmazó lókuszok méret meghatározását nemcsak az adott, hanem alternatív belső méretstandardok segítségével is elvégezzem, melyek közül az összehasonlítás alapján a legmegfelelőbbet választom ki.

4.2.4. A félautomata kiértékelés

A sok analízis sok eredménnyel, adattal jár. A több lókuszra kiterjedő genetikai profil kiértékelése, kezelése, az eredmények átvezetése mindig magában hordozza a kiértékelő, adatkezelő személy manualitásának hibalehetőségét.

Céljaim között szerepelt, hogy a konstruált alléllétrák segítségével a genetikai profilok kiértékelését segítő számítógépes alkalmazást (Fantin, 1996) úgy módosítsam, hogy az a potenciális adatbázis létrehozásakor megfelelő segítséget tudjon biztosítani.

4.3. Populáció-statisztikai értékelés

A populációs felmérések az igazságügyi hitelesítés részét képezik. Allélgyakorisági adatok nélkül megfelelő statisztikai interpretáció nem lehetséges. A szakmai ajánlásoknak megfelelően a populációs mintáknak lehetőség szerint minél jobban reprezentálnia kell a genetikai összetételt, különös tekintettel azokra a populációkra, melyek szeparáltabb közösségeket alkotnak (Council of Europe, 1993, NRC, 1997). A tiszta fajták genetikai értelemben külön populációkat alkotnak, melyekben a tenyésztési stratégiák eltéréseket hozhattak – hozhatnak– létre. Ez megnyilvánulhat adott lókuszok polimorfizmusában, ami felhasználhatóságukat befolyásolhatja. A fajták és a populációk összehasonlítását az egyediség mértékének pontosabb kalkulációja miatt célszerű megtenni, hiszen eltérések ebből a szempontból is feltételezhetők.

4.3.1. Allélgyakoriságok meghatározása

Az analízis eredményeinek ismeretében megállapítható, hogy az adott lókuszok egyes alléljai milyen gyakorisággal fordulnak elő a populációban, melyekből több paraméter – heterozigotizáció, kizárási erő – meghatározható.

4.3.2. Hardy–Weinberg és *linkage* egyensúly tesztelése

A minta származásának megállapításához szükséges statisztikai elem a DNS-profilok egyezési valószínűségének meghatározása, ami abban az esetben kalkulálható korrekt módon, ha a DNS-profilokat alkotó allélok között nincs számottevő asszociáció (Evett és Weir, 1998). A Hardy–Weinberg és *linkage* egyensúlyi teszteléssel válasz adható arra a kérdésre, hogy az autoszómás STR-ek vonatkozásában az adott populációban van-e jelentős mértékű allélikus asszociáció a lókuszok között illetve a lókuszokon belül.

4.3.3. A genetikai strukturáltság megállapítása

Jellemezni kívánom populációstatisztikai tesztek – G-statisztika, F-statisztika, AMOVA – segítségével a felmért populációk genetikai diverzitását, strukturáltságát.

4.4. Mintatípusok és a DNS extrakció vizsgálata

A kutyákkal kapcsolatos kriminalisztikai esetekben a vér mellett szőrszálak, nyálfoltok illetve gyakorta ezek keveredése jelenthetik a keresett kiindulási mintatípust. Abszurditása ellenére – az élet és a kriminalisztika produkált már ilyen – kutyaonddal keveredett emberi váladék is előfordulhat. Ezekből a DNS különböző mértékben és minőségben nyerhető, ami az extrakciós protokollok módosítását is jelentheti.

Célom a kriminalisztikai szempontból jelentős, kutyáktól származó különféle biológiai anyagmaradványokból történő DNS extrakció lehetőségének vizsgálata, a különböző mintatípusok kivitelezhetőség illetve egyszerűség szempontjából történő mérlegelése az esetleges összehasonlításhoz szükséges mintavételi eljárásra vonatkozóan.

4.5. A PCR reakció érzékenyítése, *monoplex screening*

A kriminalisztikai célú vizsgálatok korlátozott kiindulási anyagmennyisége igényli az érzékeny módszereket. A leszármazási – alomellenőrzési – célból alkalmazott eljárásoknál ez a szempont nem tekinthető elvárásnak, így célszerű annak ismerete is, hogy az adott, standardizált PCR reakció templát igénye milyen határok között használható.

Az eseti alkalmazás érdekében célom az, hogy monoplex formában olyan PCR reakciót lehessen alkalmazni, melynek érzékenységi határértéke legalább 0,2-0,5 ng, ugyanakkor kevert faji eredetű – kutya / ember – minták vizsgálatánál is sikeresen alkalmazható.

4.6. Eseti alkalmazás

Évenként rendszeresen előfordult néhány olyan ügy, melyben kutyák okoznak súlyos, olykor halált okozó sérüléseket. A bizonyítási eljárás során nem volt minden esetben tisztázható, mely állat/ok okozták a sérüléseket, melyik gazdának kell a felelősséget vállalnia. Napjainkra az állatvédelmi törvény is kiszélesítette azt az igényt, mely a kutyák azonosítását igényli, és további érdeklődésre tarthat számot a nyomszegény professzionális bűncselekmények nyomozásánál.

Céлом, hogy munkámmal a szakértői segítség lehetőségét kiszélesítsem, és a módszer biztosította előnyöket a tenyésztés mellett – leszármazási vonalak, alomellenőrzés –hasznosíthatóvá tegyem.

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1. Minták és populációk

A vizsgálatokhoz felhasznált vérminták túlnyomó többsége a SZIE ÁOTK klinikai anyagából származik. Nyál- és szőrminták kiegészítő mintavételére kiállításokon, néhány vérminta és izomszövet minta vételére állományfelmérés esetében került sor.

A populációs vizsgálatokhoz felhasznált, különböző egyedektől származó minták száma 673 db volt. Ezek közül 614 egyed 79 azonosítható fajtába vagy fajtaváltozatba – pl. schnauzer, tacsó, uszár – sorolható, 59 egyed mintája fajtaazonosító adatokat nem tartalmazott. A vérminták mellett 49 db nyálminta, 15 db szőrminta, 13 db fagyasztott spermaminta és 6 db fagyasztott izomszövet minta vizsgálata történt meg (**F1. táblázat**).

A *cytochrome b* vizsgálatok vérből és szőrszálakból történtek. Fajták közötti esetleges szekvenciális különbségek vizsgálatához német juhász és rottweiler fajták 22-22 egyedének vérmintájából extrahált DNS szolgált.

Származás ellenőrző vizsgálatokhoz vér- és szőrmintákat biztosítottunk, az igazságügyi célú vizsgálatok eseti mintákból – vér-, nyál-, szőrminta, vérrel keveredett nyálszennyeződés, biológiai szövetmaradványok – történtek.

5.2. A DNS kinyerése

A friss, nem hemolizált folyékony vérminták esetében a DNS feltárása a limfociták sejtmagjainak szukróz ozmózisos sokkal történő feldúsítását (Kanter és mtsai, 1986) követő proteolitikus sejtlízis (proteináz K), szerves extrakció (fenol-kloroform-izoamilalkohol) és ultraszűrés-koncentráció (Microcon-100, Amicon, Millipore) segítségével történt.

A hemolizált folyékony vérminták illetve vér-, nyál- és ondófolatok esetében a DNS feltárása detergens tartalmú extrakciós pufferben történő proteolitikus sejtlízis (proteináz K), szerves extrakció (fenol-kloroform-izoamilalkohol) és ultraszűrés-koncentráció (Microcon-100, Amicon, Millipore) segítségével történt (Comey és mtsai, 1994).

A szőrminták nukleáris DNS tartalmának feltárása a mikroszkópos vizsgálattal szelektált szőrszálak gyökérhüvelyi sejttömeget tartalmazó 0,5-1 cm-es tövi részének detergens tartalmú extrakciós pufferben történő proteolitikus sejtlízisével, szerves extrakciójával és ultraszűrés-koncentrációjával történt (Comey és mtsai, 1994).

Vérrel keveredett nyálszennyeződések extrakciója módosított (Pádár és mtsai, 1999) differenciált lízissel (Gill és mtsai, 1985, FBI, 1994) történt.

A minták DNS-tartalmának szemikvantitatív meghatározása etídium-bromid fluorofór festés és agaróz gélelektroforézis alkalmazásával történt.

A szőrminták mitokondriális DNS tartalmának feltárása a szőrszálak gyökérhüvelyi sejtállományt nem tartalmazó 1-1,5 cm-es száli részének detergens tartalmú extrakciós puffer-ben történő proteolitikus sejtlyízisével, szerves extrakciójával és ultraszűrés-koncentráálásával (Centricon-Amicon, Millipore) történt (Wilson és mtsai, 1995, AFDIL, 1999).

5.3. A vizsgálandó szakaszok felsokszorozása

A tíz autoszómás STR valamint a *cytochrome b* génszakasz (1. táblázat) amplifikálása GeneAmp PCR System 2400 berendezéssel történt.

1. táblázat Alkalmazott lókuszok és azonosító adataik

Marker	Primer	Primer szekvencia (5'–3')	Lok.	Ref.
CATA ₁	CATA ₁ F	GGCTGTCACCTTTTCCCTTTC	CFA 7	<i>Primmer</i>
	CATA ₁ R	CACCACAATCTCTCTCATAAATAC		
FH2054	FH2054 F	GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG	CFA 12	<i>Francisco</i>
	FH2054 R	ATGCTGAGTTTTGAACTTTCCC		
FH2010	FH2010 F	AAATGGAACAGTTGAGCATGC	CFA 24	<i>Francisco</i>
	FH2010 R	CCCCTTACAGCTTCATTTTCC		
PEZ5	PEZ5 F	GCTATCTTGTTTCCCACAGC	CFA 12	<i>Halverson</i>
	PEZ5 R	GTCAGTGTATAACAACATTGTC		
PEZ20	PEZ20 F	CCTAAATTAGAGGTCTAACC	CFA 22	<i>Halverson</i>
	PEZ20 R	GTAAGCGGGAATGTGCTCCTC		
PEZ12	PEZ12 F	GTAGATTAGATCTCAGGCAG	CFA 3	<i>Halverson</i>
	PEZ12 R	GTAGGTCCTGGTAGGGTGTGG		
PEZ3	PEZ3 F	CACTTCTCATACCCAGACTC	CFA 19	<i>Halverson</i>
	PEZ3 R	CAATATGTCAACTATACTTC		
PEZ6	PEZ6 F	ATGAGCACTGGGTGTTATAC	CFA 27	<i>Halverson</i>
	PEZ6 R	ACACAATTGCATTGTCAAAC		
PEZ8	PEZ8 F	TATCGACTTTATCACTGTGG	CFA 17	<i>Halverson</i>
	PEZ8 R	ATGGAGCCTCATGTCTCATC		
FH2079	FH2079 F	CAGCCGAGCACATGGTTT	CFA 24	<i>Francisco</i>
	FH2079 R	ATTGATTCTGATATGCCAGC		
Cyt(b)	Cyt(b) F1	CCATCCAACATCTC(A/T)(T/G)C(A/C/T)TGATGAAA		<i>Egyed</i>
	Cyt(b) R1	GCCCCTCA(A/G)AATGATATTTGTCCTC		
Cyt(b)	Cyt(b) F2	CCATCCAACATCTCCGCATGATGAAA		<i>Bartlett</i>
	Cyt(b) R2	CCCCTCAGAATGATATTTGGCCTCA		
Cyt(b)	Cyt(b) F3	CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA		<i>Parson</i>
	Cyt(b) R3	CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA		

5.3.1. A *cytochrome b* génszakasz vizsgálata

A PCR reakció-mix mindhárom primer-pár

- v1: degenerált primerek (Egyed, 2003),
- v2: Anderson szekvenciára (Cambridge referencia szekvencia, CRS) illesztett primerek (Bartlett, 1992),
- v3: Anderson szekvenciára illesztett módosított primerek (Parson, 2000)

(1. táblázat) esetében a következő volt:

BSA (2 mg/ml)	: 2 μ l	80 pg/ μ l
10 \times PCR Buffer II	: 5 μ l	1 \times
MgCl ₂ (25 mM)	: 5 μ l	2.5 mM
Primer Mix (10 pM)	: 4 μ l	0.4 pM
dNTPs (10 mM)	: 5 μ l	1 mM
<u>TaqGold (5 U/μl)</u>	<u>: 1 μl</u>	5 U
Σ	22 μ l	
DNS templát	:	20 pg-2 ng
<u>+ steril UP</u>	<u>: 28 μl</u>	
Σ	50 μ l	

Az alábbi PCR-programverziók (GeneAmp PCR System 2400) kerültek alkalmazásra:

v1: 95°C 10 perc, (94°C 1 perc, 59°C 1 perc, 72°C 1 perc) \times 30, 72°C 10 perc

v2: 95°C 11 perc, (94°C 30 mp, 50°C 45 mp, 72°C 45 mp) \times 30, 72°C 10 perc (Parson, 2000)

v3: 95°C 10 perc, (94°C 30 mp, 58°C 30 mp, 72°C 1 perc) \times 15, (94°C 30 mp, 55°C 30 mp, 72°C 1 perc) \times 20, 72°C 10 perc

A primer- és a PCR-verziók tesztelése a következő csoportosításban történt:

v1-v1, v2-v1, v3-v2, v1-v3, v2-v3, v3-v3.

5.3.2. Az STR lókuszok vizsgálata

A 10 STR lókusz multiplex amplifikálása StockMarks[®] Canine I Ver 3 kittel, a standard protokoll szerint történt (Applied Biosystems, 2001).

Az amplifikálás hatékonyságának ellenőrzése, és a fragmensek szeparálása natív, horizontális, diszkontinuus poliakrilamid gélelektroforézis (nhd-PAGE) ezüstfestéses detektálásával történt (Budowle, 1991).

5.4. A cytochrome b génszakasz szekvencia analízise

A sokszorozott fragmensek tisztítása és koncentrációja (Centricon-100, Amicon, Millipore) során nyert termékek szekvenálása standard protokoll szerint BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit felhasználásával (Applied Biosystems, 2003), a szekvenált termékek tisztítása Centri-Sep (Princeton Separations, 2004) oszlopon, az elválasztás ABI Prism® 310 genetikai analízáló készüléken (Applied Biosystems), a szekvenciák szerkesztése és illesztése a Sequencing Analysis Software 3.4.1 (Applied Biosystems) és Sequencher™ 4.1.2 (Gene Codes Corp.) komputerprogramok segítségével történt. A kapott szekvencia eredményeket az Interneten elérhető génbank szekvenciákhoz (GenBank, 2005) hasonlítottam a BLAST program (Altschul, 1997) segítségével. Referencia szekvenciaként a *Canis familiaris* mitokondriális szekvencia (16727 bp, GenBank) 14183-15322 pozíció illetve a *Homo sapiens* mitokondriális szekvencia – *Cambridge Reference Sequence* (CRS), Anderson szekvencia – (16735 bp, GenBank) szolgált.

5.5. Az STR fragmensek genotipizálása

Az STR lókuszek PCR-fragmenseinek analíziséhez a felsokszorozott DNS-szakaszok méret szerinti elválasztására – elektroforézis –, az elválasztott PCR-termék detektálására – festés, jelölés – és az adott allél típusának meghatározására van szükség. Az alléltípusok meghatározása referencia-allélokból összeállított „koktél”, ún. alléllétra segítségével történik.

5.5.1. Alléllétrák készítése

Mivel a tipizáláshoz szükséges alléllétrákat a PCR kitek nem biztosították, azokat szekvencia vizsgálatokkal igazolt, ismert genotípusú egyedek DNS-mintájának koamplifikálásával valamint a PCR-termékek reamplifikálásával kellett előállítani.

5.5.1.1. Fragmensek elválasztása, detektálása, szelektálása

A multiplex formában sokszorozott fragmensek kapilláris elektroforézissel történő elválasztását ABI Prism® 310 genetikai analízátor, a négy fluorofórral jelölt primerek lézergérsztett detektálását GeneScan® 3.1.2 szoftver (Applied Biosystems) tette lehetővé. Esetünkben a fragmensméretek meghatározása – *allele sizing* – és a különböző injektálások miatt fellépő különbség – *mobility shift* – a mintákhoz kevert belső méretstandardok alapján kalkulált. A potenciális allélként amplifikálódott fragmensek csoportosítására méretük alapján került sor.

5.5.1.1.1. Belső méretstandard kiválasztása

Az STR lókuszok hosszpolimorfizmusának meghatározása gyakorlatilag a fragmensméretre vonatkozó adatok alléltípusként való megfeleltetésével történik. A méret meghatározás alapjául szolgáló belső méretstandardok különbségei eltérő mértékű és precizitású méretezést tesznek lehetővé. Fentiek figyelembe vételével a fragmensanalízis tesztelésére négy, kereskedelmi forgalomban beszerezhető fluoreszcens méretstandard – GeneScan™-500 ROX™ és GENESCAN® 400HD [ROX] (Applied Biosystems) valamint Fluorescent Ladder (CXR), 60-400 Bases és Internal Lane Standard 600 (Promega Corp) – felhasználásával került sor. Az amplifikált fragmensek méret szerinti csoportosítása a kiválasztott standard alapján történt.

5.5.1.2. A kiválasztott fragmensek szekvencia analízise

Mivel a méretbeli eltérések önmagukban nem elégségesek az alléltípusok meghatározására szolgáló referencia allélok jellemzéséhez, a méret alapján elkülönülő csoportokból a szekvenciális különbségek megfelelő reprezentálására – a ritkán megfigyelt fragmenseket kivéve, lehetőség szerint – legalább 4-4 különböző mintát választottam.

5.5.1.2.1. A fragmensek monoplex felsokszorozása, klónozása

A lókuszok monoplex PCR vizsgálata az alábbi reakció-mix használatával történt:

10×PCR Buffer II	:	5 µl	1×
MgCl ₂ (25 mM)	:	5 µl	2,5 mM
Primer Mix (10 pM)	:	4 µl	0,4 pM
dNTPs (10 mM)	:	4 µl	800 µM
<u>TaqGold (5 U/µl)</u>	:	<u>1 µl</u>	5 U
Σ		19 µl	
DNS templát	:		1 ng-10 ng
<u>+ steril UP</u>	:	<u>31 µl</u>	
Σ		50 µl	

Az alkalmazott PCR-program:

95°C 11 perc, (94°C 30 mp, 56°C 30 mp, 72°C 30 mp) × 30,
72°C 30 perc.

Az amplifikálás hatékonyságának ellenőrzését, a fragmensek szeparálását (nhd-PAGE) és detektálását (ezüstfestés) a termékek gélből történő tisztítása és reamplifikálása követte. Az alkalmazott PCR-program:

95 °C 11 perc, (94 °C 30 mp, 56 °C 30 mp, 72 °C 30 mp) × 28, 72 °C 30 perc.

Az allélok reamplifikálását standard protokoll szerinti klónozás – TOPO TA Cloning[®] Kit, (Invitrogen, 2004) – követte.

A plazmidok izolálása két módszerrel történt:

1./ A leválasztott telepek szuszpendálása és lízise utáni reamplifikáláshoz alkalmazott PCR-mix és PCR-program az adekvát primer párokkal az alábbi volt:

10×PCR Buffer II	:	5 µl	1×
MgCl ₂ (25 mM)	:	5 µl	2,5 mM
Primer Mix (10 pM)	:	4 µl	0,4 pM
dNTPs (10 mM)	:	4 µl	800 µM
<u>TaqGold (5 U/µl)</u>	:	<u>1 µl</u>	5 U

Σ 19 µl

Plazmid DNS : 5 µl

+ steril UP : 26 µl

Σ 50 µl

95°C 11 perc, (94°C 30 mp, 56°C 30 mp, 72°C 30 mp) × 28,
72°C 45 perc

M13 primer párral:

10×PCR Buffer II	:	2,5 µl	1×
MgCl ₂ (25 mM)	:	1,5 µl	1,5 mM
Primer Mix (10 pM)	:	2 µl	0,4 pM
dNTPs (10 mM)	:	0,5 µl	200 µM
<u>TaqGold (5 U/µl)</u>	:	<u>0,2 µl</u>	1 U

Σ 6,7 µl

Plazmid DNS : 5 µl

+ steril UP : 13,3 µl

Σ 25 µl

95°C 11 perc, (94°C 30 mp, 56°C 30 mp, 72°C 30 mp) × 30,
72°C 7 perc

A PCR termékek tisztítása Centricon-100 (Amicon, Millipore) ultraszűrő membrán segítségével történt.

2./ ABI PRISM™ Miniprep kittel, standard protokoll szerint (Applied Biosystems, 2000) kivitelezve.

5.5.1.2.2. Klónok szekvenálása, a szekvenciák összehasonlítása

A lókuszek adekvát primereivel illetve M13 primerekkel a szekvenálás standard protokoll szerint BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit és BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit felhasználásával (Applied Biosystems, 2003), a szekvenált termékek tisztítása Centri-Sep (Princeton Separations, 2004) oszlopon, az elválasztás ABI Prism® 310 genetikai analizáló készüléken (Applied Biosystems), a szekvenciák szerkesztése és illesztése a Sequencing Analysis Software 3.4.1 (Applied Biosystems) és Sequencher™ 4.1.2 (Gene Codes Corp.) komputerprogramok segítségével történt. A kapott szekvencia eredményeket az Interneten elérhető génbank szekvenciákhoz (GenBank, 2005) hasonlítottam a BLAST program (Altschul, 1997) segítségével.

5.5.1.3. A repetíciós struktúrák megállapítása, elnevezése

A szekvenciális adatok alapján az ismétlődő egységek számán alapuló, egyértelmű megkülönböztetést és verifikálást lehetővé tevő allélszignálást a nemzetközi ajánlásoknak (Gill és mtsai, 1994, Bär és mtsai, 1997; Gill és mtsai, 1997, Olaisen és mtsai, 1998, Gill és mtsai, 2001, Budowle és mtsai, 2005) megfelelően kell kialakítani.

5.5.1.4. Allélokotélok készítése, reamplifikálása

A létrafokokként szolgáló fragmensek monoplex – esetenként együttes (ko-) – amplifikálással, esetenként gélből történő szeparálással és reamplifikálással nyerhetők.

A kevesebb létrafokot (< 10) tartalmazó egyszerű ismétlődések esetében a kívánt arányú keverékek Centricon-100 (Amicon, Millipore) ultraszűrő membrán segítségével történt tisztítását követően a koktélok reamplifikálása az adekvát primer párokkal az alábbi PCR-mix és PCR-program használatával került kivitelezésre:

10×PCR Buffer II	:	5 µl	1 ×
MgCl ₂ (25 mM)	:	5 µl	2,5 mM
Primer Mix (10 pM)	:	4 µl	0,4 pM
dNTPs (10 mM)	:	4 µl	800 µM

<u>TaqGold (5 U/μl)</u>	:	<u>1 μl</u>	5 U
Σ		19 μl	
Tisztított koktél	:	1 μl	
<u>+ steril UP</u>	:	<u>30 μl</u>	
Σ		50 μl	

95°C 11 perc, (94°C 30 mp, 56°C 30 mp, 72°C 30 mp) × 16,
72°C 45 perc

A több létrafokot illetve interallélokat tartalmazó koktélok összeállításakor az egyes amplifikált fokok tisztítás utáni (Centricon-100) mennyiségét célszerű a keverék összeállítása előtt a detektáló berendezésen (ABI Prism[®] 310) ellenőrizni, és a keverési arányokat az RFU értékek alapján beállítani.

5.5.2. Az allélméreték meghatározási pontosságának összehasonlítása

A detektálás szoftveres (GeneScan[®] 3.1.2) allélméret-meghatározásának pontossága az allékoktélók esetében három fluoreszcens méretstandard – GeneScan[™]-500 ROX[™] és GENESCAN[®] 400HD [ROX] (Applied Biosystems) valamint Internal Lane Standard 600 (Promega Corp) – felhasználásával lett tesztelve. Az alléllétrák egyes alléljaira vonatkozó számított átlagméretek és szórás értékek (SD) elemzése 20-20 egymást követő injektálás adatai alapján történt.

5.5.3. A tipizáló szoftver átalakítása

A GeneScan[®] 3.1.2 szoftver alléllétrához kevert belső méretstandardok segítségével meghatározott – *allele sizing* – méreteit felhasználva az allélok típusának szemiautomata meghatározása – a ti. genotipizálás – Genotyper[®] 2.5.2 szoftverrel (Applied Biosystems) történt. Mivel a program a referencia alléllétra és a minta méretének összehasonlítása útján tipizálja – *allele calling* – a fragmenseket, a tipizáló makrókat az alkalmazott belső méretstandarddal számított átlagméretek és szórás értékek alapján kell megírni.

5.6. A minták genotipizálása

A populációs minták genotipizálása a Genotyper[®] 2.5.2 szoftverrel és a szekvenált allélokból előállított alléllétrák felhasználásával történt.

5.7. Populáció- és genetikai statisztikai analízisek

A statisztikai vizsgálatok céljára – figyelembe véve a potenciális eseti érintettséget, a hiányos azonosító adatokat, a rendelkezésre álló mintaszámot valamint a fajta- illetve fajtacsoport jellegét – a mintákból hat csoportot alakítottam ki (**2. táblázat**).

2. táblázat Az analizált fajta- és fajtacsoport populációk valamint mintaszámuk

Jelölés	Fajta / Csoport	Mintaszám
POP 1 (P1)	Német juhászkutya	80
POP 2 (P2)	Rottweiler	40
POP 3 (P3)	Schnauzer	39
POP 4 (P4)	Tacskó	41
POP A1 (PA1)	min. 79	673
POP A2 (PA2)	min. 75 – kivéve P1-P4	473

A polimorfizmusok populációgenetikai szempontból számos értékkel jellemezhetők. Az általam alkalmazott eljárások csak néhány, igazságügyi relevanciával is rendelkező érték vizsgálatára korlátozódtak.

5.7.1. Populáción belüli elemzések

Annak eldöntéséhez, hogy a rendezésre álló minták milyen mértékben reprezentálják az adott populáció/ka/t, valamint annak érdekében, hogy a törvényszéki gyakorlat igényelte válaszok a származás-leszármazás vonatkozásában hitelesen legyenek közölhetők, a kérdéses mintacsoportok tényleges szaporodásközösségként történő kezelése és elemzése szükséges.

5.7.1.1. Populációgenetikai alapértékek

Az adott lókuszon megfigyelhető allélgyakoriságok ismeretében a következő értékeket számítottam ki:

H(obs) – *Observed Heterozigosity* – a populációs mintában az adott lókuszon ténylegesen megfigyelt heterozigóták aránya.

H(exp) – *Expected Heterozigosity* – a populációs mintában megfigyelt allélszámból kalkulált heterozigóták várt aránya.

$H_{\text{exp}} = 1 - \sum p_i^2 \times \frac{n}{n-1}$, ahol p_i a megfigyelt allélok gyakorisága, n pedig a vizsgált kromoszómák száma

PD – *Power of Discrimination* – az igazságügyi genetikában annak kifejezése, hogy a populációból két egyedet véletlenszerűen kiválasztva mekkora az átlagos valószínűsége annak, hogy a két egyed a vizsgált lókuszon eltérő genotípust mutat.

$$PD = 1 - \sum p_i^2, \text{ ahol } p_i \text{ a megfigyelt allélok gyakorisága}$$

$$\text{több lókuszra kombinálva } PD_{komb} = 1 - \prod (1 - PD_i)$$

PE – *Power of Exclusion* – az igazságügyi genetikában annak kifejezése, hogy a populációból egy egyedet véletlenszerűen kiválasztva mekkora az átlagos valószínűsége annak, hogy az egy szülő-utód relációból mint másik lehetséges szülő kizárható.

$$PE = 2\left(\sum p_i^2\right)^2 - \sum p_i^4, \text{ ahol } p_i \text{ a megfigyelt allélok gyakorisága}$$

$$\text{több lókuszra kombinálva } PE_{komb} = 1 - \prod (1 - PE_i)$$

PIC – *polimorfizmus információ tartalom*

$$PIC = 1 - \sum p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

5.7.1.2. Hardy-Weinberg (HWE) egyensúly tesztelése

Az allélok lókuszon belüli függetlenségének vizsgálata, a Hardy-Weinberg egyensúly megléte exact-teszttel (Guo, 1992), az Arlequin ver.2000 szoftver (Schneider, 2000) használatával történt. A teszt alkalmazott paraméterei a következők voltak: Markov-lánc lépés-száma: 1.000.000, dememorizáció lépés-száma: 1000.

5.7.1.3. A linkage disequilibrium (LD) tesztelése

Az allélok lókuszok közötti függetlensége illetve lehetséges asszociációja, a linkage disequilibrium vizsgálata permutációs valószínűségi hányados teszteléssel (Slatkin, 1996), az Arlequin ver.2001 szoftver (Schneider, 2000) használatával történt. A teszt lókuszpárokra alkalmazott paraméterei a következők: permutációk száma: 10000, kezdeti feltételek száma: 10.

5.7.2. Populációk összehasonlító elemzése

A származási valószínűség megállapításához annak vizsgálata, hogy referencia adatbázisként a rendelkezésre álló populációs minták mindegyike illetve valamelyike általános módon felhasználható-e, a populációk összehasonlító elemzése szükséges.

5.7.2.1. Populáció párok vizsgálata G-statisztikával

A homogenitás statisztikai szignifikanciájának tesztelése RXC szoftverrel (Carmody, G., Carleton University, Ottawa, CDN) történt. A program kontingencia táblázatok statisztikai szignifikanciáját teszteli úgy, hogy a megfigyeléseket tartalmazó táblázatból véletlenszerűen replikált új táblázatok G-statisztika értékeit összeveti az eredeti táblázat hasonló értékeivel. Amennyiben a random táblázatok értékének csak kis hányada (P) haladja meg az eredeti táblázat hasonló értékét, az adatok homogenitása nem megfelelő, így a populációk – az adott (általában 5%) szignifikancia szint – mellett szignifikánsan különbözöként értékelhetők.

5.7.2.2. F-statisztika és AMOVA

A populációk genetikai strukturáltságának vizsgálatához, a genetikai profilok populációk közötti variabilitásának kalkulálásához a GDA v.1.1 – *Genetic Data Analysis* – szoftver (Lewis, 2001) és Arlequin ver.2001 szoftver alkalmazásával Wright-féle F-statisztika analízist – F_{ST} , F_{IT} , F_{IS} – és molekuláris variancia analízist – AMOVA – (Weir, 1984; Michalakis, 1996) is felhasználtam. Az F-statisztikával lókuszonként és populációpáronként kapott F_{ST} értékek kifejezik, hogy a populációpárokban megfigyelt genetikai profilok eltérése alapján a totális genetikai variancia mekkora része tulajdonítható a populációk közötti varianciának. Az AMOVA elemzése során kapott Φ_{ST} – R_{ST} – érték, a Wright-féle F_{ST} érték molekuláris analógjaként az eltérő genotípusokat elválasztó molekuláris távolságok becslésével teszteli a populációkban előforduló genotípusok totális molekuláris varianciát arra nézve, hogy annak mekkora része tulajdonítható a populációk közötti varianciának. Az Arlequin szoftver F_{ST} értékekre és azok szignifikanciájára irányuló tesztjének populáció-párokra alkalmazott permutáció száma 100000, az AMOVA R_{ST} – Φ_{ST} – értékeire irányuló tesztjének permutáció száma 10000 volt. Az egyes populációs minták lókuszonkénti statisztikai analízise kiterjedt a heterozigotizáció veszteségen alapuló fixációs index – beltenyészettségi koefficiens –

$$F = 1 - \frac{H_{obs}}{H_{exp}}$$

kalkulációjára is.

5.8. Vizsgálatok az eseti alkalmazás szempontjából

A törvényszéki vizsgálatok természetéből adódóan az eseti alkalmazhatóságot többek között nagymértékben befolyásol/hat/ják a mintatípusok, azok keveredése valamint a vizsgálati – kimutathatósági – érzékenység.

5.8.1. Eltérő mintatípusok vizsgálata

A StockMarks® Canine I Ver 3 kit teszteléséhez vér-, nyál-, szőr-, sperma- és izomszövet mintákat használtam. A vizsgálatok kivitelezésére – lehetőség szerint – a kit standard protokolljának megfelelően került sor, azonban egyes szőrminták – jellegükből fakadóan – az optimális amplifikáláshoz szükséges nukleáris DNS mennyiséget nem érték el.

5.8.2. A PCR reakció érzékenysége

A multiplex kit standard protokoll szerinti 10-100 ng templát igényét az igazságügyi gyakorlat tipikus mintái igen ritkán tudják kielégíteni. A multiplex kit illetve a monoplex formában sokszorozott lókuszek – köztük a három rövid lókuszek PEZ1, PEZ5, PEZ3 – tesztelése 0,05-0,5 ng templát-tartományban történt. A PCR kondíciók a multiplex esetében a standard protokollnak – 35 ciklus – megfelelőek voltak, a monoplex vizsgálatok 30 és 32 ciklussal történtek.

5.8.3. Keveredések vizsgálata

Az eltérő faji eredetű anyagmaradványok szimulációjához a *cytochrome b* génszakasz esetében *humán illetve kutya* DNS 1:1-1:10 arányú keverékeit, az eseti minták rostálására – „*screening*” – alkalmasabb rövid STR lókuszek – PEZ1, PEZ5, PEZ3 – esetében kutya illetve *humán* DNS 1:4-1:80 arányú keverékeit alkalmaztam. A PCR kondíció *cytochrome b* vizsgálatoknál az 5.3.1 bekezdésben leírt v3, a multiplex esetében a standard protokollnak megfelelő volt, a monoplex vizsgálatok 30 és 32 ciklussal történtek. Eseti mintaszimuláció céljára kitépéssel nyert szőrminta DNS extraktuma szolgált.

5.8.4. Esettanulmányok

Az elmúlt öt évben kutatási területem több tucat esetben nyújtott segítséget a különböző hatóságok – bíróság, rendőrség, önkormányzat – és magánszemélyek számára egyaránt, melyek reprezentálására a teljesség igénye nélkül három esettípus példáját választottam

5.8.4.1. A faj azonosítása

Előzmény: Miskolc város Rendőrkapitánysága 265/3545/2004.ált. számú határozatával illegális kutya-krematórium üzemeltetésének ügyében égett csontmaradványok vizsgálatát kérte.

Vizsgálat: Két csontdarabból mechanikai feltárás, proteolitikus emésztés majd szerves extrakció és ultraszűrés alkalmazásával DNS kinyerésére irányuló tisztítást végeztünk. A tisztított DNS-minták agaróz gélelektroforézise és DNS-kötő fluorofórral való festése után a gélben UV-fényben látható mennyiségű DNS-t nem észleltünk.

A *cytochrome b* gén fragmensének PCR eljárással sokszorozott termékeit tisztítottuk, koncentráltuk és direkt módon szekvenáltuk (BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Kit, Applied Biosystems Corp.), a szekvenciákat ABI Prism[®] 310 készülékkel határoztuk meg, a szekvenciák szerkesztése és illesztése a Sequencing Analysis 3.4.1 és Sequencher 4.1 komputerprogramok segítségével történt.

A kapott szekvencia eredményeket az Interneten elérhető génbank szekvenciákhoz (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank), és magyarországi populációs vizsgálataink eredményeképpen rendelkezésre álló *cytochrome b* szekvenciákhoz hasonlítottuk.

5.8.4.2. Az egyed azonossága

Előzmény: A Veszprémi Rendőrkapitányság 1172/2002. bü. számú határozatával súlyos testi sértés ügyében a sértetti ruházaton esetlegesen fellelhető kutya eredetű biológiai anyagmaradványok összehasonlítását kérte a feltételezett támadó kutyától biztosított nyálmintával.

Vizsgálat: A ruházaton észlelt felületi benyomódások környékéről, kivágással 4 db mintát biztosítottunk. A hordozófelületeket pufferezett oldattal lemostuk majd dekantáltuk, ezt követően az oldatokat koncentráltuk. A minták sejttartalmának differenciált- valamint az összehasonlító nyálminta standard proteolitikus emésztése, szerves kémiai extrakciója és koncentrációja után nyert DNS-t fluorofórral való festés és agaróz gélelektroforézis segítségével UV-fényben kvantáltuk, majd multiplex PCR segítségével a PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ5, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8, FHC2079 lókuszokat amplifikáltunk. A fluoreszcen-lézerdetekció ABI Prism 310 készüléken GeneScan[®] 3.1.2 szoftver, a genotipizálás Genotyper[®] 2.5.2 szoftver segítségével történt.

5.8.4.3. Leszármazás vizsgálata

Előzmény: Német juhász fajtatenyésztő a lehetséges nemző kan azonosságának megállapítását kérte.

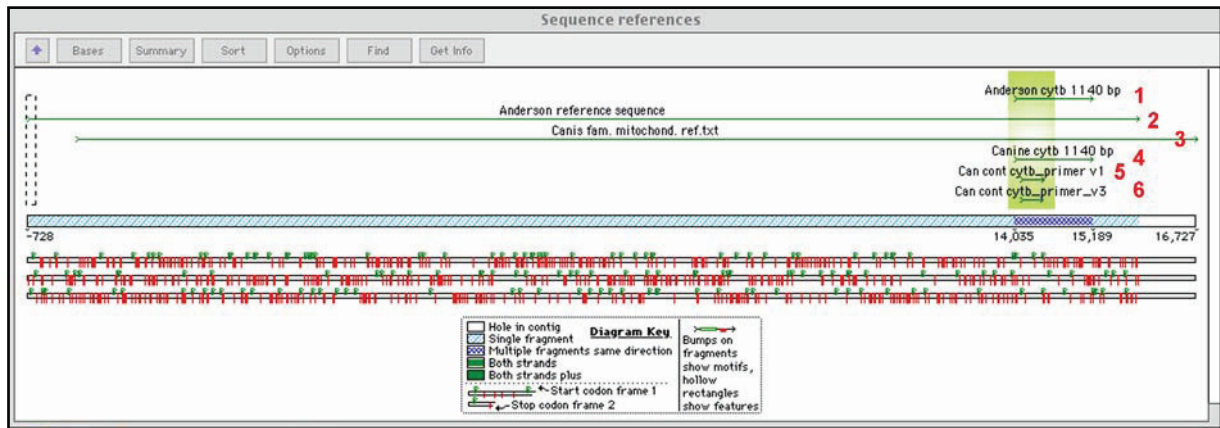
Vizsgálat: A „N. W.” nevű szuka, a „G. A. senior” nevű kan és a „G. A. junior” nevű kölyök vérmintáinak proteolitikus emésztése, szerves kémiai extrakciója és

koncentrációja után nyert DNS-t kvantáltuk, majd multiplex PCR segítségével a PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ5, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8, FHC2079 lókuszokat amplifikáltunk. A fluoreszcen-lézerdetekció ABI Prism 310 készüléken GeneScan[®] 3.1.2 szoftver felhasználásával, a genotipizálás Genotyper[®] 2.5.2 szoftver segítségével történt.

6. EREDMÉNYEK

6.1. Azonosítás – a faj azonosítása

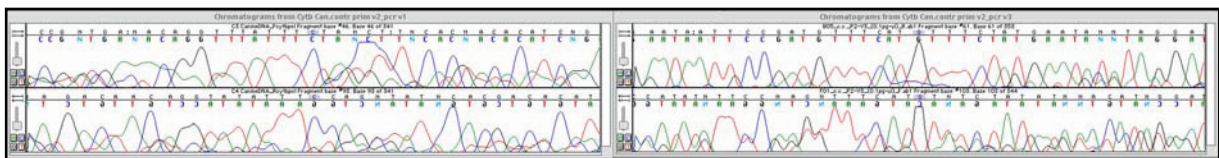
A *cytochrome b* génszakasz viszonylag rövid szakaszának vizsgálata két primer-párral volt eredményes (**F2-F3. ábra**).. Az illesztett szekvenciák pozícióját a referencia szekvenciákhoz (GenBank, 2005) viszonyítva az **1. ábra** mutatja be.



1. ábra A detektált szekvenciák és a referencia szekvenciák illeszkedése [1: Humán *Cytb* gén, 2: Humán mtDNS (CRS), 3: *Canis familiaris* mtDNS, 4: *Canis familiaris* *Cytb* gén, 5: degenerált primerekkel kimutatott szekvencia, 6: CRS szekvenciára illesztett módosított primerekkel kimutatott szekvencia]

6.1.1. Vizsgálatok Anderson (CRS) szekvenciára illesztett primerekkel

A v2 primerek az alkalmazott két PCR kondícióval rendkívül sok bizonytalan pozíciót tartalmazó, nagyon rosszul illeszthető, zavaros, gyakorlatilag értékelhetetlen szekvenciákat eredményeztek (**2. ábra**), melyek a *GenBank*-ban történő verifikálásra nem voltak megfelelőek.

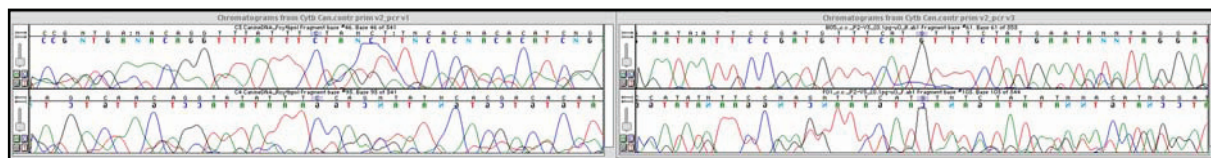


2. ábra Tipikus szekvenciák v2 primerekkel, v1 és v3 PCR kondícióval

6.1.2. Vizsgálatok CRS szekvenciára illesztett módosított primerekkel

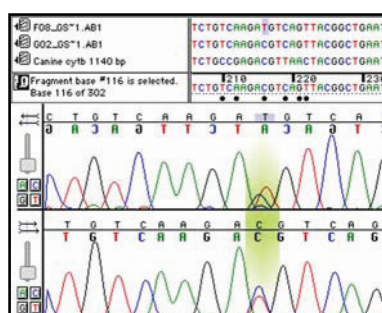
A v3 primerek a referált v2 (Parson, 2000) amplifikációs protokollal csak az egyik szálon mutattak viszonylag tiszta szekvenciát, a reverz szálon detektált szekvenciák rendkívül sok bizonytalan pozíciót tartalmaztak, kevert, nem illeszthető eredményt adtak. A módosított v3 PCR program – „*PCR enhancing*” – a detektált szekvenciák kitisztulását eredményezte (**3.**

ábra), azonban a *GenBank* adatbázisban történő azonosítás során azok a *Canis familiaris* szekvenciákkal csak $\leq 87\%$ homológiát mutattak (**F6. ábra**). A legnagyobb mértékű homológia (87%) *Canis familiaris* nukleáris pszeudogén illetve *Canis mesomelas elongae*, *Cuon alpinus* és *Canis lupus himalayensis cytochrome b* referenciákkal volt tapasztalható. Az új fragmens teljes szekvenciája megtalálható a *GenBank*-ban, Ac. No.: DQ309764 (*GenBank*, 2005).



3. ábra Tipikus szekvenciák v3 primerekkel, v2 és v3 PCR kondícióval

A rottweiler és német juhász minták vizsgálata során a *Canis familiaris cytochrome b* referencia szekvencia 1140/216 pozíciójában – a fragmens 302/116 pozíciójában – C/T nukleotid eltérések voltak megfigyelhetők (**4. ábra**). Az előforduló típusok (**F7. ábra**) 22-22 egyednél tapasztalt megoszlásában jelentős különbség nyilvánult meg (**3. táblázat**).



4. ábra C és T nukleotidok azonos pozícióban

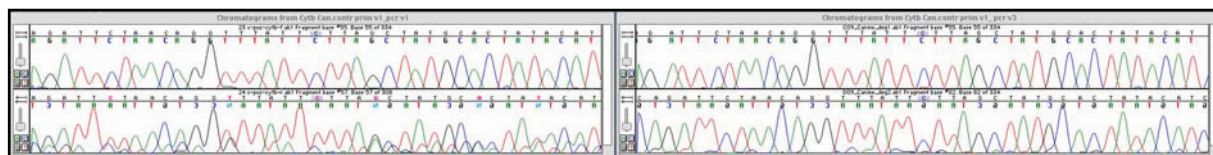
3. táblázat A heteronukleotid pozíciók megoszlása két fajta egyedeinél

német juhász csoport			rottweiler csoport		
C	9 egyed	41%	C	18 egyed	82%
C/T	10 egyed	45%	C/T	4 egyed	18%
T	3 egyed	14%	T	0 egyed	0%

6.1.3. Vizsgálatok degenerált primerekkel

A v1 primerek a kalkulált kötési optimummal programozott v1 amplifikációs protokollal az egyik szálon tiszta szekvenciát mutattak, azonban a reverz szálon detektált szekvenciák több bizonytalan pozíciót tartalmaztak, kevert, nehezen illeszthető eredményt adtak. A PCR program v3 módosításával a reverz szekvencia tökéletesen kitisztult (**5. ábra**), és a konszenzus szekvenciák a *GenBank* adatbázisban történő azonosítás során a *Canis familiaris cytochrome b* referencia szekvenciával teljes homológiát mutattak, de

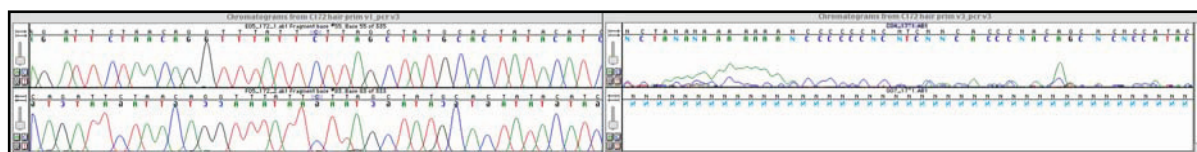
nagymértékben eltértek a v3 primerekkel kapott szekvenciáktól (**F4. ábra**). A vizsgálatok során egy esetben a referencia szekvencia 1140/352 pozíciójában – a fragmens 302/116 pozíciójában – G/A nukleotid eltérés volt megfigyelhető (F5. ábra).



5. ábra Tipikus szekvenciák v1 primerekkel, v1 és v3 PCR kondícióval

6.1.4. Szőrszálak vizsgálata módosított és degenerált primerekkel

A szőrszálak száli részéből extrahált – nukleáris DNS-t nem tartalmazó – minták a v3 PCR kondícióval alkalmazott v1 primerekkel mindkét szálon tiszta, jól illeszhető szekvenciákat adtak, melyek konszenzus szakaszai a *GenBank* adatbázisban történő azonosítás során a referencia szekvenciával teljes homológiát mutattak. A párhuzamosan végzett, v3 primerekkel történő vizsgálat során specifikus termékek nem amplifikálódtak (**6. ábra**). A kontrollált eredményeket a **F8. ábra** mutatja be.



6. ábra Tipikus szekvenciák szőrszálakból v1 és v3 primerekkel, v3 PCR kondícióval

6.2. Individualizáció – az STR polimorfizmusok vizsgálata

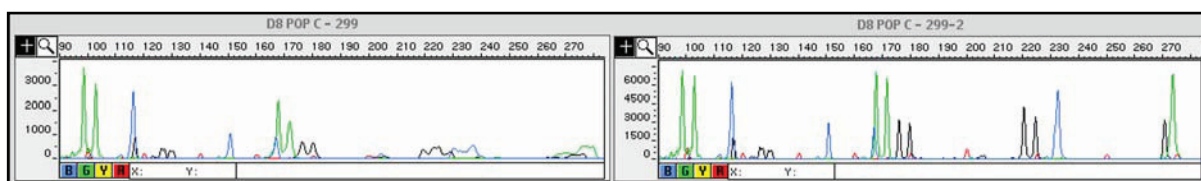
6.2.1. Multiplex rendszer

A kit használatával 10, három különböző fluoreszcenciával jelölt lókuszt – *FAM*: PEZ1 (CATA₁), FHC2054, FHC2010, *JOE*: PEZ5, PEZ20, PEZ12, *NED*: PEZ3, PEZ6, PEZ8, FHC2079 – egyszerre történő analízise volt megoldható.

A 673 populációs minta vizsgálata során a 10 lókuszon 35 minta esetében csak részleges genetikai profil volt detektálható, melyek közül 10 mintában 2-7 lókuszt egyidejű kiesése („*dropout*”) is előfordult (**4. táblázat**). A töredékes profillal rendelkező minták megnövelt templátmennyiséggel történő újraamplifikálása a teljes profil kimutatását néhány esetben lehetővé tette (**7. ábra**)

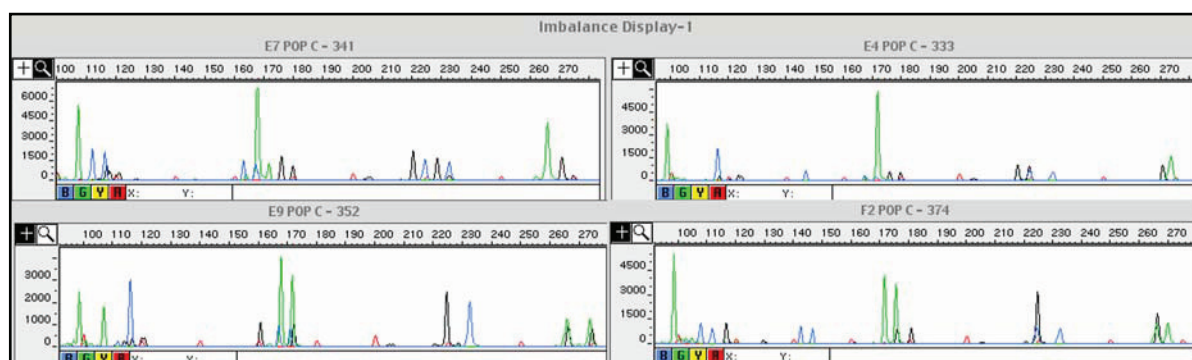
4. táblázat A nem tipizálható eredmények lókuszek közötti megoszlása

Lókuszt	PEZ1	FHC2054	FHC2010	PEZ5	PEZ20	PEZ12	PEZ3	PEZ6	PEZ8	FHC2079
Minta (db)	6	2	1	6	11	6	21	0	4	4



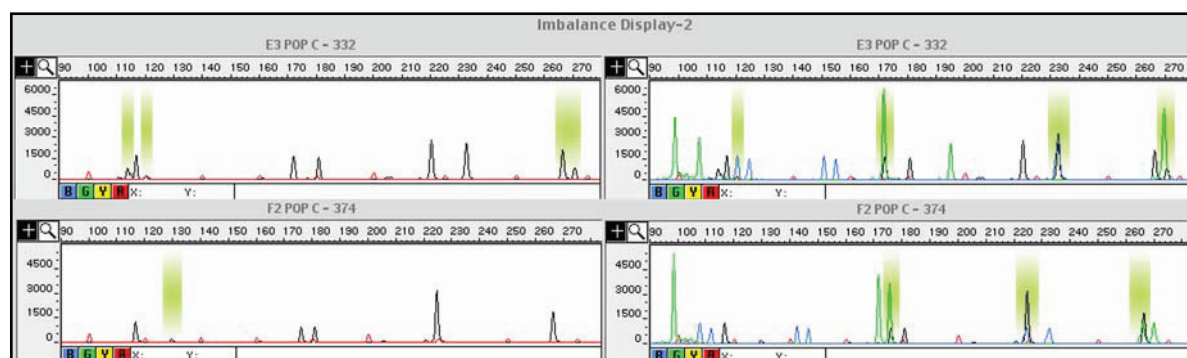
7. ábra A megnövelt mennyiségű templát csökkenti a lókuszkiesés esélyét

A kiegyensúlyozatlan felszorzozás – *PCR-imbalance* – gyakran igen nagy mértékű eltéréseket eredményezett a fluoreszcens emisszióban, ami a detektált RFU-értékek – RFU, *Relative Fluorescence Unit* – között nagyságrendi különbségben nyilvánult meg. A preferenciális amplifikálódás jelensége nem mutatott korrelációt a fragmensmérettel, leginkább a zöld („*JOE*”) fluoreszcenccel jelölt lókusztok mennyiségi túlsúlya illetve a PEZ3 lókuszt („*NED*” fluoreszcenccel jelölt csatorna legkisebb fragmensméretű lókuszt) rendkívül gyenge sokszorozódása (**4. táblázat**) jellemezte. Leginkább kiegyensúlyozottnak a kék („*FAM*”) fluoreszcenccel jelölt csatorna volt tekinthető (**8. ábra**).



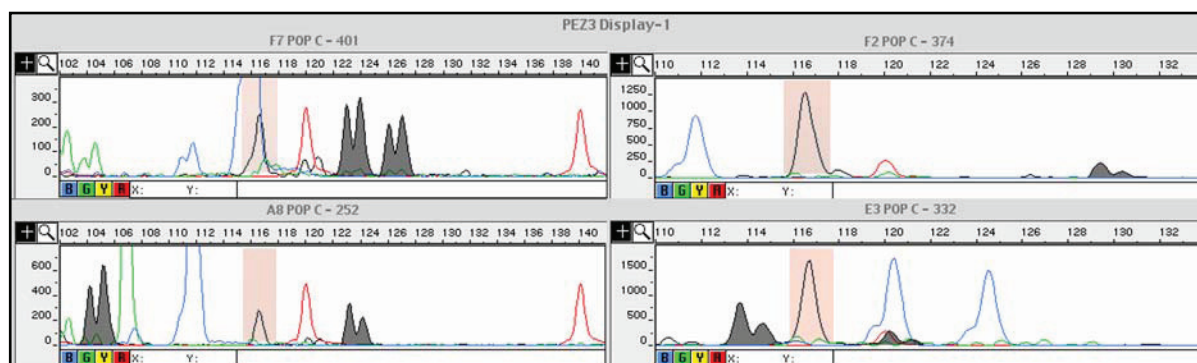
8. ábra Kiegyensúlyozatlan felszorzozódás a különböző fluoreszcens csatornák között

Az egyenlőtlen felszorzozódás egy csatornán belül, fragmensmérettől függetlenül változó formában is megnyilvánult. A lókusztok közötti illetve lókusztban belüli allélikus kiegyensúlyozatlanság – *allelic imbalance* – sokszor a fluoreszcens csatornák nagyságrendileg eltérő RFU értékeivel párosult (**9. ábra**).



9. ábra Kiegyensúlyozatlan felszorzozódás egy fluoreszcens csatornán belül és a különböző fluoreszcens csatornák között

A PEZ3 lókuszt sokszorozódása a lókusztok között általánosan mennyiségi és minőségi szempontból is a legrosszabbnak volt mondható. A kis mennyiségű termékeknel az allélikus aránytalanság és a nem teljes adenilálódás okozta kettős detektálási csúcsok (Clark, 1988) előfordulása mellett a tartományban nem allélikus eredetű fragmens is megjelent. A potenciálisan alléliként meghatározható csúcsok közötti minimális különbség a többi lókusztól és a korábbi referenciáktól (Neff, 1999) eltérően átlagosan 3 bázispárnak bizonyult (**10. ábra**).



10. ábra PEZ3 lókuszt amplifikálódása [színes sáv: nem allélikus eredetű fragmens]

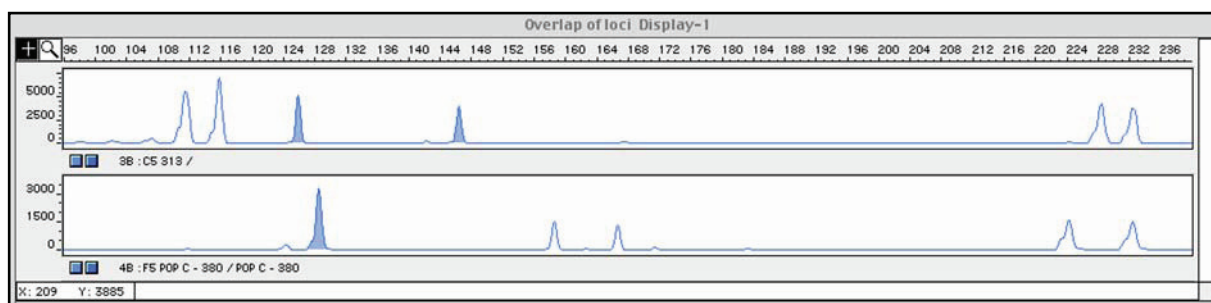
A vizsgálatokhoz felhasznált belső méretstandardok részben különböző viszonyító-fragmenseket tartalmaznak (**F9. ábra**), melyek egzakt mérete és denzitása meghatározó a méretezésre nézve, így eltérő fragmensméret meghatározást eredményeznek azonos minták esetében is (**F10. ábra**). Az azonos standarddal analizált minták méretei egy-egy lókuszt potenciálisan alléltartományában diszkrét (**F11. ábra**) és kevésbé diszkrét (**F12. ábra**), alléliként értelmezhető csoportokat alkottak. A csoportok mérettartománya egyértelmű alléltazonosításra nem alkalmas, ugyanakkor megfelelő volt a mérettartomány becsléséhez és az alléltoktól alkotó fragmensek kiválasztásához.

A populációs minták mérettartománya a kit-protokollban feltüntetett értékektől (Applied Biosystems, 2001) négy lókuszt esetében jelentős eltérést mutatott (**5. táblázat**).

5. táblázat A lókusztok várt- és tapasztalt mérettartománya bázispár értékben megadva

Lókuszt	PEZ1	FH2054	FH2010	PEZ5	PEZ20	PEZ12	PEZ3	PEZ6	PEZ8	FH2079
Várt tartomány	105-133	148-177	226-242	96-115	140-190	254-314	97-150	167-207	214-250	270-295
Mért tartomány	93-130	127-183	215-240	93-114	167-199	256-314	92-148	164-200	215-257	269-299

A mérettartománybeli eltérések a kék („FAM”) fluoreszcenciával jelölt csatorna mindegyik lókusztát érintették, a csatornán belül a PEZ1 (CATA₁) és FHC2054 lókusztok méretbeli átfedése volt megfigyelhető (**11. ábra**).



11. ábra Átfedő fragmensméretek azonos fluoreszcens csatornán belül

6.2.2. Genotipizálás

A genotípus pontos megállapításához a referencia allélokból összeállított alléllétrák használata elengedhetetlen. A populációs minták vizsgálata során a 10 lókuszon összesen 149 allélt illetve allélvariánst sikerült kimutatni. A német juhászkutya (POP1) és rottweiler (POP2) fajtapopulációban 72 illetve 56, a schnauzer (POP3) és tacsó (POP4) fajtacsoport-populációban 81 illetve 90 alléltípus volt megfigyelhető. A négy populációban az átlag alléltípus az adott lókuszonon megfigyelt alléltípusok 29%-70%-a volt (**6. táblázat**).

6. táblázat Az összesen megfigyelt illetve a négy populáció csoportban (POP1-POP4) átlagosan előfordult alléltípusok száma lókuszonként

Lókusz	PEZ1	FH2054	FH2010	PEZ5	PEZ20	PEZ12	PEZ3	PEZ6	PEZ8	FH2079
Megfigyelt alléltípus	9	14	6	6	11	31	17	30	17	8
Alléltípus átlag	6	9,5	4,2	3,5	5,75	9	8,5	13,5	10,25	4,75

6.2.2.1. Alléllétrák

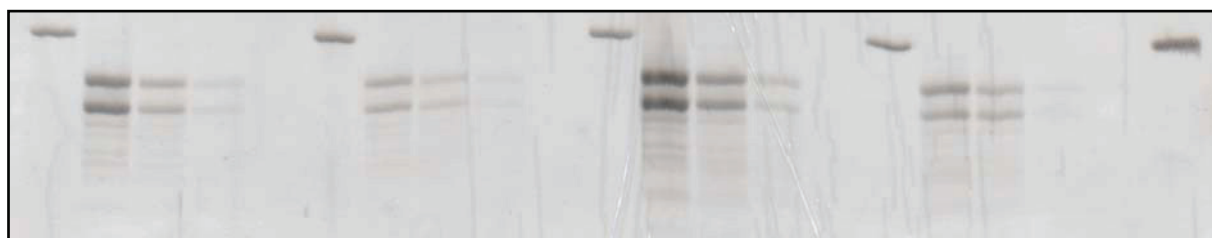
Az allélkoktélok előállítására a méret szerint elkülönülő csoportokból kiválasztott minták monoplex felsokszorozásával és szekvencia analízisével verifikált fragmenseinek keverékéből történt. A lókuszek közötti átfedés elkerülése érdekében valamint a létrák reamplifikálása során a nem allélikus tartományban megjelenő artifaktumok zavaró hatását kiküszöbölendő a 10 referencia-koktél *FAM*, *JOE*, *NED* fluoreszcein jelölésekkel, 3 keverékben

- G1: PEZ5, B1: PEZ1 (CATA₁), Y1: PEZ3,
- B2: FHC2054, Y2: PEZ6, G2: PEZ20, G3: PEZ12,
- B3: FHC2010, Y3: PEZ8, Y4: FHC2079 lókuszt

került felhasználásra (**F23. ábra**). A létrák a megfigyelt legkisebb és legnagyobb fragmens közötti tartományban lehetőség szerint – a több variáns típust (interallélt) tartalmazó hiperpolimorf lókuszok kivételével – minden referencia allélt tartalmaznak.

6.2.2.1.1. Monoplex vizsgálatok

A lókuszokat a bizonytalanul tipizálható genotípusok illetve a referencia allélok ellenőrzése céljából monoplex formában is vizsgálhatóvá kellett tenni. Az amplifikáció optimalizálása a primer- és templátmennyiség valamint a PCR programok változtatásával két fázisban történt (**12.a-b. ábra**).

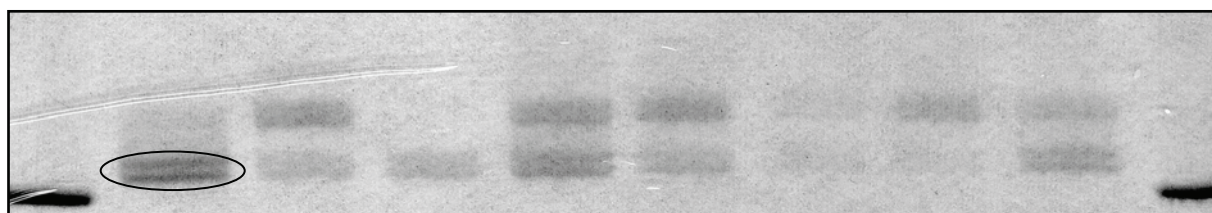


12.a. ábra PEZ20 lókusz monoplex vizsgálatának optimalizálása



12.b. ábra PEZ20 lókusz monoplex vizsgálatának optimalizálása

Néhány esetben a nem teljes adenilálódás miatt a sokszorozott termékek kettős detektálási csúccsal – *double peak* – rendelkeztek (**13. ábra**).



13. ábra PEZ5 lókusz monoplex vizsgálata

6.2.2.1.2. Szekvencia vizsgálatok

A monoplex PCR termékekből elkülönített referencia fragmensek szekvencia meghatározását és a szekvenált adatok egymással történő összehasonlítását követően azokat a génbankban ellenőriztem (Altschul, 1997). A három FHC-lókusz – 2054, 2010, 2079 – kivételével illeszthető szekvenciákat nem találtam. A típusként megkülönböztethető, új, katalogizált fragmensek szekvenciája a *GenBank*-ban megtalálható (GenBank, 2005), Ac. No.:

AF454051, AF454052 (PEZ20), AY375154 (PEZ8), AY375155 (PEZ5),
 AY375153, AY375156 (PEZ6), AY536266 (PEZ3), AY672136 (PEZ1),
 AY758357, AY758358 (PEZ12),

6.2.2.2. Méretstandardok, méretmeghatározás

Az allélok szekvencia analízis alapján meghatározott, bázispárban mért hosszának pontos ismerete mellett a szoftveres kiértékeléshez a referencia koktélok fragmenseinek relatív – belső méretstandardokhoz viszonyított – méreteinek és a méretmeghatározás során, az elektroforetikus elválasztásból fakadó eltérések, szórásértékek meghatározása is szükséges. Az allékokoktélok allélméret-meghatározásának pontosságát három fluoreszcens méretstandard – GeneScan™-500 ROX™ és GENESCAN® 400HD [ROX] (Applied Biosystems) valamint Internal Lane Standard 600 (Promega Corp) – (F9. ábra) alkalmazása esetén hasonlítottam össze. Az abszolút hosszaktól való eltérés 0,05-13,51 bázispár, a méretezett hosszak szórása 0,004-0,75 bázispár tartományba esett. Leggyakrabban és legnagyobb mértékben az eltérések az ILS600-, a méretezett hosszak szórása a GS400HD méretstandarddal volt tapasztalható. Ezzel ellentétben leggyakrabban és legkisebb mértékben az abszolút hosszaktól való eltérés a GS400HD, a szórás az ILS600 méretstandarddal volt tapasztalható (7. táblázat). A számszerű értékeket a F24.a-c. táblázat tartalmazza.

7. táblázat Méretmeghatározási pontosság eltérő belső méret-standardokkal [Standard: az alkalmazott méretstandard, 1: GENESCAN® 400HD [ROX], 2: GeneScan™-500 ROX™, 3: Internal Lane Standard 600, Eltérés: a méretezett hossz eltérése a szekvenált hosszától, Szórás: a mért hosszértékek szórása, ■: legkisebb, ■: legnagyobb, ■: a kettő közötti, ■: nincs különbség]

Lókus	PEZ1			FH2054			FH2010			PEZ5			PEZ20			PEZ12			PEZ3			PEZ6			PEZ8			FH2079					
Standard	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Eltérés	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Szórás	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

6.2.2.3. Szemiautomata kiértékelés

Az abszolút méretek alapján – a csupán szekvenciális különbséggel rendelkező variánsoktól eltekintve – azonosítható allélok elválasztás utáni kiértékeléséhez a jobb méretezési pontosság alapján az Internal Lane Standard 600 (ILS 600) belső standardot választottam. A Genotyper® 2.5.2 szoftver tipizáló makróit az ILS600 standard méretezési-

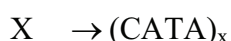
és szórásértékeinek megfelelően átalakítottam, így a referencia allélok segítségével történő genotípus meghatározás manuális hibalehetőségét lecsökkentettem (**F25.a-j. ábra**).

6.2.3. Lókuszok jellemzése

Az allélok nemzetközileg egységesíthető nevezéktanának kialakításához és megfeleltetéséhez a szekvenált fragmensek repetíciós struktúrájának megállapítása, összehasonlítása és az időközben publikálásra került adatokkal történő összevetése volt szükséges. A humán STR lókuszokra kidolgozott illetve a nem emberi DNS vizsgálatokra vonatkozó iniciális ajánlások figyelembe vételével a szerkezeti jellegzetességek alapján a vizsgált 9 db tetramer- és 1 db trimer ismétlődésű lókuszt három kategóriába csoportosítottam. A lókuszok közül négy – PEZ1 (CATA₁), PEZ5, FHC2010, FHC2079 – egyszerű ismétlődésekkel, öt – PEZ3, PEZ8, PEZ12, PEZ20, FHC2054 – összetett, nukleotid varianciát tartalmazó ismétlődésekkel, esetenként hosszbeli eltérésekkel, egy – PEZ6 – különböző, változó hosszúságú repeat-egységekkel és közbeiktatott szekvenciákkal, viszonylag sok hosszbeli eltéréssel rendelkező allélokat tartalmaz.

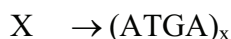
6.2.3.1. Egyszerű ismétlődéseket tartalmazó lókuszok

PEZ1 (CATA₁) lókusz: A lókusz alléljait „CATA” ismétlődésű tetramer struktúra jellemzi. A populációs minták 95-131 bp hosszú fragmenstartományában 8 allél 9 alléltípusát figyeltem meg, interallélikus variánst nem találtam. Egy adott allél – „X” – elnevezése



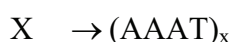
alapján történt. A határoló – „flanking” – régió eltérő lehet, a két különböző szekvencia azonos allélhossz esetén is megfigyelhető (**F13. ábra**). Az allélgyakoriság 0,1% („7” allél) és 42,3% („13” allél) között változott (**F26.a. ábra**).

FHC2010 lókusz: A lókusz alléljait „ATGA” ismétlődésű tetramer struktúra jellemzi. A populációs minták 216-240 bp hosszú fragmenstartományában 6 allélt figyeltem meg, interallélikus variánst nem találtam. Egy adott allél – „X” – elnevezése



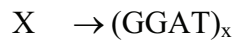
alapján történt (**F15. ábra**). Az allélgyakoriság 0,1% („7” allél) és 37,9% („10” allél) között változott (**F26.c. ábra**).

PEZ5 lókusz: A lókusz alléljait „AAAT” ismétlődésű tetramer struktúra jellemzi. A populációs minták 97-117 bp hosszú fragmenstartományában 6 allélt figyeltem meg, interallélikus variánst nem találtam. Egy adott allél – „X” – elnevezése



alapján történt (**F16. ábra**). Az allélgyakoriság 0,2% („7” allél) és 57,9% („8” allél) között változott (**F26.d. ábra**).

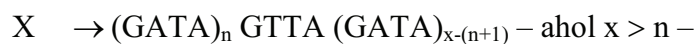
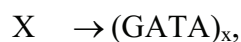
FHC2079 lókuszt: A lókuszt alléljait „GGAT” ismétlődésű tetramer struktúra jellemzi. A populációs minták 266-294 bp hosszú fragmenstartományában 8 allélt figyeltem meg, interallélikus variánst nem találtam. Egy adott allél – „X” – elnevezése



alapján történt (**F22. ábra**). Az allélgyakoriság 0,1% („12” allél) és 46,9% („6” allél) között változott (**F26.j. ábra**).

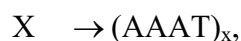
6.2.3.2. Összetett ismétlődéseket tartalmazó lókusztok

FHC2054 lókuszt: A lókuszt alléljait alapvetően a „GATA” ismétlődésű tetramer struktúra jellemzi, melyet egy „GTTA” egység két részre oszthat. A „GTTA” blokk nem minden allélban figyelhető meg, helyzete azonos hosszúságú fragmensekben (pl. „16” allél) eltérő lehet. A populációs minták 131-183 bp hosszú fragmenstartományában 13 allél 14 típusát figyeltem meg, egyetlen interallélikus variánst („9.3” allél) találtam, melyet a rev3’ határoló régióban előforduló 1 bázispár deléción eredményezett. Egy adott allél – „X” – elnevezése



alapján történt (**F14. ábra**). Az allélgyakoriság 0,1% („6” és „19” allélok) valamint 21,6% („12” allél) között változott (**F26.b. ábra**).

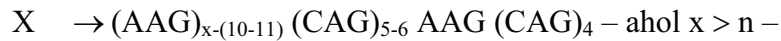
PEZ20 lókuszt: A lókuszt alléljait alapvetően „AAAT” ismétlődésű tetramer struktúra jellemzi, melyet néhány esetben a fw3’ régióban „AAAA” motívum zárhat (pl. „19” allél). A záró motívum azonos hosszúságú fragmensekben (pl. „14” allél) eltérő lehet. A populációs minták 170-202 bp hosszú fragmenstartományában 9 allél 11 allélváltozatát figyeltem meg, interallélikus variánst nem találtam. Egy adott allél – „X” – elnevezése



alapján történt (**F17. ábra**). Az allélgyakoriság 0,2% („11”, „18” és „19” allélok) valamint 54,8% („13” allél) között változott (**F26.e. ábra**).

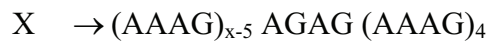
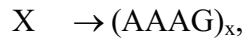
PEZ3 lókuszt: A lókuszt alléljait változó „AAG” és „CAG” ismétlődésű trimer struktúra jellemzi. Mindkét blokk minden allélban megfigyelhető, de a rev3’ régióban elhelyezkedő „CAG” motívumok száma azonos hosszúságú fragmensekben (pl. „15” allél) eltérő lehet. A populációs minták 95-149 bp hosszú fragmenstartományában 15 allél 17

típusát figyeltem meg, interallélikus variánst nem találtam. Egy adott allél – „X” – elnevezése



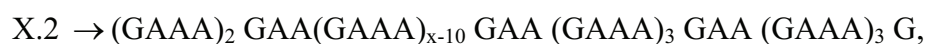
alapján történt (**F19. ábra**). Az allélgyakoriság 0,1% („19” és „33” allélok) valamint 22,1% („25” és „27” allélok) között változott (**F26.g. ábra**).

PEZ8 lókusz: A lókusz alléljait alapvetően a „AAAG” ismétlődésű tetramer struktúra jellemzi, melyet egy relatív pozícióban – a repetíciós blokk rev3’ vége előtti 5. ismétlődés – fixálódott „AGAG” egység két részre oszthat. A populációs minták 215-251 bp hosszú fragmenstartományában 17 allélt figyeltem meg, közöttük 7 interallélikus variánst („X.1” allélok) találtam, melyet a rev5’ határoló régióban előforduló 1 bázispár addíció eredményezett. Az „AGAG” blokk nem minden allélban, többek között az interallélikus variánsokban sem figyelhető meg. Egy adott allél – „X” – elnevezése



alapján történt (**F21. ábra**). Az allélgyakoriság 0,1% („11.1” és „17.1” allélok) valamint 25,4% („16” allél) között változott (**F26.i. ábra**).

PEZ12 lókusz: A lókusz alléljait alapvetően „GAAA” ismétlődésű tetramer struktúra jellemzi, melyet két megfigyelt esetben különböző helyen előforduló „GAAG” tetramer- illetve eltérő (1-3) számú, különböző relatív pozíciókban fixálódott „GAA” trimer egység tagol. A trimer motívum változása jellemzően négy, jól elkülöníthető szerkezeti felépítést eredményez, melyek hosszbeli varianciáját a fw5’ határoló régió „poli-A” – 9-11 adenint tartalmazó – szakaszának deléciós különbségei valamint a repetíciós blokk egynukleotidos addíciója is befolyásolják. A két trimer egységgel tagolt szerkezet-csoportot az első trimer egység relatív pozíciója valamint a fw3’ határoló régió szekvencia T/G szubsztitúciója különbözteti meg. A populációs minták 264-322 bp hosszú fragmenstartományában 26 allél 31 allélváltozatát, közöttük 16 interallélikus variáns („X.1, X.2, X.3” allélok) 17 allélváltozatát találtam. A szekvencia azonos hosszúságú fragmensekben (pl. „16” illetve „13.3” allélok) eltérő lehet. Egy adott allél – „X” – elnevezése



alapján történt (**F18. ábra**). Az allélgyakoriság 0,1% („11”, „11.1”, „13.3”, „19.1”, „20.1”, „20.3” és „22.1” allélok) valamint 35,1% („14” allél) között változott (**F26.f. ábra**).

6.2.3.3. Komplex ismétlődéseket tartalmazó lókuszok

PEZ6 lókusz: A lókusz alléljait alapvetően „AAAG” ismétlődésű tetramer struktúra jellemzi. Ezt azonos relatív pozíciókban rögzült két „AA” dimer és különböző relatív pozíciókban fixálódott, eltérő számú (2-3) „AAG” trimer- valamint (1-2) „AG” dimer egység tagolja. A tagoló motívumok változása jellemzően három, jól elkülöníthető szerkezeti felépítést eredményez, melyek hosszbeli varianciáját a fw5’ határoló régió „poli-A” szakaszának adenin-deléciós különbsége is befolyásolja. A populációs minták 168-205 bp hosszú fragmenstartományában 30 allélt, közöttük 20 interallélikus variánst („X.1, X.2, X.3” allélok) találtam. Azonos hosszúságú fragmensekben eltérő szekvenciát nem tapasztaltam. Egy adott allél – „X” – elnevezése

X → AA AAAG AAG (AAAG)₂ AAG AAAG AAGG AAAG AG AAAG
AA (AAAG)_{x-6},

X.1-2 → AA AAAG AAG AAAG AAGG AAAG AG AAAG AA (AAAG)₂
AG AAAG AAG (AAAG)_{x-7},

X.3 → AA AAAG AAG (AAAG)₂ AAG AAAG AAGG AAAG AG AAAG
AA AAG (AAAG)_{x-6},

alapján történt (**F20. ábra**). Az allélgyakoriság 0,1% („22.1”, „22.2”, „23.2” és „27.2” allélok) valamint 20,3% („24” allél) között változott (**F26.h. ábra**).

6.2.4. Populáció genetikai és statisztika

A statisztikai elemzések kiindulási adatait 673 egyed mintájának genotipizálásával nyertem. A részlegesen tipizálható profilokat a számítógépes programok hiányos adatként kezelték. Az összehasonlított fajta- illetve fajta-csoport populációkat sajnálatosan kis számú mintából tudtam összeállítani, ezek kalkulált eredménye prognosztizáló jellegű becslésként értékelhető.

6.2.4.1. Allélgyakoriság, populációgenetikai alapértékek

A 10 lókuszon megfigyelt fragmenstípusokból az elvégzett szekvencia analízisek során 55 allélvariáns volt kimutatható, a hosszbeli különbségek elektroforetikus detektálásával azonban csak 44 interallél különíthető el (**F12-F22. ábra**). A genotipizálással nyert adatok jelen esetben azonban csak a méretben eltérő allélvariánsokra vonatkoztathatók. A megfigyelt allélgyakoriság értékek 0,1% és 89,9% közötti tartománya valamint azok megoszlása a populációként kezelt csoporttól nagymértékben függő (**F26.a-j. és F27.a-j. ábra**). A jelentős különbségeknek köszönhetően néhány esetben – pl. FH2054, FH2010, PEZ3, PEZ8 lókuszok – fajta- illetve csoportspecifikus eloszlási görbe

sejthető, azonban a viszonylag alacsony mintaszámok és a fajtaszám miatt ezek kizárólag egyedi jellege egyértelműen nem állapítható meg. A heterozigotitás illetve a lókuszonkénti- valamint kombinált kizárási- és megkülönböztető erő leginkább alacsony értékei a német juhászkutya mintacsoportban tapasztalhatók (**8. táblázat**). A populációs minták allélgyakorisági értékeit és néhány populációgenetikai jellemzőjét a **F28.a-b. táblázatok** mutatják be.

8. táblázat Heterozigotitás, kizárási- illetve megkülönböztető erő a populációs mintákban

	H(obs)					H(exp)					PE					PD				
	POP 1	POP 2	POP 3	POP 4	POP A1	POP 1	POP 2	POP 3	POP 4	POP A1	POP 1	POP 2	POP 3	POP 4	POP A1	POP 1	POP 2	POP 3	POP 4	POP A1
PEZ 1	0.3506	0.5750	0.5945	0.8780	0.5442	0.3528	0.7354	0.6849	0.8256	0.7275	0.1903	0.4779	0.4320	0.6321	0.5046	0.5529	0.8663	0.8356	0.9161	0.8808
FH 2054	0.6329	0.5250	0.5675	0.8780	0.6780	0.7197	0.5496	0.8433	0.8702	0.8515	0.4671	0.3622	0.6609	0.7172	0.7010	0.8738	0.7600	0.9321	0.9328	0.9587
FH 2010	0.5316	0.5000	0.4594	0.7317	0.5089	0.6195	0.5585	0.6094	0.6964	0.7303	0.3276	0.2758	0.3609	0.4327	0.4889	0.7713	0.7200	0.7757	0.8424	0.8790
PEZ 5	0.1794	0.3250	0.5945	0.5365	0.4227	0.1918	0.2965	0.6679	0.7187	0.5968	0.0993	0.1176	0.3697	0.4605	0.3567	0.3128	0.4388	0.7860	0.8554	0.7655
PEZ 20	0.3947	0.4250	0.5135	0.7692	0.5075	0.3536	0.4715	0.7175	0.7622	0.6333	0.1954	0.2527	0.4519	0.5412	0.3996	0.5792	0.6813	0.8473	0.8994	0.8140
PEZ 12	0.1923	0.7500	0.4864	0.7317	0.5592	0.3380	0.6933	0.8122	0.8623	0.8102	0.1763	0.4232	0.6102	0.6965	0.6466	0.4326	0.8013	0.9058	0.9459	0.9241
PEZ 3	0.4210	0.6500	0.6216	0.8023	0.6288	0.5319	0.6490	0.8448	0.8797	0.8506	0.3067	0.3594	0.6587	0.7278	0.7019	0.7023	0.7550	0.9335	0.9513	0.9528
PEZ 6	0.7848	0.7750	0.6216	0.7561	0.7533	0.8487	0.8038	0.8641	0.8072	0.8863	0.6935	0.6125	0.7122	0.6287	0.7733	0.9497	0.9213	0.9481	0.9316	0.9722
PEZ 8	0.6962	0.6250	0.7027	0.7073	0.6771	0.7536	0.6525	0.8726	0.8533	0.8729	0.5347	0.3938	0.7085	0.6879	0.7475	0.9028	0.7975	0.9423	0.9423	0.9657
FH 2079	0.2820	0.6750	0.5675	0.5365	0.4715	0.3559	0.6370	0.6741	0.6374	0.6796	0.1793	0.3520	0.3998	0.3735	0.4312	0.5409	0.7638	0.8137	0.7841	0.8347
Átlag	0.4466	0.5825	0.5729	0.7327	0.5751	0.5066	0.6047	0.7591	0.7913	0.7639	0.3170	0.3627	0.5365	0.5898	0.5751	0.6618	0.7505	0.8720	0.9001	0.8948

POP 1: Német juhász minták	H, P ≤ 20 %	40 % < H, P ≤ 50 %	60 % < H, P ≤ 70 %
POP 2: Rottweiler minták			
POP 3: Schnauzer minták	20 % < H, P ≤ 30 %	50 % < H, P ≤ 60 %	70 % < H, P ≤ 80 %
POP 4: Tacskó minták			
POP A1: Összes minta	30 % < H, P ≤ 40 %		H, P > 80 %

	POP 1	POP 2	POP 3	POP 4	POP A1
ΣPE	99.0400090985951%	99.4298805514217%	99.9867932091878%	99.9964052656038%	99.9957403550387%
ΣPD	99.9999521262742%	99.9999926402885%	99.999999963443%	99.999999997096%	99.999999998460%

6.2.4.2. Genetikai egyensúly tesztelése

Az Arlequin szoftver Hardy-Weinberg Equilibriumra irányuló analízise során az exact teszt (Guo, 1992) mind a tíz lókuszon az egyensúlytól statisztikailag rendkívül szignifikáns – $P \leq 0,001$ – eltérést mutatott ki az összes mintát tartalmazó populációs csoport esetében. A két fajtacsoport szignifikanciája kisebb mértékű, a schnauzereknél – $P_{FH2054} = 0,00613$, $P_{PEZ20} = 0,00731$, $P_{PEZ12} = 0,00107$ – kifejezettebb, a tacskó fajtacsoportban a három lókusztól való eltérése nem jelentősen – $0,01 \leq P < 0,05$ – szignifikáns. A rottweiler populációban az allélok megoszlása egy lókuszon sem tér el szignifikánsan – $P > 0,05$ – az egyensúlytól, a német juhászkutya populáció azonban a PEZ12 és PEZ3 lókuszon rendkívül nagy devianciát – $P_{PEZ12} = 0,00159$ illetve $P_{PEZ3} = 0,00089$ – mutat.

A lókuszpárok összehasonlítása az Arlequin szoftver lókuszek közötti allél-asszociációra irányuló permutációs valószínűségi hányados tesztjének Expectation-

Maximization – „EM” – algoritmusával (Slatkin, 1996), 45 teszttel történt. A szignifikáns eltérést mutató tesztek aránya az összes mintát tartalmazó populációs csoport esetében – ahol a nagyon szignifikáns deviációk száma a $P_{FH2054/PEZ20}$, $P_{PEZ20/PEZ6} \geq 0,001$ lókuszpárok kivételével a legmagasabb – gyakorlatilag 100%. A tacsó fajtacsoport-populációs mintában ez az arány – $4/45 = 8,8\%$ – a legalacsonyabb, nagyon szignifikáns – $P \leq 0,001$ – deviációt nem találtam. A schnauzer fajtacsoport – $9/45 = 20\%$ -os – eltérései közül nagymértékben deviánsnak – $P_{PEZ12/PEZ8} \leq 0,001$ – egy lókuszpár, a rottweiler fajtapopuláció – $7/45 = 15,5\%$ – eltérései közül két lókuszpár – $P_{PEZ1/PEZ3}$, $P_{PEZ1/PEZ8} \leq 0,001$ – bizonyult. A német juhász fajtapopuláció nagyszámú – $24/45 = 53,3\%$ – eltérése közül 12 olyan lókuszok között észlelhető, amelyek közül legalább az egyik a két, HW disequilibriumot mutató lókusz közül került ki, kifejezetten szignifikáns lókuszpárnak azonban – $P_{PEZ1/PEZ20}$, $P_{PEZ1/PEZ3}$, $P_{PEZ5/FH2054}$, $P_{PEZ5/PEZ12} \leq 0,001$ – kevesebb bizonyult (**F29. ábra**).

6.2.4.3. Genetikai strukturáltság

A magyarországi kutyapopuláció genetikai tagoltságának, heterogenitásának becslése érdekében a reprezentánsként kiválasztott 6 mintacsoport allélgyakoriságon alapuló G-statisztika valamint Wright-féle F-statisztika tesztelése mellett molekuláris variancia analízist – AMOVA – alkalmaztam. A mintacsoport-párok fenotípusos szintű – megfigyelt allélgyakoriságon alapuló – illetve molekuláris szintű – megfigyelt allélok molekuláris távolságán alapuló – összehasonlítása során tapasztalt valószínűségi értékek szignifikancia szintjei – $P(G)$, $P(F_{ST})$, $P(\Phi_{ST})$ – alapján a populációs minták egymáshoz viszonyított nagyfokú heterogenitása figyelhető meg. A populációk allélgyakoriság eloszlásában tapasztalt nagyszámú inhomogenitás legnagyobb mértékben a két fajtapopulációt tartalmazó párokban jelentkezett. A schnauzer-tacsó fajtacsoport-pár a lókuszok több mint felében nem, illetve közepes mértékű homogenitás eltérést mutatott, ami a két csoport és a vegyes állomány összehasonlítása során hasonlóan jutott érvényre. Habár a molekuláris variancia elemzése során lókusz szinten kisebb genetikai tagoltság volt tapasztalható, jelentős deviancia összességében csupán a tacsó-vegyes állomány minta-párnál nem állapítható meg. A genetikai variancia a populáción belül leginkább a PEZ6-, legkevésbé a FHC2079 lókuszon érvényesül (**9. táblázat**).

különbségként értékelhető a német juhász állományhoz képest. Lényeges eltérés volt tapasztalható a két fajtacsoport között is. A schnauzerek – a tacsó fajtacsoporttal ellentétben – a vegyes állományokkal mutatnak egyezést (F31. táblázat), ugyanakkor a molekuláris variancia analízis során tesztelt diverzitások szignifikanciája alapján a vegyes állomány heterogenitása leginkább a tacsó fajtacsoportéhoz hasonlítható.

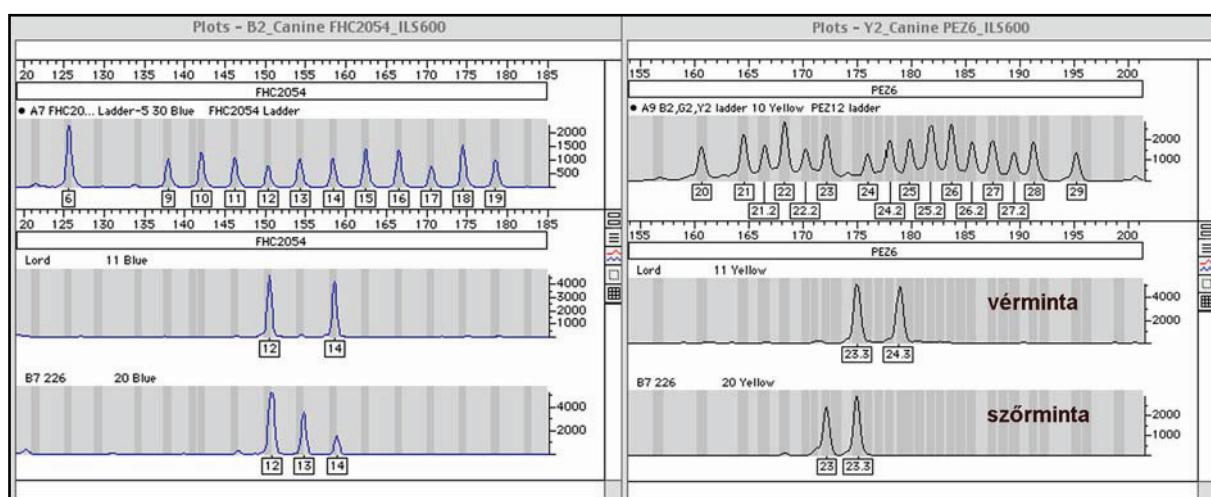
6.3. Eseti alkalmazással kapcsolatos vizsgálatok

6.3.1. Eltérő típusú biológiai anyagmaradványok vizsgálata

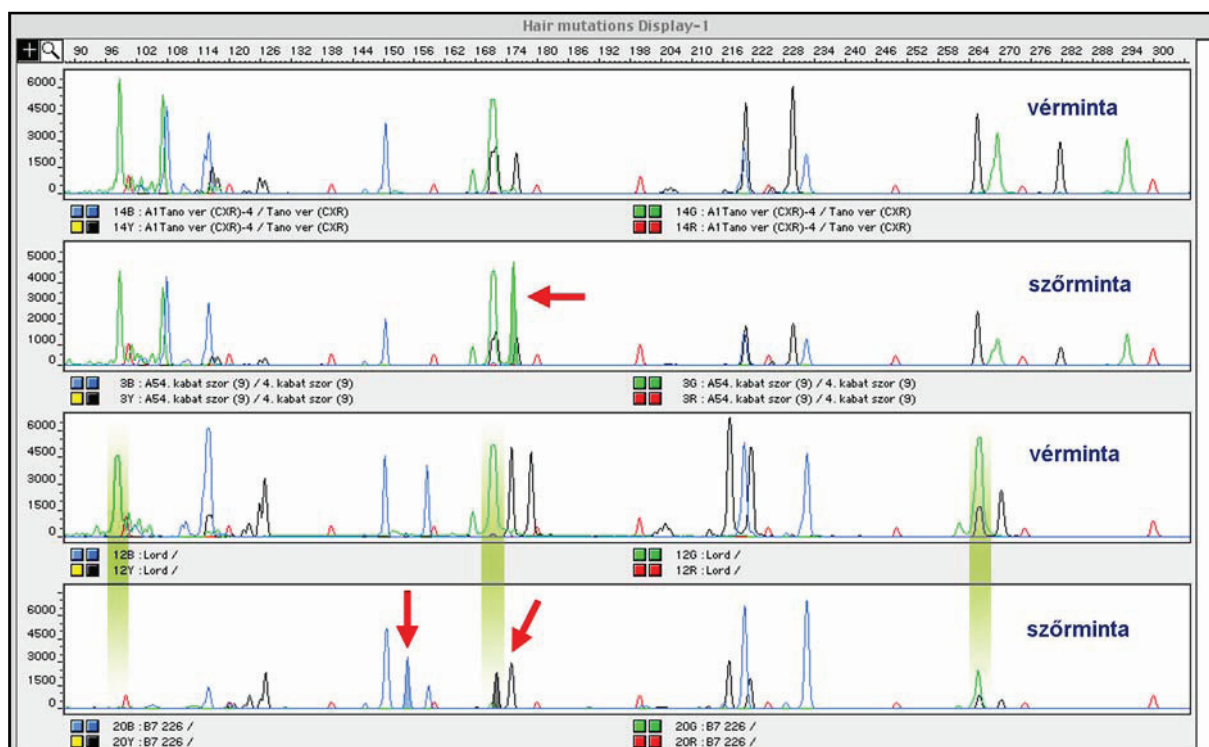
Igazságügyi és alomellenőrzési szempontból potenciálisan felmerülő biológiai mintatípusok közül folyékony- és alvadt vérmintát, beszáradt vérfoltot valamint izomszövetet, nyáltörletet és szőrszalakat vizsgáltam. A dedikált extrakciós módszerek célra vezetőnek bizonyultak, az eltérő mintákból sikeres analízis volt kivitelezhető (F32-F35. ábra).

A szőrszalakból végzett profilmeghatározás során fellépő ambivalenciák részben a mintákból kinyert DNS mennyiségi és minőségi randomitásának, részben a kültakaró változékonyságát érintő esetleges genetikai háttérnek köszönhetőek. A nem optimális mintákból az allélikus kiegyensúlyozatlanság – *allelic imbalance* – leginkább a PEZ3 lókuszon érvényesült (F35. ábra).

Mindezek mellett egyes szőrszalak genetikai profiljában megmutatkozó eltérések nem korlátozódtak allél/ok vagy lókuszt/ok kiesésére – *allelic dropout* –, néhány esetben mutációs esemény valószínűsíthető (14. ábra), mely egynél több lókuszt is érinthet (15. ábra).



15. ábra Feltételezett szomatikus mutáció genotipizálása szőrminta vizsgálata során



14. ábra Szomatikus mutáció és PCR kiegyensúlyozatlanság előfordulása szőrminták vizsgálata során

A megfigyelések alapján a mutációk nemcsak egy teljes ismétlődő egység különbséget – pl. PEZ20, FHC2054 lókuszok – eredményezhetnek, a PEZ6 lókusz „24.3” → „23” allél-változása (**15. ábra**) 7 bázispár különbség mellett megtartotta a komplex szerkezeten belüli (**F20. ábra**) azonosságát.

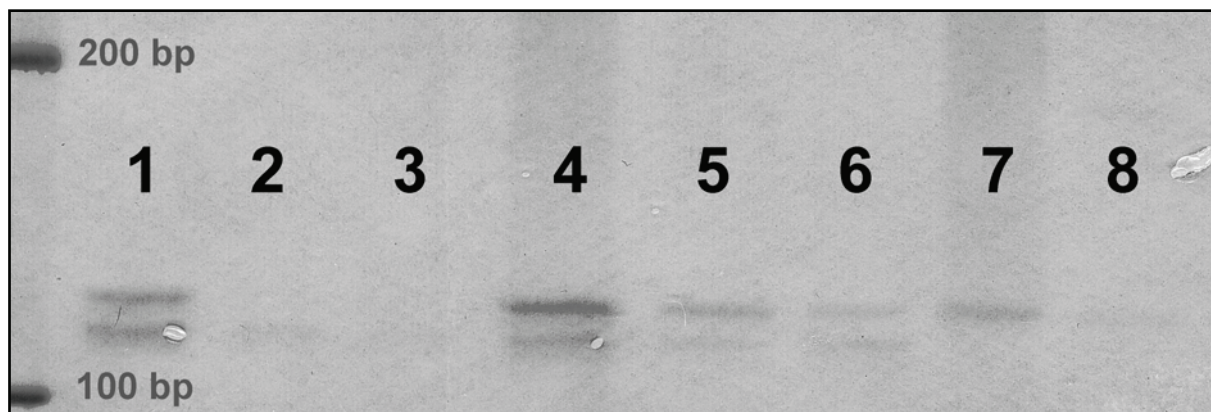
6.3.2. Kimutathatóság, érzékenységi vizsgálatok

A kriminalisztikai szempontból releváns mintatípusok természetükből fakadóan gyakran csak igen csekély mennyiségben lelhetők fel illetve biztosíthatók. A konfirmáció korlátainak felmérése, valamint a genetikai profil megállapítására alkalmas eseti minták szűrése céljából a lókuszok monoplex formában történő vizsgálatának és PAGE detekciójának érzékenységét teszteltem. A minimális templátküszöb 50 pg, a PCR ciklusszáma 30-32 volt (**11. táblázat**).

11. táblázat A kimutatási érzékenység tesztelése során alkalmazott monoplex PCR kondíciók

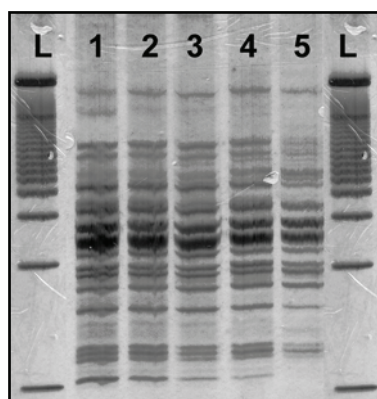
Minta	1	2	3	4	5	6	7	8
Templát (ng)	1	0,2	0,1	1	0.5	0,2	0,1	0,05
PCR ciklusszám	30	30	30	32	32	32	32	32

A sokszorozás sikerességét a PAGE hozamgélek 100-200 pg kiindulási DNS mennyiség mellett igazolták (**16. ábra**), a biztonságos kimutathatóságot a fluoreszcens detektálás is megerősítette (**F36. ábra**).



16. ábra PEZ1 lókuszt monoplex PCR érzékenyítése [1-8: minták, 100bp, 200 bp: méretstandardok]

A multiplex kit tesztelése során – a korábban leírtaknak megfelelően (**7. ábra**) – az alacsony DNS koncentráció fokozott kiegyensúlyozatlan felsokszorozódást, lókuszt- illetve allélkiesést eredményezett. A részleges genetikai profil jelentette kockázat figyelembe vételével (**F45. ábra**) 35 PCR ciklus alkalmazása mellett 100-200 pg templát DNS kimutatása elérhető volt (**17. ábra**).



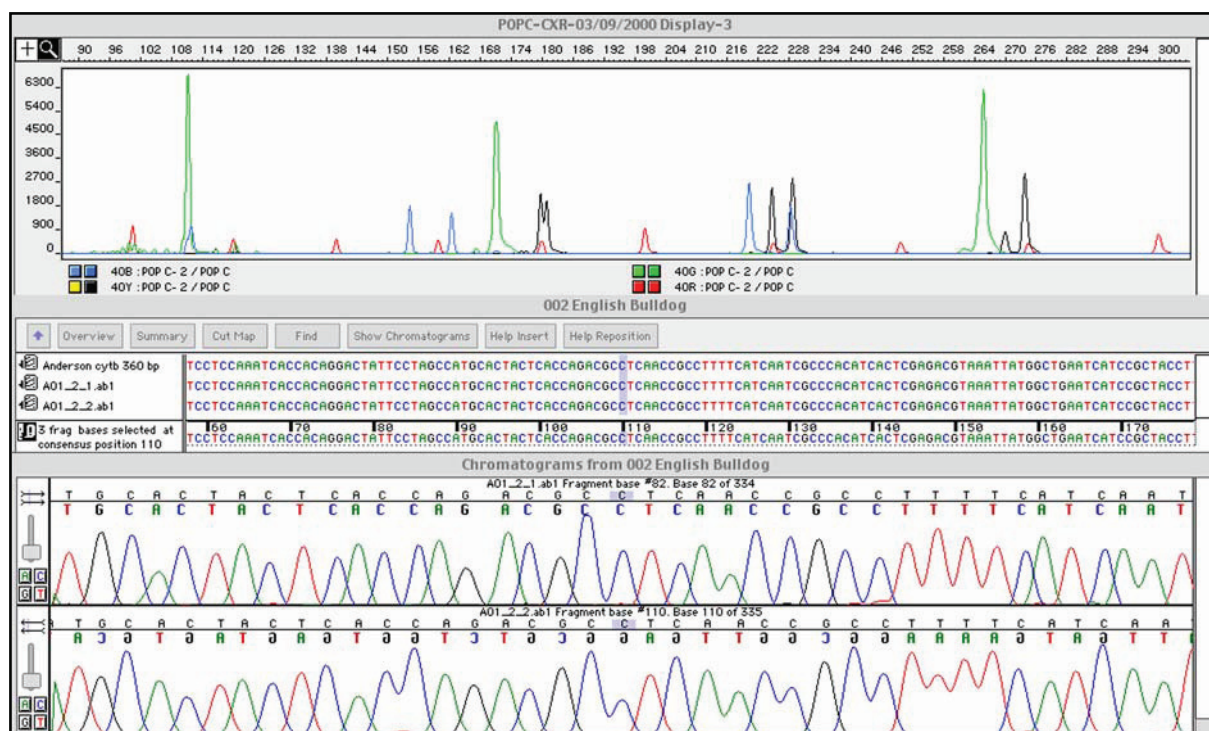
1-5: minták, L: méretstandardok
 1: 2 ng templát DNS
 2: 1 ng templát DNS
 3: 0,5 ng templát DNS
 4: 0,2 ng templát DNS
 5: 0,1 ng templát DNS

17. ábra Multiplex PCR reakció érzékenységének tesztelése [Σ 35 ciklus]

6.3.3. Faji eredet meghatározása – keveredések vizsgálata

A kriminalisztikai eseti minták fiziológias mintához hasonló „homogén” formában ritkán állnak rendelkezésre, leggyakrabban kevert faji eredettel – pl. prokarióta-eukarióta, taxon-taxon keveredések – kell számolni. A számtalan lehetőség közül munkám során a kutya-ember eredetű mintakeveredést teszteltem. A vizsgálatok mitokondriális szekvencia analízis és nukleáris fragmensanalízis szinten kerültek kivitelezésre. A laboratóriumi kevert

minták mellett vizsgált, kitépéssel biztosított szőrszálakból nyert DNS extraktumból – a kutya specifikus nukleáris genetikai profil megállapítása ellenére – a térben és időben elkülönített *cytochrome b* szekvencia analízis konzervatív primer párokkal humán homológiát mutatott ki (18. ábra).

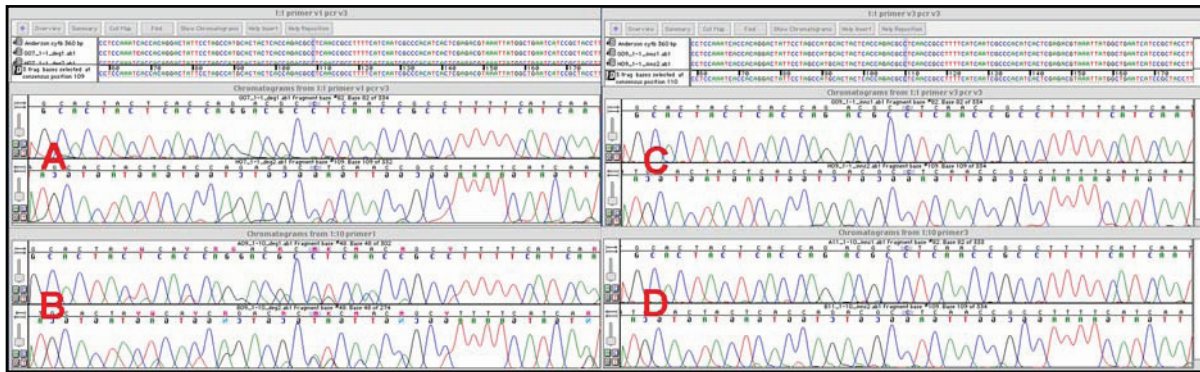


18. ábra Kitépelt szőrszálakból nyert DNS vizsgálata nukleáris- és *cytochrome b* primerekkel

6.3.3.1. *Cytochrome b* génszakasz

Az emberi illetve kutya eredetű DNS extraktumok laboratóriumi úton előállított keveredését degenerált primer párral (Egyed és mtsai, 2003) és konzervatív primerekkel (Bartlett és mtsai, 1992, Parson és mtsai, 2000) teszteltem (F37-F39. ábra). A vizsgálati eredmények alapján a kevert faji eredet – primerektől függően eltérő mértékben – csak kutya DNS többségi jelenléte esetén mutatható ki (19. ábra).

Degenerált primer pár alkalmazásával az azonos arányban jelenlévő kutya eredetű DNS-t jellemző szekvenciális pozíciók a detektált emberi mitotípus kromatogramjában helyenként gyengén, nem konszenzus módon jelennek meg. Kétszeres többségben a kutya-specifikus nukleotidok minor komponensként szinte minden pozícióban azonosíthatók, tipikusan kevert szekvencia azonban csak tízszeres kutya eredetű többség mellett tapasztalható (F37. ábra). A konzervatív primer párok szinte azonos módon érzéketlenek a keveredésekre, a kimutatott mitotípusok a nagyságrendi többség ellenére gyakorlatilag tiszta emberi homológiaként értékelhetők (F38-F39. ábra).



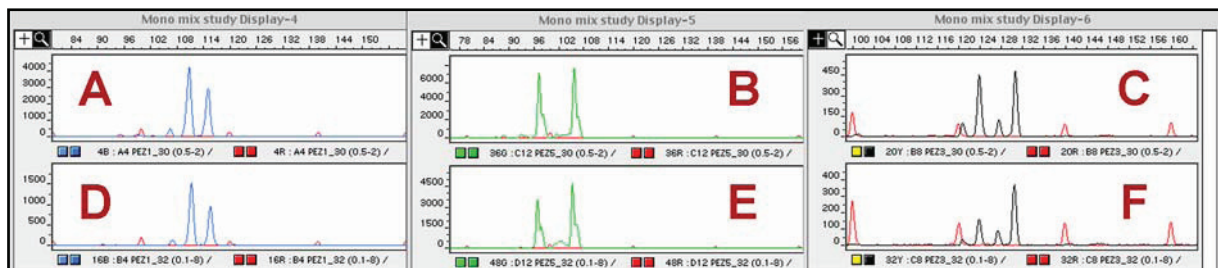
19. ábra Kevert faji – ember és kutya – eredetű DNS vizsgálata különböző *cytochrome b* primerekkel [A: degenerált primerek, 1:1 keveredés, B: degenerált primerek, 1:10 keveredés, C: konzervatív primerek, 1:1 keveredés, D: konzervatív primerek, 1:10 keveredés]

6.3.3.2. STR lókuszek

A laboratóriumi úton előállított keveredések kutya specifikus STR analízise során a multiplex kit tesztelése mellett a confirmáció lehetőségére is tekintettel csak a három legrövidebb fragmenstartomány – PEZ1, PEZ5 és PEZ3 lókuszek – érzékenységét vizsgáltam (F40-F45. ábra). Az alkalmazott, nagyságrendileg eltérő komponens arányok (12. táblázat) ellenére, a kisebbségben jelenlévő kutya eredetű DNS templát a multiplex formában történő felszorzozás során 30 PCR ciklussal is allélvesztés nélkül volt kimutatható (20. ábra).

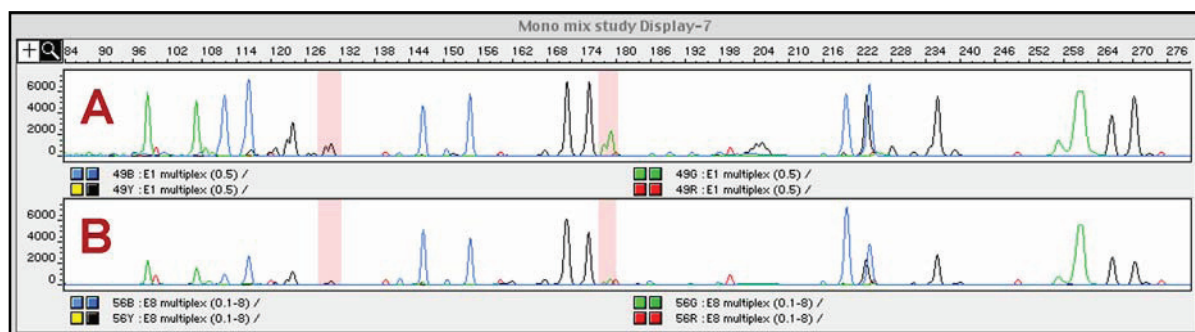
12. táblázat A kevert eredetű DNS minták kimutatási érzékenységének tesztelése során alkalmazott komponens arányok mono- és multiplex vizsgálatok esetén

Minta	1	2	3	4	5	6	7	8
Templát DNS kutya / humán	0,5 ng / 0 ng	0,2 ng / 0 ng	0,1 ng / 0 ng	0,5 ng / 2 ng	0,2 ng / 2 ng	0,1 ng / 2 ng	0,1 ng / 4 ng	0,1 ng / 8 ng



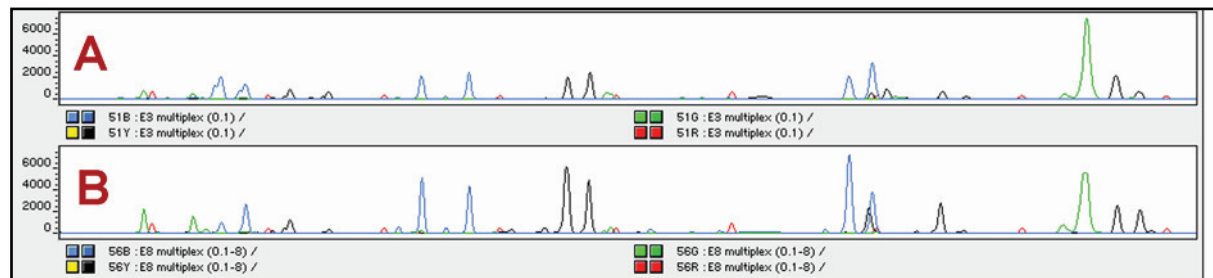
20. ábra Kevert faji – kutya és ember – eredetű DNS vizsgálata multiplex lókuszekkel [30 ciklus, 1:4 keveredés (A: PEZ1 lókus, B: PEZ5 lókus, C: PEZ3 lókus), 32 ciklus, 1:80 keveredés (D: PEZ1 lókus, E: PEZ5 lókus, F: PEZ3 lókus)]

A multiplex kit esetében az alacsony templát koncentrációból fakadó kiegyensúlyozatlanság párosulva a nagy arányú relatív koncentráció különbséggel a magas PCR ciklusszám – 35 ciklus – mellett is allélvesztést eredményezhet (**21. ábra**).



21. ábra Kutya illetve kevert faji – kutya és ember – eredetű DNS vizsgálata multiplex kittel [A: 0,5 ng kutya DNS templát, B: 0,1 ng kutya DNS templát, 1:80 keveredés, színes sáv: lehetséges allélvesztés]

Az alsó kimutatási küszöbérték – 100 pg kutya DNS templát – keveredésekben történt tesztelése során az emberi eredetű DNS reakció erősítő hatása – *PCR enhancer* – mind a monoplex, mind pedig a multiplex (**22. ábra**) PCR esetében megfigyelhető volt.



22. ábra Kutya illetve kevert faji – kutya és ember – eredetű DNS vizsgálata multiplex kittel [A: 0,1 ng kutya DNS templát, B: 0,1 ng kutya DNS templát, 1:80 keveredés]

6.3.4. Esetek mintáinak vizsgálati eredménye

6.3.4.1. A „krematórium” eset

Az égett csontmaradványokból detektált szekvenciák és a referencia-szekvenciák között megállapított azonosságok bizonyossággal határos valószínűséggel alátámasztják azt a feltételezést, hogy a vizsgált csontmaradványok kutyától származnak.

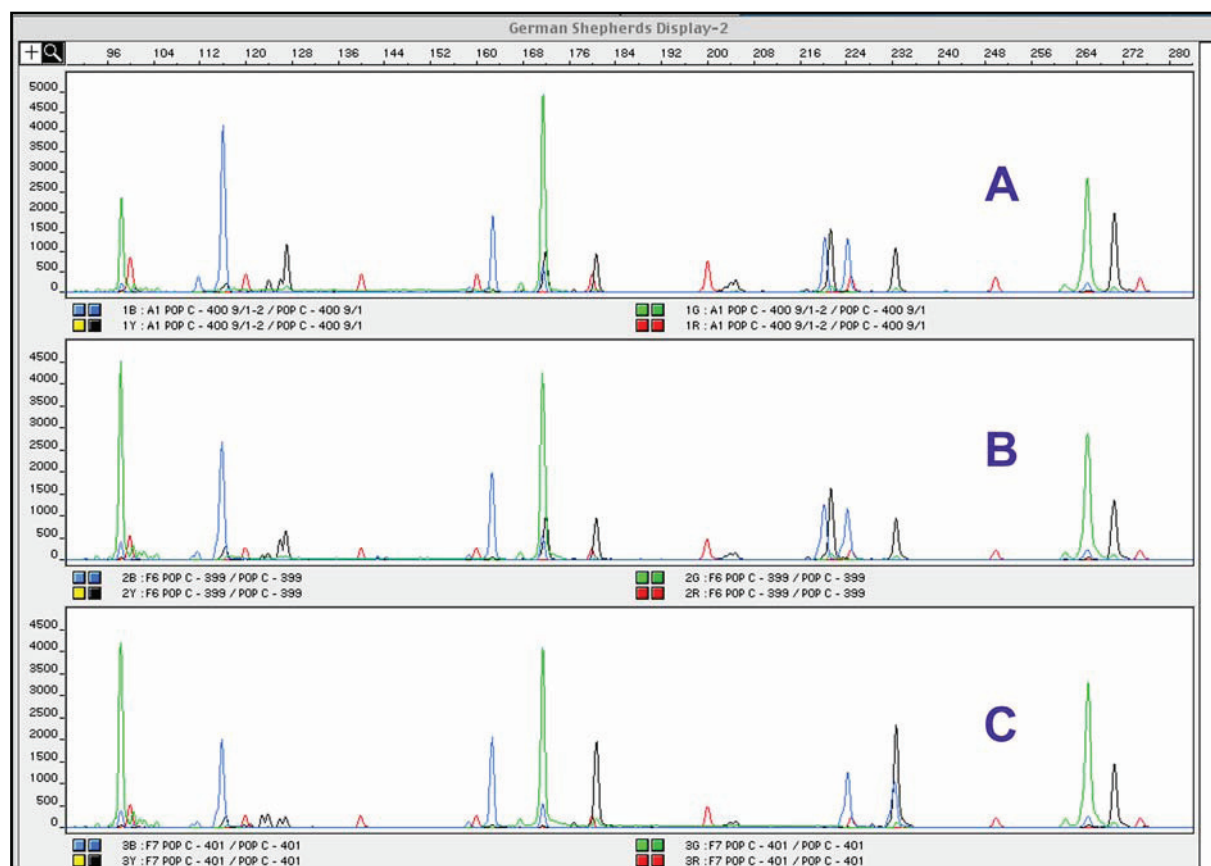
6.3.4.2. Súlyos testi sértés

A vizsgált biológiai anyagmaradványok kutyától származnak. A bűnjelmintákból – potenciális nyálszennyeződések – kimutatott genetikai profilokban a megfelelő

lókuszokon detektált fragmensek – allélok – egyezése nagy valószínűséggel alátámasztja azt a feltételezést, hogy azok egy egyedtől származnak. Az összehasonlító nyálmintából kimutatott genetikai profilban a megfelelő lókuszokon detektált allélok megegyeznek a bűnjelmintákból kimutatott genetikai profillal, így alátámasztják azt a feltételezést, hogy a sértetti ruházaton fellelt, kutyától származó biológiai anyagmaradványok az adott egyedtől származnak.

6.3.4.3. Alomellenőrzés

A „G. A. senior” nevű kan biológiai apasága a „G. A. junior” nevű kölyök vonatkozásában a genetikai vizsgálatok összesített eredménye alapján nem zárható ki. Korrekt valószínűségi érték a leszármazás vonatkozásában a magyarországi fajta-populáció genetikai-statisztikai felmérésének hiányában nem adható meg. Tekintettel a „N. W.” nevű szuka és kölykének megegyező genetikai profiljára (23. ábra), bizonyos állományokban illetve tenyészvonalakban nagymértékű beltenyésztés valószínűsíthető, ami a közeli rokon – esetlegesen kan és kölyke – egyedek megkülönböztetését az adott lókuszkészlettel nem teszi lehetővé.

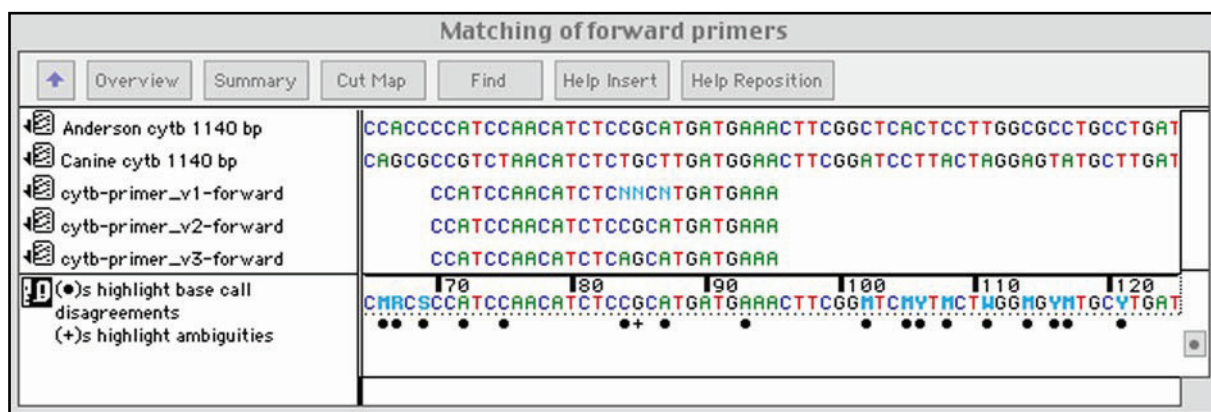


23. ábra Alomellenőrző vizsgálat eredménye német juhászkutya állományban [A: szuka, B: kölyök, C: kan]

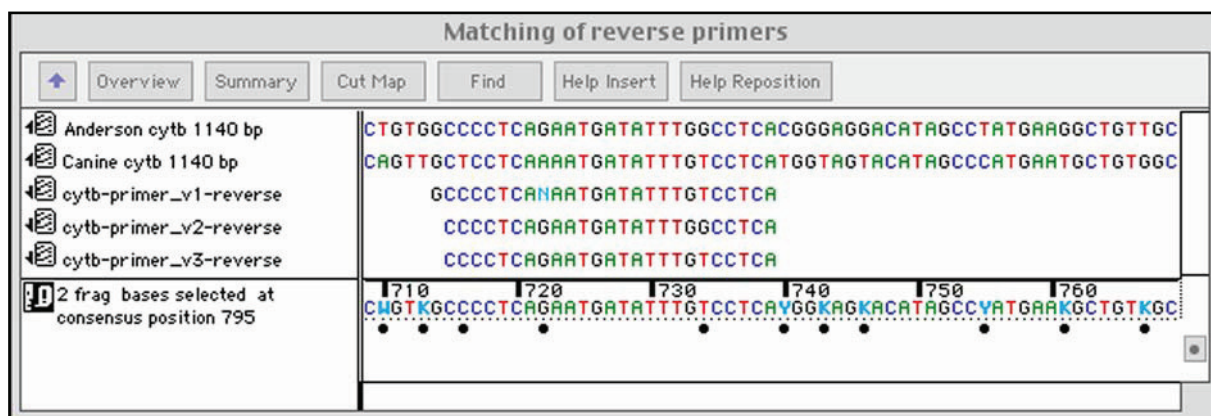
7. KÖVETKEZTETÉSEK

7.1. A faji eredet meghatározása

A *cytochrome b* gén fajok között leginkább szekvenciális eltéréseket mutató, definiált szakasza több éve biztosít lehetőséget faji eredet vizsgálatára (Kocher, 1989). Az igazságügyi gyakorlatban leginkább elterjedt, viszonylag konzervatív szekvencia-intervallumra illesztett primer párok (Bartlett, 1992) azonban a módosítások (Parson, 2000) ellenére is emberi *cytochrome b* komplementaritással rendelkeznek, ugyanakkor a kutyák esetében a *forward* primerek öt-öt pozícióban, a *reverse* primerek két- illetve három pozícióban deviálnak (**24.a-b. ábra**). Az általunk tervezett degenerált primer pár (Egyed, 2003) ezeket az eltéréseket a *forward* primer esetében három pozícióra, a *reverse* primer esetében egy bázispárral megnövelt hossz mellett két pozícióra redukálja.



24.a. ábra A *forward* primerek emberi- és kutya *Cytb* szekvenciához viszonyított eltérései [v1: degenerált primer (Egyed, 2003), v2: humán komplementer primer (Bartlett, 1992), v3: módosított humán komplementer primer (Parson, 2000)]



24.b. ábra A *reverse* primerek emberi- és kutya *Cytb* szekvenciához viszonyított eltérései

A primerek inkomplementaritásából fakadó anellációs – amplifikálódási – elégtelenségek csökkentése, kiküszöbölése érdekében végrehajtott PCR protokoll módosítások következményeképpen a pozícionális bizonytalanságok nagyrészt megszűntek. A változtatásoknak

köszönhetően a degenerált primerekkel egyértelmű, verifikálásra alkalmas szekvenciák nyerhetők, melyek a génbank referenciák alapján kutya *cytochrome b* gén homológiával, mitokondriális genomként azonosíthatók, ugyanakkor szignifikánsan eltérnek a konzervatív primerekkel kimutatott szekvenciáktól. A szakaszon belül mutáció eredményezte nukleotid szubsztitúció is megfigyelhető (**F5. ábra**), amelynek esetleges polimorfizmusát – SNP jellegét – további vizsgálatok igazolhatják.

Habár a konzervatív primerek által detektált szekvenciák *cytochrome b* gén homológiája is a *Canidae* taxon vonatkozásában a legnagyobb, tisztán mitokondriális genomból – szőrszálak száli része – nem vizsgálhatók. Fentiek alapján ezen szakaszok mint pszeudogének a nukleáris genom részét képezik (Ishiguro, 2005), ami inszercióval – transzpozíciós elemként – a genom számos helyére – pl. „junk” DNS – multiplikálódhat.

A többkópiás előfordulás valószínűségét támasztják alá azok a heteroplazmia – azonos pozícióban együttesen detektálható különböző nukleotidok – jellegű pozíciók, melyek bizonyos mértékben olyan fajtaspecifikus jelleggel is rendelkezhetnek, mint a 1140/216 pozíció C/T eltérései a német juhász illetve rottweiler mintacsoport esetében.

Az eredmények alapján nem zárható ki, hogy a mitokondriális *cytochrome b* gén konzervatív jellegének gyengülése valamint multiplikálódása a nukleáris genomban fajta- vagy fajtacsoport kizárására, esetleges valószínűsítésére alkalmas kiegészítő információt is szolgáltat, azonban a feltételezés megerősítéséhez további vizsgálatokra van szükség.

7.2. Az egyed azonosságának megállapítása

Az igazságügyi célra alkalmazott polimorf STR markereknek speciális kritériumoknak is meg kell felelniük. Jól definiáltaknak, egyértelműen és reprodukálhatóan meghatározhatóknak, azonosíthatóknak kell lenniük, lehetőleg magas fokú polimorfizmussal rendelkezzenek, genetikai kapcsoltság nélkül. Technikai szempontból megfelelően érzékeny, standardizálható vizsgálati módszert igényeljenek, az eredmények interpretálását adekvát populáció genetikai-genetika statisztikai elemzések támasszák alá.

7.2.1. Az alkalmazott markerek definiálása

A „*flanking*” régiót is tartalmazó szekvenálási eredmények alapján a vizsgált STR lókuszek három csoportba sorolhatók. Egyszerű ismétlődésű motívumokkal a PEZ1 (CATA₁), PEZ5, FHC2010 és FHC2079 lókuszt, összetett ismétlődésű motívumokkal a PEZ3, PEZ8, PEZ12, PEZ20 és FHC2054 lókuszt, komplex, hipervariábilis motívummal a PEZ6 lókuszt rendelkezik. A trimer PEZ3 lókuszt kivételével az összes lókuszt tetramer ismétlődések strukturálják. A PEZ3 lókuszt a korábbi referenciák (Neff, 1999) tetramer-, a PEZ1 lókuszt dimer-repetíciós szakaszként írják le, de ezt az elemzett szekvenciák egyértelműen kizárják. A

lókuszok kromoszómális lokalizációja napjainkra tisztázásra került (Lindblad-Toh, 2005), a PEZ1 lókusz CATA₁ néven is referált. Köztes allélok manifesztációja részben a *flanking* régiók deléciós és addíciós mutációjának – pl. PEZ8, FHC2054 lókuszok –, részben a *flanking*- és repetitív régiókban együttesen megnyilvánuló deléciós, inszerciós változat-oknak – pl. PEZ12, PEZ6 lókuszok – köszönhető, mely legnagyobb számban a PEZ6 lókuszon figyelhető meg. Azonos hossz mellett megnyilvánuló szekvenciális változékonyság a határoló – pl. PEZ1 lókusz – illetve az ismétlődő régióban – pl. FHC2054, PEZ20, PEZ12 lókuszok – egyaránt előfordul (**F13-F22. ábra**).

A szekvenciák alapján egyértelmű, a szakmai ajánlásoknak megfelelő (Budowle, 2005), laboratóriumok közötti adatcserére és összehasonlításra alkalmas allél-nevezéktan alakítható ki, ami nemzetközi törvényszéki alkalmazásra javasolható. A repeat alapú nomenklatúra a PEZ12, FHC2010, FHC2079 és FHC2054 lókuszok esetében megegyezik az időközben publikált javaslatokkal (Eichmann, 2004), de a PEZ6 lókusz esetében az interallélikus gyakoriság minimalizálása érdekében a komplex polimorf régió önkényesen kijelölt végpontjait egy és két bázispárral eltérően toltam el. A módosítás következtében az allélgyakoriság eloszlás az intermedier allélok túlsúlyáról áttolódott, az allél meghatározás – „*allele calling*” – egyszerűsödött (**F26.h. ábra, F27.h. ábra**). A vizsgált többi lókusszal kapcsolatban referálható nevezéktan ajánlás jelenleg nem áll rendelkezésre. Ennek hiányában a diszkrét tulajdonságok számszerűsége csupán a várható allélikus mérettartomány – „*allele sizing*” – alapján becsülhető bizonyos mértékben, de az összevethetőség a nem azonos belső méretstandardok alkalmazása (**F24.a-b. táblázat**), a köztes allélok előfordulása és az esetleges mérettartomány átfedés (**F22. ábra**) miatt nem lehetséges. Az adott lókuszok jelentős tartománybeli eltérése (**5. táblázat**) alapján azonban már gyanítható, hogy eltérő mintacsoportokban a polimorfizmus mértéke kifejezetten különbözhet.

Fentiek alapján a különböző laboratóriumokban meghatározott genetikai profilok egymásnak még kiegészítő információk birtokában is csak nehezen illetve egyáltalán nem feleltethetők meg.

7.2.2. Technikai, módszertani jellemzők

A StockMarks[®] Canine I Ver 3 kit alapvetően alomellenőrzési céllal – *American Kennel Club* ajánlással – került kereskedelmi forgalomba (Halverson, 2005). Nagy templát-igényének – vö. a 10 lókuszos multiplex PCR mixben a DNS templát-koncentráció intervalluma 1-10 ng/μl a StockMarks[®] Canine kit, 0,02-0,04 ng/μl az AmpflSTR[™] Profiler Plus[™] Human kit esetén – standardizálása a viszonylag homogén, mennyiségileg kevésbé korlátozott referencia minták lehetőségére épül. A 20 db primer keveréke nem tökéletesen

optimalizált egyetlen annealing hőmérsékletre, így a kit az amplifikáció specificitását magas templát-koncentráció mellett alkalmazott „*touchdown*” PCR protokollal (Applied Biosystems, 2003) kívánja kompenzálni.

A kevesebb kiindulási DNS mennyiség illetve az eltérő primer affinitás által indukált sokszorozási egyenetlenségek allél- és lókusztípusonként (4. táblázat), termék-kiyensúlyozatlansággal (9. ábra) járnak, melyek a tipikus preferenciális amplifikálódástól eltérően nem korrelálnak a fragmensmérettel. A nem adekvát primer kötődés a „NED” fluoreszcens csatornán belül a PEZ3 lókusztípusában olyan nem allélikus eredetű fragmensek megjelenéséhez vezethet (10. ábra), melyek összefüggését a PEZ3-primerekkel a monoplex vizsgálatok nem támasztják alá (F36. ábra). A nem tökéletes adenilálódás (Magnuson és mtsai, 1996) elkerülése érdekében a kit standard protokollját – 72°C, 30 perc (Applied Biosystems, 2001) – később módosították – 60°C, 60 perc (Applied Biosystems, 2003) –, de a leginkább PEZ3 és PEZ5 lókusztípusoknál előforduló jelenség teljes mértékű kiküszöbölése nem mindig eredményes. A kettős detektálási csúcsok egy bázispárnyi különbséggel rendelkező interallélok megkülönböztetését rendkívül megnehezíthetik, nem kellő körültekintéssel téves genotipizáláshoz is vezethetnek. Habár az érintett lókusztípusok esetében intermedier allélokat nem figyeltem meg, a referencia allélokat tartalmazó alléllétrák reamplifikálásához a *reverse* primerek 5' végének GTTCTT– „*pig-tailing*” – addíciójával (Butler, 2001) rendelkező primerek javasolhatók (F25.d. ábra).

Monoplex formában a lókusztípusok megfelelően beállított reakciómix használatával *touchdown* jelleg nélkül, lényegesen kevesebb kiindulási DNS – 0,1-1 ng/μl – szükséglettel, valamint az addicionális amplifikációs artifaktumok esélyét jelentősen csökkentő, alacsonyabb– 30 PCR ciklus – ciklusszámmal is sikeresen sokszorozhatók (12.b. ábra).

A detektálható fragmensek méret-meghatározásához – *allele sizing* – a kit-protokollban GeneScanTM-500 ROXTM belső méretstandard javasolt. Habár az egynukleotidos detektálási felbontás általában a négyszáz bázispár tartományba tartozó fragmenshosszaknál is elérhető, az egy adott – leginkább komplex szerkezetű – allél esetén megnyilvánuló legnagyobb és legkisebb méret különbsége meghaladhatja a 0,5 bázispárt (Eichmann, 2005). A méret-meghatározás pontosságának tesztelését a GENESCAN[®] 400HD [ROX] (Applied Biosystems) és Internal Lane Standard 600 – korábban Fluorescent Ladder (CXR), 60-400 Bases névvel (Promega Corp) forgalmazott – belső méretstandardokkal (F9. ábra) is elvégezve az abszolút hosszakhoz viszonyított mérethűség leginkább GS400HD illetve GS500 standardokat jellemezte, ugyanakkor a relatív méretek szórása szignifikáns módon az ILS600 alkalmazásával adódott legkisebbnek (7. táblázat).

Mivel az allélmeghatározás – *allele calling* – alapjául referencia allélkoktéllok szolgálnak, a valódi – szekvenált nukleotidok számával megegyező – hossz pontossága nem elsődleges kritérium (**F10. ábra**). A méretezett fragmenseknek azonban méret-eltéréseiket – szórás értékek – is beleértve a szemiautomata genotipizáláshoz szükséges méretezési tartományba – $\pm 0,5$ bázispár „*allele size window*” – kell esniük, ami különösen az intermedier allélokat tartalmazó lókuszok – pl. PEZ6, PEZ8 – esetén elengedhetetlen. Az előállított allélkoktéllokat (**F23. ábra**) GeneScanTM-500 ROXTM helyett Internal Lane Standard 600 belső méretstandarddal használva a köztes allélok is biztonsággal tipizálhatók (**F25.f., h., i. ábra**).

7.2.3. Populáció elemzések

Az allélgyakorisági értékek megoszlási adatai (**F27.b., i., j. ábra**) a szaporodás-közösségek – még inkább a befolyásolt, irányított szaporodásközösségek – sajátosságait, egymással szemben fennálló különbségeit támasztják alá (**8. táblázat**).

Az összes vizsgált minta alapján, a genetikai diverzitás jellemzésére szolgáló PIC – polimorfizmus információ tartalom – értékekre figyelemmel a markerek közül leginkább polimorfnek a PEZ6 lókusz bizonyult, ami feltehetően szerkezetbeli komplexitásának, nagyszámú – a lókuszok között legtöbb, 20 megfigyelt – intermedier alléljának is köszönhető. Egy adott lókuszon az alacsony allélszám illetve egy vagy két allél kiemelkedő gyakorisága egyaránt alacsony PIC értéket produkál, így a marker- és populáció-függő értékek az eredményeimmel (**F28.a-b. táblázat**) analóg módon, széles tartományban variálhatnak (Fantin, 1996, Altet, 2001), ugyanakkor vegyes állományban esetenként hasonlóképpen alakulhatnak (Eichmann, 2005).

Habár a mikrovariáns allélok tendenciózus megjelenése megnövekedett mutációs rátával párosulva korrelációt mutathat a magasabb fokú polimorfizmussal (Moller, 1994, Brinkmann, 1995), megjegyzendő, hogy a PEZ8 lókusz jóval kevésbé kifejezett interallélikus jellege – 7 megfigyelt köztes típus – ellenére is a PEZ6 lókuszéval közel azonos polimorfizmus információ tartalommal bír, amely felülmúlja a PEZ12 lókusz variáns allélok alapján – 16 megfigyelt típus – várt hipotetikus polimorfizmusát. A három lókuszon megfigyelt konszenzus – teljes ismétlődésekkel jellemezhető – allélok számának – 10-10 – egyezése alapján valószínűsíthető, hogy az intermedier allélok megjelenése a polimorfizmus fokát általánosságban nem számottevően befolyásolja, annak mértékében megnyilvánuló eltérések sokkal inkább a szaporodás-közösségekben – így akár azonos fajták lokális populációjában – végbemenő genetikai drift illetve fixálódás következményeképp jönnek létre. Nem zárható ugyanakkor ki a megegyező méretű, szekvenciális különbséggel

rendelkező allélváltozatok befolyásoló hatása sem, de jelen esetben csupán fragmenshossz alapján a variáns allélok 20%-a nem különíthető el (F13., F14., F17., F18., F19. ábra).

A konvencionális értelemben nem génként kezelendő, mendeli öröklődésű polimorf markerek allélgyakoriság állandóságának összefüggését Hardy-Weinberg egyensúlynak nevezik. A lókusztok összességén vizsgált egyensúly HWE és LD tesztelése esetén a lókusztok egyazon hipotézis elvégzett tesztorozatának részesei, így a tesztorozat szignifikancia-szintje – kísérleti jellegű hibaráta – annak a valószínűsége, hogy a tesztek közül legalább egy az igaz nullhipotézis elvetését okozza. A hipotézis hamis elvetésének elkerülése érdekében a HWE 10 tesztből álló tesztorozata esetén az egyedi tesztelések korrekciója 0,05 kísérleti hibarátához rendelt 0,005 egyedi szignifikancia-szint alkalmazását jelenti (Weir, 1996). Amennyiben mindegyik lókuszt valószínűségi értéke meghaladja a tesztorozatok egyedi szignifikancia-szintjét, a nullhipotézis egyik mintára sem vethető el, ha az egyensúlyt a populáció teljes genomiális szintjén vizsgáljuk.

A HWE nullhipotézis tesztelt valószínűségének szignifikáns eltérései az összes mintát tartalmazó populációban a csoport heterogén voltának – elkülönült szubpopulációk – köszönhetőek (Evett, 1998). A két fajtacsoport kisebb devianciájánál a Wahlund-hatás mellett a mintavételi bizonytalanság – *sampling effect* – az alacsony mintaszám miatt nagyobb mértékben érvényesül. A német juhászkutya mintacsoport két lókuszon tapasztalt erős devianciájára összetett oksági összefüggések szolgáltathatnak magyarázatot, melyek között az alacsony mintaszám, az ún. „ritka kan hatás” szelektív fedeztetés miatti erősödése, a kanok és szukák közötti eltérő allélgyakoriság, a magas mutációs ráta, a genotípusosan eltérő populációból történő nagy mértékű allélmigráció illetve a genotípust vagy genotípus kombinációkat érintő szelekció – ismert vagy nem ismert *marker assisted selection* (MAS) – esetleg egyéb, allélszegregációs mechanizmusok említhetők. A kérdés pontos tisztázásához a fajta hiteles pedigrével rendelkező, nagyobb számú mintacsoportjának vizsgálata szükséges.

A természetes populációkban megfigyelhető LD a demográfiai háttér és a genetikai tényezők egymásra gyakorolt komplex befolyásának eredménye. Bonferroni-eljárással a LD tesztorozatok – 45 teszt – egyedi szignifikancia-szintjének korrekciója 5%-os kísérleti hibaráta fenntartása érdekében 0,001 értékre történt. A tacsó fajtacsoport mintában a valószínűségi értékek minden tesztben meghaladták az egyedi szignifikancia-szintet, azonban a többi populáció – jellemzően leginkább a német juhászkutya mintacsoport – esetében 1-4 olyan lókusztópár volt, ahol az egyedi szignifikancia-szintnél kisebbnek bizonyult a kalkulált valószínűség. Fentiek alapján feltételezhető, hogy ezekben a populációs mintákban genom szinten *linkage disequilibrium* van, ugyanakkor bizonyos vegyes állományokban – a fennálló heterozigotizációs deficit ellenére – sem állapítható meg lókusztok közötti kapcsolttság

(Eichmann, 2005). Mivel a fizikai kapcsoltság különböző kromoszómális lokalizáció esetén nem áll fenn, az asszociációért demográfiai hatások, eltérő allélgyakoriság eloszlással rendelkező földrajzi, területi szubdivíziók illetve azok keveredése, a palacknyak effektus és nem utolsósorban a természetes- és irányított szelekció felelős.

A LD vizsgálatok során az EM-algoritmus genotípusos adatokra vonatkozó valószínűségi hányadosának tesztelési feltétele a gamétafázisukban nem ismert genotípusok HW-egyensúlynak megfelelő populációs-eloszlása (Schneider, 2000). Fentiek alapján az eredmények kiértékelésénél figyelembe kell venni, hogy a LD-teszt akkor is elvetheti az allélok lókuszek közötti függetlenségének hipotézisét, ha a populáció a vizsgált lókuszon a HW-egyensúlytól jelentősen deviál (Excoffier, 1998). Az exact teszttel a rottweiler populációs mintában Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés nem volt tapasztalható, ugyanakkor a kimutatott kis számú – a lókuszpárok 15,5%-át érintő – szignifikancia a feltételezett homogenitás ellenére két esetben is kifejezett mértékben jelentkezett. A német juhászkutya fajtapopuláció mintában az exact teszt jelentős deviációt két lókuszon jelzett, és a nagyszámú – a lókuszpárok 53,3%-át érintő – szignifikáns eltérés közül 12 olyan lókuszek között volt észlelhető, amelyek közül legalább az egyik a két HW disequilibriumot mutató lókuszból került ki. Ezekben az esetekben bizonyos mértékben elképzelhető, hogy a lókuszekon belül megfigyelt allélikus asszociáció a statisztika torzításával hozzájárult a LE hipotézis téves elvetéséhez. A kérdés tisztázásához további elemzésekre van szükség (**F29. ábra**).

A vizsgált magyarországi kutya populációs minta genetikai strukturáltságának, varianciájának tesztelése mind fenotípusos, mind pedig molekuláris szinten jól definiált heterogenitást támaszt alá, mely legnagyobb mértékben a két fajtapopuláció vonatkozásában tapasztalható (**9. táblázat**). A lókuszonként némiképp változó mértékű szignifikancia és a molekuláris variancia fenotípusos varianciánál moderáltabb inhomogenitása általában véve is erőteljesen megnyilvánul. A genetikai változatosság populáción belüli érvényesülése mellett a populációk közötti megoszlás mértékének legalacsonyabb – PEZ6 lókuszból – szélső értéke is felülmúlja a humán analógiákat, ami diszkrét szaporodásközösségek fennállását jelzi. A FHC2079 lókuszból kiemelkedő (**9. táblázat**) interpopulációs varianciája – mely a többi lókusztól eltérően molekuláris szinten még inkább kifejezett –, a mintacsoportokban kialakult sajátos allélgyakorisági eloszlások – egy- ill. kétcsúcsos görbék (**F27.j. ábra**) – hatásával indokolható. A genetikai tagoltság terén a fajtacsoportok és a vegyes állomány közötti viszonylagos hasonlóság – kevesebb szignifikáns eltérés – feltehetően a fajtacsoportokon belül is meglévő szubstrukturálódásnak köszönhető, ennek ellenére velük kapcsolatban teljes analógiáról nem beszélhetünk.

A random párosodás korlátozottsága miatt a homozigotizáció mértékének növekedésével kisebb genetikai változatossággal rendelkező szubdivíziók jönnek létre. A populáción

belül fixálódott variancia jellemzésére szolgáló, az egyed különböző típusú tulajdonságainak közös eredetére vonatkozó beltenyésztési koefficiensek – F_{IS} illetve F_{IT} – valamint a szubpopulációk genetikai divergenciáját, különböző egyedek azonos típusú tulajdonságainak közös eredetét valószínűsítő közös leszármazási együttható – F_{ST} – konfidencia tartományba eső értékei tendenciájukban amerikai felmérésekkel (Halverson, 2005) korrelálnak, az eltérések a mintaszámra, fajtaösszetételre és a lókusz készletre vezethetők vissza (**F30. táblázat**). A kifejezetten szubstrukturáltak mutatkozó magyarországi populációs mintában a közös leszármazás allélgyakoriságok alapján tesztelt varianciája minden esetben meghaladta az allélok molekuláris szerkezetéből fakadó mértéket (**10. táblázat**). Mindez a matematikai távolság-mátrixokat elemző, eltérő mutációs modellekre alkalmazott statisztikai algoritmusok különbségéből adódhat, ami az „X” és az „X-1” illetve „X-5” repetíciót tartalmazó allélok gyakoriságát a mutációs valószínűség vonatkozásában más módon értelmezi.

A panmixis ellenében ható irányított és korlátozott szaporodás-szaporítás a megnövekedett homozigóta aránnyal rendelkező beltenyészetek kialakulását segíti elő, ami a két vizsgált fajtapopuláció közül a német juhászkutya állományban jóval kifejezettebb, mint a rottweilerekénél. A genotípus gyakoriságok heterozigóta-hiánya alapján kalkulált beltenyésztési koefficiensek (**F31. táblázat**) rottweiler és tacsó állományban tapasztalt negatív értékei heterozigóta hatásnak – *outbreeding* – tulajdoníthatók, de a tacsó mintacsoportnál mintavételi hiba – tacsóra hasonlító egyed tacsóként történő azonosítása – sem zárható ki. A vegyes állományok értékelésénél figyelembe kell vennünk, hogy azok random szaporodásközösségként, – a fennálló HW disequilibrium miatt gyakorlatilag valódi szaporodásközösségként – populációgenetikai szempontból nem értelmezhetők. A schnauzer mintacsoport alacsony mintaszámmal párosuló fajta-heterogenitása, HWE diszkrepanciái illetve a csoportot alkotó fajtákban fixálódott beltenyészettség egyaránt hozzájárulhatott a koefficiens viszonylag magas értékéhez, de ennek tisztázása további vizsgálatokat igényel.

A populációs vizsgálatok összessége nagymértékben alátámasztja azt a feltételezést, hogy a fajták illetve azok regionális tenyésztői szokások, stratégiák által befolyásolt demográfiai története a lokális kutyapopulációkban jelentős genetikai sruktúráltságot hoz létre. A különbségek nemcsak a fajták között, hanem esetlegesen azonos fajták szubpopulációi, tenyészvonalai között is kifejeződnek, így a polimorfizmus-jellemzők szempontjából azok egymásnak való megfeleltetése, helyettesítése nem célravezető. Kizárólagos fajtajellegzetességet marker szinten az eddigi vizsgálatok nem tártak fel, de nem zárható ki, hogy a hiteles fajtapopulációk megfelelő mintaszámú további felmérése és genetikai statisztika analízise többlókuszos profilok esetében a humán etnikai eredet-becslésnél – *Estimating of Ethnic Origin*, EEO – (Klitschar, 2003, Füredi, 2003) magasabb valószínűséget produkálhat. A kor-

rekt magyarországi fajtapopulációk analízise a tapasztalt – és esetlegesen feltárható – Hardy-Weinberg- és/vagy *linkage disequilibriumok* tisztázásához, megalapozott diszkusszálásához is szükséges, melyek hiánya megnehezítheti, illetve ellehetetlenítheti a kutyáktól származó anyagmaradványok genetikai bizonyítékként történő igazságügyi alkalmazását.

7.3. Törvényszéki alkalmazás

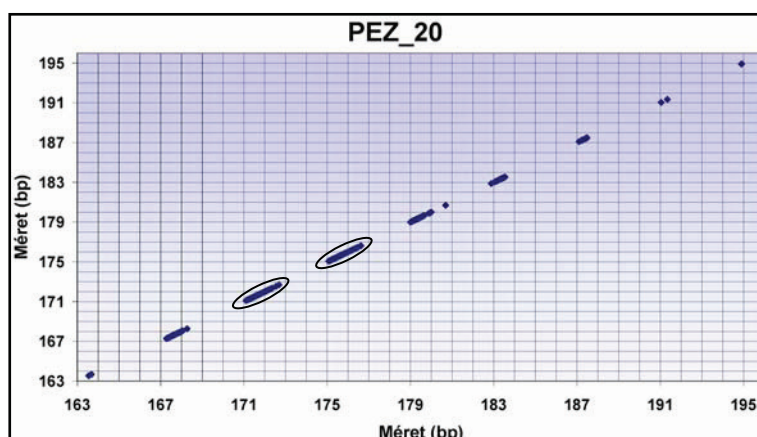
Az igazságügyi genetika érdeklődése a jogalkalmazói igényekre és szakmai kihívásokra reflektálva az elmúlt néhány évben – a humán relevanciák bővülése mellett – fokozott mértékben az állati eredetű biológiai anyagok vizsgálata felé fordult (Budowle, 2005), mivel többek között a kutyákkal kapcsolatos esetek (Eichmann, 2004, Halverson, 2005) szakértői interpretálására a bírósági gyakorlatban (9) is egyre gyakrabban van szükség. Az eseti specialitások mellett érvényesülő generális szempontok részben genetikai-populációgenetikai, részben technikai megalapozottságot igényelnek, melyek alapján a felállított hipotézisek, tárgyi bizonyítékok statisztikai igazolására (Inman, 2001) nyílik lehetőség.

7.3.1. Általános vonatkozások

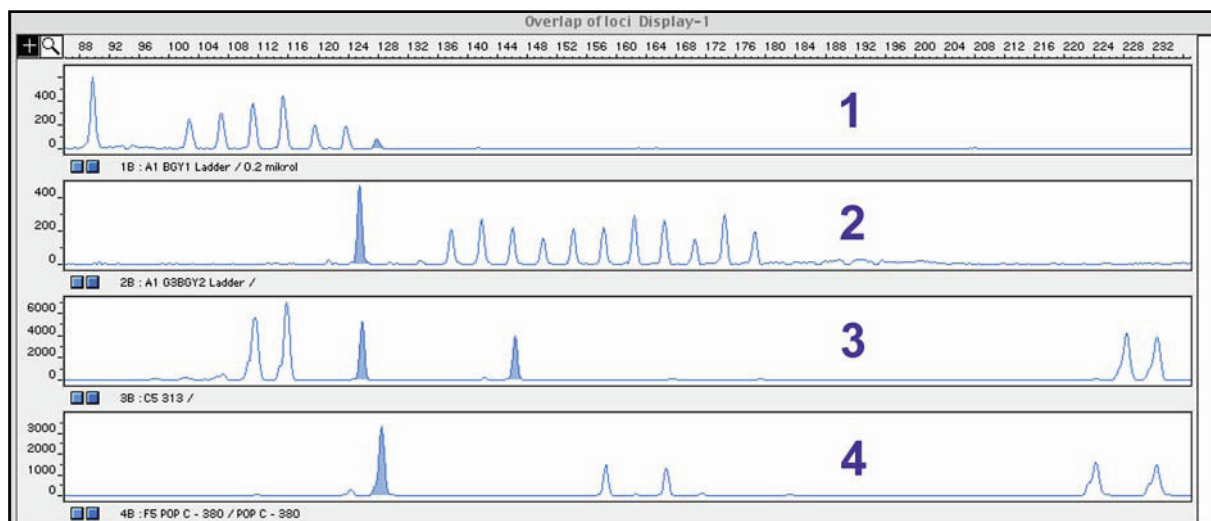
Az utóbbi években világszerte – így Magyarországon is – egyre több laboratórium kezdte el – alapvetően származás ellenőrzési céllal – az állati polimorfizmusok molekuláris genetikai vizsgálatát. A jelenlegi gyakorlatban mindehhez gyakran saját fejlesztésű markerkészletet, analitikai- és viszonyítási körülményeket, azonosító kódokat, elnevezést, adatbázist használnak. Az egyedi inerciarendszerek összevethetetlenségük mellett az ellenőrizhetőség hiányát is magukban foglalják. Ennek veszélyét a laboratóriumok egy része kontrollminták körfelmérésével igyekszik kiküszöbölni, de ez korántsem jelent törvényszéki igényekhez adaptált megfelelést. A genetikai profilban kimutatott tulajdonságok azonosításához egyértelműen tisztázni kell, melyik polimorf marker – kromoszómális lokalizáció – melyik alléljáról – ismétlődő egységek számának megfelelő elnevezés – lehet szó, majd a fragmenseket analitikai eljárással pontosan meg kell határozni. Az alléldetermináció napjainkban a betűkódon – a fragmenshosszat az alléleloszlásnak megfelelően betűvel jelölik – valamint a hossz méreten – az elnevezést az amplikonok elektroforetikus migrációja alapján kalkulált mérete adja – illetve a repetíciószámán – ismétlődő egységek számán – alapuló módszerekkel történik (Budowle, 2005). A méretbeli eltérések kimutatásának analitikai felbontása meglehetősen nagy pontossággal bír, de a kizárólag belső referencia-standardokkal megvalósított alléldefiniálás eltéréseiből (F24.a-c. táblázat) fakadóan az esetenként téves alléltípezés kockázatán kívül a – jogelveket is sérthető – intra- illetve interlaboratoriális összehasonlítás, ellenőrzés nehézségeivel, ellehetetlenülésével is számolni kell. Fentiekkel összhangban a

leginkább biztonságos, hatékony és standardizálható adatértelmezéshez referencia-allélok keverékéből összeállított „koktél” – alléllétra – alkalmazása szükséges (Budowle, 2005).

A kereskedelmi forgalomból nem beszerezhető alléllétrák kifejlesztése és hitelesítése jelentős ráfordításokat igényel, de segítségükkel bizonyos allélok (25. ábra) 0,5 bázispárt is meghaladó (Eichmann, 2005) méretezési– *allele size window* – intervalluma illetve a lókuszek mérettartomány-átfedése ellenére (26. ábra) megbízható allél meghatározás – *allele calling* – érhető el (F25.a-j. táblázat).



25. ábra A PEZ20 lókuszek fragmenseinek méretbeli eloszlása és a méretek szórása CXR 60-400 belső méretstandard használatával



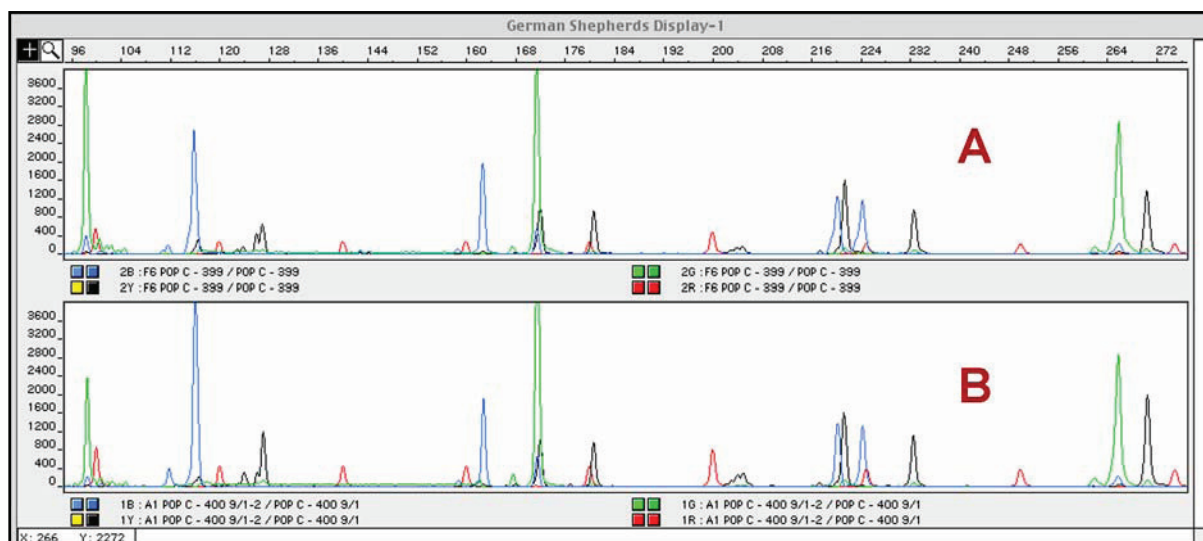
26. ábra Egy fluoreszcens csatornán belüli méretátfedés – PEZ1 és FHC2054 lókuszek [1: PEZ1 allékoktól, 2: FHC2054 allékoktól, 3: 313 sz. minta PEZ1(12/13), FHC2054(6/11), 4: 380 sz. minta PEZ1(16/16), FHC2054(14/16)]

A statisztikai igazolás – a genetikai bizonyíték Bayes-elvű hipotézis-tesztelésének interpretációja – gyakorlati értelemben általában az elkövető által hátrahagyott biológiai nyom genetikai profiljának és a védelem álláspontja szerint ártatlan vádlott genotípusának

véletlenszerű egyezési valószínűségét – pontosabban szólva annak valószínűségi becslését – jelenti, melyhez a kérdéses DNS-profil népességben való előfordulási gyakoriságának ismerete szükséges (Evet, 1998). A profilok frekvenciája – ezáltal az egyezési valószínűség mértéke – ugyanakkor az adott populáció sajátosságaitól függhet (**F27.a-j. ábra**), így a statisztikai kiértékelést az allélgyakorisági adatbázisok alapvetően befolyásolják. Amennyiben az egyezést mutató profil megfigyelésének várt valószínűsége összefügghet – ti. a vádlott és az elkövető azonos populációba tartozhat – a biológiai nyom genotípusának megfigyelési valószínűségével, az egyedek között lehetséges genetikai korreláció – közös őstől való leszármazás – az adott (szub)populációban a biológiai nyom genotípusát a teljes szaporodásközösségben tapasztalnál gyakoribbá teheti. Nagyfokú beltenyésztés esetén a homozigóta genotípusok aránya a HW-egyensúlyi értékhez képest magasabb, így az egyezést mutató homozigóta genotípus megfigyelésének esélye nagyobb, mint az a véletlenszerű párválasztás alapján várható. Fentieknek illetve a kriminalisztikai tapasztalatoknak megfelelően a valószínűségi értékek kalkulációja során a genetikai korreláció hatását kifejező közös leszármazási együttható – F_{ST} – (Balding, 1994) valamint a nem véletlenszerű párválasztást reprezentáló populáción belüli beltenyésztési együttható – F_{IS} – (Ayres, 1999) alkalmazása egyaránt megkövetelt.

A jellemző populáció statisztikai adatokból levonható következtetések a magyarországi fajtapopulációk hiteles mintavétellel – tenyésztői klubok, szervezetek közreműködésével – megvalósított, reprezentatív vizsgálatának további szükségszerűségét támasztják alá. Referencia adatbázisok nélkül a genetikai- és/vagy kapcsoltsági egyensúly hiánya validálható, számszerűsített statisztikai kalkulációt nem tesz lehetővé, a valószínűségi kategóriák szubjektív, tapasztalathiányos alkalmazása merész – szakértői (?) – következtetésekkel, értelmezéssel járhat együtt. Habár 10 lókuszt tartalmazó marker-készlet rottweilerekénél viszonylag mérsékelt, 95,6% kombinált kizárási erő – CPE – mellett is megoldást kínálhat az alomellenőrzési gyakorlatban (Altet, 2001), más fajták – pl. német juhászkutyák – beltenyésztettsége 99,04% CPE ellenére az egyenes ági leszármazás során nem identikus DNS-profilokat eredményezhet (**27. ábra**).

A közeli rokonságból illetve leszármazásból fakadó hatások felerősödése a fajta vonatkozásában nemcsak a 99,99995% kombinált megkülönböztetési erő – CPD – törvényszéki interpretálását módosítja, hanem – a tenyésztői kennelek genetikai adatbázisának, profil-nyilvántartásának hiányában – inkorrekt, esetleg valótlan származás-igazolást tesz lehetővé.



27. ábra Származásellenőrzési vizsgálat során detektált, 10 lókuszon megegyező genetikai profil német juhászkutya állományban [A: szuka, B: kölyök]

7.3.2. Eseti jellegzetességek

Az emberi eredetű biológiai anyagok kriminalisztikai vizsgálatának gyakorlatát követve (FBI Laboratory, 1994, AFDIL, 1999, Butler, 2005) és tapasztalatait felhasználva (Pádár, 1993, Pádár, 2000, Füredi, 2003) a kutyáktól származó biológiai anyagok és anyagmaradványok azonosítása és azonosságának megállapítása megvalósítható. Természetesen a bűnjelminták különleges- éppenséggel egyedi jellegére, a technikai-, módszertani problémákra és hibalehetőségekre, az eredmények összehasonlíthatóságára, statisztikai alátámasztására, standardizálására, validálására tekintettel a humán vonatkozású rendszerek már meglehetősen sok mindent optimalizáltak, de ezek állatokkal kapcsolatos vetülete még napjainkban is rendelkezik fel nem tárt területekkel.

A kriminalisztikai praktikumban, általánosságban előforduló csekély mennyiségű, heterogén – különböző faji eredetű DNS-keveréket tartalmazó – mintákból nyert célszakaszok kutya-specifikus kvantálását lehetővé tevő teszt jelenleg nem áll rendelkezésre. A fajspecifikus STR lókuszek érzékeny – kb. 100-200 pg templát-szükségletű – de biztonságos, alacsony artifaktum rizikót jelentő –, maximum 30-32 PCR ciklussal történő – multiplex amplifikálása törvényszéki esetekben legalább részleges genetikai profil kimutatására, statisztikai mintavétel esetén szűrővizsgálatokra alkalmas (**F36. ábra**). A multiplex kit parciális genotípusainak értelmezése – a lókuszt- és allélkiesések együttes előfordulásának esélye miatt – kis mennyiségű vagy degradált mintából nagy körültekintést és tapasztalatot igényel (**21. ábra**).

Az alsó PCR reakcióküszöb közelében tapasztalható „dropout” gyakoriságát (Lederer, 2001) a multiplex további optimalizálása csökkentheti (Halverson, 2005). A változó –

leggyakrabban nyál és szőr – eseti mintatípusokból sikeres profilmeghatározás végezhető (**F32-F35. ábra**), melyet természetesen a nyomképződés, az anyagtranszfer és a mintavétel jelentősen befolyásolhat (Eichmann, 2004). Technikai szempontból a multiplex kit leginkább problémás lókusza a PEZ3, ami a trimer ismétlődés „stutter” affinitásának, részleges adenin addíciójának – *double peaks* – és valószínűleg – monoplex formában redukálható (**F36. ábra**) – primer kompetíciós gátlásoknak tulajdonítható. A szőrszálak vizsgálata során nemcsak a technikai nehézségekkel – pl. templát- illetve sokszorozódási egyensúly hiánya – hanem genetikai hatásokkal – pl. szomatikus mutáció lehetősége (Pádár, 2002) – is számolni kell (**14. ábra**). A gyakorta telogén- illetve telogén-közeli állapotú szőrszálak teljesebb – esetenként egyáltalán tipizálható – genetikai profiljának megállapítása a továbbiakban rövidített amplikonok (Hellmann, 2001, Butler, 2003) módszerével fejleszthető, és a mutációs gyakoriságok elemzése (**15. ábra**) is nagyszámú, kiegészítő vizsgálatot igényel.

A kutya specifikus STR-ek amplifikációs artifaktum-mentes sokszorozódását a nagyságrendileg több humán DNS jelenléte negatív módon nem befolyásolja (Eichmann, 2004), a minimál-templátküszöb tartományban a reakcióelegy makro-molekuláris sztochasztikájára és kinetikájára gyakorolt, BSA-hoz – *bovine serum albumin* – hasonló (Comey, 1994) hatása inkább a reakció erősödésében – *PCR enhancing* – játszik szerepet (**22. ábra, F40-F45. ábra**). A faj – ti. mitokondriális *cytochrome b* gén – azonosítása során az egyed azonosságának – ti. nukleáris STR lókusztok – vizsgálatával ellentétben a nagyságrendileg kevesebb emberi eredetű komponens tartalmazó mintákból is emberi homológia detektálható (**19. ábra**). Az eseti gyakorlatban – különösen a kutyatámadásokkal kapcsolatos minták között – csak elvétve fordul elő tisztán az állattól származó biológiai anyag. A harapásnyomok környékének többé-kevésbé kiterjedt, sértetti vérszennyeződése a hordozófelületen vizualizálható különbségeket gyakran korlátozza, az elővizsgálatok pozitivitása nem mindig garantálja értékelhető profil kimutatását (Eichmann, 2004), ezért a releváns minták szelektálásához szűrővizsgálatként is monoplex, nukleáris STR javasolható. Egynemű anyagnak tűnő mintatípusok járulékos emberi szennyezése mintabiztosítás során – pl. szőrszálak kitépése, érintése – könnyen ellentmondó eredményekhez vezethet (**18. ábra**), és a kezdeti szakszerűtlen – helyszíni – tevékenységet még rendkívül körültekintő, idő- és költségigényes eljárással is csak részben lehet kompenzálni.

7.3.3. Szakértői vélemények

A kutya eredetű biológiai anyagokkal, anyagmaradványokkal kapcsolatban, a fentiekben leírt eredményeknek és következtetéseknek megfelelően törvényszéki és tenyésztési célra megalapozott szakértői vélemények adhatók. A lehetőség gyakorlatban

megnyilvánuló formái ugyanakkor számos, – néha lényegi – különbségeket takarnak, melyek kereskedelmi forgalomból beszerzett marker-készletek használata mellett is érvényre juthatnak. Habár bizonyos jogalkalmazók véleménye a törvényszéki szakértők „különleges ismeretét” kizárólag a bíróság vonatkozásában értelmezi, az igazságügyi alkalmazás nemcsak jogi tájékozottságot és továbbképzést (2005 évi XLVII. tv.) jelent. A szakértő természettudományos szakmai területén szerzett speciális gyakorlata és rátermettsége révén (Butler, 2005) az objektív bizonyosság fogalmának természettudományi-, jogi-, filozófiai vetületeit a genetikai bizonyíték adott bűncselekménnyel fennálló kapcsolatában – ti. büntető ügy igazolásában – (Inman, 2001) speciálisan értékelheti.

A bizonyítási láncolat – *chain of evidence* – és a gyakorlati alkalmazás igényelte minőségirányított, egységes, átfogó paradigma (ILAC, 2002, Budowle, 2005) a szakértői vizsgálatok áttekinthetőségét, ellenőrizhetőségét módszertani és személyi vonatkozásaiban egyaránt garantálhatja. A faj azonosítására konfirmáló vélemény-kategória alkalmazható (**F5. ábra**), de a potenciális keveredés (**19. ábra**) illetve szennyezés (**18. ábra**) körültekintő mérlegelést tesz szükségessé. Az egyed azonosságát valószínűsítő kategóriákban lehet deklarálni, de a technikai megvalósítás során a hitelesített alléllétrák nélkül történő genotipizálás nagy kockázati tényezőt jelent az eredmények helytálló véleményi konkludálásában. A reprezentatív populációgenetikai adatbázisok hiányában korrekt, numerikus, származási- valamint leszármazási valószínűsítés nem adható, korrekciós faktorok (**F31. táblázat**) nem építhetők be. A magyarországi kutyapopuláció nagymértékben feltételezhető heterogenitása miatt egymással analóg, a statisztikai tesztelésnél egymást helyettesítő referencia adatok felhasználhatóságát az eddigi vizsgálatok nem támasztják alá (**9. táblázat**), a helyi fajta-állományokra és tenyésztői vonalakra extrapolálható allélgyakorisági értékek csak tenyésztői szervezetek közreműködésével biztosíthatók. A megbízható állományfelmérések nemcsak az egyed azonosságának kriminalisztikai célú megállapításához, hanem a professzionális tenyésztők – klubok – kutyáinak regisztrált leszármazásához, genetikailag determinált betegségének kiszűréséhez is nagyban hozzájárulhatnak.

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Munkámat megelőzően az ismeretlen faji eredetű biológiai minták törvényszéki azonosításához a *cytochrome b* gén fajok között leginkább szekvenciális eléréseket mutató, jól körülhatárolható szakaszát viszonylag konzervatív szekvencia-intervallumra – humán CRS (*Cambridge Reference Sequence*) homológ szakaszra – illesztett, primer párok alkalmazásával használták fel. A tisztán detektált pozicionális különbségek a *GenBank* adatbázisban található homológiák segítségével nagyrészt lehetővé teszik a taxon meghatározását, azonban a primer kötődési helyen – a relatív állandóság ellenére – előforduló nukleotid inkomplementaritások sokszor – többek között a *Canidae* esetében – zavaros, kevert, értékelhetetlen elektroferogramokkal járnak együtt.

Az általunk tervezett degenerált primerek (Egyed és mtsai, 2003) és alkalmazott PCR kondíciók használatával a detektálási ambivalenciák – más fajoknál, pl. *Cervidae* is – megszüntethetők, az azonosítás konfirmálása biztonsággal megtörténhet. A jellemző szakaszon belül egyetlen pozícióban nukleotid szubsztitúció is megfigyelhető, melynek okát – egyedi mutáció, esetleges SNP – további vizsgálatok tisztázhatják (**F5. ábra**). A korábbi referenciával rendelkező primerek (Parson, 2000) módosított PCR körülményekkel nukleáris genomban lokalizált, pszeudogénként (Ishiguro, 2005) definiálható *cytochrome b* analóg szakaszokat eredményeztek, melyek heteronukleotid pozíciói (**F7. ábra**) több kópiás, multiplikálódott előfordulást támasztanak alá. Az új szekvenciát regisztráltam a *GenBank*-ban, katalógusszáma: DQ309764 (GenBank, 2005). A vizsgálatok egyes fajták – német juhászkutya / rottweiler – közötti különbségeket tártak fel, így jelenleg az sem zárható ki, hogy ezek a csak sejtmagi DNS-ből amplifikálható (**F8. ábra**) szakaszok fajta-jellegzetességet hordozhatnak, de ezt kiegészítő vizsgálatoknak kell megerősíteniük.

Doktori munkám megkezdése előtt a vizsgált, kutya specifikus STR markerek a PEZ20 lókuszt kivételével tetramer ismétlődésként – FHC2010, FHC2054, FHC2079 (Francisco, 1996), PEZ3, PEZ5, PEZ6, PEZ8, PEZ12 (Neff, 1999) – valamint dimer ismétlődésként – PEZ1 (Neff, 1999) – részben leírásra, illetve – kereskedelmi standardizálással rendelkező reagens kitként – forgalmazásba kerültek, mindezek azonban az igazságügyi célú alkalmazást lehetővé tevő alapvető követelményeket nem biztosították. Nem állt rendelkezésre egyértelmű, szerkezet alapú nevezéktan, az allélméret meghatározás – *allele sizing* – mellett az allélok azonosításához – *allele calling* – szükséges referencia allélok, allélgyakorisági adatok nem voltak hozzáférhetőek, ráadásul az eseti jellegzetességekből fakadó technikai, módszertani ismeretek és tapasztalatok is meglehetősen hiányosak voltak (Halverson, 2005).

A vizsgálatok alapján a polimorfizmus molekuláris szerkezete illetve a PEZ1 és PEZ3 lókusztok korábbi referenciáktól eltérő motívum-hossza tisztázható (**F12-F22. ábra**). A nem publikált típus-szekvenciákat regisztráltam a *GenBank*-ban (GenBank, 2005). A fragmensek

katalógusszáma: AF454051, AF454052 (PEZ20), AY375154 (PEZ8), AY375155 (PEZ5), AY375153, AY375156 (PEZ6), AY536266 (PEZ3), AY672136 (PEZ1), AY758357, AY758358 (PEZ12). A repetíciós struktúra és a megfigyelt variánsok ismeretében nemzetközi használatra alkalmas nevezéktan ajánlható, ami újabb eredményekkel is (Eichmann, 2004) részben egyezést mutat.

Szekvenálással hitelesített referencia fragmensekből allélok – alléllétrák – előállítására nyílt lehetőség (**F23. ábra**), melyek méretezési pontosságának – *allele sizing* – tesztelése (**7. táblázat, F24.a-c. táblázat**) és szemiautomata tipizálása – *allele calling* – (**F25.a-j. ábra**) a markerek polimorfizmusának (**6. táblázat, F28.a-b. táblázat**) mértékét a magyarországi kutya populáció többé-kevésbé reprezentatív állományában felmérhetővé tette.

Az allélok megfigyelt gyakoriságából kiindulva populáció genetikai – genetikai statisztika – analíziseket végeztem. Habár a vizsgált állományok mintavételi elégtelenségek – viszonylag alacsony mintaszám, az egyedek adminisztratív adatpontatlansága, esetleges tenyésztői inkorrekttség, etc. – okán nem feltétlenül reprezentatívak, az mindenképpen kijelenthető, hogy fajták illetve fajtacsoportok között szignifikáns genetikai különbségek fixálódhattak (**8-9. táblázat**), egymásnak megfeleltethető csoportok kialakulása nem valószínűsíthető (**F29. ábra, F30-F31. táblázat**). A jogalkalmazói szempontok hatékonyabb érvényesülése – valószínűsítési kategóriák numerikus alátámasztása - valamint a hiteles tenyésztői érdekek – ellenőrzött tenyészállományok genetikai stabilitása, hiteles leszármazás, öröklődő defektusok kiszűrése – egyaránt a tenyésztői szervezetekkel kollaboráló, további populációs vizsgálatok igényét támasztják alá.

A viszonylag nagy vizsgálati volumen technikai tapasztalatából (**4. táblázat, 9. ábra**), kiindulva, a bűnjelminták esetenkénti szűrővizsgálata a markerek monoplex formában történő felsokszorozásának optimalizálásával és érzékenyítésével (**16. ábra**) sikeresen kivitelezhető. A kevert faji eredetű minták tesztelése a kutyák *cytochrome b* alapú azonosításának korlátozottsága (**F37-F39. ábra**) és ambivalenciája (**18. ábra**) mellett a fajidegen DNS nukleáris STR amplifikációra gyakorolt erősítő hatását igazolta (**22. ábra, F40-F45. ábra**). A kriminalisztikai szempontból unikum jellegű szőrminták genetikai profiljának meghatározása (**14-15. ábra**) során nem hagyható figyelmen kívül egyedi mutációs események bekövetkezése sem (Pádár, 2002).

A PhD munka eredményeit felhasználva elsőként nyílt lehetőség Magyarországon a kutyákat érintő bűncselekmények (Pádár, 2001, Pádár, 2002) valamint származásellenőrzés (Pádár, 2001) DNS alapú vizsgálatokkal alátámasztott szakértői véleményezésére, melyek tapasztalata hozzájárulhatott külföldi – pl. *State of Washington v. K. L. and G. T.* (9) – bíróságok hasonló eseteinek (Halverson, 2005) tisztázásához is.

9. IRODALOM

- Adler, J., McCormick, J. (1998)** The DNA detectives. With a new national database and other high-tech tools on the way, forensic science is becoming a more powerful crimefighter than ever. Newsweek 1998. November 23.:50-55
- AFDIL** (Armed Forces DNA Identification Laboratory, DoD DNA Registry, Office of the Armed Forces Medical Examiner) **(1999)** Organic extraction of DNA from hair using micro tissue grinders. Validation Folder. Washington, DC
- Altschul, SF., Madden, TL., Schäffer, AA., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, DJ. (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acid Res 25: 3389-402
- Altet, L., Francino, O., Sánchez, A. (2001)** Microsatellite Polymorphism in Closely Related Dogs. J Hered 92:276-79
- American Kennel Club (1996)** Pure-Bred Dogs Sect. AKC News Sep. 9.
- Anderson, S., Bankier, AT., Barrel, BG., de Bruijn, MHL., Coulson, AR., Drouin, J., Eperon, IC., Nierlich, DP., Roe, BA., Sanger, F., Schreier, PH., Smith, AJH., Staden R., Young, IG. (1981)** Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290:457-65.
- Andrews, RM., Kubacka, I., Chinnery, PF., Lightowlers, RN., Turnbull, DM., Howell, N. (1999)** Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nat Genet 23:147
- Applied Biosystems (1997)** AmpF ℓ STR[®] Profiler[™] PCR Amplification Kit User's Manual. Foster City, CA
- Applied Biosystems (2001)** AmpF ℓ STR[®] Identifier[™] PCR Amplification Kit User's Manual. Foster City, CA
- Applied Biosystems (2000)** ABI Prism[™] Miniprep Kit Protocol. Foster City, CA
- Applied Biosystems (2003)** BigDye[™] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit Protocol. Foster City, CA
- Applied Biosystems (2003)** BigDye[™] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol. Foster City, CA
- Applied Biosystems (2001)** StockMarks[®] Canine I Ver 3 Paternity PCR Typing Kit Protocol. Foster City, CA
- Applied Biosystems (2003)** StockMarks[®] for Dogs Canine Genotyping Kit Protocol. PN 4307481. Foster City, CA
- Ayres, KL., Overall, ADJ. (1999)** Allowing for within-subpopulation inbreeding in forensic match probabilities. Forensic Sci Int 103:207-16

- Balding, DJ.,** Nichols RA (1994) DNA profile match probability calculation: how to allow for population stratification, relatedness, database selection and single bands. *Forensic Sci Int* 64:125-40
- Balogh, MK.,** Burger, J., Bender, K., Schneider, PM., Alt, KW. (2003) STR genotyping and mtDNA sequencing of latent fingerprint on paper. *Forensic Sci Int* 137:188-95
- Bamshad, MJ.,** Wooding, S., Watkins, WS., Ostler, C., Batzer, MA., Jorde, LB. (2003) Human population genetic structure and inference of group membership. *Am J Human Gen* 72: 578-89.
- Bartlett, SE.,** Davidson, WS. (1992) FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Biotechniques* 12(3):408-11
- Batzer, MA.,** Deininger, PL. (1991) A human-specific subfamily of Alu sequences. *Genomics* 9:481-87
- Bär, W.,** Brinkmann, B., Budowle, B., Carracedo, A., Gill, P., Lincoln, P., Mayr, WR., Olaisen, B. (1997) DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *International Society for Forensic Haemogenetics. Int J Legal Med* 110:175-76
- Bär, W.,** Kratzer, A., Machler, M., Schmid, W. (1988) Postmortem stability of DNA. *Forensic Sci Int.* 39(1):59-70
- Bócz, E. (szerk)** (2004) *Kriminalisztika*. BM Duna Palota és Kiadó, ISBN 963 8036 83 4 ö
- Branicki, W.,** Kupiec, T., Pawlowski, R. (2003) Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. *J Forensic Sci* 48:83-87
- Brinkmann, B.,** Moller, A., Wiegand, P. (1995) Structure of new mutations in 2 STR systems. *Int J Legal Med* 111:267-72
- Brinkmann, B.,** Junge, A., Meyer, E., Wiegand, P. (1998) Population genetic diversity in relation to microsatellite heterogeneity. *Hum Mutat* 11:135-44
- Brinkmann, B.,** Carracedo, A. (eds) (2003) *Progress in Forensic Genetics* (9):v, ICS:1239. Elsevier ISBN 0444507175
- Brouillette, JA.,** Andrew, JR., Venta, PJ. (2000) Estimate of nucleotide diversity in dogs with a pool-and-sequence method. *Mam Genome* 11:1079-86
- Budowle, B.,** Chakraborty, R., Giusti, AM., Eisenberg, AJ., Allen, RC. (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet.* 48:137-44.

- Budowle, B.,** Garofano, P., Hellman, A., Ketchum, M., Kanthaswamy, S., Parson, W., van Haeringen, W., Fain, S., Broad, T. (2005) Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *Int J Legal Med* PMID: 15834735
- Butler, JM. (2001)** Forensic DNA Typing. Biology & technology behind STR markers. Academic Press ISBN 0-12-147951-X
- Butler, J.,** Shen, Y., McCord, B. (2003) The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci* 48:1054-64
- Butler, JM. (2005)** Forensic DNA typing. Biology technology, and genetics of STR markers. Second edition. Elsevier Academic Press, ISBN 0-12-147952-8
- Cavalli-Sforza, LL.,** Menozzi, P., Piazza, A. (1994) The History and Geography of Human Genes. Princeton University Press ISBN: 0-691-08750-4
- Chakraborty, R.,** Stivers, DN., Su, B., Zhong, Y., Budowle, B. (1999) The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: Implications for development of new DNA typing systems. *Electrophoresis* 20:1682-96
- Chung, DT.,** Drabek, J., Opel, KL., Butler, JM., McCord, BR. (2004) A study on the effects of degradation and template concentration on the amplification efficiency of the STR miniplex primer sets. *J. Forensic Sci* 49(4):733-40
- Clark, JM. (1988)** Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 16:9677-86
- Coble, MD.,** Just, RS., O'Callaghan, JE., Letmanyi, IH., Peterson, CT., Irwin, JA., Parsons, TJ. (2004) Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *Int J Legal Med* 118:137-46
- Comey, CT.,** Koons, BW., Presley, KW., Smerick, JB., Sobieralski, CA., Stanley, DM., Baechtel, FS. (1994) DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. *J Forensic Sci* 39:1254-69
- Connors, E.,** Lundregan, T., Miller, N., McEwen, T. (1996) Convicted by Juries, Exonerated by Science: Case Studies in the Use of DNA Evidence to Establish Innocence After Trial. National Institute of Justice NCJ 161258
- Corach, D.,** Filgueira, RL., Marino, M., Penacino, G., Sala, A. (2001) Routine Y-STR typing in forensic casework. *Forensic Sci Int* 118:131-35
- Council of Europe (1993)** The use of analysis of deoxyribonucleic acid (DNA) within the framework of the criminal justice system. Recommendation No. R (92) 1. Council of Europe Press

- Council of Europe (1993)** The use of analysis of deoxyribonucleic acid (DNA) within the framework of the criminal justice system. Recommendation No. R (92) 1. Council of Europe Press
- Cyranoski, D. (2004)** Japan's ethnic crime database sparks fears over human rights. *Nature* 427 (6973):383
- D'Andrea, F., Fridez, F., Coquoz, R. (1998)** Preliminary experiments on the transfer of animal hair during simulated criminal behaviour. *J. Forensic Sci* 43(6):1257-58
- Daniels, DL., Hall, AM., Ballantyne, J. (2004)** SWIGDAM Developmental validation of a 19-locus Y-STR system for forensic casework. *J. Forensic Sci* 49(4):668-83
- De Munnynck, K., Van de Voorde, W. (2002)** Forensic approach of fatal dog attacks: a case report and literature review. *Int J Legal Med* 116:295-300
- DeNise, S., Johnston, E., Halverson, J., Marshall, K., Rosenfeld, D., McKenna, S., Sharp, T., Edwards, J. (2004)** Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. *Anim Genet* 35:14-17
- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, HA., Caskey, CT. (1991)** DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 49:746-56
- Edwards, A., Hammond, HA., Jin, L., Caskey, CT., Chakraborty, R. (1992)** Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12:241-53.
- Egyed, B., Füredi, S., Angyal, M., Boutrand, L., Vandenberghe, A., Woller, J., Pádár, Zs. (2000)** Analysis of eight STR loci in two Hungarian populations. *Int J Legal Med* 113:272-75
- Egyed, B., Ósz, K., Pádár, Zs., Hackler, L., Puskás, L., Zöldág, L. (2003)** Cytochrome b gén szekvencia-variánsok azonosítása DNS-chipen – fajtaazonosítás molekuláris genetikai módszerrel. *Prog V. Magyar Genetikai Kongresszus*, 35-36
- Eichmann, C., Berger, B., Reinhold, M., Lutz, M., Parson, W. (2004)** Canine specific STR typing of saliva traces on dog bite wounds. *Int J Legal Med* 118:337-42
- Eichmann, C., Berger, B., Parson, W. (2004)** A proposed nomenclature for 15 canine specific polymorphic canine STR loci for forensic purposes. *Int J Legal Med* DOI 10.1007/s00414-004-0452-5
- Eichmann, C., Berger, B., Steinlechner, M., Parson, W. (2005)** Estimating the probability of identity in a random dog population using 15 highly polymorphic canine STR markers. *Forensic Sci Int* 151:37-44.
- Ellegren, H. (2004)** Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5(6):435-45

- Excoffier, L., Slatkin M. (1998)** Incorporating genotypes of relatives into a test of linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 62:171-180
- Evett, IW., Weir, BS. (1998)** Interpreting DNA evidence. Sinauer Associates Inc. Publishers ISBN 0-87983-155-4
- Evett, IW., Gill, PD., Jackson, G., Whitaker, J., Champod, C. (2002)** Interpreting small quantities of DNA: the hierarchy of propositions and the use of Bayesian networks. *J. Forensic Sci* 47:520-30
- Fantin, D., Bozzini, M., Gaiser, C., Halverson, J., Bates, S., Ziegler, J. (1996)** Automating canine parentage verification. *Anim Genet* 27(Suppl. 2):29
- FBI Laboratory (1994)** PCR-based typing protocols. Laboratory Folder. Quantico, VA
- Ferrara, P. (2003)** Analysis of the first 1000 database hits in Virginia and implementation of point of arrest DNA collection. Oral presentation on 14th International Symposium on Human Identification, Phoenix (AZ)
- Forensic Science Service (FSS).** <http://www.forensic.gov.uk>
- Francisco, LV., Langston AA., Mellersh, CS., Neal, CL., Ostrander, EA. (1996)** A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for genetic mapping. *Mam Genome* 7(5):359-62
- Füredi, S, Woller, J., Pádár, Zs. (1995)** Hungarian population data for the STR systems TH01 and VWA. *Int J Legal Med* 108:48-49
- Füredi, S, Budowle, B., Woller, J., Pádár, Zs. (1996)** Hungarian population data on six STR loci - - HumVWFA31, HumTH01, HumCSF1PO, HumFES/FPS, HumTPOX, and Hum HPRTB - derived using multiplex PCR amplification and manual typing. *Int J Legal Med* 109:100-01
- Füredi, S (2003)** Humán polimorf mikroszatellita (short tandem repeat) lókuszok igazságügyi genetikai vizsgálata magyar populációkban. Doktori értekezés, ELTE TTK
- Garbolino, P., Taroni, F (2002)** Evaluation of scientific evidence using Bayesian networks. *Forensic Sci Int* 125:149-55
- GenBank (2005)** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>
- Gill, P., Jeffreys, AJ., Werrett, DJ. (1985)** Forensic application of DNA “fingerprints”. *Nature* 318:577-79
- Gill, P., Werrett, DJ. (1987)** Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting. *Forensic Sci Int* 35(2-3):145-48
- Gill, P., Kimpton, C., d’Aloja, E., Andersen, JF., Bar, W., Brinkmann, B., Holgersson, S., Johnsson, V., Kloosterman, AD., Lareu, MV., Nellesmann, L., Pfitzinger, H., Phillips, CP., Schmitter, H., Schneider, P., Stenersen, M. (1994)** Report of the European DNA Profiling Group (EDNAP) – towards standardisation of short tandem repeat (STR) loci. *Forensic Sci Int* 65:51-59

- Gill, P.,** Brinkmann, B., d'Aloja, E., Andersen, J., Bar, W., Carracedo, A., Dupuy, B., Eriksen, B., Jangblad, M., Johnsson, V., Kloosterman, AD., Lincoln, P., Morling, N., Rand, S., Sabatier, M., Scheithauer, R., Schneider, P., Vide, MC. (1997) Consideration from the European DNA Profiling Group (EDNAP) concerning STR nomenclature. *Forensic Sci Int* 87:185-92
- Gill, P.,** Whitaker, J., Flaxman, C., Brown, N., Buckleton, J. (2000) An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci Int* 112 (1):17-40
- Gill, P.,** Brenner, C., Brinkmann, B., Budowle, B., Carracedo, A., Jobling, MA., de Knijff, P., Kayser, M., Krawczak, M., Mayr, WR., Morling, N., Olaisen, B., Pascali, V., Prinz, M., Roewer, L., Schneider, PM., Sajantila, A., Tyler-Smith, C. (2001) DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs. *Int J Legal Med* 114:305-309
- Gill, P.** (2001) Application of low copy number DNA profiling. *Croat Med J* 42(3):229-32
- Gill, P.,** Kirkham, A. (2004) Development of a simulation model to assess the impact of contamination in casework using STRs. *J Forensic Sci* 49:485-91
- Goedecke, N.,** McKenna, B., El-Difrawy S., Carey, L., Matsudaira, P., Ehrlich, D. (2004) A high performance of multilane microdevice system designed for the forensics laboratory. *Electrophoresis* 25:1678-86
- Guillen, M.,** Lareu, MV., Pestoni, C., Salas, S., Carracedo, A. (2000) Ethical-legal problems of DNA Databases in criminal investigation. *J Med Ethics* 26: 266-71
- Guo, SW.,** Thompson, EA. (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-72
- Halverson, J.,** Dvorak, J., Stevenson, T., inventors. (1999) Metamorphix, Inc., assignee. Microsatellite sequences for Canine genotyping. US Patent #5,874,217
- Halverson, J.,** Edwards, J (1999) Microsatellite polymorphism in major dog breeds. *PE Applied Biosystems Bulletin*
- Halverson, J.,** Basten, C. (2005) A PCR multiplex and database for forensic DNA identification of dogs. *J Forensic Sci* 50(2): 352-63
- Halverson, J.,** Basten, C. (2005) Forensic DNA identification of animal-derived trace evidence: tools for linking victims and suspects. *Croat Med J* 46 (4):598-605
- Hellmann, A.,** Schleenbecker, U., Rohleder, U., Demmelmeyer, H. (2003) DNA typing of canine samples – allele frequencies and standardization of the STR marker. *Forensic Sci Int* 136:66
- Hellmann, A.,** Rohleder, U., Schmitter, H., Wittig, M. (2001) STR typing of human telogen hairs – a new approach. *Int J Legal Med* 114: 269-73

- Herrnstadt, C.,** Preston, G., Howell, N. (2003) Errors, phantoms and otherwise, in human mtDNA sequences. *Am J Hum Genet* 72:1585-86
- Higuchi, R.,** von Beroldingen, CH, Sensabaugh GF, Erlich HA (1988) DNA typing from single hairs. *Nature* 322:543-46
- Holland, MM.,** Parsons, TJ. (1999) Mitochondrial DNA sequence analysis – Validation and use for forensic casework. *Forensic Sci Rev* 11:21-50
- Holt, CL,** Buoncristiani, M, Wallin, JM., Nguyen, T., Lazaruk, KD., Walsh, PS. (2002) **TWGDAM** validation of AMPFLSTR™ PCR amplification kits for forensic DNA casework. *J. Forensic Sci* 47:66-96
- Horváth, E. (1979)** Vércsoportok. Medicina Kiadó ISBN 9632404874
- Howitt, T. (2003)** The National DNA database: A tool for crime fighting. Oral presentation 14th International Symposium on Human Identification, Phoenix (AZ)
- ILAC (2002)** Guidelines for Forensic Science Laboratories. ILAC-G19
- Inman, K.,** Rudin, N. (2001) Principles and practice of criminalistics. The profession of forensic science. CRC Press, ISBN 0-8493-8127-4
- Interpol DNA Unit (2003)** Global DNA Database Inquiry 2002: Results and Analysis. I.C.P.O. Interpol, General Secretariat
- Intepol handbook** on DNA data exchange and practice (2001) Recommendations from the Interpol DNA Monitoring Expert Group. I.C.P.O.-Interpol, General Secretariat
- Invitrogen™ (2004)** TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing. Instruction Manual Version N. Carlsbad, CA
- Irion, DN.,** Schaffer, AL., Famula, TR., Eggleston, ML., Hughes, SS., Pedersen, NC. (2003) Analysis of genetic variation in 28 dog breed populations with 100 microsatellite markers. *J Hered* 94(1):81-87
- Irwin, DM.,** Kocher, TD., Wilson, AC. (1991) Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* 32 (2):128-44
- Ishiguro, N.,** Nakajima, A., Terai, S., Horiuchi, M., Shinagawa, M. (2005) Multiple nuclear pseudogenes of mitochondrial DNA exist in the canine genome. Ac.No.:AB048586 (GeneBank, 2005)
- Jeffreys, AJ.,** Wilson, V., Thein, SL. (1985) Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314:67-72
- Jeffreys, AJ.,** Wilson, V., Thein, SL. (1985) Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 316:76-79
- Jeffreys, A.,** Morton, D. (1987) DNA fingerprinting of dog and cats. *Anim Genet* 18:1-15.

- Jobling, MA.,** Gill, P. (2004) Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet* 5(10):739-51
- Johson, P.,** Martin, P., Williams, R. (2003) Genetics and forensics: making the National DNA Database. *Sci. Studies* 16:22-37
- Joseph, S.,** Sampson, J. (1994) Identification, isolation, and characterisation of canine microsatellite sequences. *Anim Genet* 25:307-21
- Kanter, E.,** Baird, M., Shaler, R., Balazs, I. (1986) Analysis of restriction fragment length polymorphisms in deoxyribonucleic acid (DNA) recovered from dried bloodstains. *J. Forensic Sci* 31:403-08
- Karger, B.,** Rand, SP., Brinkmann, B. (2000) Criminal anticipation of DNA investigations resulting in mutilation of a corpse. *Int J Legal Med* 113(4):247-48
- Kasai, K.,** Nakamura, Y., White, R. (1990) Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science *J Forensic Sci*, 35:1196-1200
- Kayser, M.,** Sajantila, A. (2001) Mutations at Y-STR loci: implications for paternity testing and forensic analysis. *Forensic Science Int* 118:116-21
- Kim, KS.,** Lee, SE., Jeong, HW., Ha, JH. (1998) The complete nucleotide sequence of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. *Mol Phylogenet E* 10:210-20
- Kirkness, EF.,** Bafna, V., Halpern, AL., Levy, S., Remington, K., Rusch, DB., Delcher, AL., Pop, M., Wang, W., Fraser, CM., Venter, JC. (2003) The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science*. 301(5641):1898-903.
- Klein, G. (2001)** Vak akarat és önző DNS. Magvető Kiadó ISBN 963 14 2216 x
- Kline, MC.,** Vallone, PM., Redan, JW., Duewer, DL., Calloway, CD., Butler, JM. (2005) Mitochondrial DNA typing screens with control region and coding region SNPs. *J. Forensic Sci* 50(2):377-85
- Klitschar, M.,** Füredi, S., Egyed, B., Reichenpfader, B., Kleiber, M. (2003) Estimating the ethnic origin (EEO) of individuals using short tandem repeat loci of forensic relevance. *Progress in Forensic Genetics* (9):53-56, ICS 1239. Elsevier ISBN 0444507175
- Kocher, TD.,** Thomas, WK., Meyer, A., Edwards, SV., Paabo, S., Villablanca, FX., Wilson, AC. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6196-200
- Koskinen, MT.,** Bredbacka, P. (2000) Assessment of the population structure of five Finnish dog breeds with microsatellites. *Anim Genet* 31(5):310-17
- Koskinen, MT. (2003)** Individual assignment using microsatellites DNA reveals unambiguous breed identification in the domestic dog. *Anim Genet* 34:297-301

- Krenke, BE.,** Tereba, A., Anderson, SJ., Buel, E., Culhane, S., Finis, CJ., Tomsey, CS., Zachetti, JM., Sprecher, CJ. (2002) Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system. *J Forensic Sci* 47:773-85
- Lanrdry, PA.,** Koskinen, MT., Primmer, CR. (2002) Deriving evolutionary relationships among populations using microsatellites and (deltamu) (2): all loci are equal, but some are more equal than others. *Genetics* 161:1339-47
- Lederer, T.,** Betz, P., Seidl, S. (2001) DANN analysis of fingernail debris using different multiplex systems: a case report. *Int J Legal Med* 114(4-5):263-66
- Lewis, PO.,** Zaykin, D. (2001) Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>
- Lontainé Santora, Zs.** (1982) Polimorf tulajdonságok vérfoltokban. Kandidátusi értekezés.
- Lopez, JV.,** Cevario, S., O'Brien, SJ. (1996) Complete nucleotide sequences of the domestic cat (*Felis catus*) mitochondrial genome and transposed mtDNA tandem repeat (Numt) in the nuclear genome. *Genomics* 33:229-46
- Lowe, A.,** Murray, C., Whitaker, J., Tully, G., Gill, P. (2002) The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces. *Forensic Sci Int* 129:25-34
- Levo, A.,** Koski, A., Ojanpera, I., Vuori, E., Sajantila, A. (2003) Post mortem SNP analysis of CYP2D6 gene reveals correlation between genotype and opioid drug (tramadol) metabolite riation in blood. *Forensic Sci Int* 135:9-15
- Lindblad-Toh, K.,** Wade, CM., Mikkelsen, TS., Karlsson, EK., Jaffe, DB., Kamal, M., Clamp, M., Chang, JL., Kulbokas, EJ., Zody, MC., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, RK., Ostrander, EA., Ponting, CP., Galibert, F., Smith, DR., deJong, PJ., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, CW., Cook, A., Cuff, J., Daly, MJ., DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, C., Kim, L., Koepfli, KP., Parker, HG., Pollinger, JP., Searle, SMJ., Sutter, NB., Thomas, R., Webber, C., Broad Institute, GSP., Lander, ES. (2005) Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438(8):803-19
- Lunetta, P.,** Levo, A., Mannikö, A., Penttila, A., Sajantila, A. (2002) Death in bathtub revisited with molecular genetics: a victim with a suicidal traits and a LQTS mutation. *Forensic Sci Int* 130:122-24
- Magnuson, VL.,** Ally, DS., Nylund, SJ., Karanjawala, ZE., Rayman, JB., Knapp, JI., Lowe, AL., Ghosh, S., Collins, FS. (1996) Substrate nucleotide-determined non-templated addition of

adenine by Taq DNA polymerase: Implications for PCR based genotyping and cloning. BioTechniques 21:700-09

McVicker S, (2004) DNA testing woes across state threaten thousands of cases www.truthinjustice.org/labs-flawed.htm

Mellersh, CS., Hitte, C., Richman, M., Vignaux, F., Priat, C., et al. (2000) An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome. Mam Genome 11:120-30

Menotti-Raymond, MA., David, VA., Stephens, JC., Lyons, LA., O'Brien. SJ. (1997) Genetic individualization of domestic cats using feline STR loci for forensic applications. J Forensic Sci 42(6):1039-1051

Michalakis, Y., Excoffier L (1996) A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. Genetics 142:1061-64

Moller, A., Meyer, E., Brinkmann, B. (1994) Different types of structural variation in STRs: HumFES/FPS, HumVWA and HumD21S11. Int J Legal Med 106:319-23

Montagna, CP. (1996) The recovery of seminal componets and DNA from the vagina of a homicide victim 34 days postmortem. J Forensic Sci. 41(4):700-02

Morling, N., Allen, R., Carracedo, A., Geadá, H., Guidet, F., Hallenberg, C., Martin, W., Mayr, WR., Olaisen, B., Pascali, V., Schneider, PM. (2003) Recommendations on genetic investigations in paternity cases. Int J Legal Med 117:51-61

MSZ EN ISO/IEC 17025 Vizsgáló és kalibrálólaboratóriumok felkészültségének általános követelményei

Nadir, E., Margalit, H., Gallily, T., Ben-Sasson, SA. (1996) Microsatellite spreading in the human genome: Evolutionary mechanisms and structural implications. Proc Natl Acad Sci USA 93(13):6470-75

National Commission of the Future of DNA Evidence (2001) The future of Forensic DNA testing: Prediction of the Research and Development Working Group. Washington

Neff, MW., Broman, KW., Mellersh, CS., Ray, K., Acland, GM., Aguirre, GD., Ziegler, JS., Ostrander, EA., Rine, J. (1999) A second-generation genetic linkage map of the domestic dog, *Canis familiaris*. Genetics 151:803-20

NRC National Research Council (1997) The evaluation of forensic DNA evidence. Proc Natl Acad Sci USA 94:5498–500

Olaisen, B., Bar, W., Brinkmann, B., Budowle, B., Carracedo, A., Gill, P., Lincoln, P., Mayr, WR., Rand, S. (1998) DNA recommendations 1997 of the International Society for Forensic Genetics. Vox Sang 74:61-63

Oorschot, RAH., Jones, MK. (1997) DNA fingerprints from fingerprints. Nature 387:767

- Ostrander, EA.,** Sprague, Jr. GF., Rine, J. (1993) Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)_n markers for genetic mapping in dog. *Genomics* 16:207-13
- Overall, K.,** Love, M. (2001) Dog bite-related of humans – demography, epidemiology, injury and risk. *J Am Vet Med Assoc.* 218:1923-34
- Oz, C.,** Zamir, A., Gafny, R., Motro, U. (2003) “The story of Abraham, Isaac and Jacob” or “am I my brother’s keeper?”. *J Forensic Sci.* 48(1):137-39
- Pádár, Zs.,** Woller, J. (1993) The first experiences of the application of DNA polymorphism in criminal cases in Hungary. *Proceedings of 1st International Symposium on Forensic Sciences, Liptovsky Jan (Slovak Republic)*
- Pádár, Zs.,** Barta, A., Egyed, B., Füredi, S., Kemény, G., Woller, J. (2000) Hungarian experience of examination of the fingernails in violent crime. *Progress in Forensic Genetics* (8):492-94, ICS 1193. Elsevier ISBN-444-50303-x
- Pádár, Zs.,** Egyed, B., Kontadakis, K., Zöldág, L., Fekete, S. (2001) Resolution of parentage in dogs by examination of microsatellites after death of putative sire. *Acta Vet Sci Hung* 49:269-73
- Pádár, Zs.,** Egyed, B., Kontadakis, K., Furedi, S., Woller, J., Zoldag, L., Fekete, S. (2002) Canine STR analyses in forensic practice. Observation of a possible mutation in a dog hair. *Int J Legal Med* 116: 286–88
- Pádár, Zs.,** Egyed, B., Kontadakis, K., Füredi, S., Woller, J., Zöldág, L., Fekete S. Importance of canine identification in the Hungarian forensic practice. (2003) *Progress in Forensic Genetics* (9):897-900, ICS 1239. Elsevier ISBN 0444507175
- Pádár, Zs.,** Egyed, B., Zenke, P., Ósz, K., Zöldág, L., Fekete S. (2003) Genetikai polimorfizmusok alkalmazhatósága kriminálkynológiai esetekben – STR vizsgálatok magyarországi kutyapoulációkban. *Prog V. Magyar Genetikai Kongresszus, 59*
- Parker, HG.,** Kim, LV., Sutter, NB., Scott, C., Lorentzen, TD., MaLek, TB., Johnson, GS., DeFrance. HB., Ostrander, EA., Kruglyak, L. (2004) Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science* 304:1160-1164
- Parson, W.,** Pegoraro, K., Niederstatter, H., Föger, M., Steinlechner, M. (2000) Species identification by means of the cytochrome b gene. *Int J Legal Med* 114:23-28
- Parson, W.,** Brandstätter, A., Alonso, A., Brandt, N., Brinkmann, B., Carracedo, A., Corach, D., Froment, O., Furach, I., Grzybowski, T., Hedberg, K., Keyser-Tracqui, C., Kupiec, T., Lutz-Bonengel, S., Mevag, B., Ploski, R., Schmitter, H., Schneider, PM., Syndercombe-Court, D., Sörensen, E., Thew, H., Tully, G., Scheithauer, R. (2004) The EDNAP mitochondrial DNA population database (EMPOP) collaborative exercises: organisation, results and perspectives. *Forensic Sci Int* 139:215-26

- Parsons, T.J.,** Weedn, V.W. (1997) Preservation and recovery of DNA in postmortem specimens and trace samples. In Haglund, W.D., Sorg, M.H. (eds.): Forensic Taphonomy. The Postmortem Fate of Human Remains. CRC Press ISBN 0849394341
- Parsons, T.J.,** Coble, M.D. (2001) Increasing the forensic discrimination of mitochondrial DNA testing through analysis of the entire mitochondrial genome. Croatian Med J 42:304-09
- Pascali, V.L.,** Lago, G., Dobosz, M. (2003) The dark side of the UK National DNA Database. Lancet 362:834
- PE AgGen, Inc.** (1999) Protocol Canine I Ver 3 Single PCR Reaction #4307481C. Foster City, CA
- Pereira, L.,** Van Asch, B., Amorim, A. (2004) Standardization of nomenclature for dog mtDNA D-loop: a prerequisite for launching a Canis familiaris database. Forensic Sci Int 141:99-108.
- Phillips, C.,** Lareu, M., Sanchez, J., Brion, M., Sobrino, B., Morling, M., Schneider, P., Syndercombe Court, D., Carracedo, A. (2004) Selecting single nucleotide polymorphisms for forensic application. Prog in Forensic Genet 10:18-20 International Congress Series 1261. Elsevier, ISBN 0-444-51505-4
- Polymeropoulos, M.H.,** Xiao, H., Rath, D.S., Merril, C.R. (1991) Tetranucleotide repeat polymorphisms at the human tyrosine hydroxylase gene. Nucleic Acids Res 19:3753
- Primmer, C.R.,** Matthews, M.E. (1993) Canine tetranucleotide repeat polymorphism at the VIAS-D10 locus. An Genet 24(4):332
- Primrose, S.B.** (1998) Principles of Genome Analysis : A Guide to Mapping and Sequencing DNA from Different Organisms. Blackwell Science Inc. ISBN: 0632049839
- Princeton Separation Inc.** (2004) Centri-Sep Protocol. Ver. 7.0 2/04
- Promega Corporation** (1993) GenePrint® STR Systems Technical Manual No. D004. Madison, WI
- Promega Corporation** (1999) PowerPlex® 2.1 System Technical Manual No. TMD011. Madison, WI
- Rothuizen, J.,** Wolfswinkel, J., Lenstra, J., Frants, R. (1994) The incidence of mini- and microsatellite repetitive DNA in the canine genom. Theoretical and Applied Genetics 89:403-06
- Saferstein, R.** (1990) Criminalistics. An introduction to forensic science. 4th.ed. Prentice-Hall, Inc. ISBN 0-13-193525-9
- Savolainen, P.,** Rosen, B., Holmberg, A., Leitner, T., Uhlen, M., Lundeberg, J. (1997) Sequence analysis of domestic dog mitochondrial DNA for forensic use. J Forensic Sci. 42(4):593-600
- Schleyer, F.,** Oepen, I., Henke, J. (1995) Humanbiologische Spuren. Kriminalistik Verlag, Heidelberg ISBN 3-7832-0695-2

- Schneider, P.,** Seo, Y., Rittner, C. (1999) Forensic mtDNA hair analysis excludes a dog from having caused a traffic accident. *Int J Legal Med* 112:315-16
- Schneider, PM.,** Balogh, K., Naveran, N., Bogus, M., Bender, K., Lareu, M., Carracedo, A. (2004) Whole genom amplification – the solution for a common problem in forensic casework? *Prog Forensic Genet* 10:24-26 International Congress Series 1261. Elsevier, ISBN 0-444-51505-4
- Schneider, S.,** Roesli, D., Excoffier, L. (2000) Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. <http://anthro.unige.ch/arlequin>
- Siegel, JA.,** Saukko, PJ., Knupfer, GC. (eds.) (2000) Encyklopedia of forensic sciences. Academic Press, ISBN 0-12-227215-3
- Slatkin, M.,** Excoffier, L. (1996) Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity* 76:377-83
- Staub, RE.,** Speer, MC., Luo, Y., Rojas, K., Overhauser, J., Otto, L., Gilliam, TC. (1993) A microsatellite genetic linkage map of human chromosome 18. *Genomics* 15:48-56
- Stout, SD,** Ross, LM. (1991) Bone fragments a body can make. *J Forensic Sci.* 36(3):953-57
- Sweet, DJ,** Sweet, CH. (1995) DNA analysis of dental pulp to link incinerated remains of homicide victim to crime scene. *J Forensic Sci.* 40(2):310-14
- Szibor, R.,** Krause, D., Kropf, S. (1995) Usage of X-linked markers for forensic purposes. *Advances in Forensic Science* 6:141-45
- Thompson, WC.,** Taroni, F., Aitken, CGG. (2003) How the probability of a false positive affects the value of DNA evidence. *J Forensic Sci* 47(3):47-54
- Thorwald, J.** (1973) *A Detektívek órája.* Minerva Kiadó
- Todhunter, RJ.,** Bliss SP., Casella, G., Wu, R., Lust, G., Burton-Wurster, NI., Williams, AJ., Gilbert, RO., Acland, GM. (2003) Genetic structure of susceptibility traits for hip dysplasia and microsatellite informativeness of an outcrossed canine pedigree. *J Hered* 94(1):39-48.
- TWGDAM** (1995) Established guidelines for a quality assurance program for DNA testing laboratories, including RFLP and PCR technologies. *Crime Lab Dig* 18:44-75
- Urquhart, A.,** Kimpton, CP., Downes, TJ., Gill, P. (1994) Variation in short tandem repeat sequences--a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int J Legal Med* 107:131-20
- Veres, M.** (1998) Kutya származásellenőrzése DNS mikroszatellita allélok alapján. Szakdolgozat. ÁOTE Állattenyésztési és Takarmányozástan Tanszék
- Vila, C.,** Maldonato, JE., Wayne, RK. (1999) Filogenetic relationships, evolution and genetic diversity of the domestic dog. *J Hered* 90:71-77

- Walsh, PS.,** Fildes, NJ., Rynolds, R. (1996) Sequence analysis and characterization of **stutter** products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res* 24:2807-12
- Wang, DB.,** Fan, JB., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, MS., Shen, N., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, C., Rozen, S., Hudson, TJ., Lipshutz, R., Chee, M., Lander, ES. (1998) Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science* 280:1077-82
- Wang, W.,** Kirkness, EF. (2005) Short interspersed elements (SINEs) are a major source of canine genomic diversity. *Genome Res* 15:1798-1808
- Walsh, JT. (1999)** The evolving role of the judiciary in admitting scientific evidence. *Judicature Genes and Justice The Growing Impact of the New Genetics on the Courts* 83(3)
- Weber, JL.,** May, PE., (1989) Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed by the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44:388-96
- Weber, JL.(1990)** Human DNA polymorphisms based on length variation in simple sequence tandem repeats. *Genome analysis Vol.1.* Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Weir, BS.,** Cockerham, CC. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-70
- Weir, BS (1996)** *Genetic Data Analysis II.* Sinauer Associates, Inc. ISBN 0-87893-902-4
- Weiss, HB.,** Friedman, DI., Coben, JH. (1998) Incidence of dog bite injuries treated in emergency departments. *JAMA* 279:51-53
- Weller, JI.,** Seroussi, E., Ron, M. (2006) Estimation of the number of genetic markers required for individual animal identification accounting for genotyping errors. *Anim Genet* 37:387-89
- Wetton, JH.,** Higgs, JE., Spriggs, Ac., Roney, CA., Tsang, CSF., Foster, AP. (2003) Mitochondrial profiling of dog hairs. *Forensic Sci Int* 133:235-41
- Wickenheiser, RA. (2002)** Trace DNA: A review, discussion of theory, and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact. *J Forensic Sci* 47(3):442-50
- Wilson, MR.,** Stoneking, M., Holland, MM., DiZinno, JA., Budowle, B. (1993) Guidelines for the use of mitochondrial DNA sequencing in forensic science. *Crime Lab Dig* 20:68-77
- Wilson, MR.,** Polansky, D., Butler, J., DiZinno, JA., Replogle, J., Budowle, B. (1995) Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. *Biotechniques*, 18(4):662-69
- Woller, J.,** Füredi, S., Pádár, Zs. (1995) AMPFLP analysis of the VNTR loci D1S80 and ApoB in Hungary. *Int J Legal Med* 107:273-74

Zajc, I., Mellersh, C., Sampson, J. (1997) Variability of canine microsatellites within and between different dog breeds. *Mam Genome* 8:182-85.

Zajc, I., Sampson, J. (1999) Utility of canine microsatellites in revealing the relationship of pure bred dogs. *J Hered* 90(1):104-07

Zhou, H., Lamont, S.J. (1999) Genetic characterization of biodiversity in highly inbred chicken lines by microsatellite markers. *Anim Genet* 30:256-264

Zöldág, L. (1996) Kutyagenetika és örökletes betegségek. Antenus Kft, Budapest

2005. évi XLVII. törvény az igazságügyi szakértői tevékenységről

1st International DNA User's Conference (1999) www.interpol.com/Public/Forensic/dna/conference/minutes.asp

(1) home.iprimus.com.au/dna_info/dna/JA_DNA_SuppSub

(2) www.forensic-evidence.com/site/EVID/EL_DNAerror.html

(3) www.wcl.american.edu/innocenceproject/fact.htm

(4) www.cpa.org.au/garchve2/997cult.html

(5) www.scientific.org/archive/Sutton%20Press%20Release.htm

(6) www.alternet.org/rights/19234/

(7) <http://www.dogbitelaw.com/PAGES/statistics.html>

(8) http://www.onlinelawyersource.com/personal_injury/dog-bite/

(9) <http://www.courts.wa.gov/opinions/?fa=opinions.opindisp&docid=435078MAJ>

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓ

- Budowle, B., Woller, J., Koons, B.W., Füredi, S., Errera, JD., Pádár, Zs. (1996) Hungarian population data on seven PCR-based loci. *J Forensic Sci* 41:667-70
- Egyed, B., Füredi, S., Angyal, M., Boutrand, L., Vandenberghe, A., Woller, J., Pádár, Zs. (2000) Analysis of eight STR loci in two Hungarian populations. *Int J Legal Med* 113:272-75
- Egyed, B., Füredi, S., Angyal, M., Boutrand, L., Vandenberghe, A., Woller, J., Pádár, Zs. (2000) Analysis of eight STR loci in two Hungarian populations. *Forensic Sci Int* 113:25-27
- Egyed, B., Csikai, M., Füredi, S., Pádár, Zs. (2005) Population genetic data on the STR loci D2S1338, D19S433 and SE33 in Hungary. *J Forensic Sci* 50:720-21.
- Egyed, B., Füredi, S., Pádár, Zs. (2005) Population genetic study in two Transylvanian populations using forensically informative autosomal and Y-chromosomal STR markers. *Forensic Sci Int* Doi: 10.1016/j.forsciint.2005.10.020
- Egyed, B., Füredi, S., Angyal, M., Balogh, I., Kalmár, L., Pádár, Zs. (2006) Analysis of the population heterogeneity in Hungary using fifteen forensically informative STR markers. *Forensic Sci Int* 158(2-3):244-9.
- Füredi, S., Woller, J., Pádár, Zs. (1995) Hungarian population data for the STR systems TH01 and VWA. *Int J Legal Med* 108:48-49
- Füredi, S., Budowle, B., Woller, J., Pádár, Zs. (1996) Hungarian population data on six STR loci - HumVWFA31, HumTH01, HumCSF1PO, HumFES/FPS, HumTPOX, and Hum HPRTB - derived using multiplex PCR amplification and manual typing. *Int J Legal Med* 109: 100-01
- Füredi, S., Woller, J., Pádár, Zs. (1997) A population study of the STR loci HumLPL, HumF13B and HumF13A01 in Hungary. *Int J Legal Med* 110:107-08
- Füredi, S., Angyal, M., Kozma, Zs., Sétáló, J., Woller, J., Pádár, Zs. (1997) Semi-automatic DNA profiling in a Hungarian Romany population using the STR loci HumVWFA31, HumTH01, HumTPOX and HumCSF1PO. *Int J Legal Med* 110:184-87
- Füredi, S., Kozma, Zs., Woller, J., Pádár, Zs., Angyal, M., Bajnóczki, I., Nishi, K. (1998) Population genetic data on four STR loci in a Hungarian Romany population. *Int J Legal Med* 112:72-74
- Füredi, S., Angyal, M., Woller, J., Pádár, Zs. (1999) Y-STR haplotyping in two Hungarian populations. *Int J Legal Med* 113:38-42
- Füredi, S., Egyed, B., Vandenberghe, A., Angyal, M., Woller, J., Pádár Zs. (2000) Population genetic data on 5 autosomal and 8 Y-chromosomal STR loci in 2 Hungarian populations. *Progress in Forensic Genetics* (8) ICS 1193. Elsevier, ISBN 044450303X:151-53

- Pádár, Zs., Füredi, S., Woller, J. (1997) Polimorf DNS lókuszok PCR amplifikációja. Molekuláris Medicina, (Kopper, L., Marcsek, Z., Kovalszky, I. szerk). Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, ISBN 963 242 345 3:112-18
- Pádár, Zs., Barta, A., Egyed, B., Füredi, S., Kemény, G., Woller, J. (2000) Hungarian experience of examination of the fingernails in violent crime. Progress in Forensic Genetics (8) ICS 1193. Elsevier, ISBN 044450303X:492-94
- Pádár, Zs., Füredi, S., Angyal, M. (2001) Kriminálisztikai (DNS-) vizsgálati lehetőségek újszülöttmegőlésekben. Belügyi Szemle (1):69-72.
- Pádár, Zs., Egyed, B., Kontadakis, K., Zöldág, L., Fekete, S. (2001) Resolution of parentage in dogs by examination of microsatellites after death of putative sire. Acta Vet Sci Hung 49(3):269-73
- Pádár, Zs., Angyal, M., Egyed, B., Füredi, S., Woller, J., Zöldág, L., Fekete, S. (2001) Canine microsatellite polymorphism as a resolution of an illegal animal death case in a Hungarian Zoological Garden. Int J Legal Med 115:79-81
- Pádár, Zs., Kontadakis, K., Egyed, B., Füredi, S., Woller, J., Zöldág, L., Fekete, S. (2002) Canine STR analyses in forensic practice – observation of possible mutation of a catagen doghair. Int J Legal Med 116:286-88
- Pádár, Zs., Egyed, B., Kontadakis, K., Füredi, S., Woller, J., Zöldág, L., Fekete S. (2003) Importance of canine identification in the Hungarian forensic practice. Progress in Forensic Genetics (9) ICS 1239. Elsevier, ISBN 0444507175 :897-900
- Pádár, Zs., Zenke, P., Egyed, B., Ósz, K., Kontadakis, K., Zöldág, L., Fekete, S. (2004) STR-analyse bei Hunden – Forensische Anwendung und Erfahrungen. Rechtsmedizin 4:342
- Pádár, Zs., (2004) Kriminálisztikai célú DNS-vizsgálatok Magyarországon. Kriminálisztika (Bócz, E. szerk) BM Duna Kiadó, Budapest, ISBN 963 836 83 4 ö:598-606
- Pádár Zs. (2005) A DNS-vizsgálatok szerepe és szakértői problémái emberölési ügyekben. Belügyi Szemle (1):13-29
- Sótonyi, P., Járny, J., Pádár, Zs., Woller, J., Füredi, S., Gál, T. (1996) Comparative study on reused haemodialysis membranes. Int J Artificial Organs 19:387-92
- Woller, J., Füredi, S., Pádár, Zs. (1995) AMPFLP analysis of the VNTR loci D1S80 and ApoB in Hungary. Int J Legal Med 107:273-74
- Woller, J., Füredi, S., Pádár, Zs. (1996) Hungarian population data for 11 PCR-based polymorphisms. Advances in Forensic Haemogenetics (6) Springer, ISBN 3540604928:647-49
- Woller, J., Budowle, B., Füredi, S., Pádár, Zs. (1996) Hungarian population data on the loci HLA-DQ α , LDLR, GYPA, HBG, D7S8 and GC. Int J Legal Med 108:280-82

- Woller, J., Füredi, S., Pádár, Zs. (1997) Polimeráz láncreakción alapuló DNS vizsgálatok a magyar igazságügyi gyakorlatban. Orvosi Hetilap 138:3223-28
- Woller, J., Budowle, B., Angyal, M., Füredi, S., Pádár, Zs. (1998) Population data on the loci HLA-DQ α , LDLR, GYPA, HBG, D7S8, GC and D1S80 in a Hungarian Romany population. Progress in Forensic Genetics (7) ICS 1167. Elsevier, ISBN 0444829652:381-83
- Zöldág, L., Albert, M., Fodor, Zs., Pádár, Zs., Kontadakis, K., Eszes, F. (2001) Az általános vízkór (anasarca) öröklődéskórtani vizsgálata magyarországi angol bulldog fajtájú kutya populációban. Hung Vet Journal (6):335-41

“The criminalist must synthesize and interpret laboratory results in the greater context of the crime, or risk misinterpreting them. Critical thinking is the first skill to be involved at the beginning of case, and continues through every phase of an analysis and interpretation. Too often our thinking is constricted by what we believe is true, but what we expect to be true, or by commands from the god of productivity. The competent analyst will not sacrifice thoughtfulness at any stage of his work.”



Consider this framework on which to hang your thoughts.”

(K. Inman, 2001)

11. FÜGGELÉK

11.1. Rövidítések jegyzéke

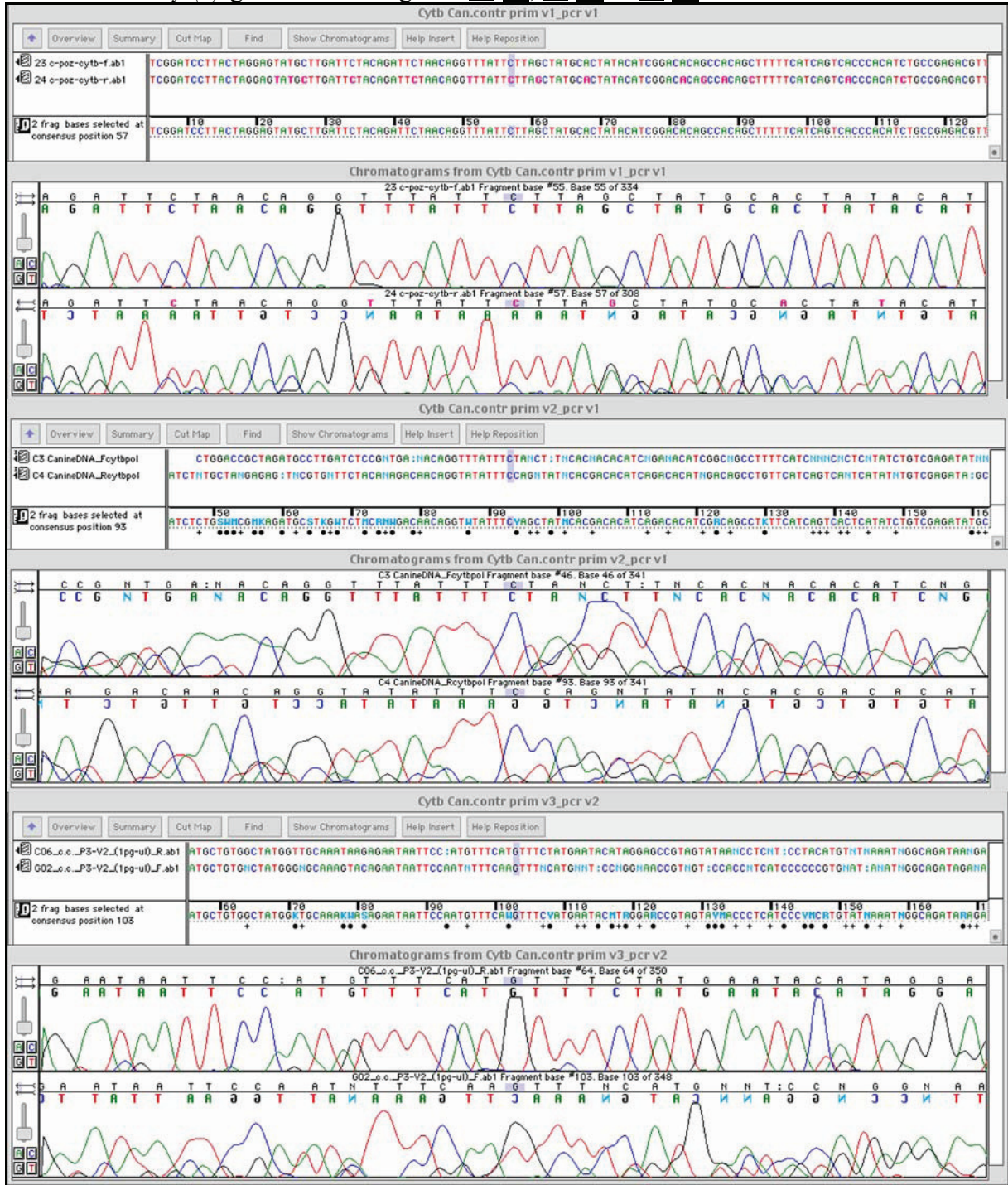
AKC	American Kennel Club
AMOVA	molekuláris varianciaanalízis (Analysis of Molecular Variance)
CFA	Canis familiaris autoszóma
CODIS	Combined DNA Index System (az USA bűnügyi DNS-adatbázis rendszere)
CRS	Cambridge referencia szekvencia
EEO	etnikai származás becslése
EM	Expectation-Maximization algoritmus
FHC	Fred Hutchinson Cancer Research Center
H(exp)	becsült heterozigótaság
H(obs)	megfigyelt heterozigótaság
HWE	Hardy-Weinberg egyensúly
kb	kilobázis
kb.	körülbelül
LE	kapcsoltsági egyensúly
LD	kapcsoltsági egyensúlytalanság (linkage disequilibrium)
LR	valószínűségi hányados
n	kromoszómák (allélok) száma
N	egyedek száma
PD	igazságügyi megkülönböztető erő
PE	igazságügyi szülősségi kizáró erő
PEZ	Perkin Elmer Zoogene
PIC	polimorfizmus információ tartalom
SD	szórás
SE	standard hiba
SINE	short interspersed nuclear element
SNP	egynukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)
STR	Short Tandem Repeat
UKC	United Kennel Club

11.2. Táblázatok, ábrák

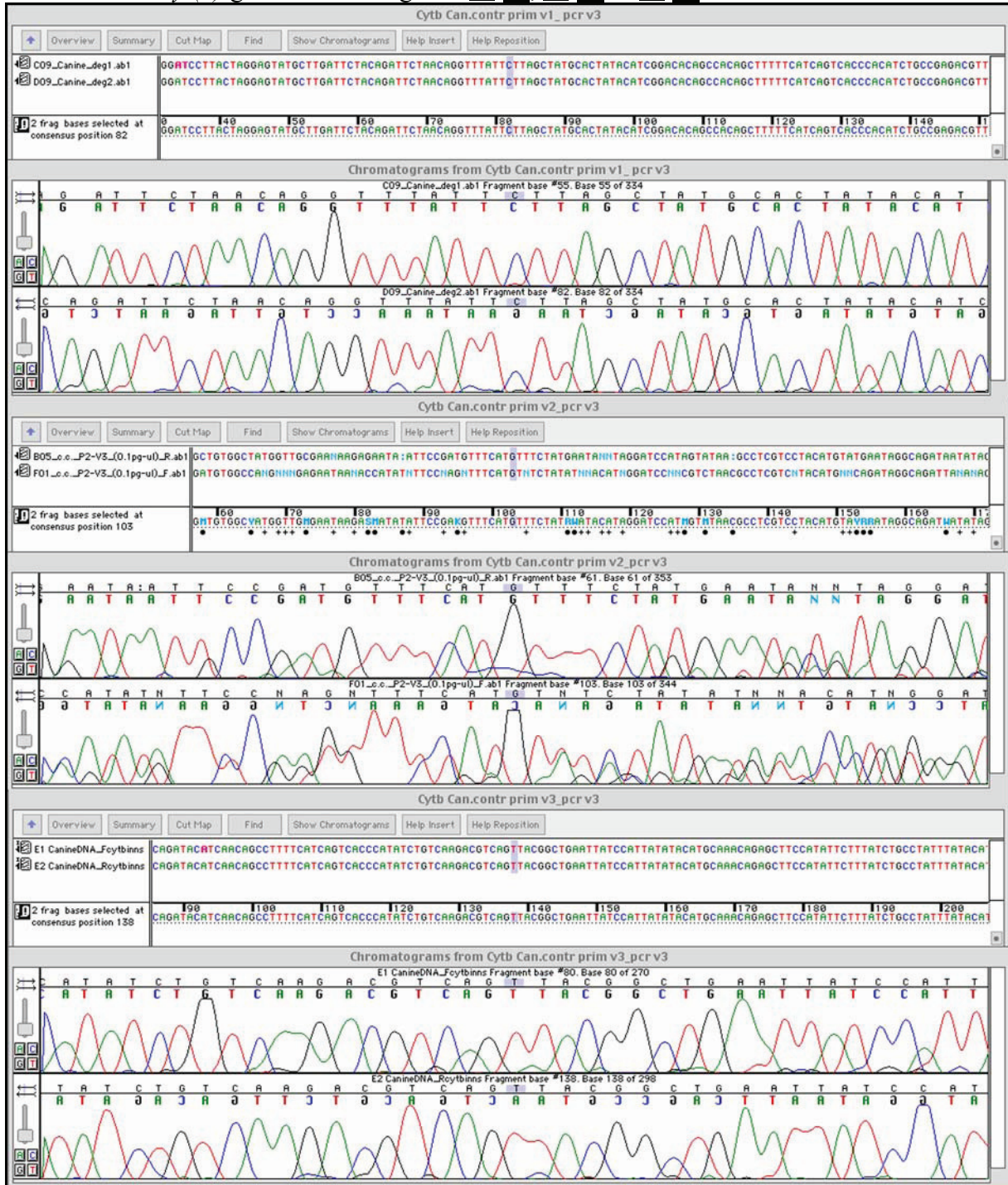
F1. táblázat A populációs minták fajtankénti megoszlása

Fajta	Mintatípus	Mintaszám	Fajta	Mintatípus	Mintaszám
Agár	vér	2	Labrador retriever	vér	7
Airedale terrier	vér	2	Leonbergi	vér	2
Alaszkai malamut	vér	4	Magyar agár	vér	1
Amerikai bulldog	vér	1	Magyar vizsla	vér	20
Amerikai cocker spániel	vér	6	Mopsz	vér	2
Amerikai staffordshire terrier	vér	16	Moszkvai örkutya	vér	1
Angol bulldog	vér	3	Mudi	vér	19
Angol bulldog	szőr	9	Mudi	izom	6
Angol cocker spániel	vér	25	Nápolyi masztiff	vér	3
Angol szetter	vér	4	Német bokszter	vér	13
Arany retriever	vér	7	Német dog	vér	10
Argentín dog	nyál	1	Német dog	nyál	8
Basset hound	vér	1	Német juhászkutya	vér	78
Basset hound	szőr	1	Német juhászkutya	nyál	1
Beagle	vér	4	Német juhászkutya	szőr	1
Belga juhászkutya	vér	1	Német spicc	vér	1
Bernáthegyi	nyál	5	Német vizsla	vér	7
Berni pásztorkutya	vér	3	Óangol juhászkutya	vér	5
Berni pásztorkutya	nyál	5	Orosz agár	vér	1
Bichon bolognese	vér	2	Pekingi palotakutya	vér	7
Bichon frise	vér	1	Pireneusi hegyikutya	nyál	1
Bichon havanese	vér	1	Pointer	vér	4
Bordeauxi dog	vér	3	Puli	vér	8
Bordeauxi dog	nyál	4	Rottweiler	vér	34
Brie-i juhászkutya	vér	2	Rottweiler	nyál	6
Bullmasztiff	vér	3	Sarplaninai juhászkutya	vér	1
Bullmasztiff	nyál	1	Schnauzer	vér	38
Cane corso	vér	3	Schnauzer	nyál	1
Coton de tulear	vér	1	Sealyham terrier	vér	1
Csau-csau	vér	3	Si-cu	vér	1
Csau-csau	nyál	1	Skót juhászkutya	vér	9
Csivava	vér	3	Szakállas collie	vér	1
Dalmata	vér	5	Szamojéd	vér	1
Délorosz juhászkutya	vér	2	Szamojéd	nyál	2
Dobermann	vér	15	Szibériai husky	vér	6
Dobermann	nyál	7	Szibériai lajka	vér	3
Erdélyi kopó	vér	2	Tacskó	vér	41
Fila brasileiro	vér	1	Tibeti terrier	vér	2
Fila brasileiro	nyál	1	Törpe pincser	vér	2
Foxterrier	vér	2	Újfundlandi	vér	4
Francia bulldog	vér	3	Uszkár	vér	33
Hannoveri véreb	vér	1	Weimari vizsla	vér	2
Hovawart	vér	2	West highland white terrier	vér	12
Ír szetter	vér	3	West highland white terrier	szőr	1
Jagd terrier	vér	1	Yorkshire terrier	vér	4
Kaukázusi juhászkutya	vér	15	Ismeretlen fajta	vér	38
Kerry blue terrier	vér	1	Ismeretlen fajta	nyál	5
Kínai harcikutya	vér	3	Ismeretlen fajta	szőr	3
Komondor	vér	4	Spermabank No.	sperma	13
Kuvasz	vér	7	Összesen:	<i>min. 79</i>	673

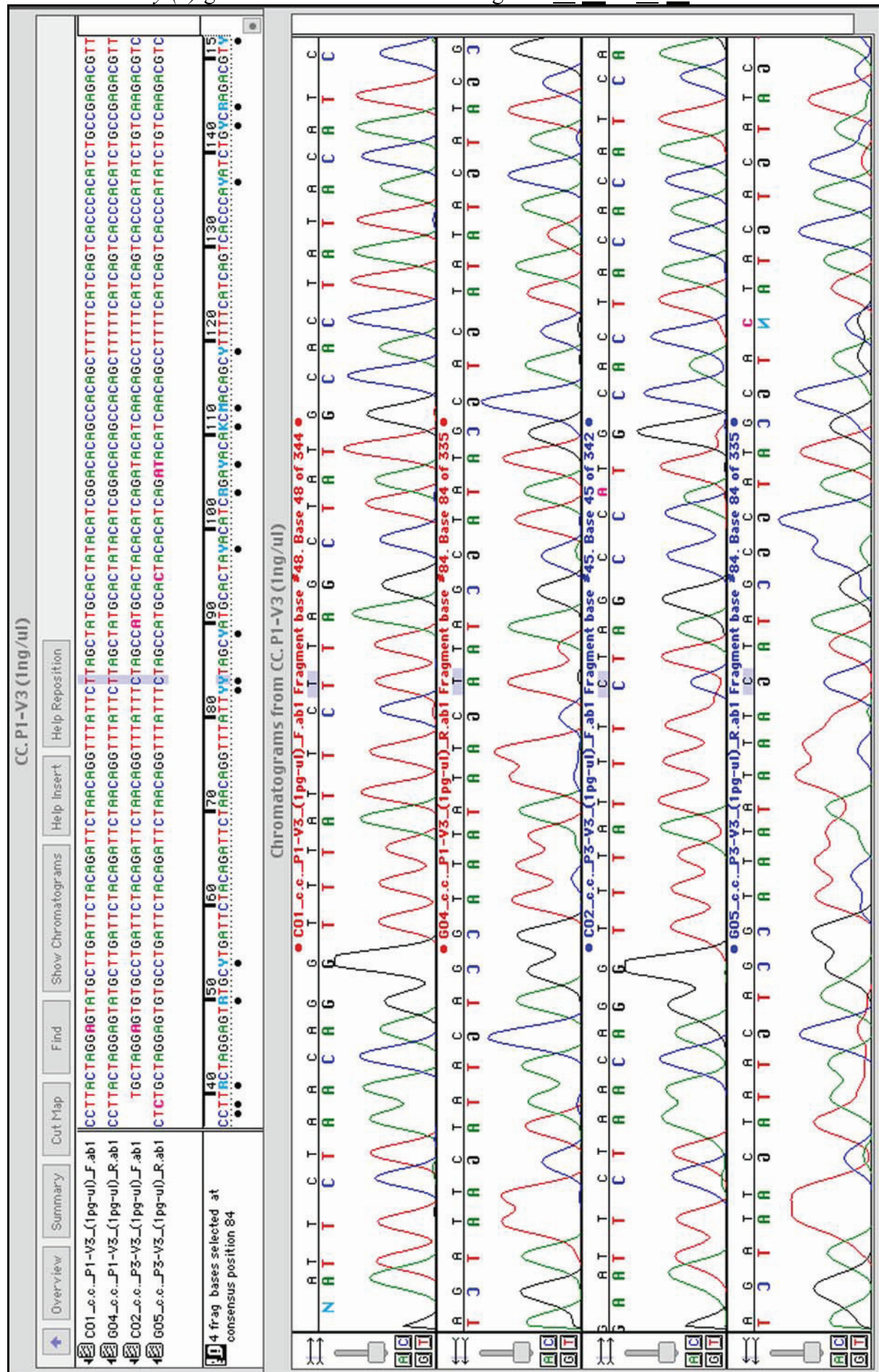
F2. ábra A *Cyt(b)* génszakasz vizsgálata v1-v1, v2-v1 és v3-v2 kondíciókkal



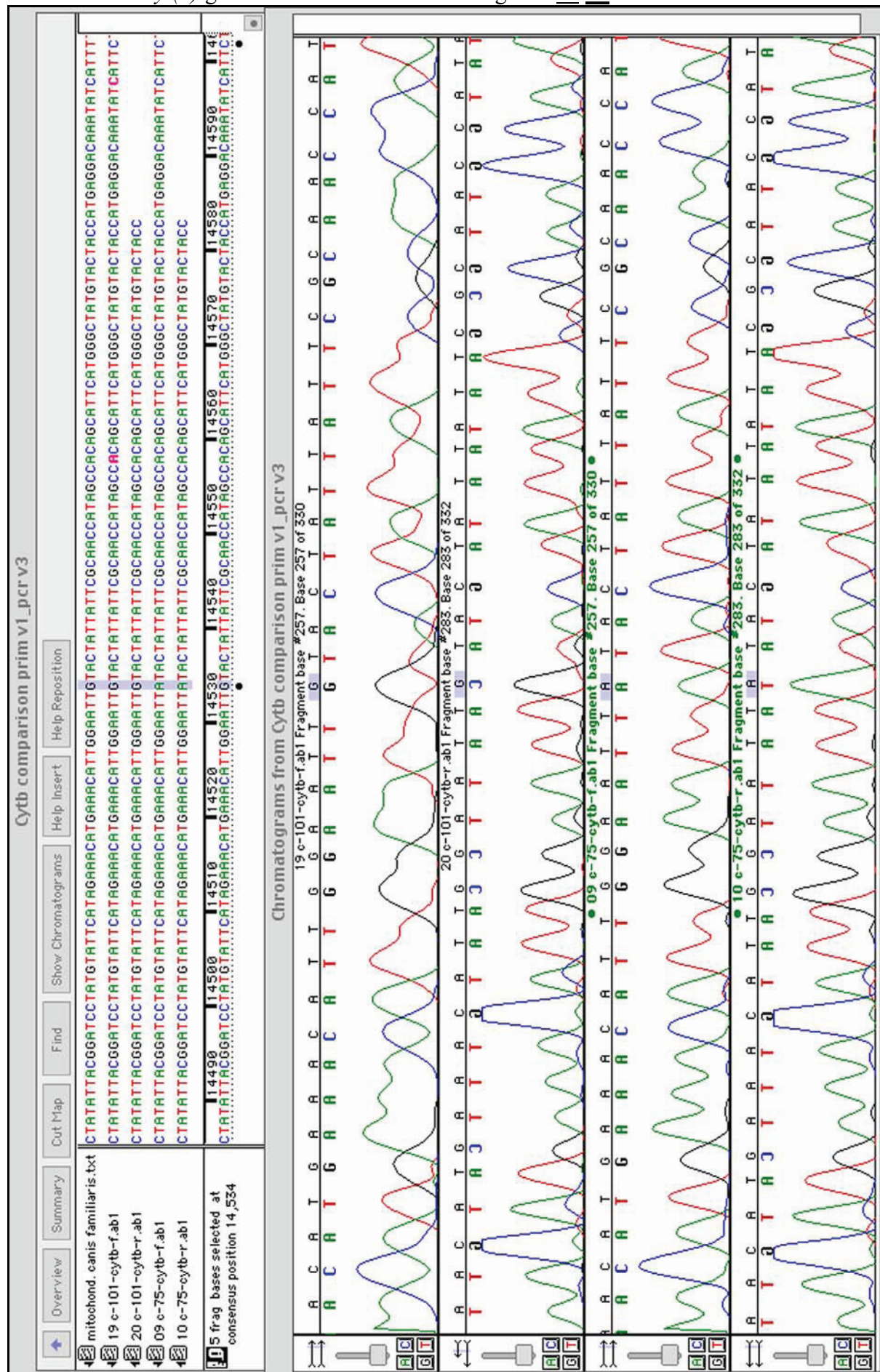
F3. ábra A *Cyt(b)* génszakasz vizsgálata $v1-v3$, $v2-v3$ és $v3-v3$ kondíciókkal



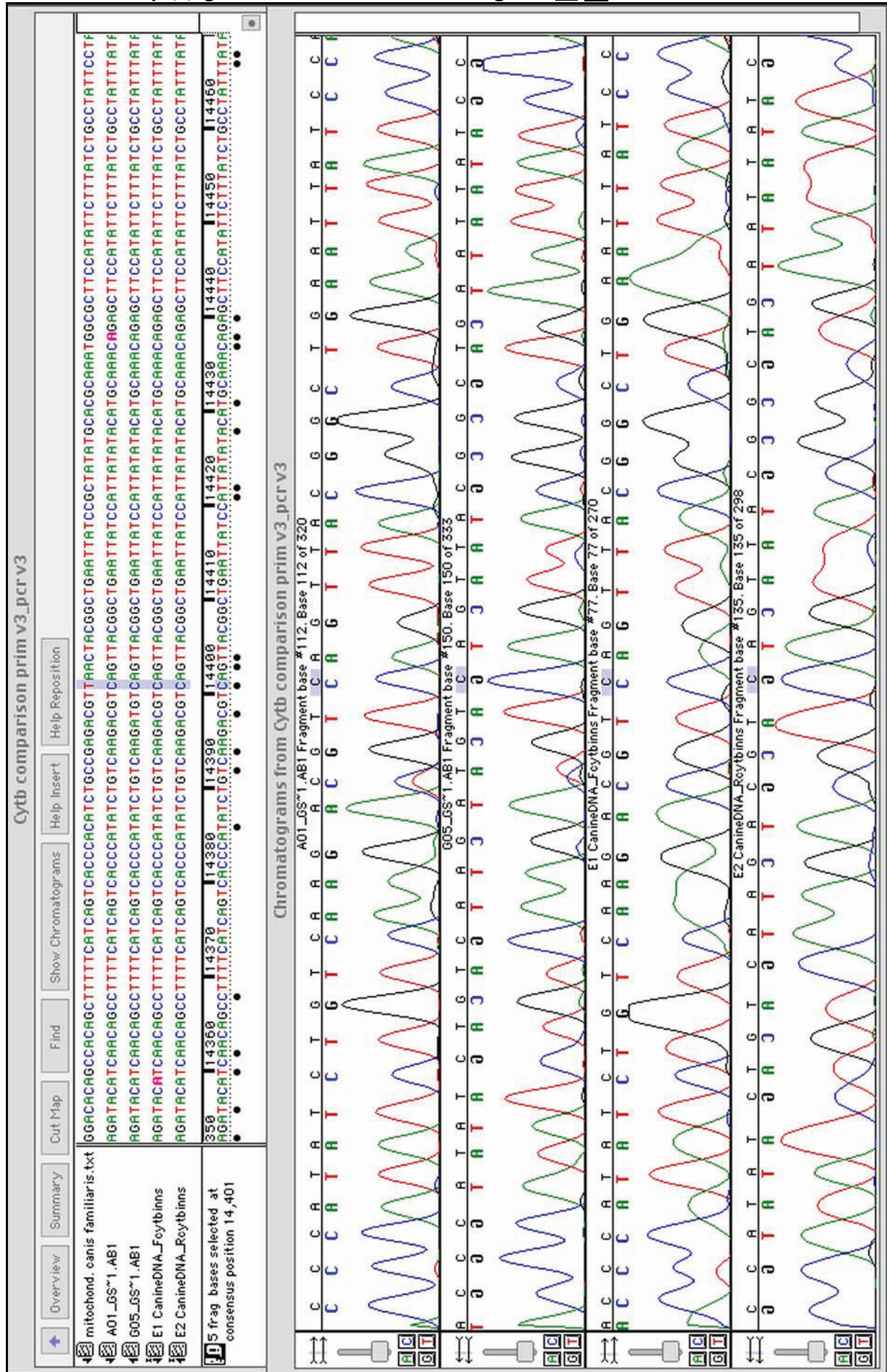
F4. ábra A *Cyt(b)* génszakasz összehasonlító vizsgálata *v1-v3* és *v3-v3* kondíciókkal



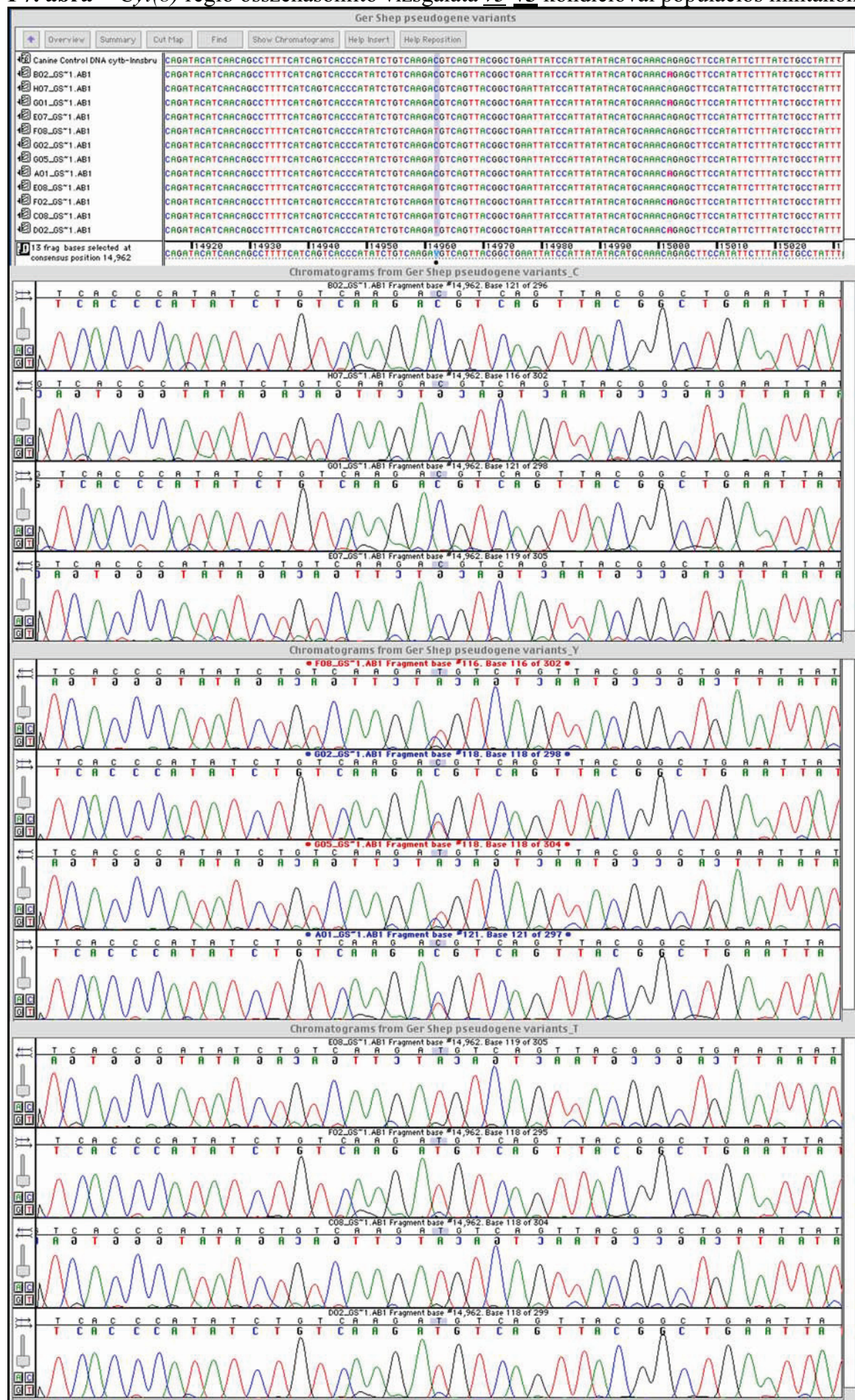
F5. ábra A *Cyt(b)* génszakasz összehasonlító vizsgálata *v1-v3* kondícióval



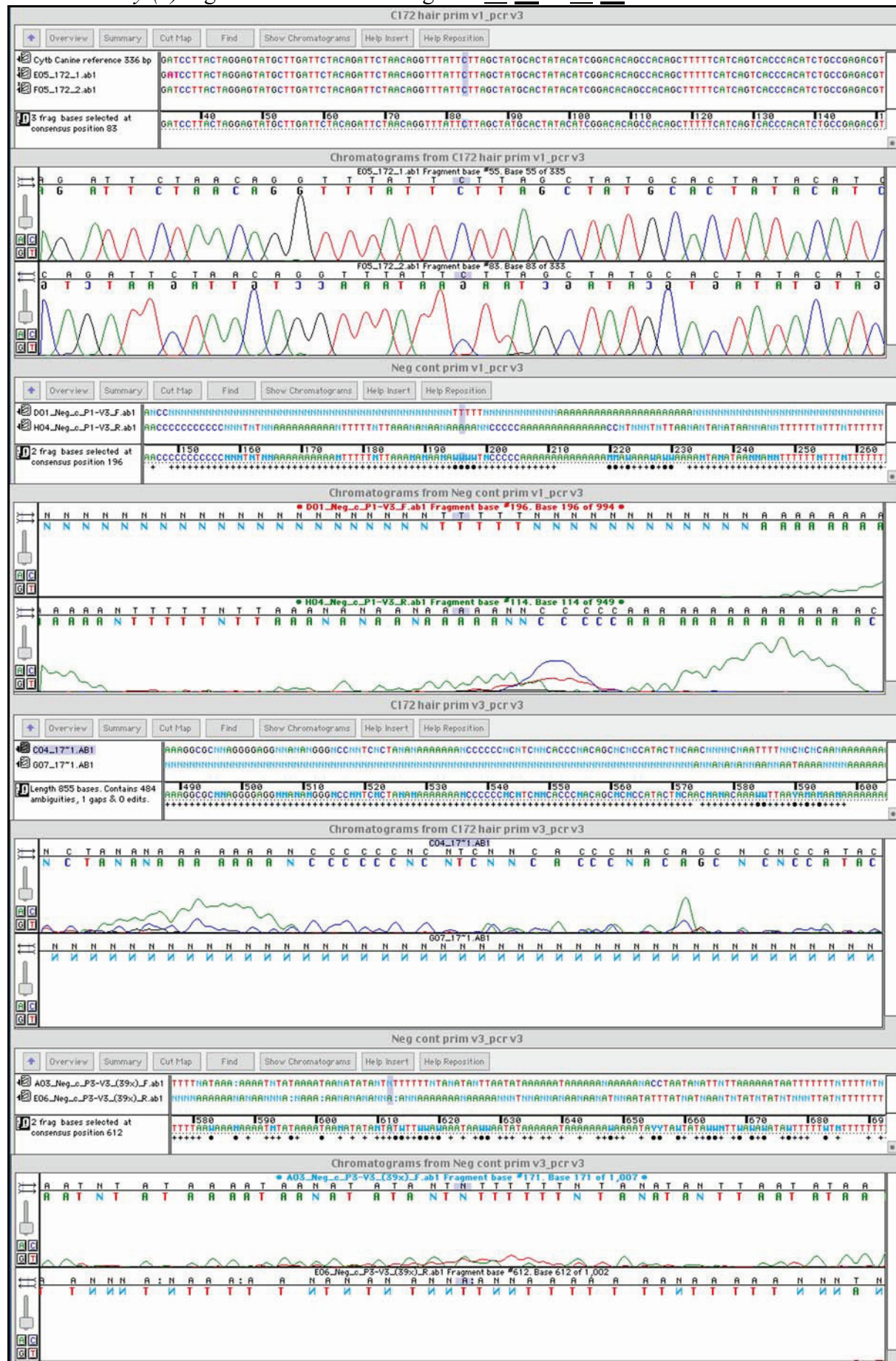
F6. ábra A *Cyt(b)* génszakasz összehasonlító vizsgálata v3-v3 kondícióval



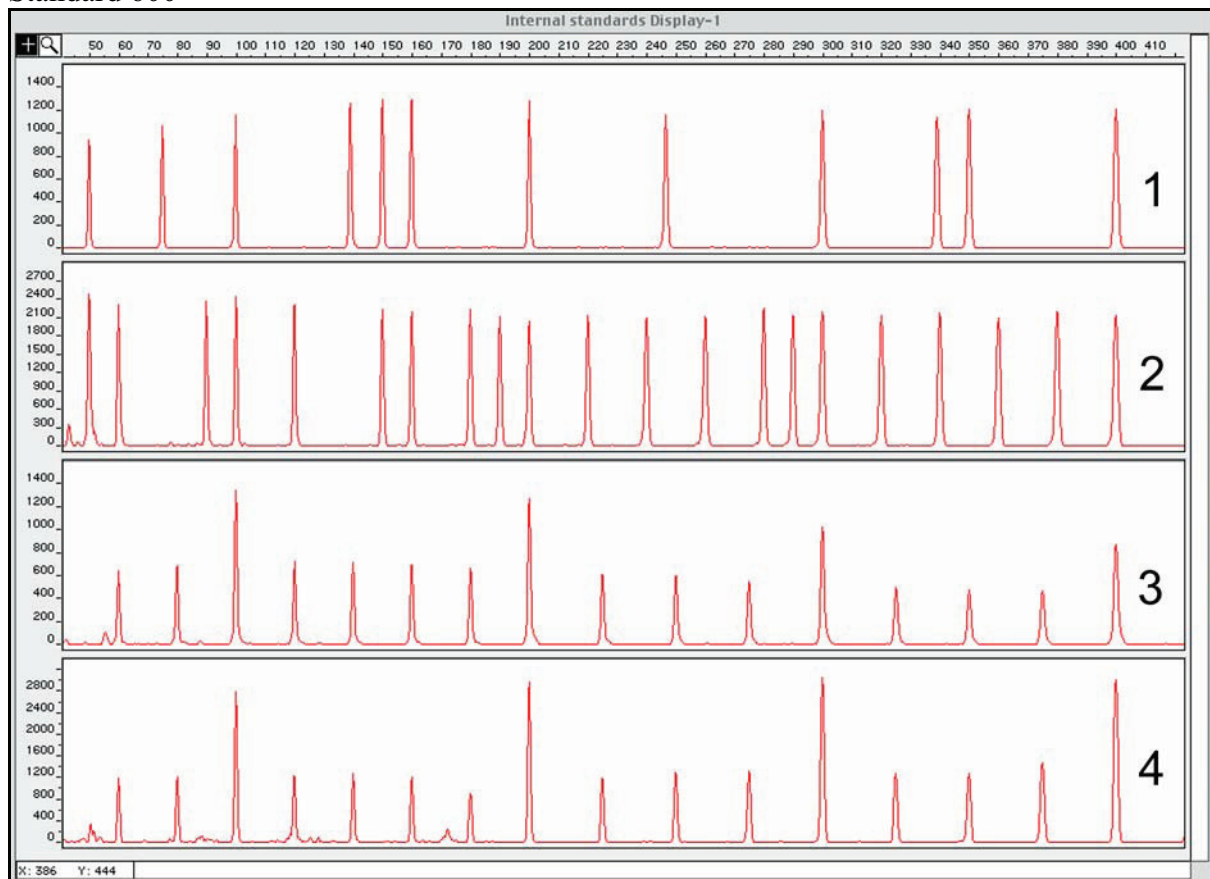
F7. ábra *Cyt(b)* régió összehasonlító vizsgálata $\nu 3$ - $\nu 3$ kondícióval populációs mintákon



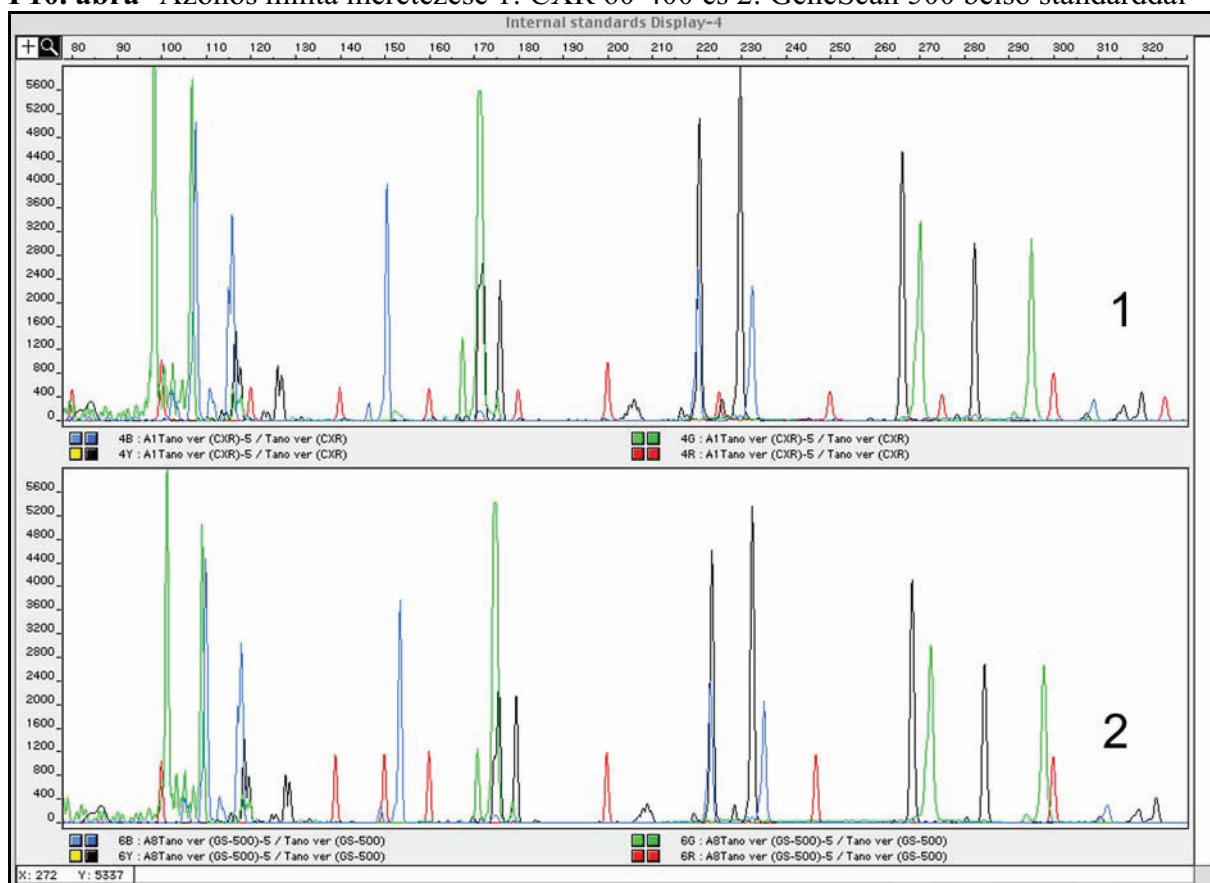
F8. ábra *Cyt(b)* régió összehasonlító vizsgálata $v1-v3$ és $v3-v3$ kondícióval szőrszálakból



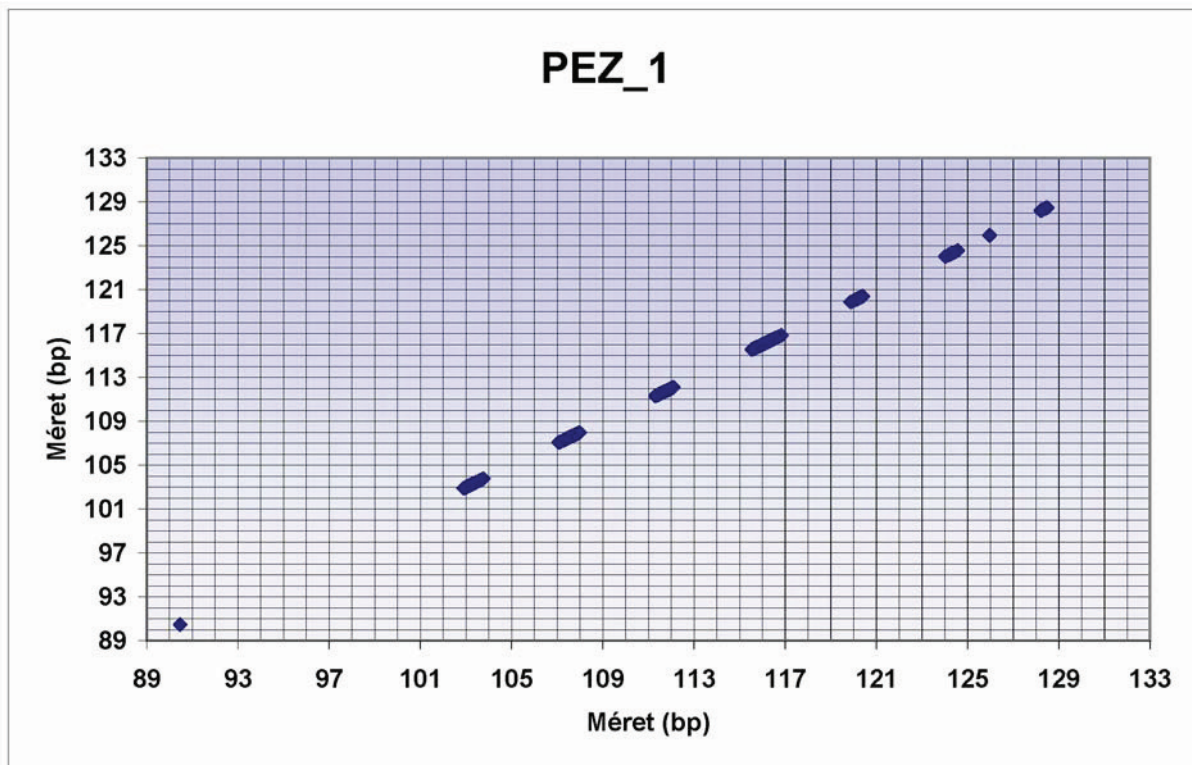
F9. ábra A vizsgálatokhoz használt belső méretstandardok. 1: GeneScan™-500 ROX™, 2: GENESCAN® 400HD [ROX], 3: Fluorescent Ladder (CXR), 60-400 Bases, 4: Internal Lane Standard 600



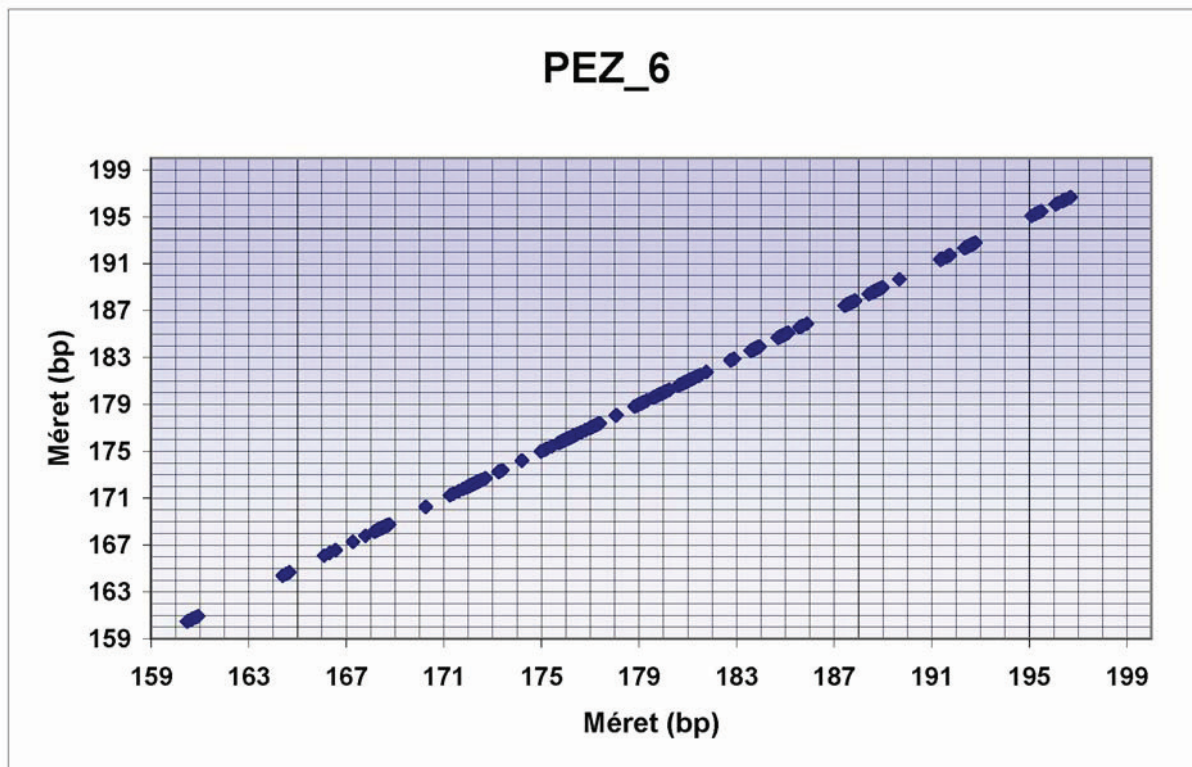
F10. ábra Azonos minta méretezése 1: CXR 60-400 és 2: GeneScan 500 belső standarddal

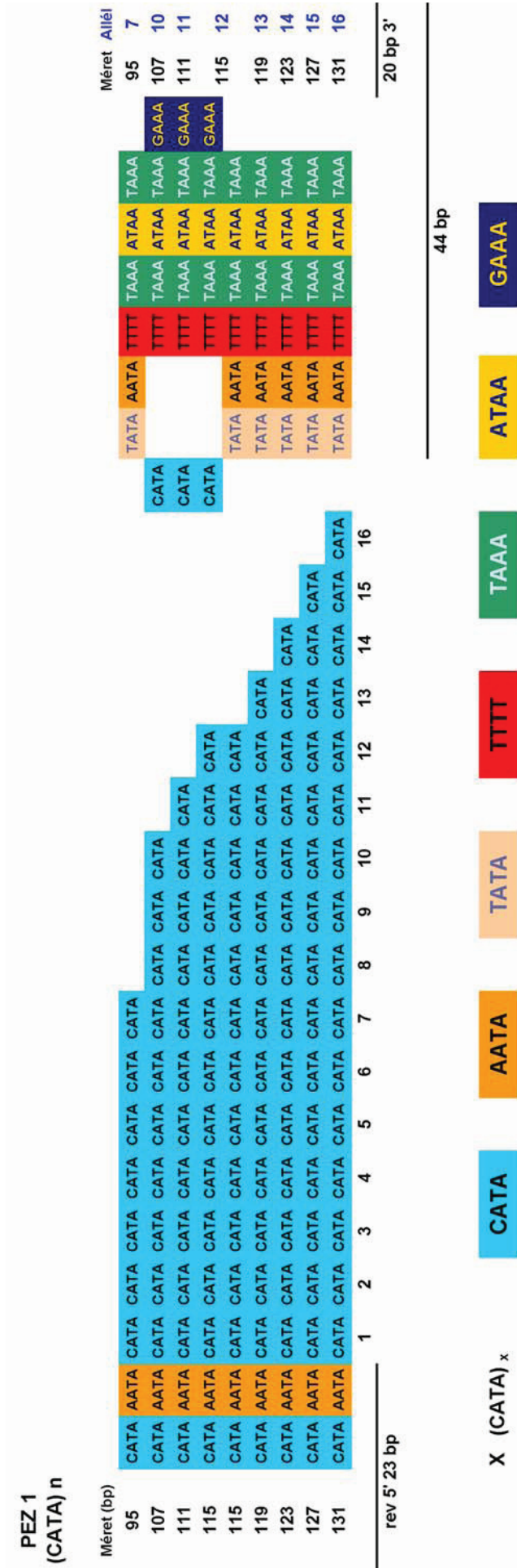


F11. ábra A populációs minták méretbeli eloszlása a PEZ1 lókuszon CXR 60-400 belső méretstandard használatával

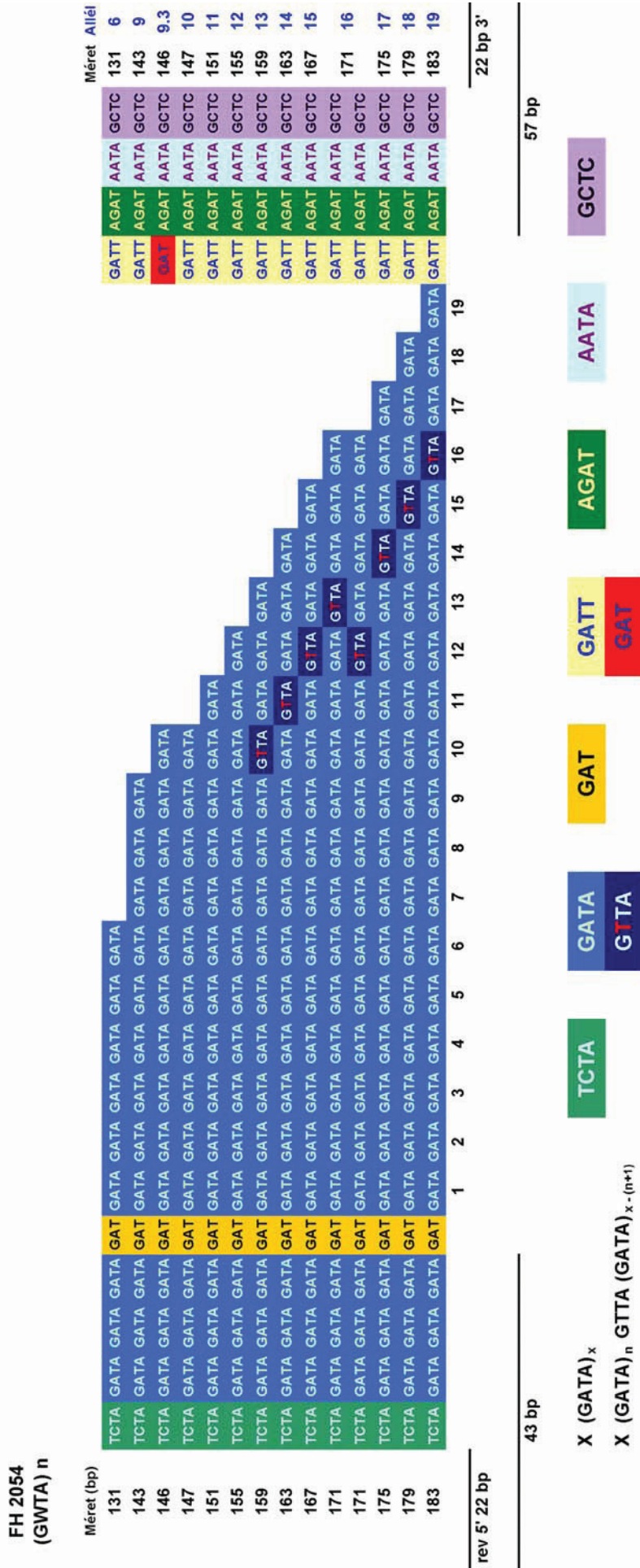


F12. ábra A populációs minták méretbeli eloszlása a PEZ6 lókuszon CXR 60-400 belső méretstandard használatával

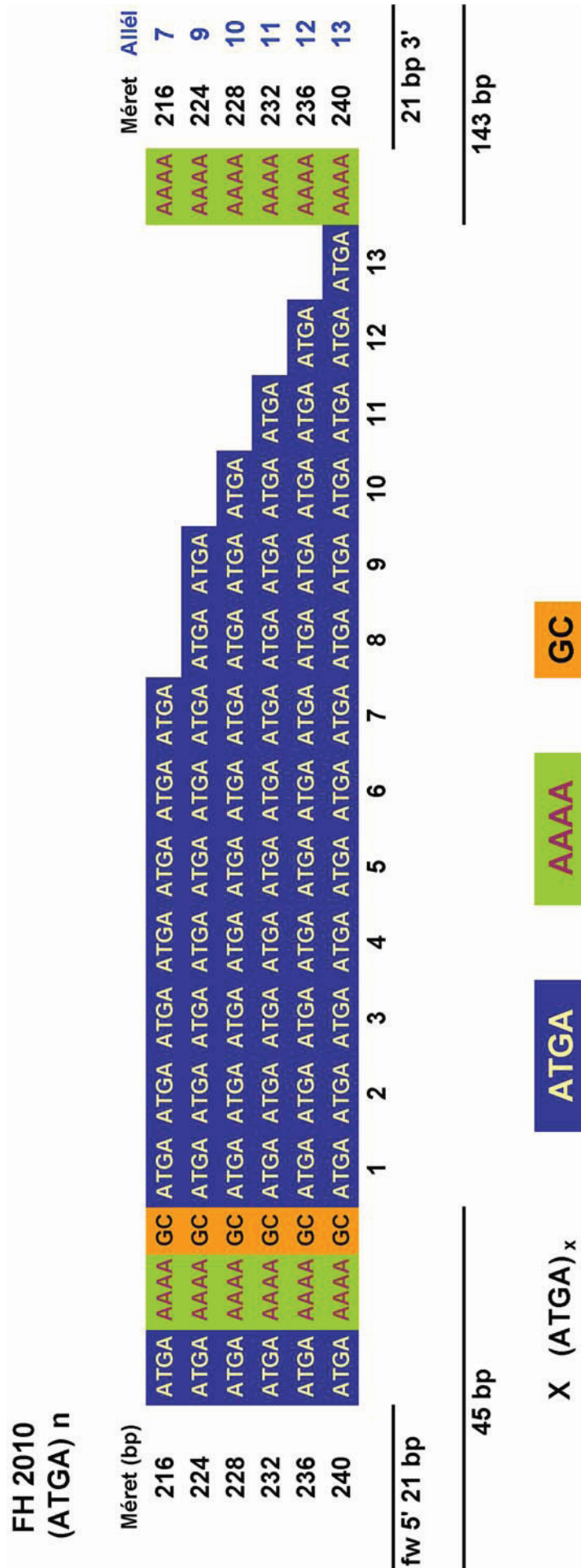




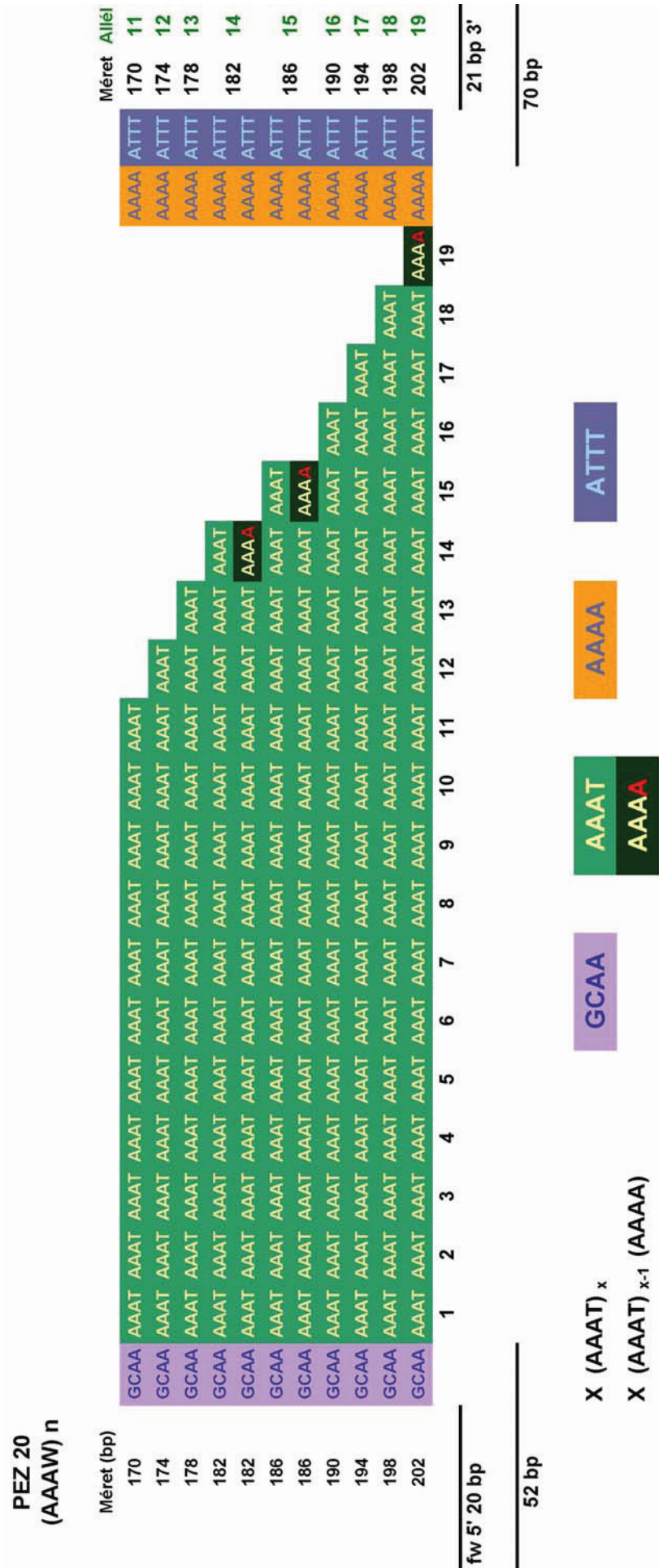
F13. ábra PEZ1 (CATA)_n lókusz struktúrája



F14. ábra FHC2054 lókusz struktúrája

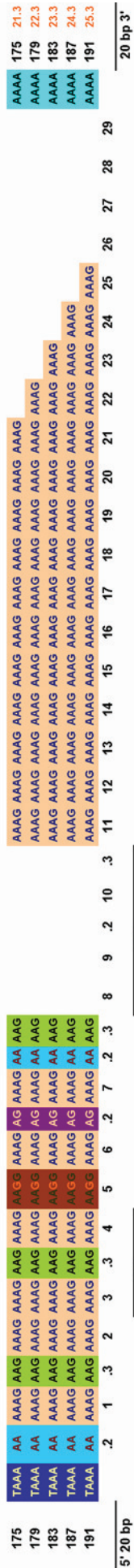
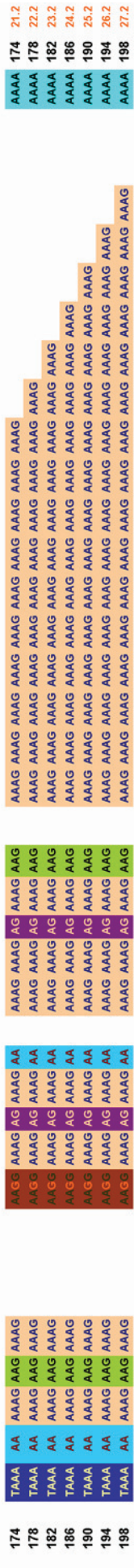
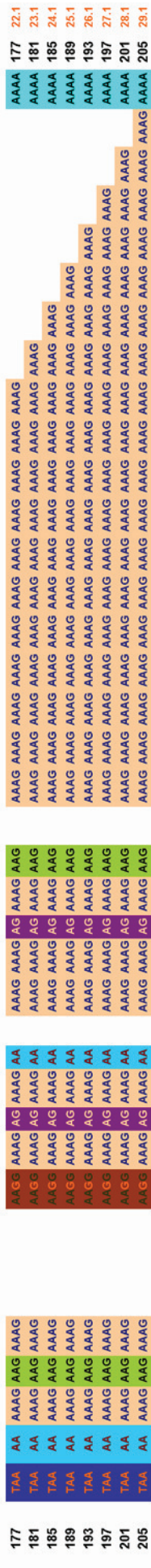
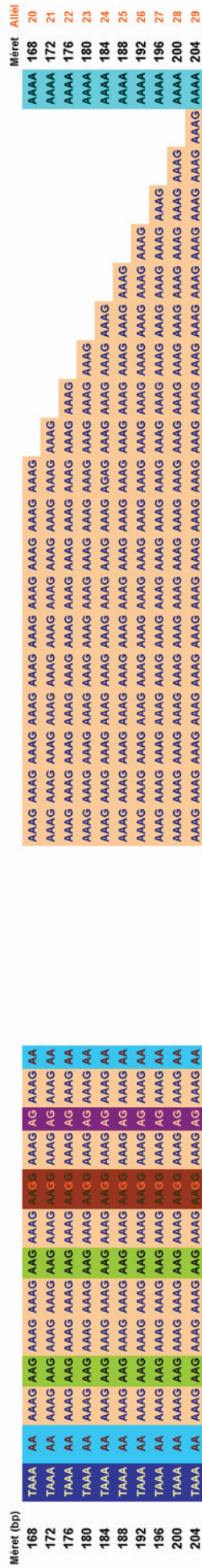


F15. ábra FHC2010 lókusztérkép



F17. ábra PEZ20 lókusztér szerkezete

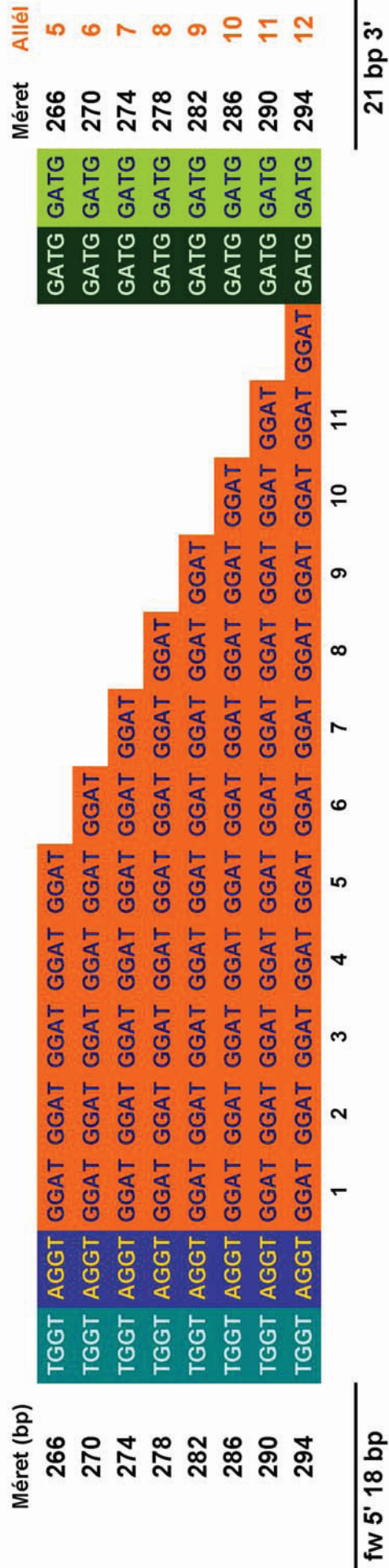
PEZ 6
(AARG)n (AA)2 (AAG)2-3 (AG)1-2



F20. ábra PEZ6 lókuszturájaja

- X AAAAAAG(AAG)₂ AAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG (AAAAG)_{x6}
- X.1 AAAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG(AAAG)₂ AGAAAGAAAG(AAAG)_{x7}
- X.2 AAAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG(AAAG)₂ AGAAAGAAAG(AAAG)_{x7}
- X.3 AAAAAAGAAAG(AAAG)₂ AAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG(AAAG)_{x6}

**FH 2079
(GGAT) n**



X (GGAT) x

TGGT

AGGT

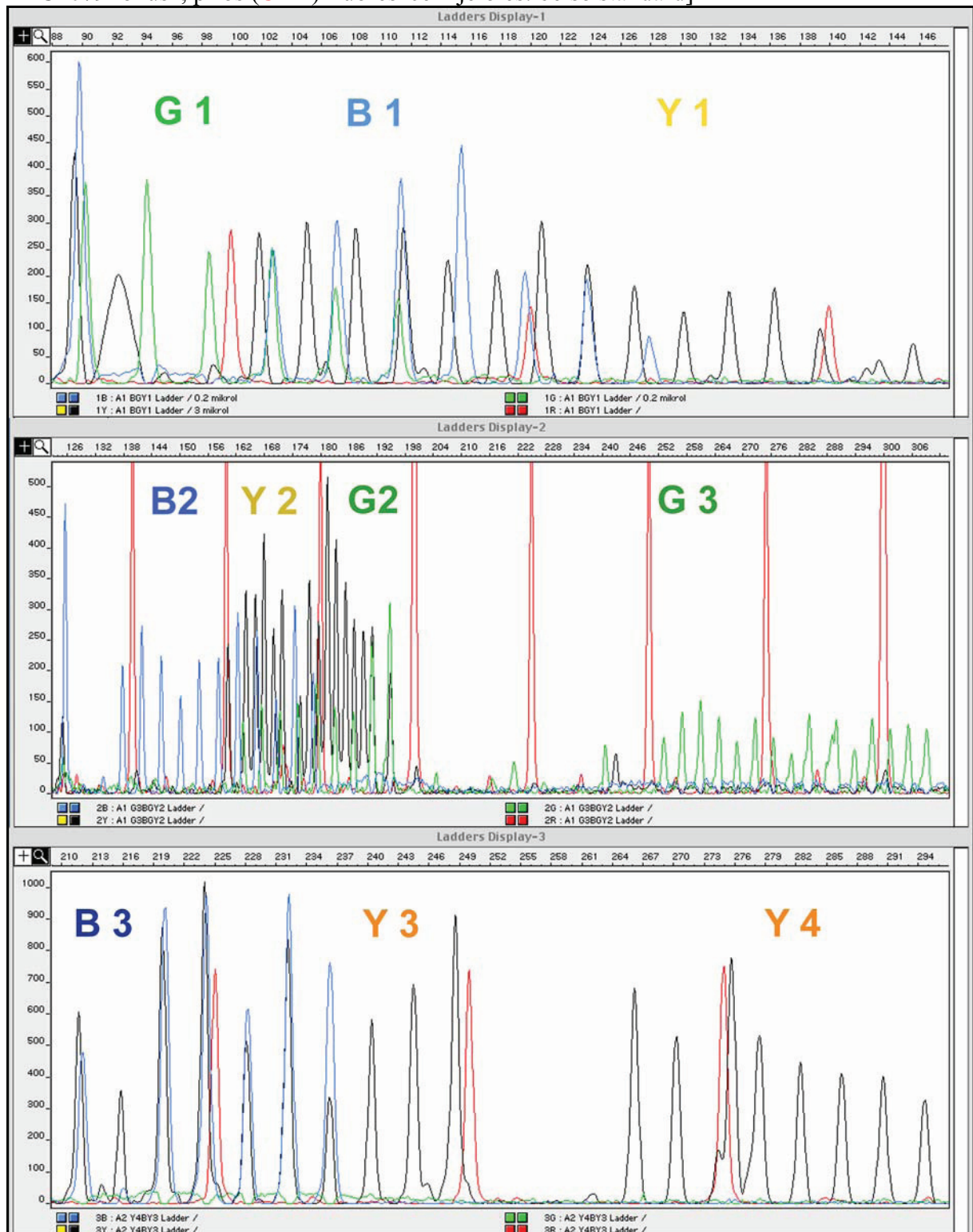
GGAT

GATG

GATG

F22. ábra FHC2079 lókusztérkép

F23. ábra Alléloktervek keveréke ILS 600 méretstandard alkalmazásával [B: kék („*FAM*”), G: zöld („*JOE*”), Y: sárga („*NED*”) fluoreszcein jelölés, G1: PEZ5, B1: PEZ1 (CATA₁), Y1: PEZ3, B2: FHC2054, Y2: PEZ6, G2: PEZ20, G3: PEZ12, B3: FHC2010, Y3: PEZ8, Y4: FHC2079 lókuszt, piros (*CXR*) fluoreszcein jelölés: belső standard]



F24.a. táblázat Az allékok méretmeghatározása különböző belső méretstandardok segítségével [Hossz: az allél szekvenált hossza bázispárban megadva, Méret: az allél adott méretstandarddal számított átlagmérete bázispárban megadva, SD: szórástérték, az egyes számított allélméreték átlagmérettől való eltérése bázispárban megadva, GS400HD: GENESCAN® 400HD [ROX], GS500: GeneScan™-500 ROX™, ILS600: Internal Lane Standard 600]

	GS400HD			GS500		ILS600		
	Allél	Hossz (bp)	Méret (bp)	SD (bp)	Méret (bp)	SD (bp)	Méret (bp)	SD (bp)
PEZ 1	7	95	93.16	0.30	93.44	0.13	90.02	0.05
	10	107	105.76	0.34	106.13	0.15	102.98	0.05
	11	111	110.12	0.36	110.14	0.15	107.24	0.06
	12	115	114.55	0.37	114.19	0.12	111.51	0.03
	13	119	118.80	0.41	118.04	0.14	115.56	0.05
	14	123	123.05	0.40	122.07	0.14	119.82	0.05
	15	127	127.19	0.43	126.13	0.16	123.99	0.05
	16	131	131.36	0.44	130.23	0.14	128.14	0.07
FH 2054	6	131	128.64	0.07	127.72	0.04	125.73	0.12
	9	143	140.76	0.13	140.09	0.13	137.97	0.09
	10	147	144.79	0.14	144.57	0.15	142.08	0.12
	11	151	148.82	0.16	149.06	0.19	146.19	0.14
	12	155	152.89	0.15	153.53	0.25	150.30	0.14
	13	159	156.95	0.17	157.91	0.31	154.35	0.12
	14	163	161.10	0.14	162.16	0.27	158.47	0.09
	15	167	165.23	0.29	166.24	0.39	162.49	0.15
	16	171	169.38	0.34	170.31	0.45	166.51	0.16
	17	175	173.54	0.38	174.37	0.46	170.54	0.14
	18	179	177.74	0.40	178.39	0.48	174.58	0.14
19	183	181.90	0.38	182.40	0.48	178.58	0.15	
FH 2010	7	216	216.09	0.11	215.50	0.05	211.99	0.08
	9	224	224.22	0.14	223.52	0.04	220.04	0.09
	10	228	228.37	0.13	227.53	0.08	224.10	0.09
	11	232	232.57	0.15	231.55	0.06	228.17	0.11
	12	236	236.72	0.14	235.57	0.07	232.22	0.08
	13	240	240.89	0.14	239.58	0.07	236.27	0.10
PEZ 5	6	97	93.23	0.16	93.31	0.07	90.26	0.05
	7	101	97.19	0.17	97.62	0.03	94.43	0.05
	8	105	101.27	0.18	101.79	0.04	98.59	0.04
	9	109	105.56	0.18	105.70	0.05	102.80	0.05
	10	113	109.87	0.18	109.70	0.06	107.04	0.05
	11	117	114.20	0.23	113.68	0.07	111.25	0.03
PEZ 20	11	170	166.89	0.53	167.71	0.05	163.52	0.04
	12	174	171.00	0.62	171.68	0.06	167.40	0.05
	13	178	175.14	0.70	175.63	0.05	171.30	0.04
	14	182	179.13	0.75	179.39	0.04	175.06	0.05
	15	186	183.22	0.70	183.37	0.06	179.08	0.05
	16	190	187.26	0.63	187.30	0.05	183.05	0.05
	17	194	191.28	0.60	191.11	0.05	186.96	0.05
	18	198	195.33	0.60	194.90	0.05	190.87	0.03
	19	202	199.24	0.59	198.52	0.05	194.64	0.04

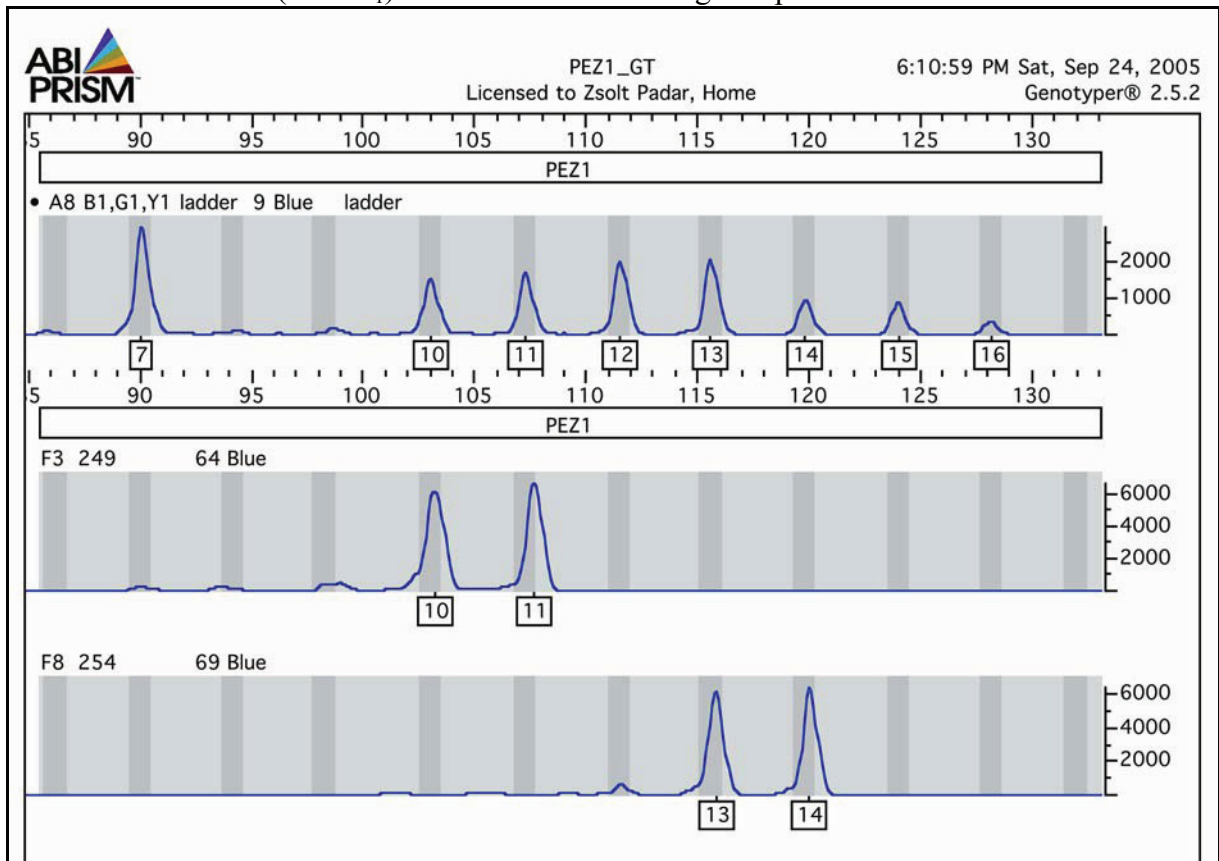
F24.b. táblázat Az allékoktélók méretmeghatározása különböző belső méretstandardok segítségével

		GS400HD			GS500		ILS600	
	Allél	Hossz (bp)	Méret (bp)	SD (bp)	Méret (bp)	SD (bp)	Méret (bp)	SD (bp)
PEZ 12	11	264	257.66	0.05	256.60	0.05	253.52	0.06
	12	268	261.47	0.04	260.46	0.05	257.42	0.05
	13	272	265.25	0.03	264.34	0.05	261.32	0.06
	14	276	269.09	0.05	268.25	0.05	265.22	0.05
	15	280	272.91	0.06	272.13	0.04	269.12	0.05
	16	284	276.72	0.04	276.01	0.03	273.01	0.04
	17	288	280.55	0.06	279.89	0.06	276.85	0.04
	18	292	284.42	0.05	283.75	0.06	280.65	0.05
	19	296	288.28	0.06	287.65	0.06	284.44	0.03
	20.1	301	293.15	0.06	292.57	0.05	289.27	0.04
	20.2	302	294.10	0.05	293.54	0.05	290.26	0.06
	21.2	306	297.99	0.06	297.47	0.05	294.13	0.04
	22.2	310	301.85	0.06	301.42	0.05	297.98	0.06
	23.2	314	305.79	0.06	305.41	0.04	301.81	0.06
	24.2	318	309.68	0.08	309.31	0.05	305.63	0.06
25.2	322	313.62	0.06	313.25	0.06	309.49	0.05	
PEZ 3	15	95	92.20	0.04	92.24	0.05	89.05	0.20
	19	107	104.26	0.07	104.32	0.05	101.43	0.26
	20	110	107.53	0.06	107.33	0.04	104.62	0.23
	21	113	110.87	0.06	110.43	0.04	107.92	0.21
	22	116	114.15	0.06	113.43	0.05	111.15	0.24
	23	119	117.22	0.05	116.27	0.05	114.07	0.20
	24	122	120.64	0.06	119.42	0.05	117.41	0.20
	25	125	123.52	0.05	122.28	0.04	120.35	0.19
	26	128	126.60	0.07	125.33	0.06	123.45	0.21
	27	131	129.69	0.06	128.45	0.06	126.57	0.18
	28	134	132.95	0.07	131.77	0.06	129.85	0.19
	29	137	135.99	0.06	134.80	0.06	132.94	0.17
	30	140	138.97	0.06	137.89	0.04	135.96	0.19
	31	143	142.01	0.08	141.22	0.05	139.03	0.20
33	149	148.08	0.05	148.01	0.04	145.22	0.20	
FH 2079	5	266	270.09	0.08	269.37	0.06	266.05	0.06
	6	270	274.10	0.10	273.47	0.07	270.19	0.03
	7	274	278.20	0.13	277.70	0.12	274.34	0.06
	8	278	282.16	0.14	281.66	0.08	278.30	0.05
	9	282	286.29	0.11	285.78	0.08	282.33	0.04
	10	286	290.37	0.10	289.86	0.06	286.35	0.05
	11	290	294.43	0.12	294.00	0.07	290.41	0.05
	12	294	298.47	0.12	298.15	0.06	294.46	0.06

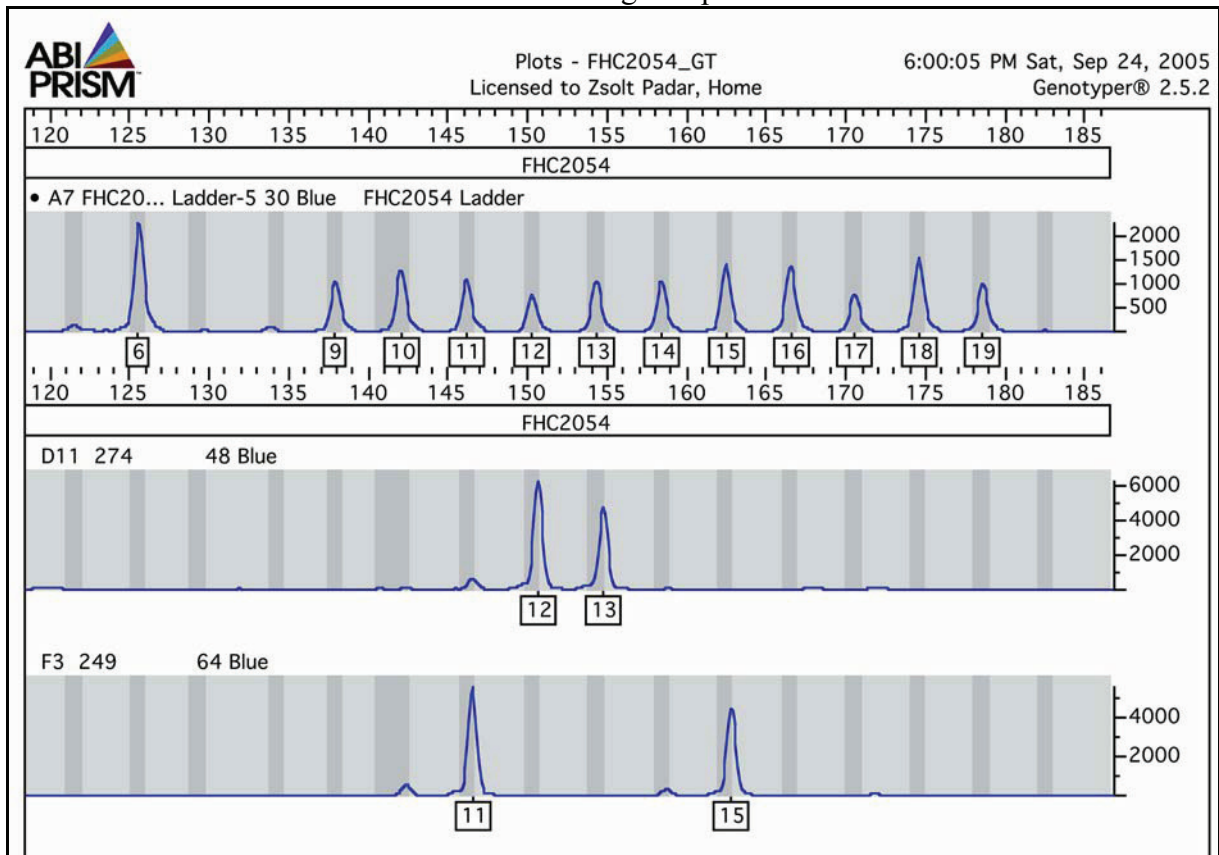
F24.c. táblázat Az allékoktélók méretmeghatározása különböző belső méretstandardok segítségével

		GS400HD			GS500		ILS600	
	Allél	Hossz (bp)	Méret (bp)	SD (bp)	Méret (bp)	SD (bp)	Méret (bp)	SD (bp)
PEZ 6	20	168	163.32	0.08	164.24	0.06	160.18	0.06
	21	172	167.29	0.05	168.16	0.06	164.04	0.05
	21.2	174	169.34	0.06	170.19	0.07	166.00	0.04
	22	176	171.25	0.07	172.06	0.07	167.84	0.05
	22.2	178	173.32	0.05	174.05	0.05	169.82	0.04
	22.3	179	174.20	0.04	174.99	0.08	170.73	0.05
	23	180	175.24	0.08	175.91	0.06	171.68	0.04
	23.1	181	176.17	0.05	176.96	0.09	172.63	0.02
	24	184	179.25	0.09	179.75	0.07	175.49	0.05
	24.1	185	180.23	0.05	180.78	0.10	176.56	0.05
	24.2	186	181.31	0.07	181.72	0.06	177.47	0.03
	25	188	183.24	0.06	183.56	0.06	179.34	0.00
	25.1	189	184.26	0.05	184.59	0.09	180.26	0.05
	25.2	190	185.29	0.05	185.51	0.04	181.33	0.04
	26	192	187.19	0.06	187.33	0.06	183.14	0.05
	26.1	193	188.23	0.09	188.35	0.08	184.22	0.03
	26.2	194	189.26	0.07	189.25	0.05	185.15	0.04
	27	196	191.17	0.06	191.07	0.03	187.00	0.04
	27.1	197	192.22	0.09	192.13	0.06	188.02	0.05
	27.2	198	193.21	0.07	193.00	0.04	188.97	0.04
28	200	195.17	0.06	194.77	0.05	190.82	0.05	
28.1	201	196.25	0.08	195.71	0.05	191.72	0.04	
29	204	199.10	0.06	198.44	0.05	194.67	0.04	
29.1	205	200.19	0.09	199.66	0.05	195.87	0.06	
PEZ 8	11	215	216.03	0.03	215.54	0.04	212.10	0.07
	11.1	216	217.05	0.14	216.93	0.13	213.13	0.09
	12	219	220.04	0.06	219.58	0.07	216.19	0.05
	12.1	220	221.15	0.13	220.76	0.14	217.24	0.09
	13	223	224.26	0.05	223.65	0.07	220.24	0.05
	13.1	224	225.33	0.13	224.60	0.16	221.21	0.10
	14	227	228.47	0.05	227.68	0.06	224.34	0.06
	14.1	228	229.57	0.12	228.89	0.17	225.42	0.11
	15	231	232.72	0.05	231.72	0.06	228.38	0.02
	16	235	236.91	0.05	235.75	0.05	232.51	0.06
	17	239	241.13	0.06	239.83	0.07	236.60	0.04
	18	243	245.26	0.06	243.91	0.05	240.71	0.07
	19	247	249.34	0.06	248.01	0.05	244.87	0.06
20	251	253.39	0.07	252.05	0.06	248.96	0.05	

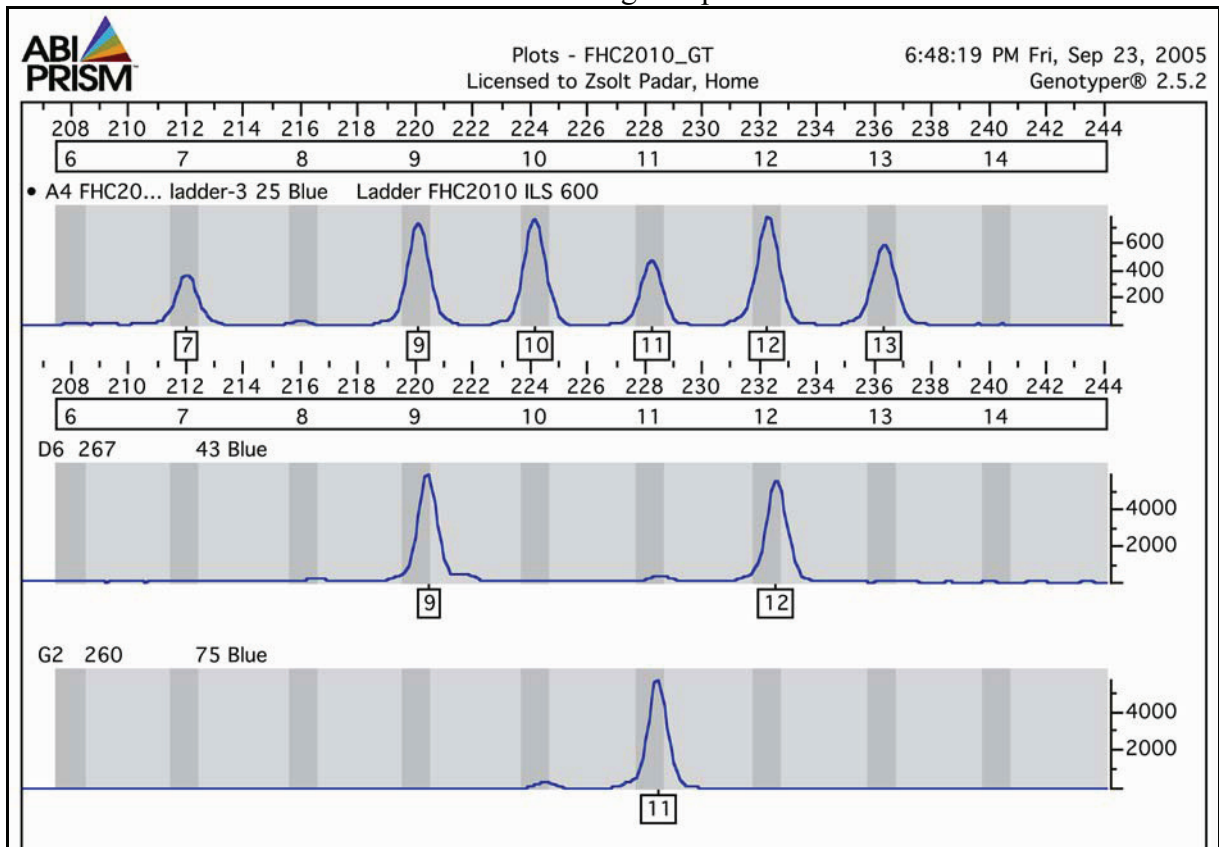
F25.a. ábra PEZ1 (CATA₁) lókuszt szemiautomata genotipizálása



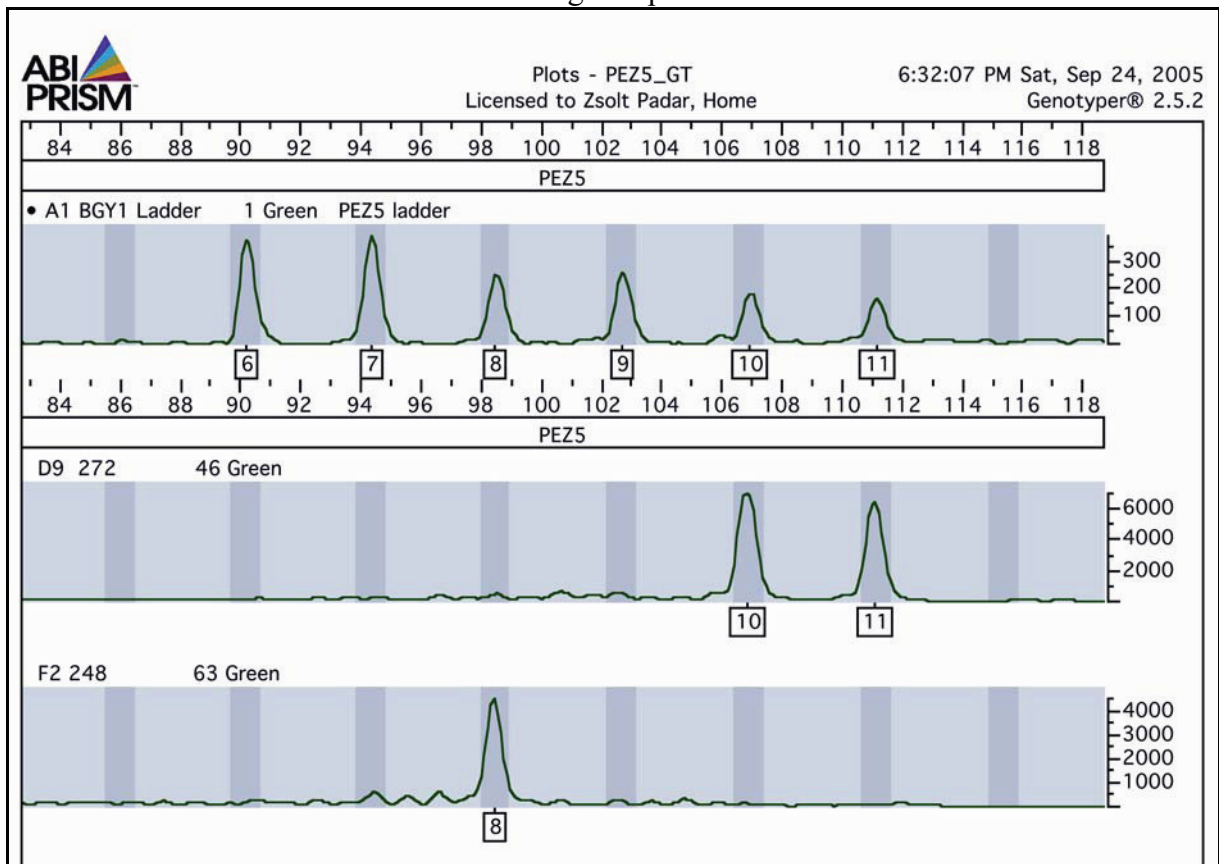
F25.b. ábra FHC2054 lókuszt szemiautomata genotipizálása



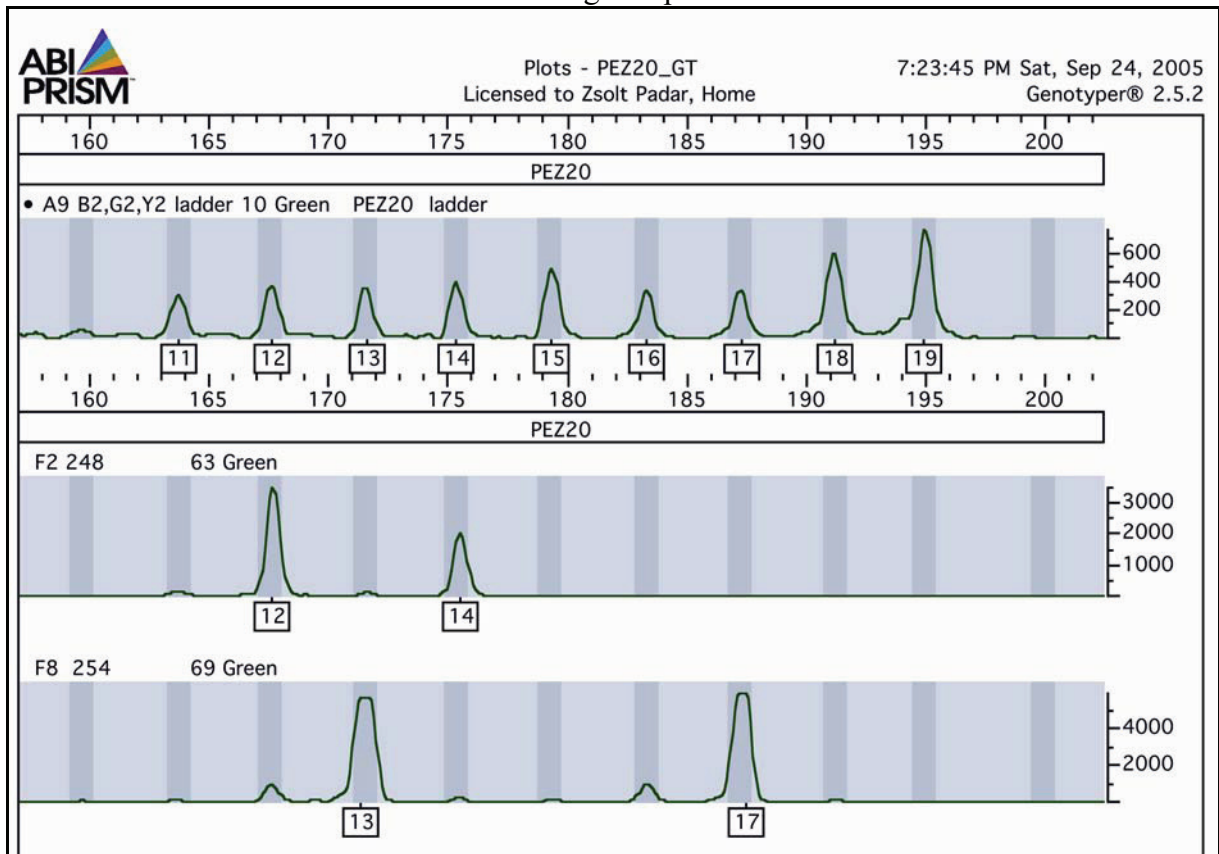
F25.c. ábra FHC2010 lókus szemiautomata genotipizálása



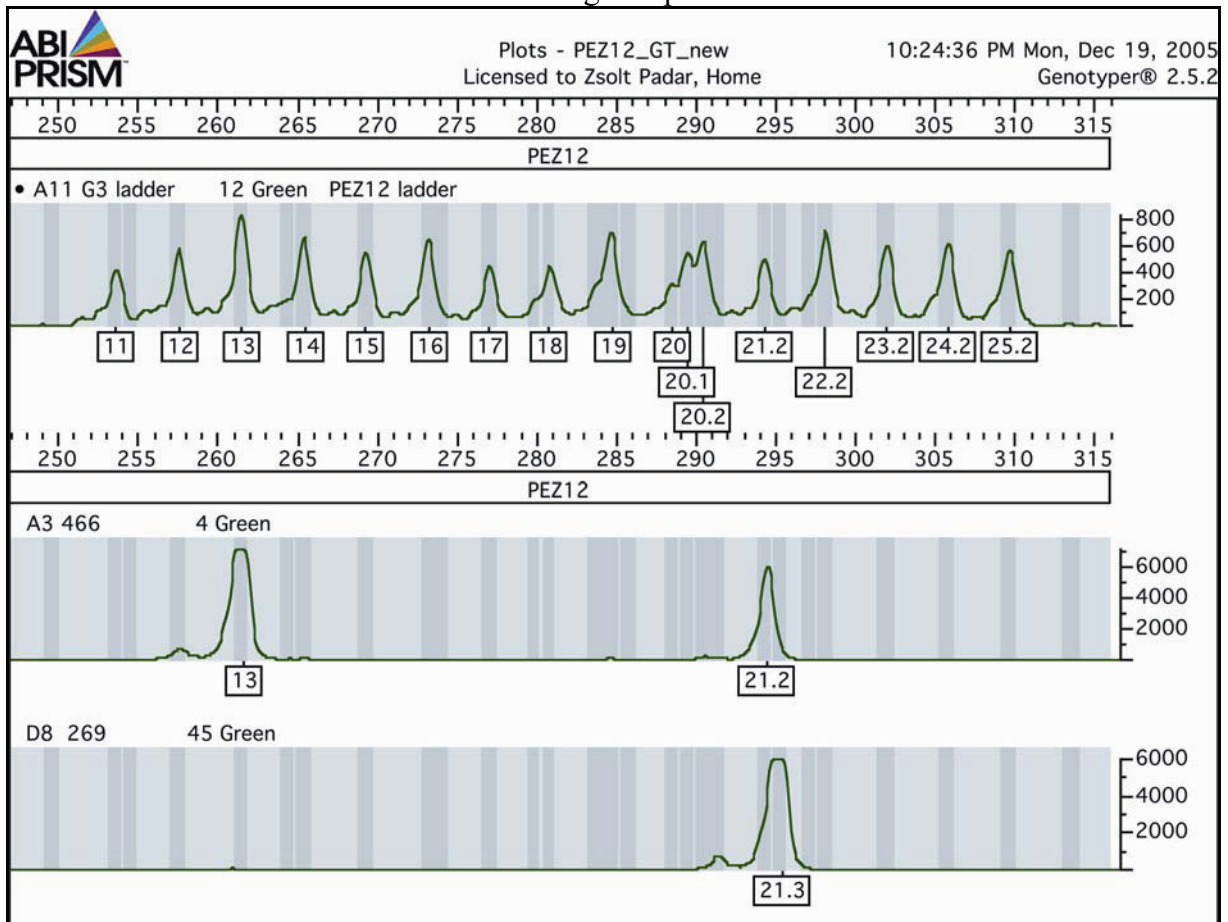
F25.d. ábra PEZ5 lókus szemiautomata genotipizálása



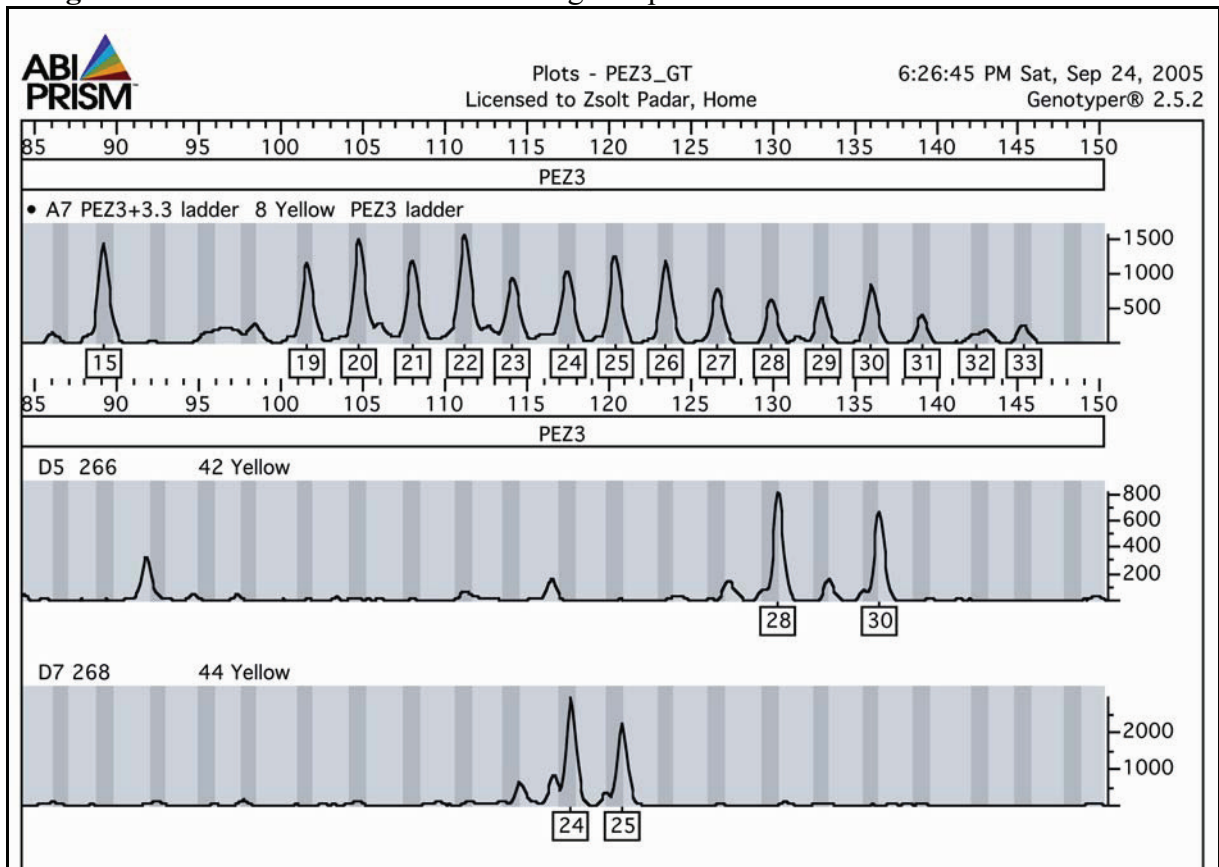
F25.e. ábra PEZ20 lókuszt szemiautomata genotipizálása



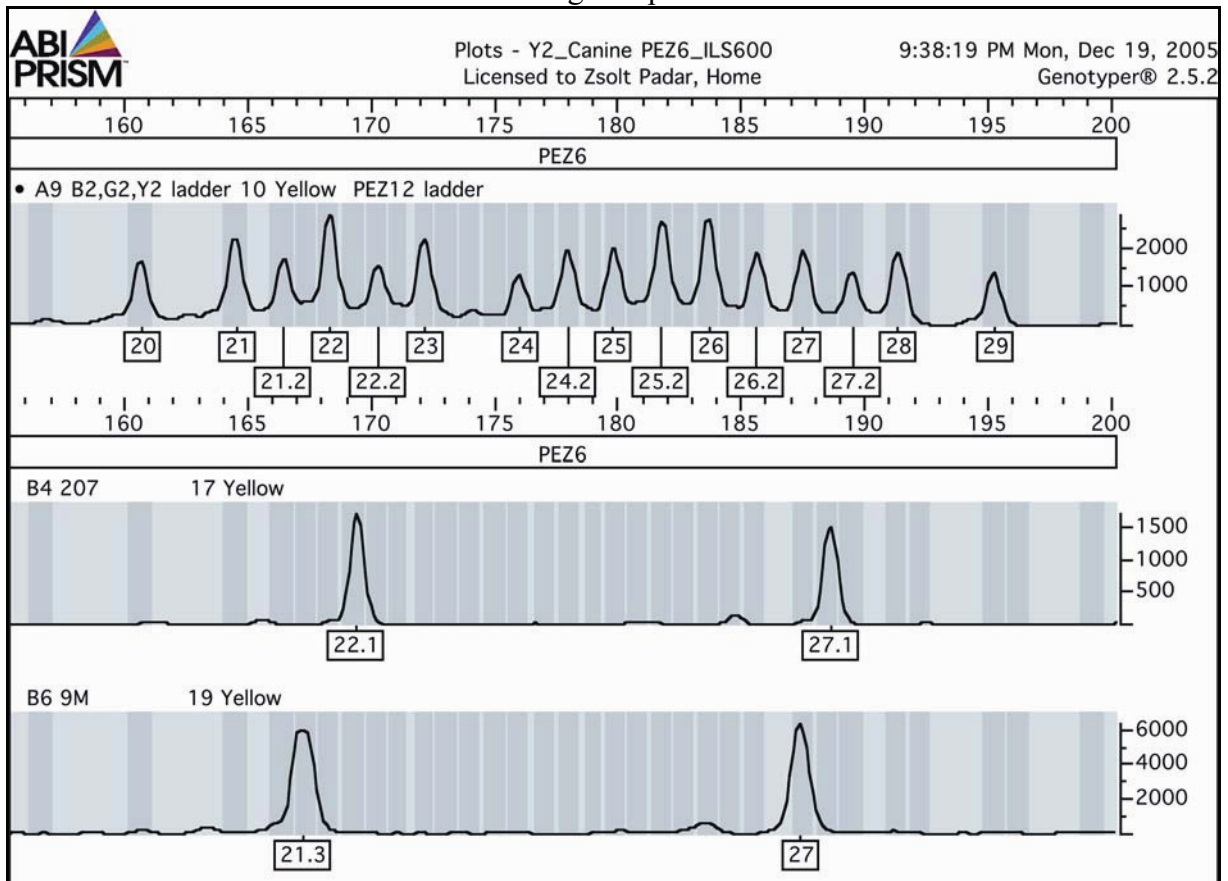
F25.f. ábra PEZ12 lókuszt szemiautomata genotipizálása



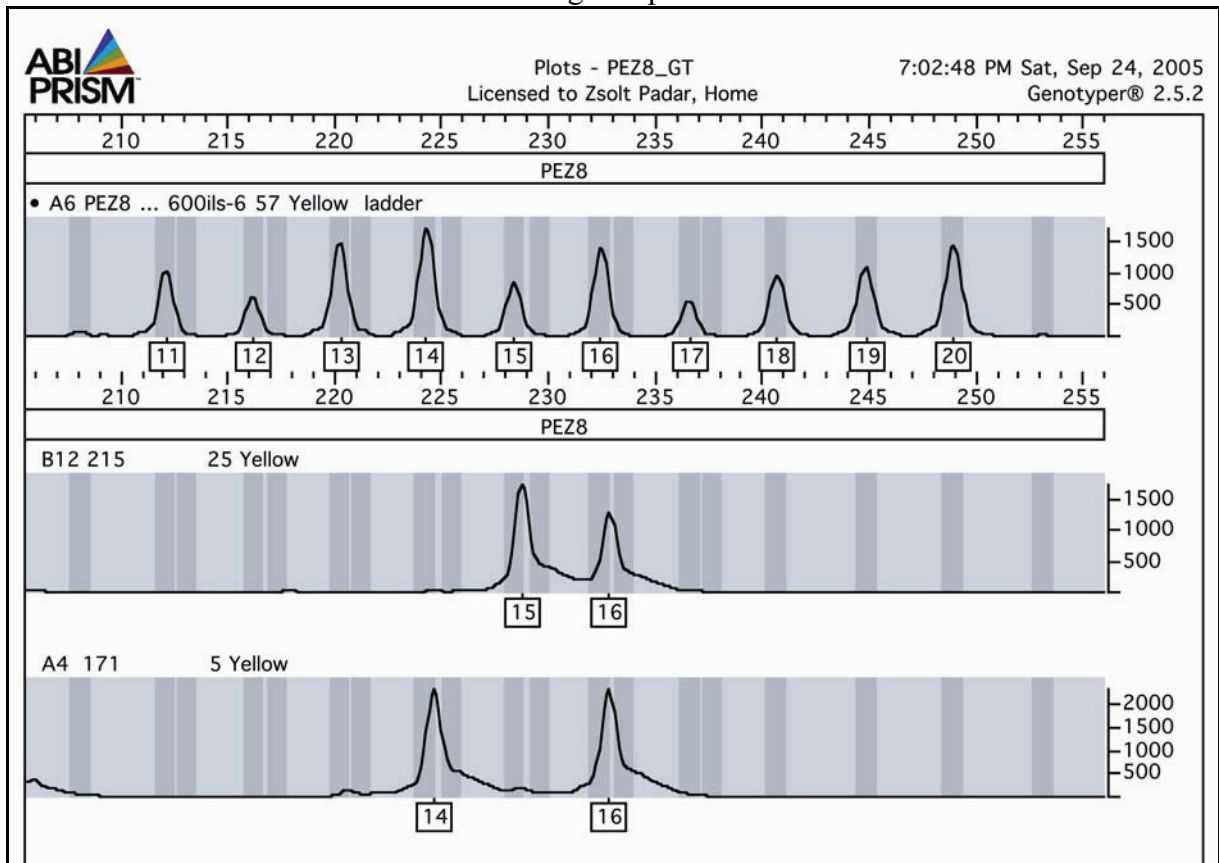
F25.g. ábra PEZ3 lókuszt szemiautomata genotipizálása



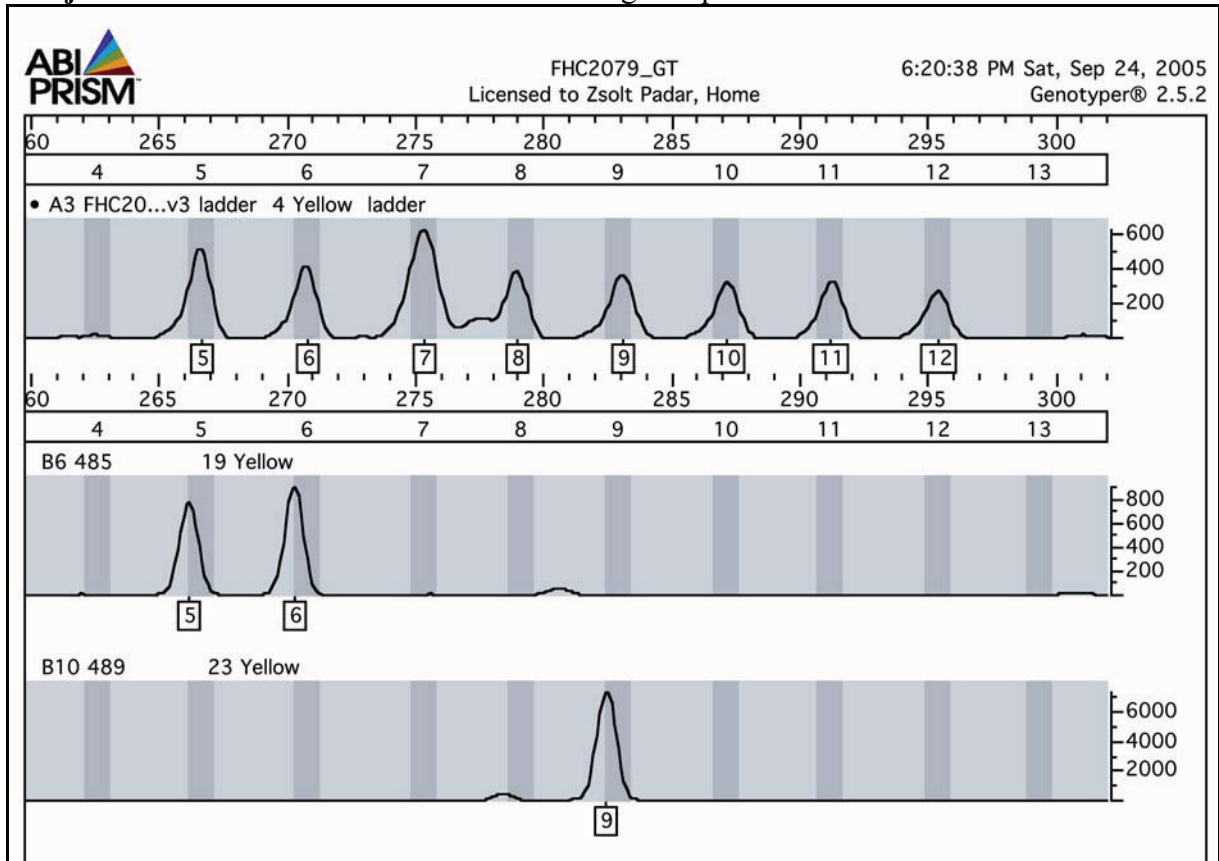
F25.h. ábra PEZ6 lókuszt szemiautomata genotipizálása



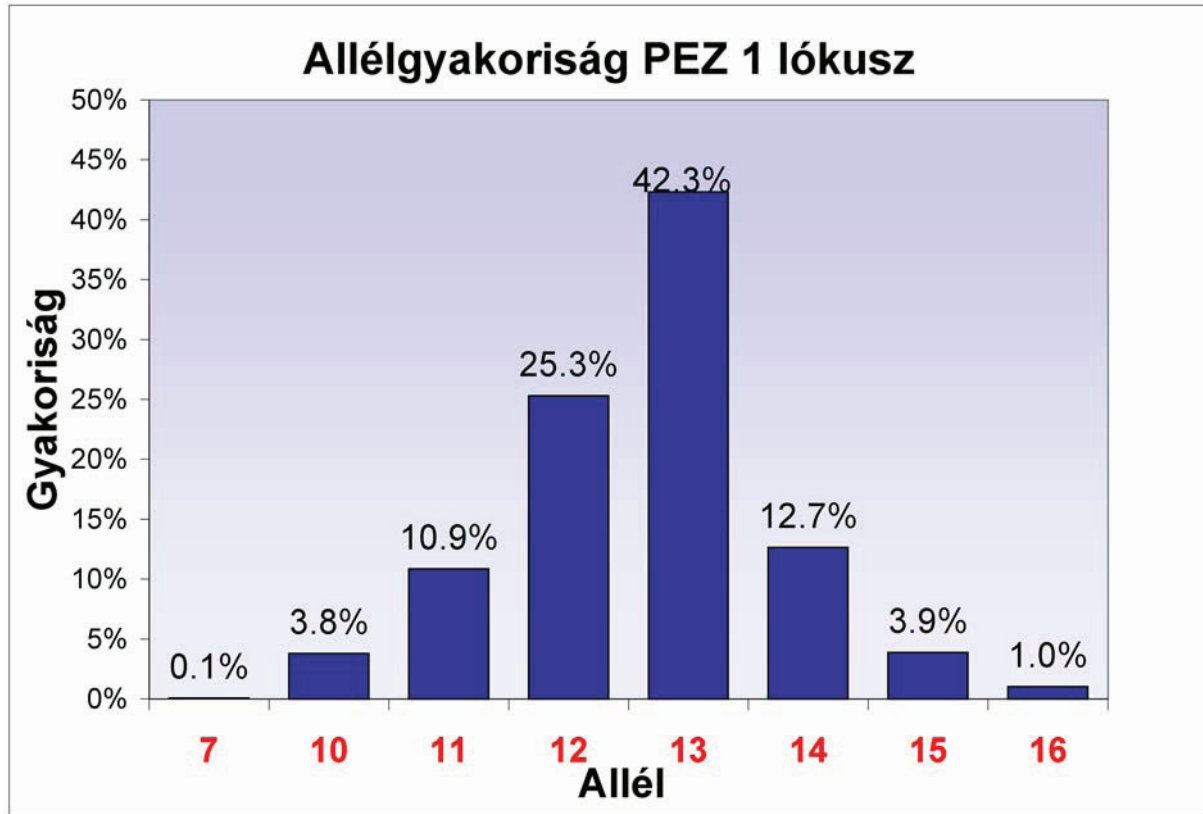
F25.i. ábra PEZ8 lókuszt szemiautomata genotipizálása



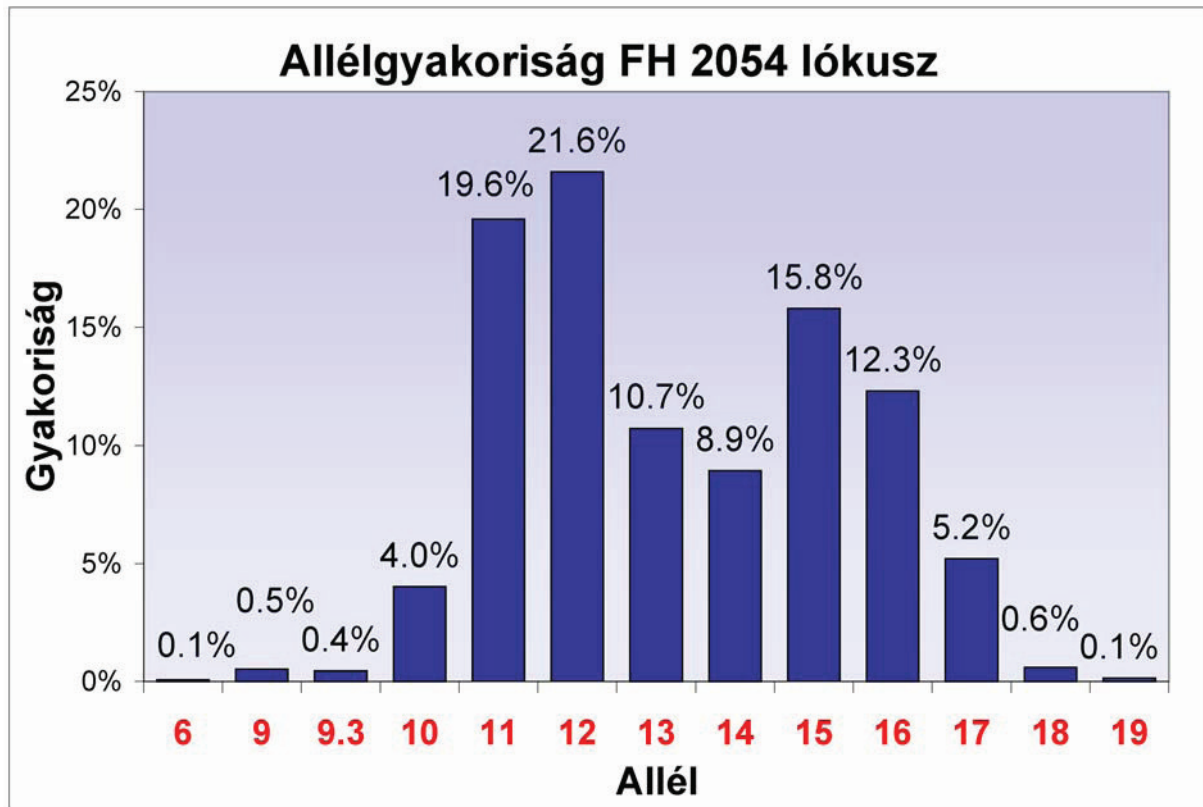
F25.j. ábra FHC2079 lókuszt szemiautomata genotipizálása



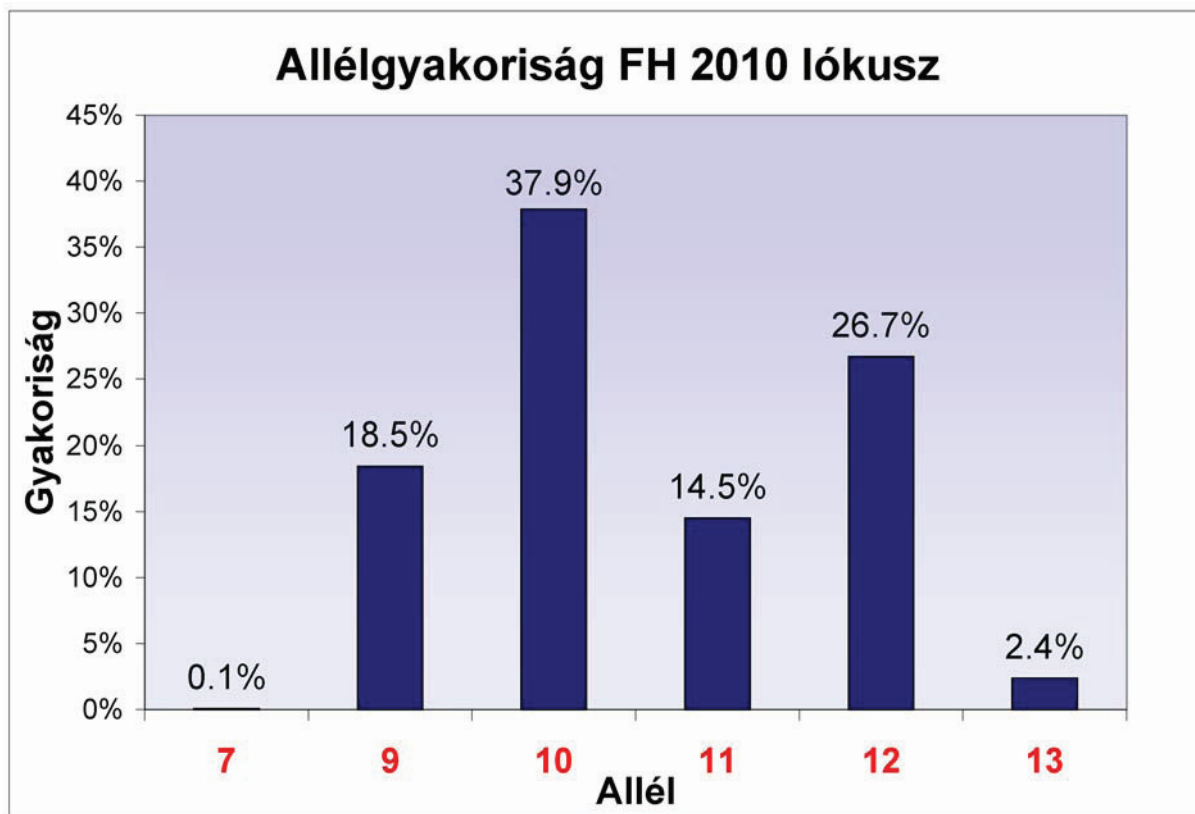
F26.a. ábra PEZ1 lókuszon megfigyelt allélgyakoriság a teljes (POPA1) populációs mintában



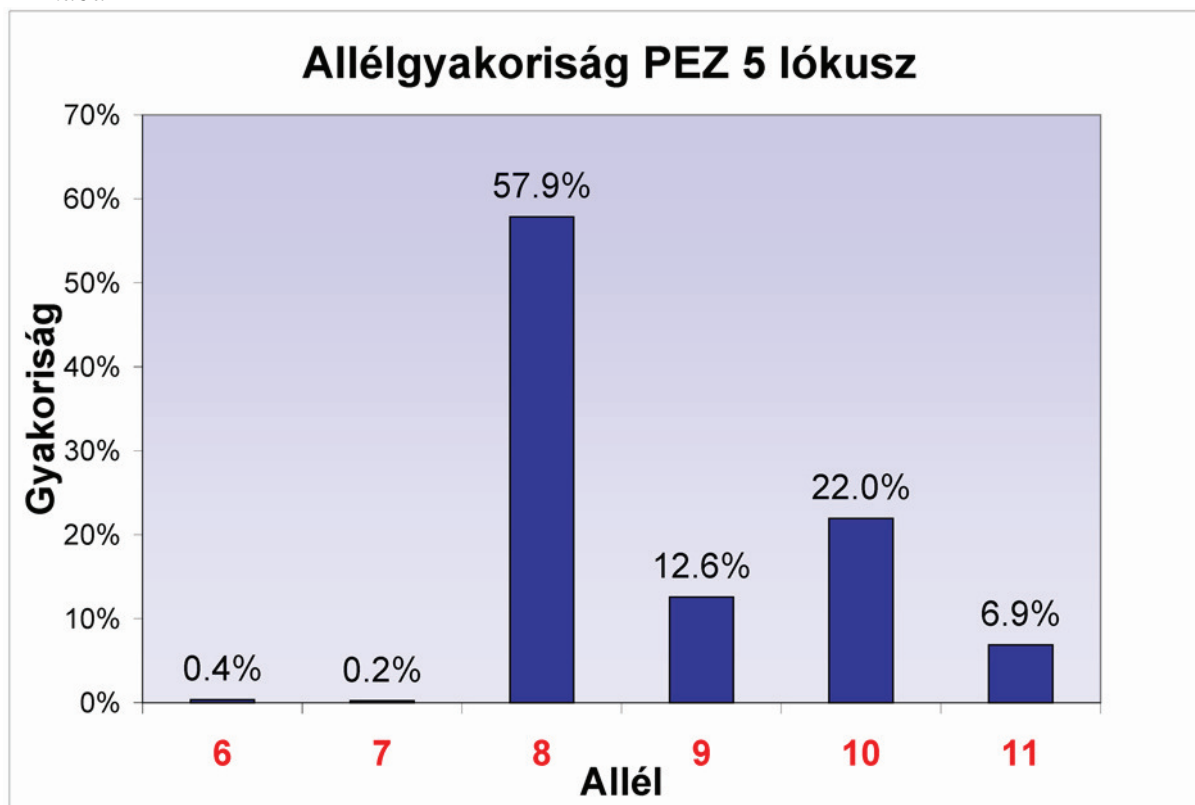
F26.b. ábra FHC2054 lókuszon megfigyelt allélgyakoriság a teljes (POPA1) populációs mintában



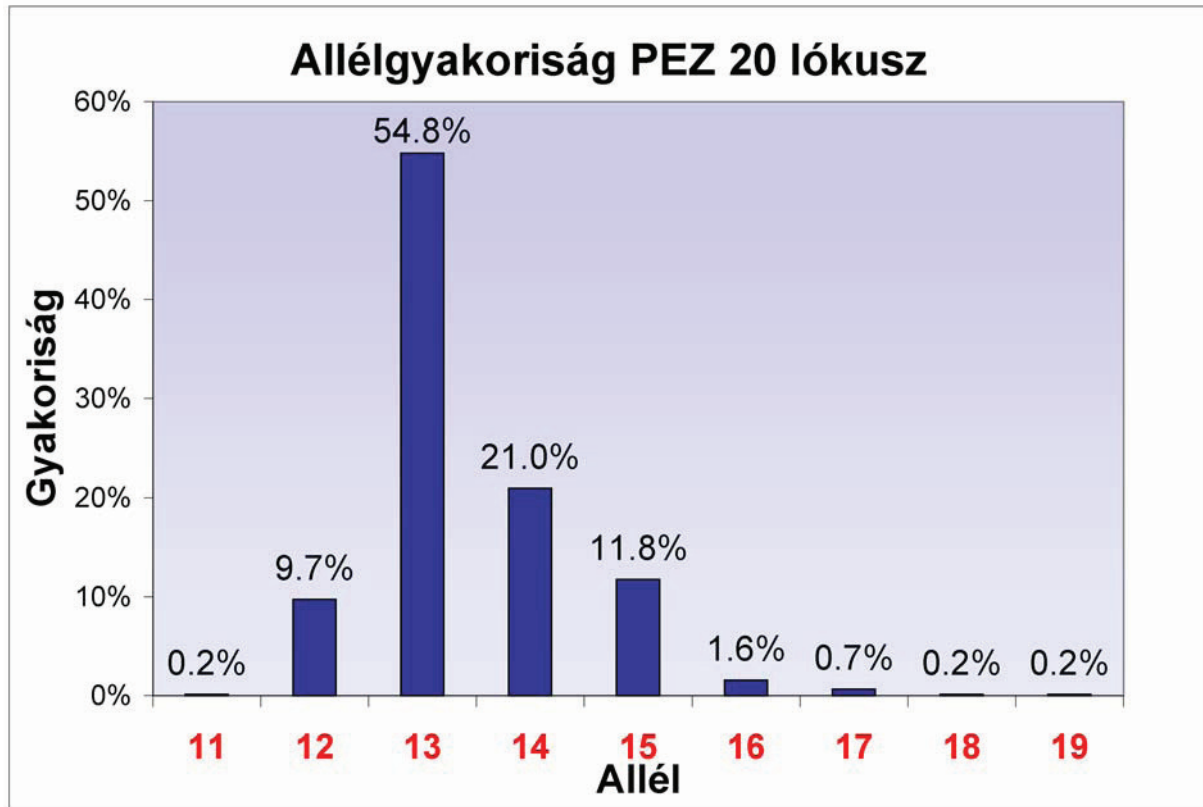
F26.c. ábra FHC2010 lókuszon megfigyelt allélgyakoróság a teljes (POPA1) populációs mintában



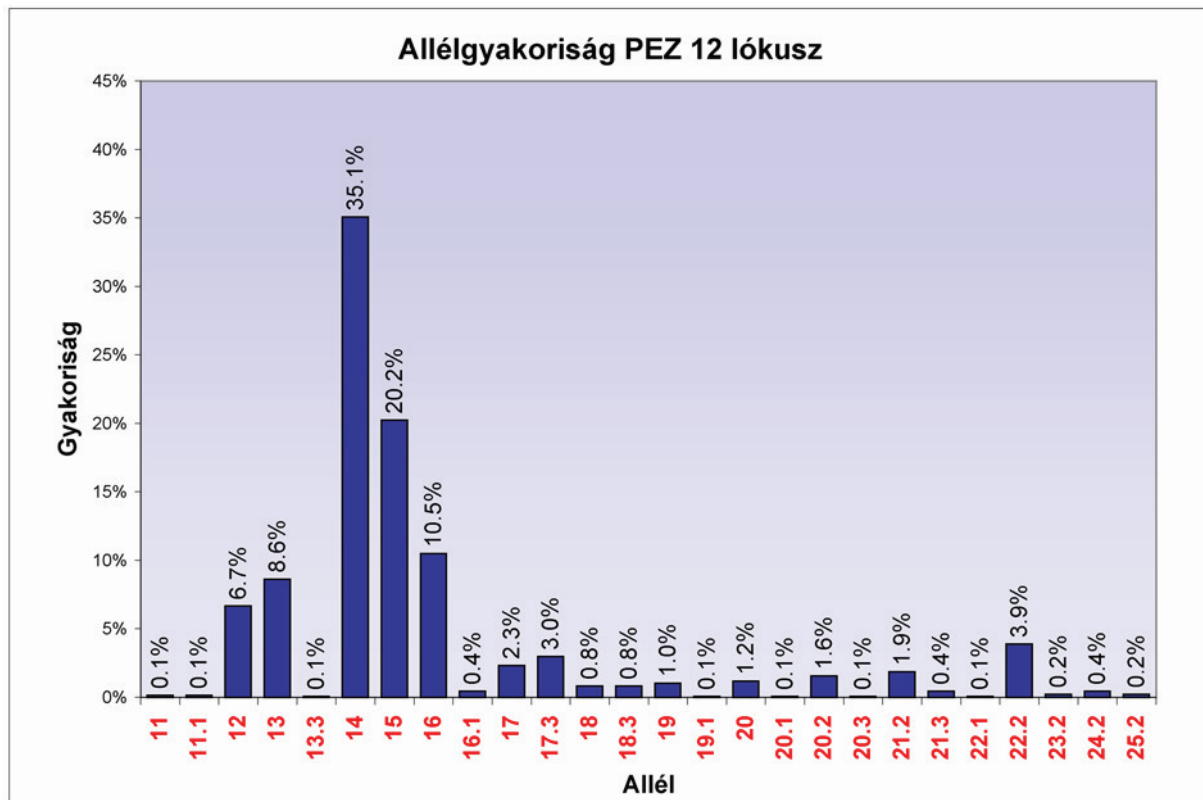
F26.d. ábra PEZ5 lókuszon megfigyelt allélgyakoróság a teljes (POPA1) populációs mintában



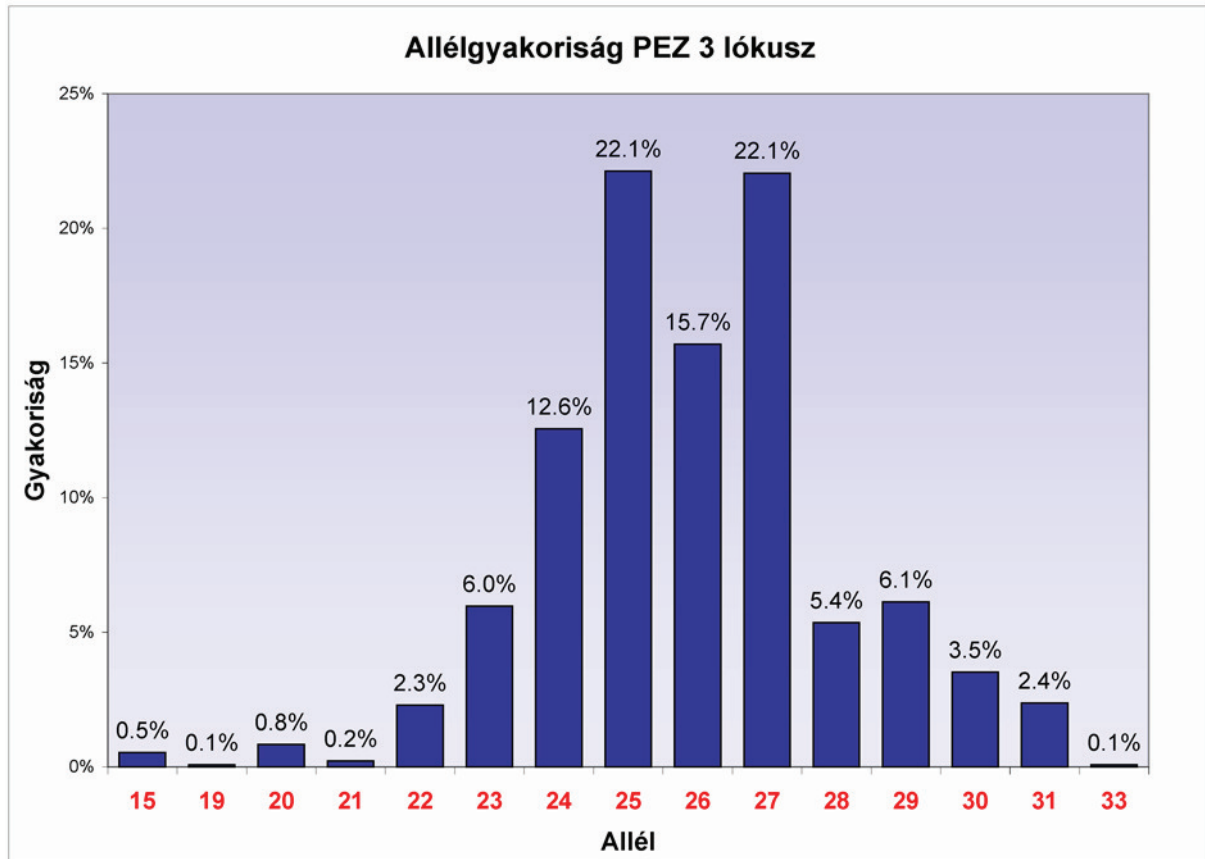
F26.e. ábra PEZ20 lókuszon megfigyelt allélgyakoriság a teljes (POPA1) populációs mintában



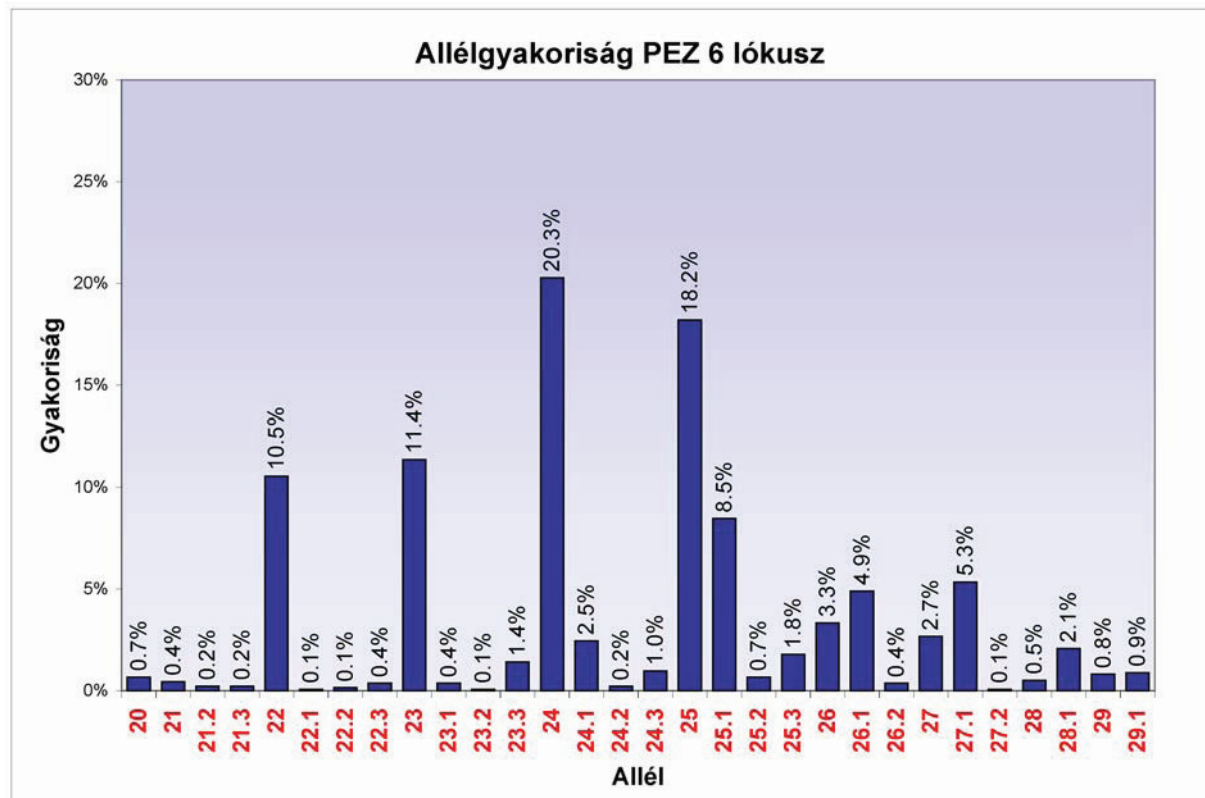
F26.f. ábra PEZ12 lókuszon megfigyelt allélgyakoriság a teljes (POPA1) populációs mintában



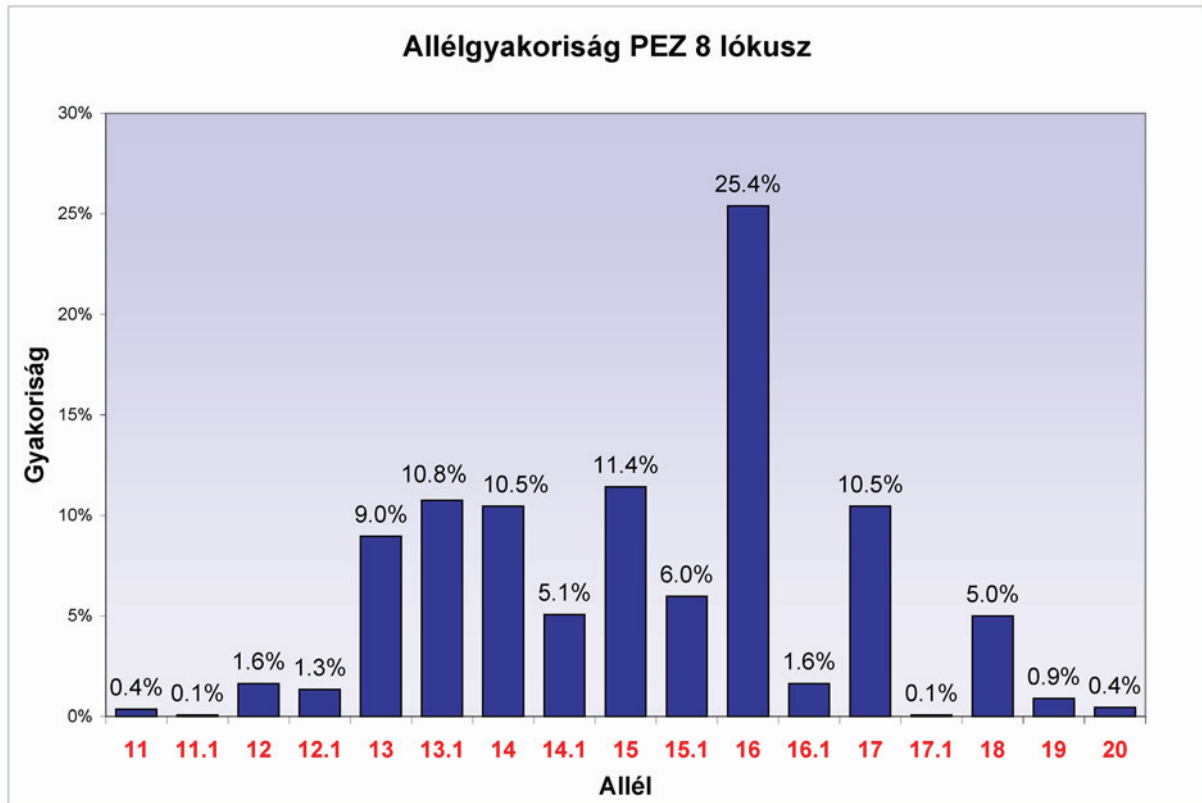
F26.g. ábra PEZ3 lókuszon megfigyelt allélgyakoriság a teljes (POPA1) populációs mintában



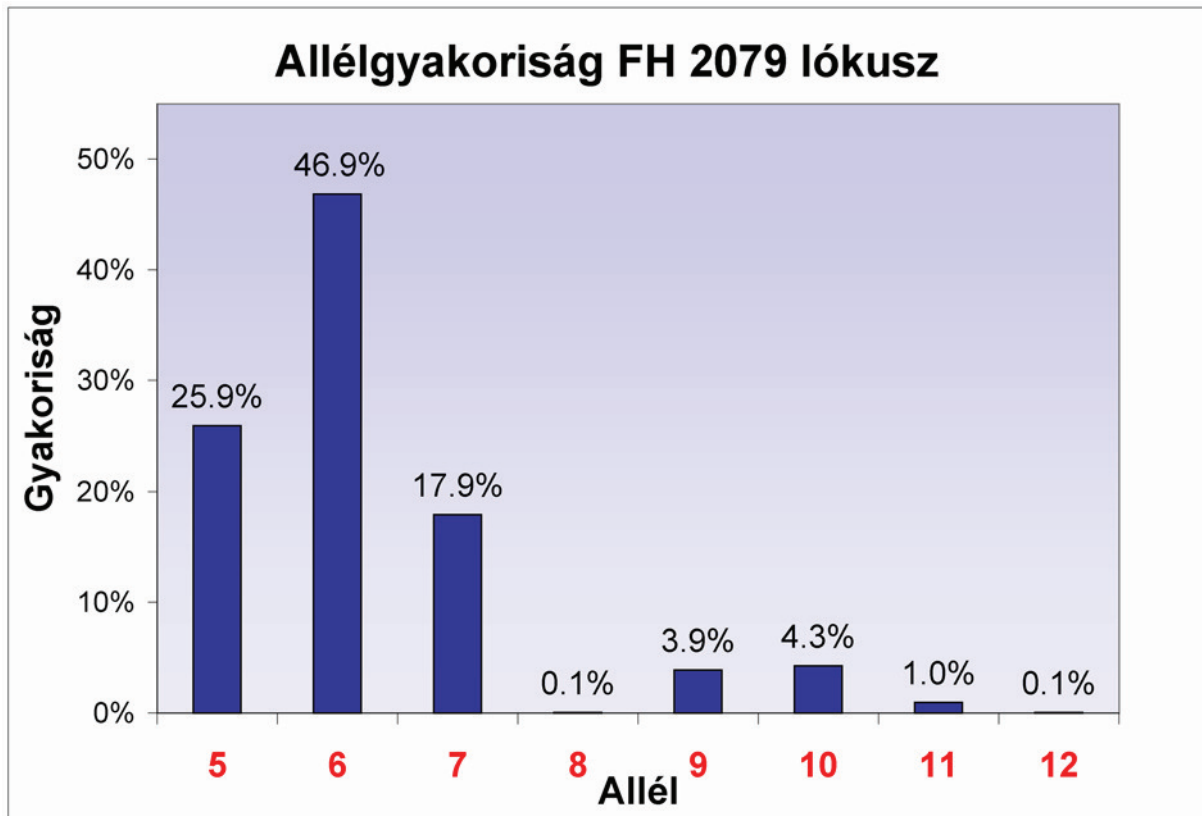
F26.h. ábra PEZ6 lókuszon megfigyelt allélgyakoriság a teljes (POPA1) populációs mintában



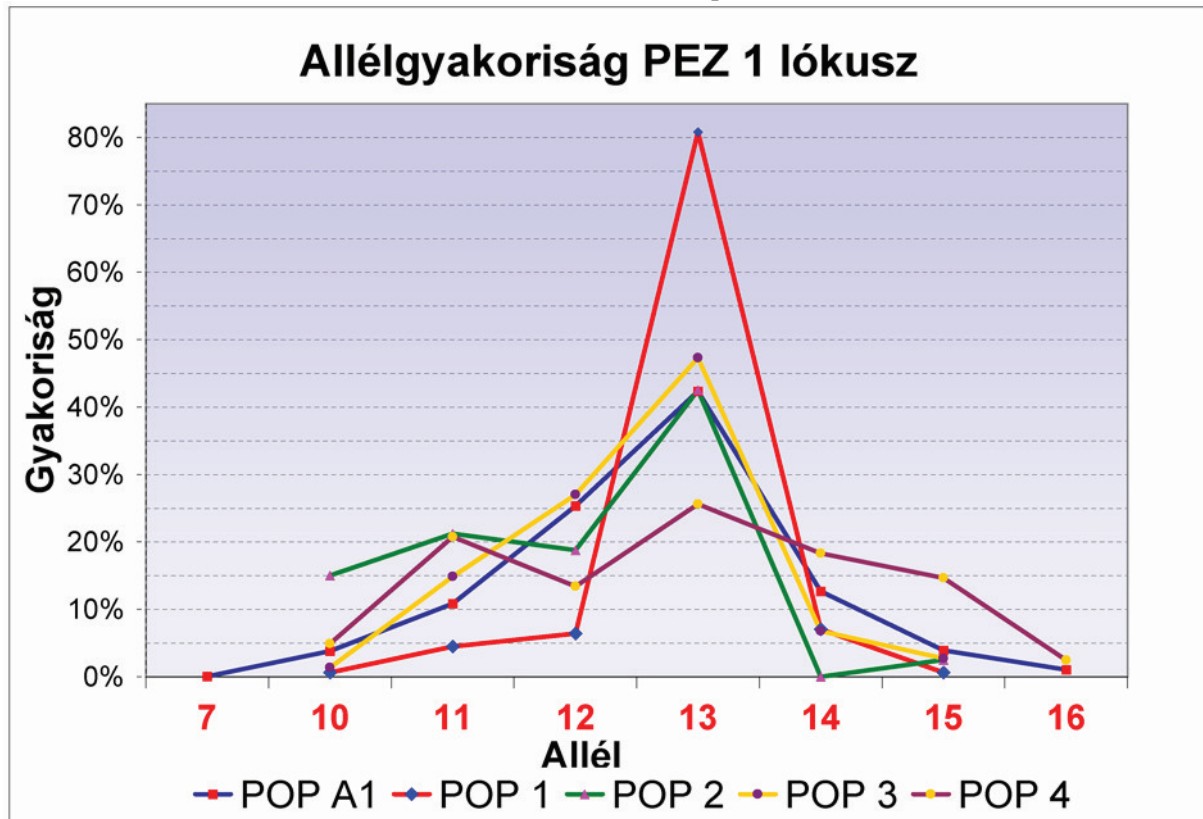
F26.i. ábra PEZ8 lókuszon megfigyelt allélgyakoriság a teljes (POPA1) populációs mintában



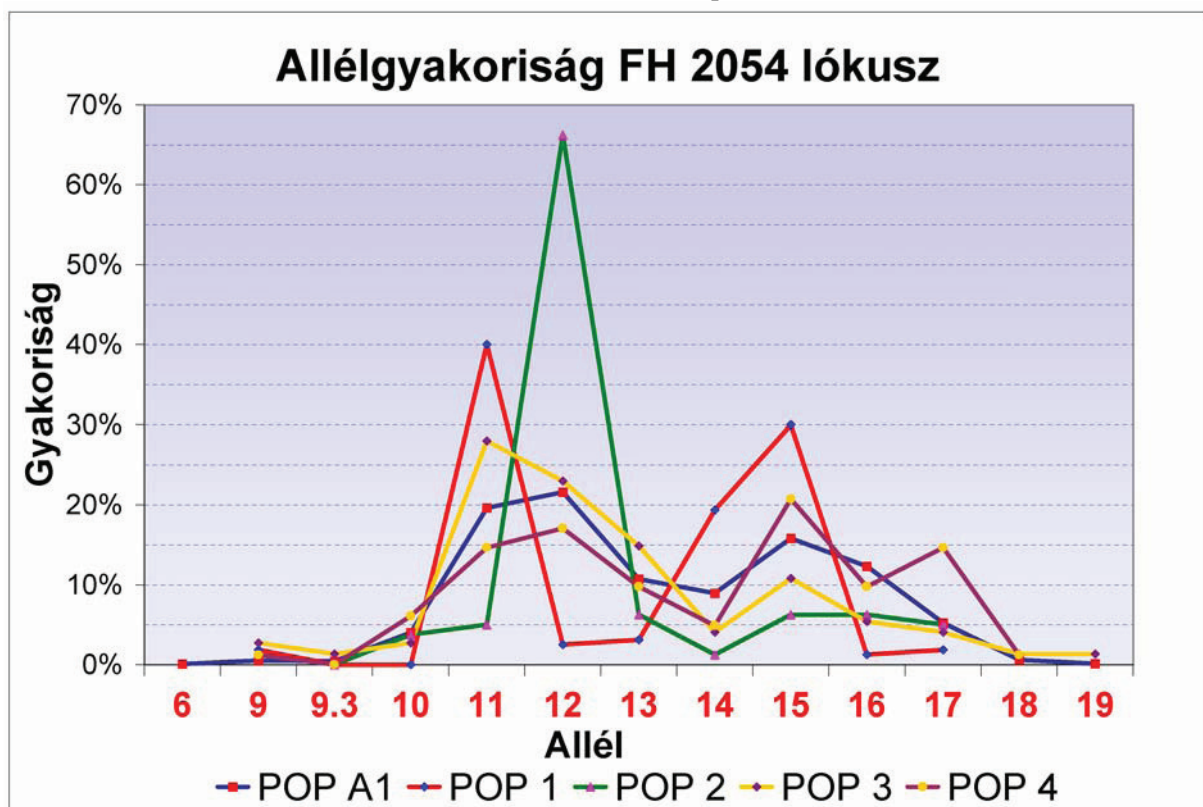
F26.j. ábra FHC2079 lókuszon megfigyelt allélgyakoriság a teljes (POPA1) populációs mintában



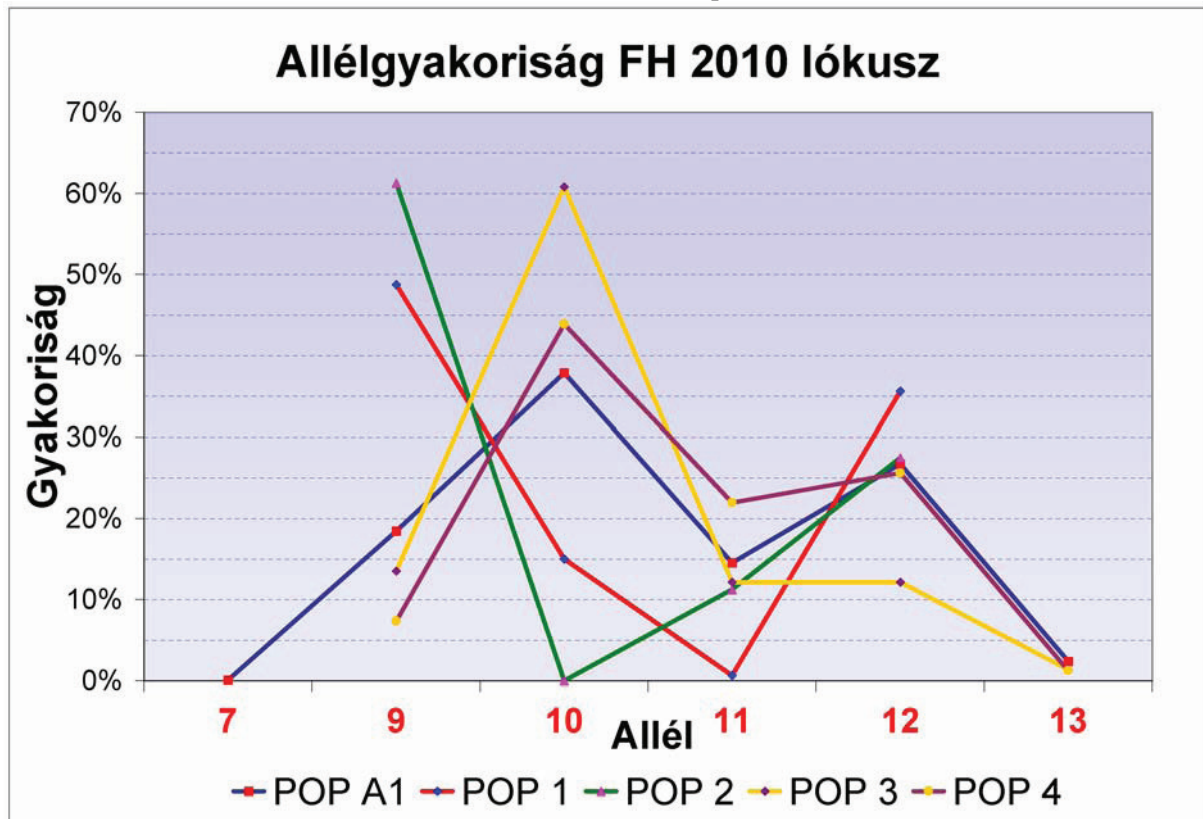
F27.a. ábra PEZ1 lókuszon megfigyelt allélgyakoriságok a különböző populációs mintákban [POPA1: összes minta, POP1: német juhászkutya minták, POP2: rottweiler minták, POP3: schnauzer minták, POP4: tacskó minták]



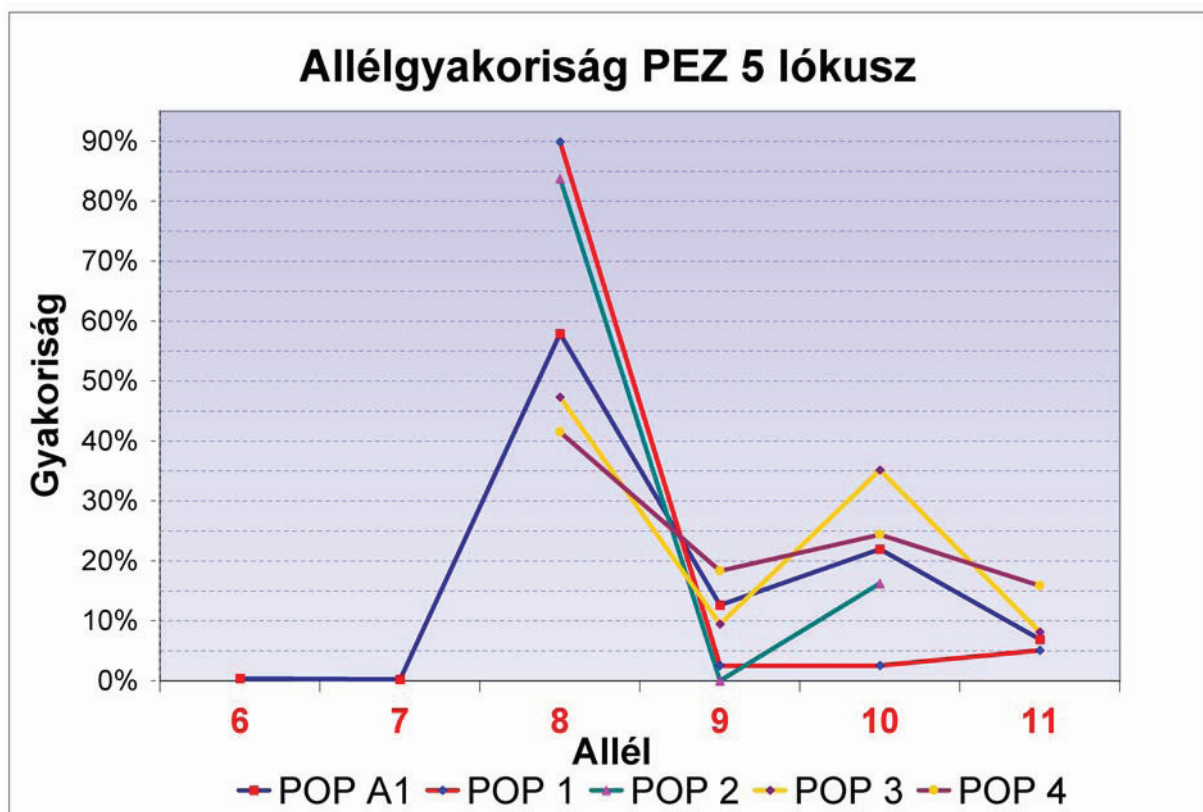
F27.b. ábra FHC2054 lókuszon megfigyelt allélgyakoriságok a különböző populációs mintákban [POPA1: összes minta, POP1: német juhászkutya minták, POP2: rottweiler minták, POP3: schnauzer minták, POP4: tacskó minták]



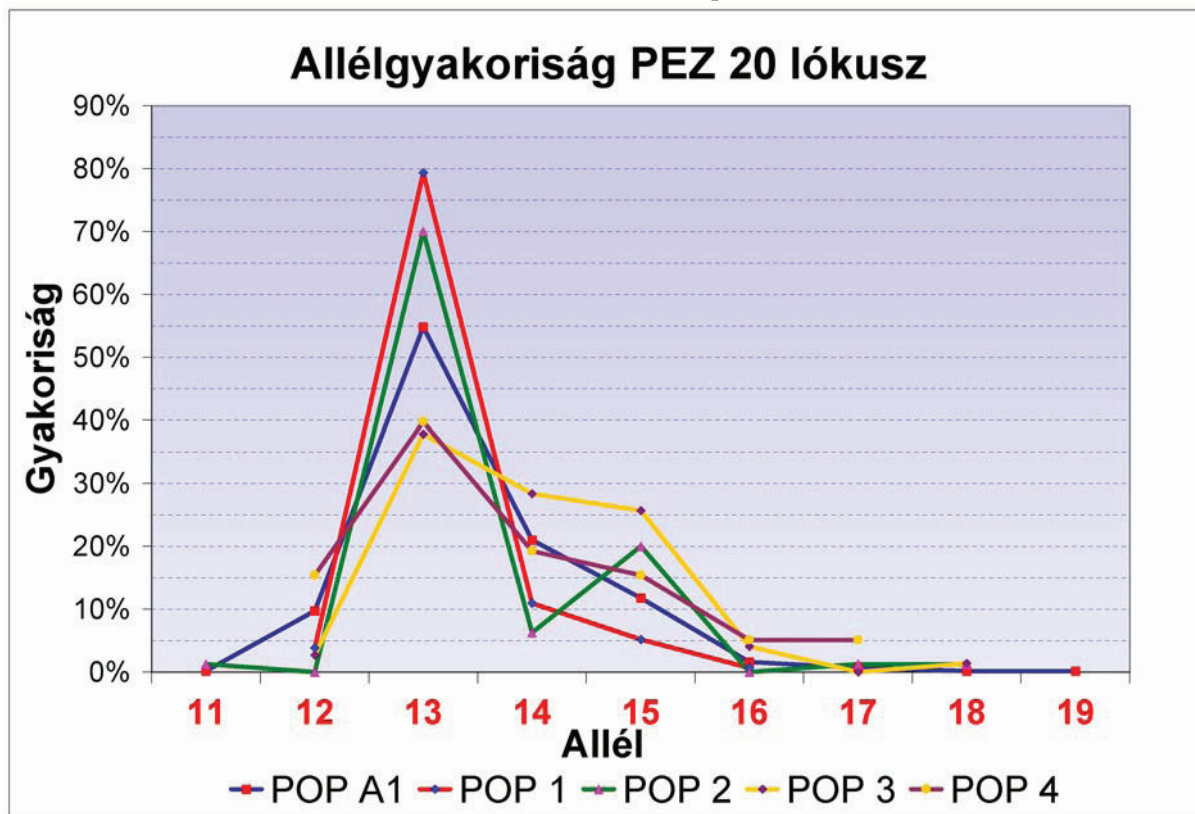
F27.c. ábra FHC2010 lókuszon megfigyelt allélgyakoriságok a különböző populációs mintákban [POPA1: összes minta, POP1: német juhászkutya minták, POP2: rottweiler minták, POP3: schnauzer minták, POP4: tascó minták]



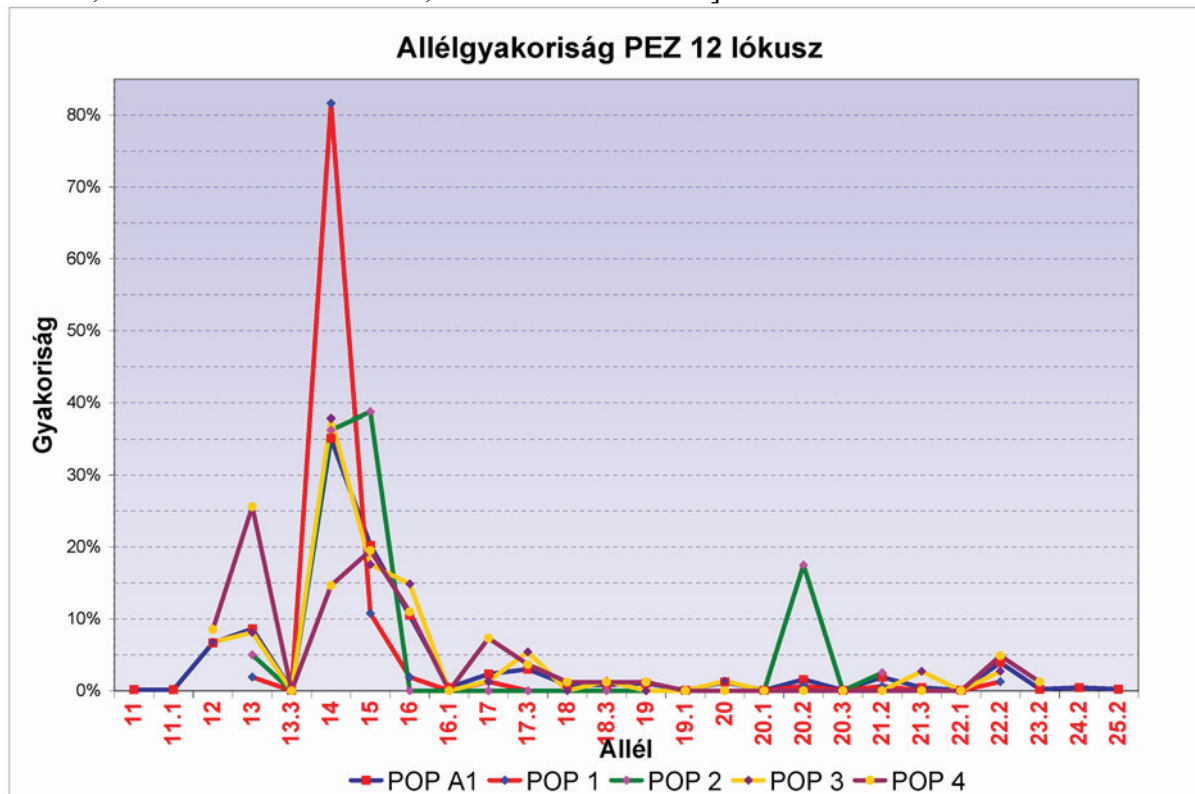
F27.d. ábra PEZ5 lókuszon megfigyelt allélgyakoriságok a különböző populációs mintákban [POPA1: összes minta, POP1: német juhászkutya minták, POP2: rottweiler minták, POP3: schnauzer minták, POP4: tascó minták]



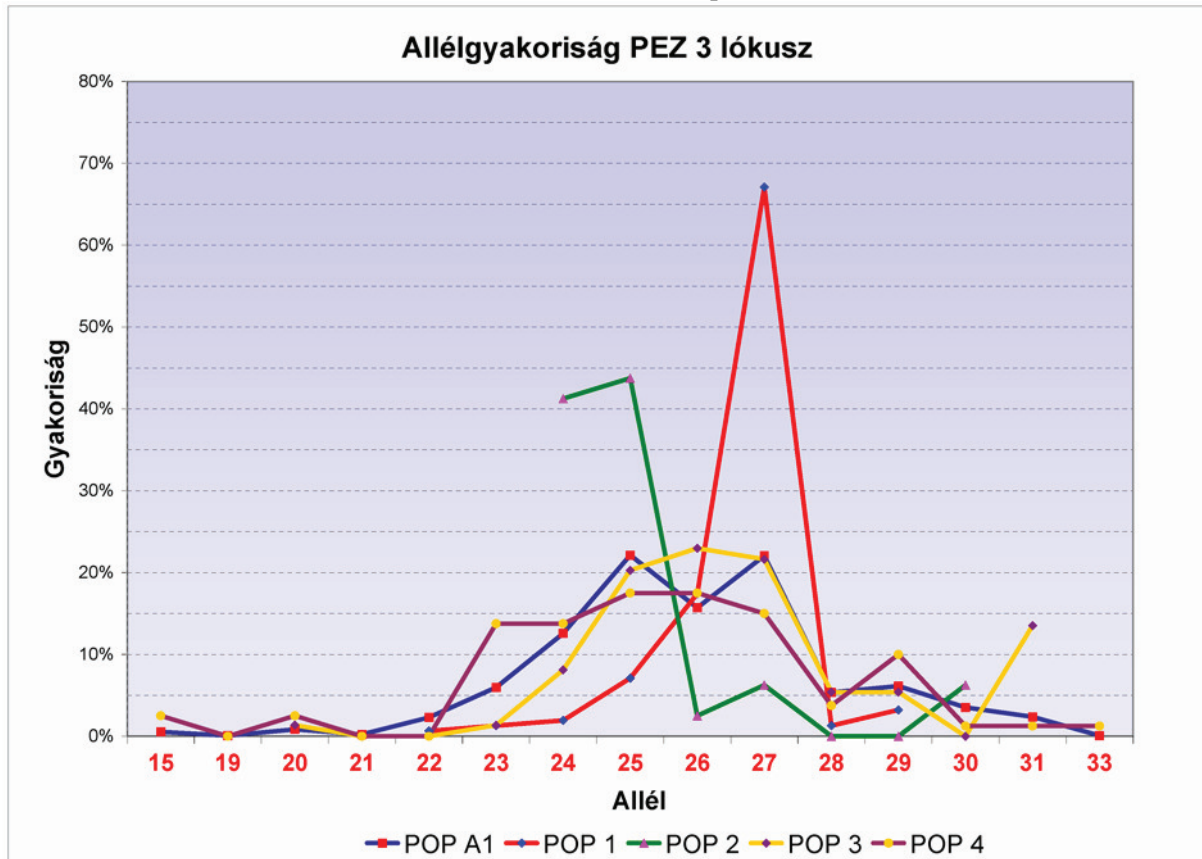
F27.e. ábra PEZ20 lókuszon megfigyelt allélgyakoriságok a különböző populációs mintákban [POPA1: összes minta, POP1: német juhászkutya minták, POP2: rottweiler minták, POP3: schnauzer minták, POP4: tacsó minták]



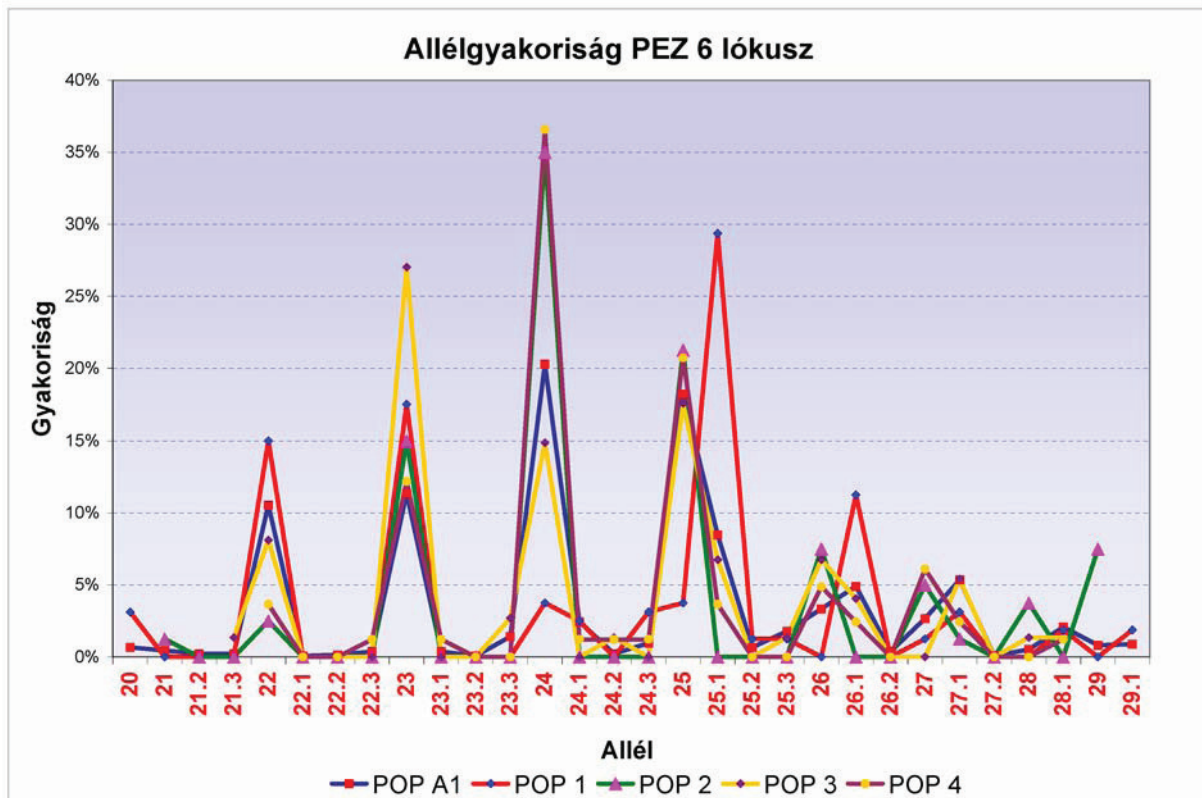
F27.f. ábra PEZ12 lókuszon megfigyelt allélgyakoriságok a különböző populációs mintákban [POPA1: összes minta, POP1: német juhászkutya minták, POP2: rottweiler minták, POP3: schnauzer minták, POP4: tacsó minták]



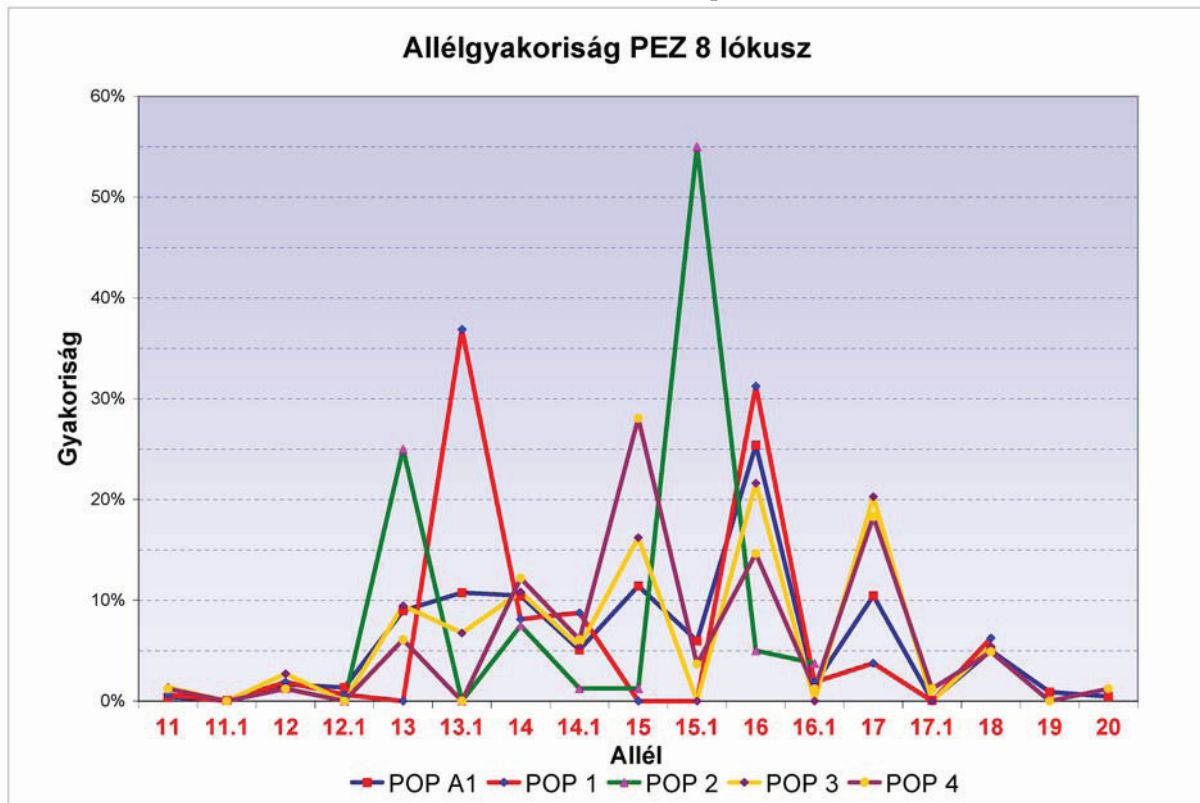
F27.g. ábra PEZ3 lókuszon megfigyelt allélgyakoriságok a különböző populációs mintákban [POPA1: összes minta, POP1: német juhászkutya minták, POP2: rottweiler minták, POP3: schnauzer minták, POP4: tacsó minták]



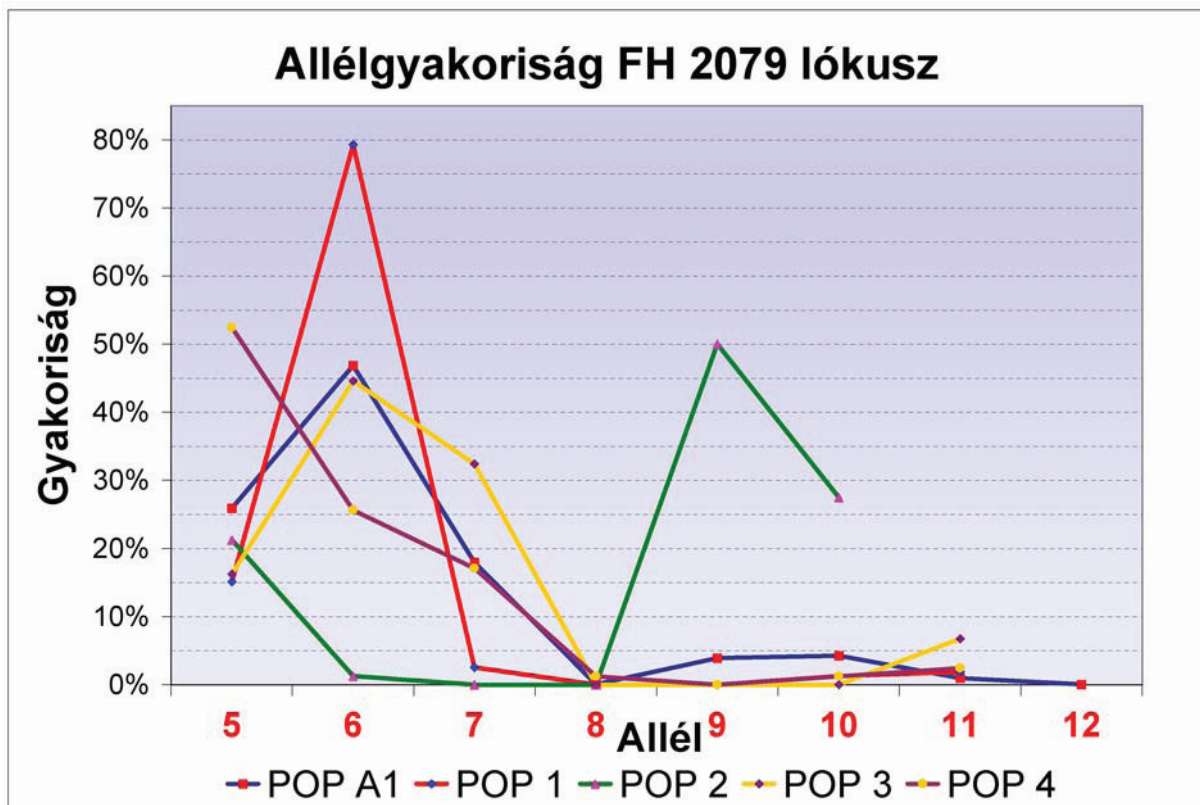
F27.h. ábra PEZ6 lókuszon megfigyelt allélgyakoriságok a különböző populációs mintákban [POPA1: összes minta, POP1: német juhászkutya minták, POP2: rottweiler minták, POP3: schnauzer minták, POP4: tacsó minták]



F27.i. ábra PEZ8 lókuszon megfigyelt allélgyakoriságok a különböző populációs mintákban [POPA1: összes minta, POP1: német juhászkutya minták, POP2: rottweiler minták, POP3: schnauzer minták, POP4: tacsó minták]



F27.j. ábra FHC2079 lókuszon megfigyelt allélgyakoriságok a különböző populációs mintákban [POPA1: összes minta, POP1: német juhászkutya minták, POP2: rottweiler minták, POP3: schnauzer minták, POP4: tacsó minták]



F28.a. táblázat Allélgyakorisági értékek és populációgenetikai jellemzők a különböző populációs mintákban [PA1: összes minta, P1: német juhászkutya minták, P2: rottweiler minták, P3: schnauzer minták, P4: tacsó minták, N: egyedek száma, n: allélszám, PE: kizáró erő, PD: megkülönböztető erő, PIC: polimorfizmus információ tartalom, H(obs): megfigyelt heterozigotizáció, H(exp): becsült heterozigotizáció, SE: standard hiba]

Allél	PEZ 12					PEZ 3					PEZ 6					PEZ 8				
	P1	P2	P3	P4	PA1	P1	P2	P3	P4	PA1	P1	P2	P3	P4	PA1	P1	P2	P3	P4	PA1
11					0,001											0,006		0,014	0,012	0,004
11.1					0,001															0,001
12			0,068	0,085	0,067											0,019	0,013	0,027	0,012	0,016
12.1																0,006				0,013
13	0,019	0,050	0,081	0,256	0,086												0,250	0,095	0,061	0,090
13.1																0,369		0,068		0,108
13.3					0,001															
14	0,816	0,363	0,378	0,146	0,351											0,081	0,075	0,108	0,122	0,105
14.1																0,088	0,013	0,054	0,061	0,051
15	0,108	0,388	0,176	0,195	0,202				0,025	0,005							0,013	0,162	0,280	0,114
15.1																	0,550		0,037	0,060
16	0,019		0,149	0,110	0,105											0,313	0,050	0,216	0,146	0,254
16.1					0,004											0,019	0,038		0,012	0,016
17	0,013		0,014	0,073	0,023											0,038		0,203	0,183	0,105
17.1																			0,012	0,001
17.3			0,054	0,037	0,030															
18				0,012	0,008											0,063		0,054	0,049	0,050
18.3			0,014	0,012	0,008															
19				0,012	0,010					0,001										0,009
19.1					0,001															
20			0,014		0,012			0,014	0,025	0,008	0,031			0,007					0,012	0,004
20.1					0,001															
20.2	0,006	0,175			0,016															
20.3					0,001															
21										0,002		0,013			0,004					
21.2	0,006	0,025			0,019										0,002					
21.3			0,027		0,005								0,014		0,002					
22						0,006				0,023	0,150	0,025	0,081	0,037	0,105					
22.1					0,001										0,001					
22.2	0,013		0,027	0,049	0,039										0,001					
22.3														0,012	0,004					
23						0,013		0,014	0,138	0,060	0,175	0,150	0,270	0,122	0,114					
23.1															0,012	0,004				
23.2			0,012	0,002											0,001					
23.3													0,027		0,014					
24						0,019	0,413	0,081	0,138	0,126	0,038	0,350	0,149	0,366	0,203					
24.1											0,025			0,012	0,025					
24.2				0,004									0,014	0,012	0,002					
24.3											0,031			0,012	0,010					
25						0,071	0,438	0,203	0,175	0,221	0,038	0,213	0,176	0,207	0,182					
25.1											0,294		0,068	0,037	0,085					
25.2				0,002							0,013				0,007					
25.3											0,013		0,014		0,018					
26						0,174	0,025	0,230	0,175	0,157		0,075	0,068	0,049	0,033					
26.1											0,113		0,041	0,024	0,049					
26.2															0,004					
27						0,671	0,063	0,216	0,150	0,221	0,013	0,050		0,061	0,027					
27.1											0,031	0,013	0,054	0,024	0,053					
27.2															0,001					
28						0,013		0,054	0,038	0,054		0,038	0,014		0,005					
28.1											0,019		0,014	0,012	0,021					
29						0,032		0,054	0,100	0,061		0,075			0,008					
29.1											0,019				0,009					
30							0,063		0,013	0,035										
31								0,135	0,013	0,024										
32																				
33									0,013	0,001										

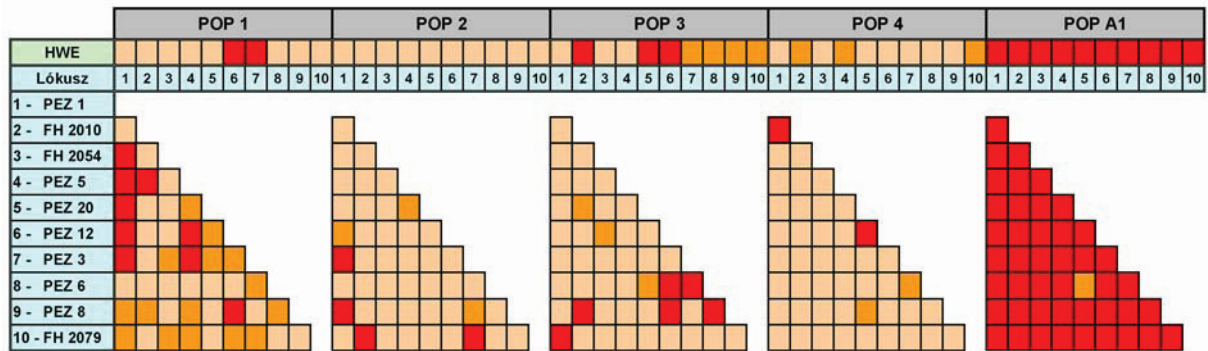
N	79	40	37	41	667	77	40	37	40	652	80	40	37	41	673	80	40	37	41	669
n	158	80	74	82	1334	155	80	74	80	1306	160	80	74	82	1346	160	80	74	82	1339
PE	0,176	0,423	0,610	0,697	0,647	0,307	0,359	0,659	0,728	0,702	0,693	0,612	0,712	0,629	0,773	0,535	0,394	0,709	0,688	0,748
PD	0,433	0,801	0,906	0,946	0,924	0,702	0,755	0,934	0,951	0,953	0,950	0,921	0,948	0,932	0,972	0,903	0,798	0,942	0,942	0,966
PIC	0,304	0,626	0,765	0,829	0,790	0,479	0,559	0,806	0,850	0,832	0,824	0,769	0,837	0,776	0,875	0,710	0,580	0,837	0,822	0,860
H(obs)	0,190	0,750	0,486	0,732	0,559	0,416	0,650	0,622	0,800	0,629	0,788	0,775	0,622	0,756	0,753	0,700	0,625	0,703	0,707	0,677
H(Exp)	0,323	0,693	0,799	0,856	0,810	0,516	0,638	0,840	0,876	0,850	0,846	0,804	0,864	0,807	0,886	0,751	0,633	0,866	0,850	0,872
SE	0,053	0,073	0,066	0,055	0,015	0,057	0,076	0,060	0,052	0,014	0,040	0,063	0,056	0,062	0,012	0,048	0,076	0,056	0,056	0,013

	FH 2054					FH 2010					FH 2079					PEZ 1					PEZ 5					PEZ 20									
	P1	P2	P3	P4	PA1	P1	P2	P3	P4	PA1	P1	P2	P3	P4	PA1	P1	P2	P3	P4	PA1	P1	P2	P3	P4	PA1	P1	P2	P3	P4	PA1					
Alliél																																			
5					0.001					0.001	0.151	0.213	0.162	0.524	0.259										0.004										
6											0.792	0.013	0.446	0.256	0.469										0.002										
7											0.025		0.324	0.171	0.179					0.001															
8														0.012	0.001																				
9	0.019		0.027	0.012	0.005	0.488	0.613	0.135	0.073	0.185	0.500			0.039																					
9.3			0.014		0.004																														
10			0.038	0.027	0.061	0.040	0.150		0.608	0.439	0.379	0.013	0.275	0.012	0.043	0.006	0.150	0.014	0.049	0.038	0.025	0.163	0.351	0.244	0.220										
11	0.400	0.050	0.284	0.146	0.196	0.006	0.113	0.122	0.220	0.145	0.019		0.068	0.024	0.010	0.045	0.213	0.149	0.207	0.109	0.051		0.081	0.159	0.069						0.013				
12	0.025	0.663	0.230	0.171	0.216	0.356	0.275	0.122	0.256	0.267						0.064	0.188	0.270	0.134	0.253											0.039	0.027	0.154	0.097	0.002
13	0.031	0.063	0.149	0.098	0.107					0.014	0.012	0.024				0.808	0.425	0.473	0.256	0.423											0.794	0.700	0.378	0.397	0.548
14	0.194	0.013	0.041	0.049	0.089											0.071	0.068	0.183	0.127											0.110	0.063	0.284	0.192	0.210	
15	0.300	0.063	0.108	0.207	0.158											0.006	0.025	0.027	0.146	0.039											0.052	0.200	0.257	0.154	0.118
16	0.013	0.063	0.054	0.098	0.123																										0.006	0.041	0.051	0.016	0.007
17	0.019	0.050	0.041	0.146	0.052																										0.013	0.051	0.007	0.002	0.002
18			0.014	0.012	0.006																										0.013	0.014	0.014	0.002	0.002
19			0.014		0.001																														

N	80	40	37	41	671	80	40	37	41	669	80	40	37	41	668	78	40	37	41	667	79	40	37	41	667	77	40	37	39	662
n	160	80	74	82	1342	160	80	74	82	1344	159	80	74	82	1338	156	80	74	82	1334	158	80	74	82	1334	155	80	74	78	1325
PE	0.467	0.362	0.661	0.717	0.701	0.328	0.276	0.361	0.433	0.489	0.179	0.352	0.400	0.373	0.431	0.190	0.478	0.432	0.632	0.505	0.099	0.118	0.370	0.461	0.357	0.195	0.253	0.452	0.541	0.400
PD	0.874	0.760	0.932	0.933	0.959	0.771	0.720	0.776	0.842	0.879	0.541	0.764	0.814	0.784	0.835	0.553	0.866	0.836	0.916	0.881	0.313	0.439	0.786	0.855	0.766	0.579	0.681	0.847	0.899	0.814
PIC	0.661	0.526	0.804	0.844	0.833	0.536	0.468	0.545	0.634	0.684	0.318	0.562	0.604	0.573	0.627	0.322	0.672	0.626	0.790	0.687	0.182	0.235	0.571	0.661	0.548	0.333	0.422	0.654	0.719	0.589
H(obs)	0.638	0.525	0.568	0.878	0.678	0.538	0.500	0.459	0.732	0.509	0.300	0.675	0.568	0.537	0.472	0.346	0.575	0.595	0.878	0.545	0.177	0.325	0.595	0.537	0.423	0.403	0.425	0.514	0.769	0.508
H(Exp)	0.714	0.550	0.836	0.870	0.852	0.617	0.543	0.590	0.696	0.730	0.350	0.637	0.674	0.637	0.678	0.339	0.725	0.685	0.826	0.726	0.190	0.276	0.646	0.719	0.597	0.356	0.472	0.718	0.762	0.633
SE	0.050	0.079	0.061	0.052	0.014	0.054	0.079	0.081	0.072	0.017	0.054	0.076	0.077	0.075	0.018	0.054	0.071	0.076	0.059	0.017	0.044	0.071	0.079	0.070	0.019	0.054	0.079	0.074	0.068	0.019

F28.b. táblázat Allélgakorisági értékek és populációgenetikai jellemzők a különböző populációs mintákban

F29. ábra Populációs minták HWE és LD tesztelési eredményei



POP 1: Német juhász minták
 POP 2: Rottweiler minták
 POP 3: Schnauzer minták
 POP 4: Tacskó minták
 POP A1: Összes minta

0.05 < P
 0.01 < P < 0.05
 0.01 > P

F30. táblázat Populációs minták genetikai ságának tesztelési eredményei [POP(1,2,3,4, A2, A1): a négy- illetve öt populációs csoportból álló minták, POP(Zoogen): Halverson, 2005, LCI: alsó bootstrap konfidencia érték, UCI: felső bootstrap konfidencia érték]

	POP (1, 2, 3, 4)			POP (1, 2, 3, 4, A2)			POP (1, 2, 3, 4, A1)			POP (Zoogen)		
	F(IT)	F(ST)	F(IS)	F(IT)	F(ST)	F(IS)	F(IT)	F(ST)	F(IS)	F(IT)	F(ST)	F(IS)
PEZ 1	0.1814	0.1320	0.0569	0.2831	0.0839	0.2174	0.2663	0.0661	0.2144	0.2360	0.112	0.139
FH 2054	0.2473	0.1454	0.1192	0.2342	0.0720	0.1747	0.2387	0.0636	0.1870	0.1150	0.057	0.061
FH 2010	0.2688	0.1880	0.0995	0.3504	0.1288	0.2544	0.2387	0.0636	0.1870	0.1860	0.092	0.103
PEZ 5	0.2695	0.1836	0.1052	0.3264	0.0918	0.2584	0.3185	0.0775	0.2613	0.2740	0.143	0.152
PEZ 20	0.1574	0.1120	0.0511	0.2228	0.0571	0.1757	0.2100	0.0490	0.1693	-	-	-
PEZ 12	0.3553	0.1822	0.2116	0.3420	0.0944	0.2734	0.3489	0.0798	0.0900	0.1680	0.085	0.349
PEZ 3	0.3028	0.1885	0.1408	0.2959	0.0952	0.2218	0.3010	0.0827	0.2380	0.1610	0.088	0.079
PEZ 6	0.1719	0.0745	0.1052	0.1689	0.0412	0.1332	0.1701	0.0345	0.1404	0.2220	0.077	0.157
PEZ 8	0.2584	0.1695	0.1071	0.2564	0.0831	0.1890	0.2595	0.0743	0.2001	0.2080	0.092	0.128
FH 2079	0.3948	0.3189	0.1115	0.3626	0.1570	0.2438	0.3731	0.1419	0.2694	0.2470	0.136	0.128
Σ Lókusz	0.2621	0.1690	0.1121	0.2818	0.0896	0.2111	0.2805	0.0765	0.2209	0.216	0.106	0.123
LCI	0.2189	0.1338	0.0893	0.2451	0.0717	0.1851	0.2415	0.0606	0.1912	0.178	0.078	0.099
UCI	0.3080	0.2100	0.1391	0.3192	0.1086	0.2404	0.3182	0.0956	0.2513	0.262	0.151	0.153

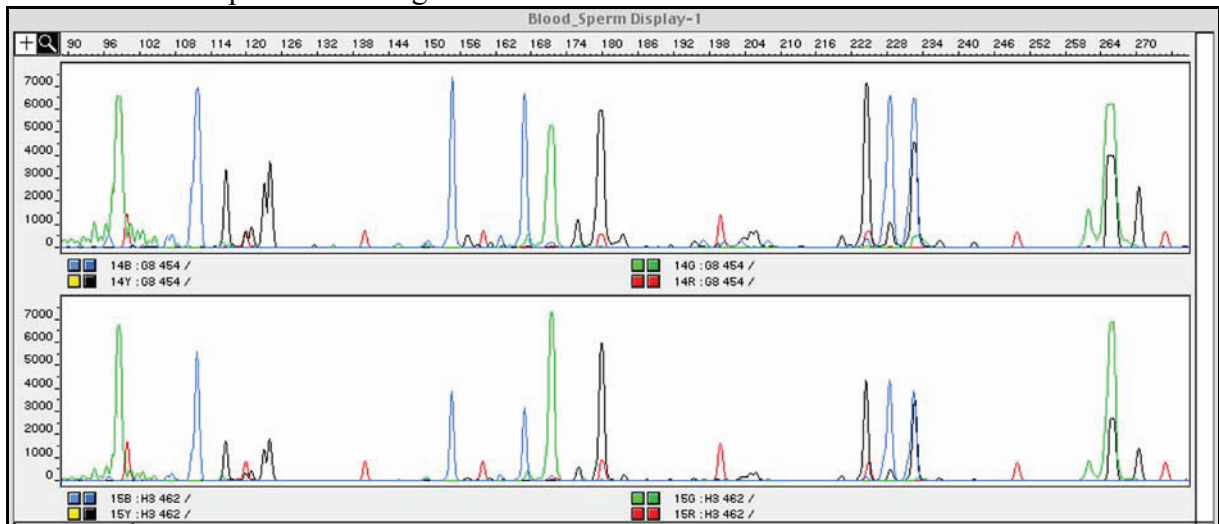
POP 1: Német juhász minták
 POP 2: Rottweiler minták
 POP 3: Schnauzer minták
 POP 4: Tacskó minták
 POP A1: Összes minta
 POP A2: Összes minta kivéve POP 1-4

F31. táblázat Populációs minták beltenyészettségének vizsgálata

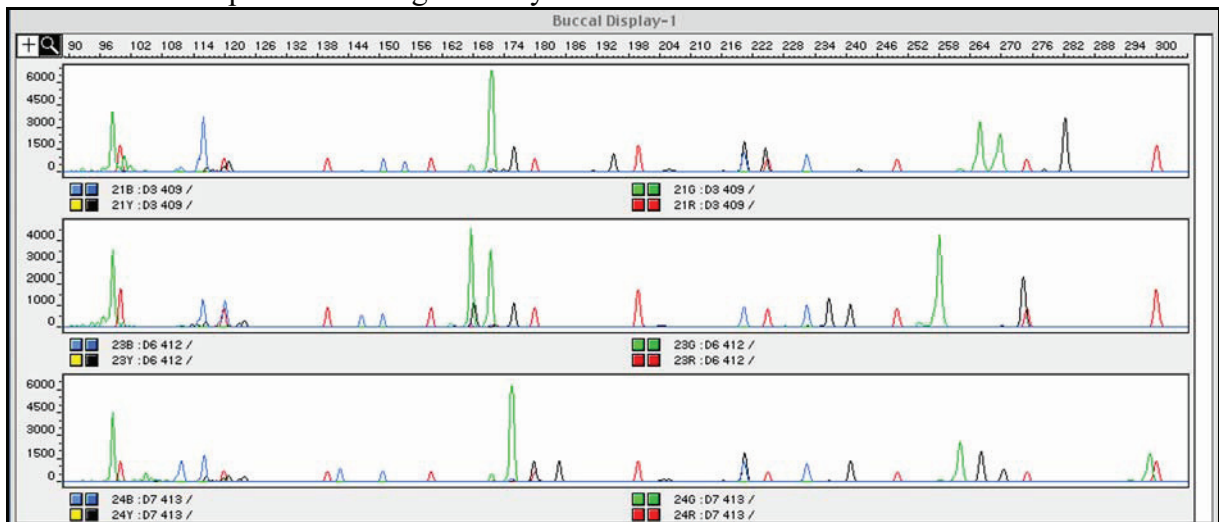
	F					
	POP1	POP2	POP3	POP4	POPA2	POPA1
PEZ 1	0.0062	0.2181	0.1320	-0.0635	0.2672	0.2520
FH 2054	0.1206	0.0448	0.3270	-0.0090	0.1939	0.2038
FH 2010	0.1419	0.1047	0.2461	-0.0507	0.3088	0.3032
PEZ 5	0.0647	-0.0961	0.1099	0.2535	0.2974	0.2917
PEZ 20	-0.1162	0.0986	0.2843	-0.0092	0.2157	0.1986
PEZ 12	0.4311	-0.0818	0.4011	0.1515	0.2907	0.3098
PEZ 3	0.2085	-0.0015	0.2642	0.0880	0.2477	0.2608
PEZ 6	0.0753	0.0358	0.2806	0.0633	0.1437	0.1501
PEZ 8	0.0762	0.0421	0.1947	0.1711	0.2186	0.2243
FH 2079	0.2076	-0.0597	0.1581	0.1583	0.2866	0.3062
Σ Lókusz	0.1184	0.0367	0.2452	0.0740	0.2435	0.2471

POP 1: Német juhász minták
 POP 2: Rottweiler minták
 POP 3: Schnauzer minták
 POP 4: Tacskó minták
 POP A1: Összes minta
 POP A2: Összes minta kivéve POP 1-4

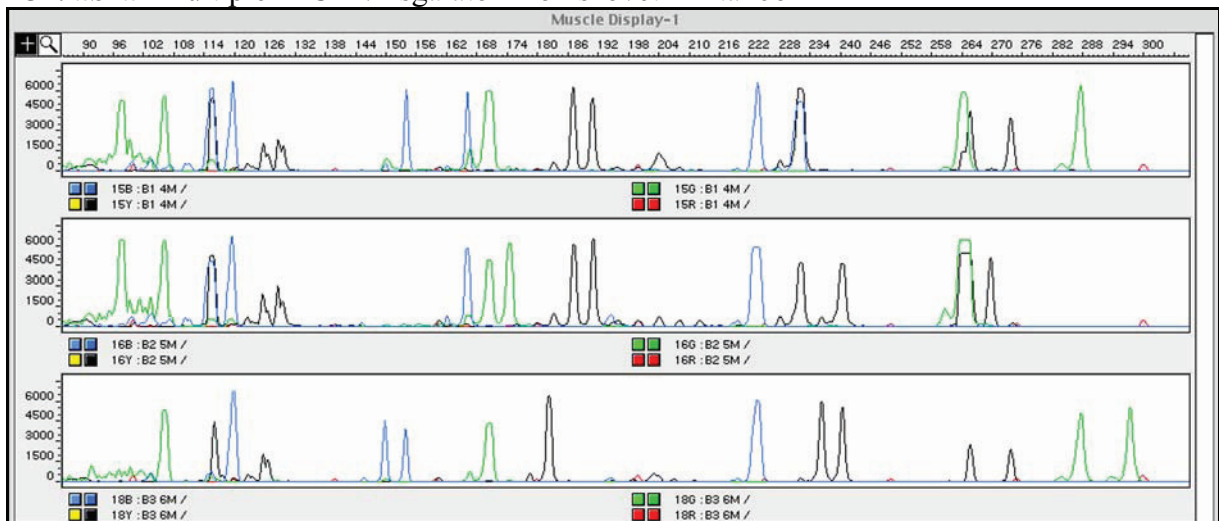
F32. ábra Multiplex PCR vizsgálatok ondómintákból



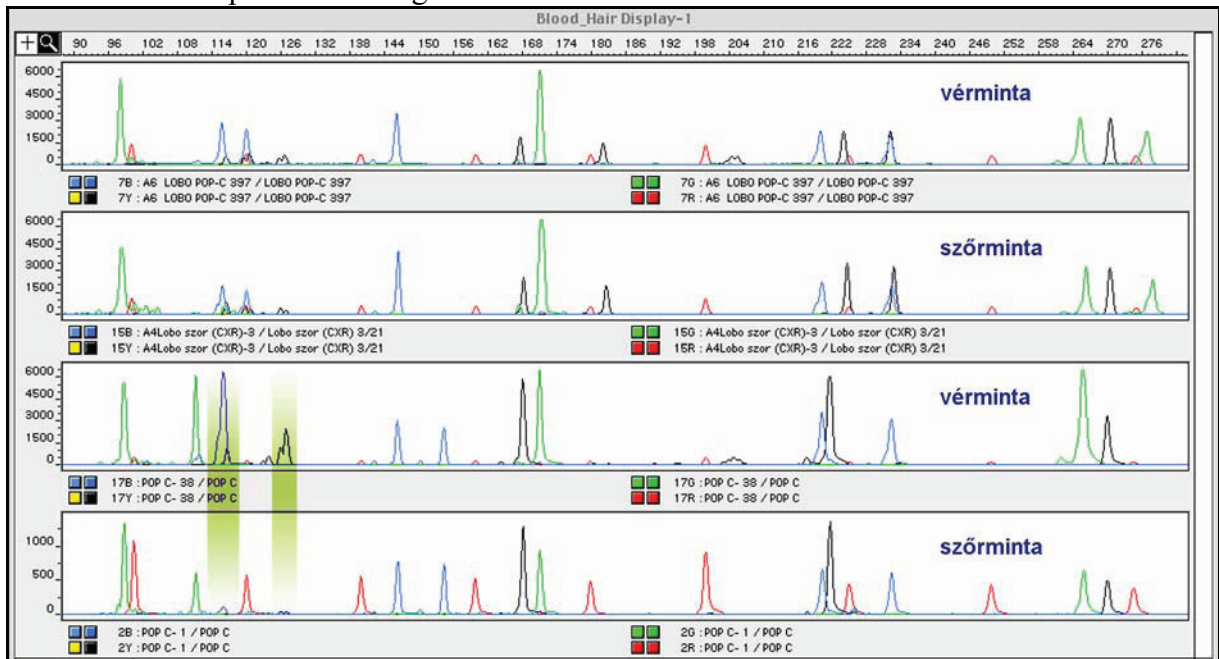
F33. ábra Multiplex PCR vizsgálatok nyáلتörletekből



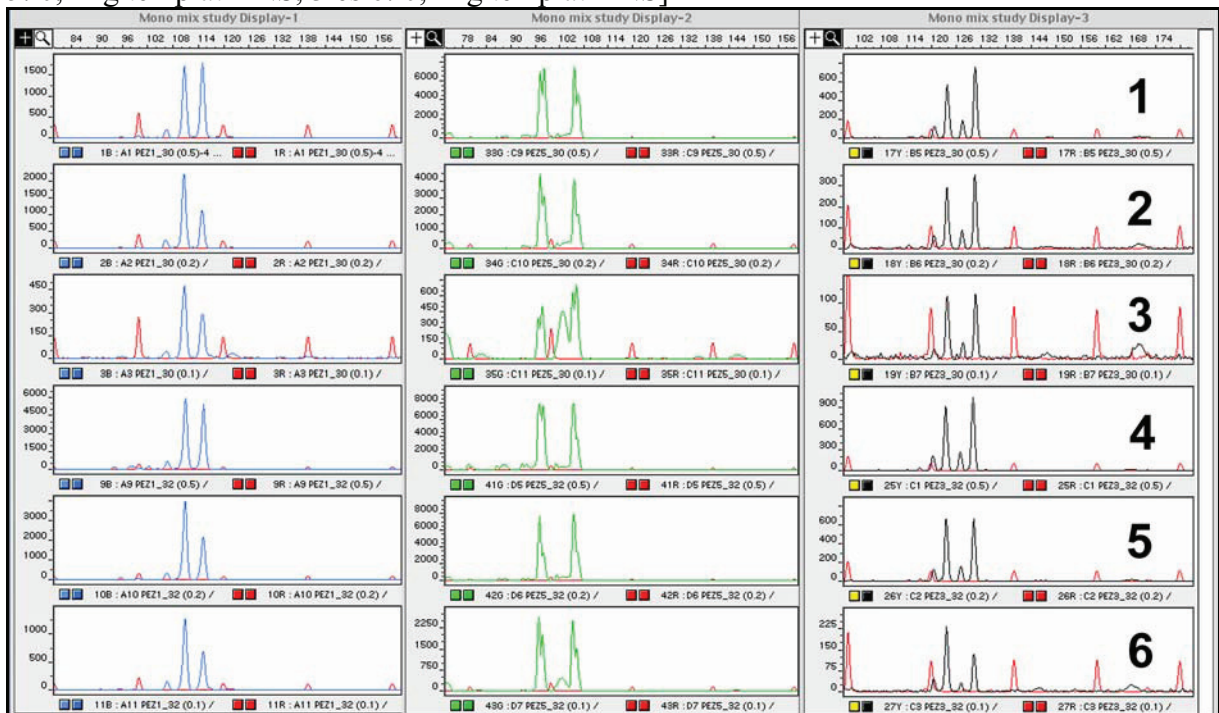
F34. ábra Multiplex PCR vizsgálatok izomszövet mintákból



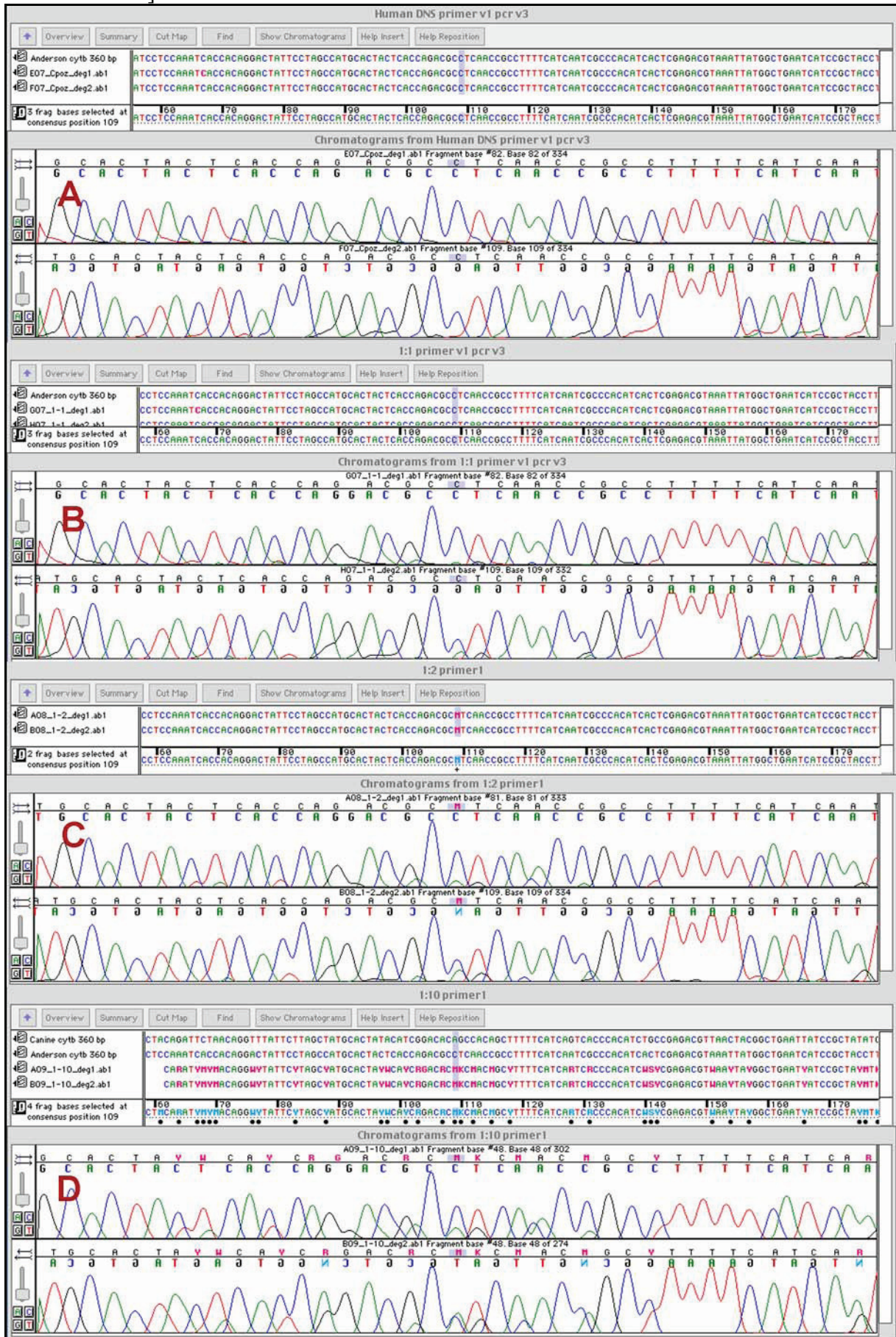
F35. ábra Multiplex PCR vizsgálatok vér- és szőrmintákból



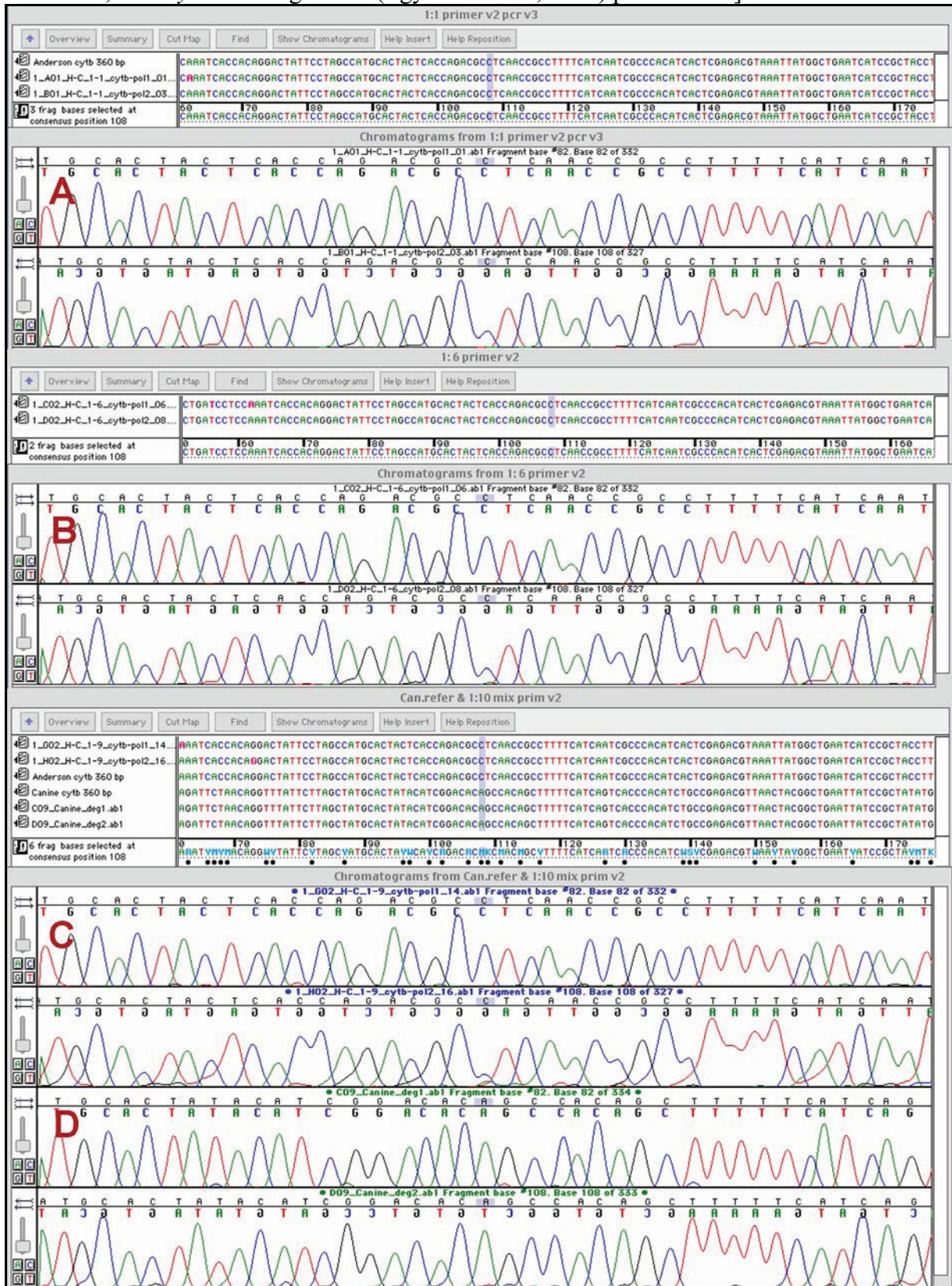
F36. ábra Kutya eredetű DNS monoplex vizsgálata PEZ1 (kék), PEZ5 (zöld) és PEZ3 (fekete) lókuszon [1-3: 30 PCR ciklus, 4-6: 32 PCR ciklus, 1és 4: 0,5 ng templát DNS, 2 és 5: 0,2 ng templát DNS, 3 és 6: 0,1 ng templát DNS]



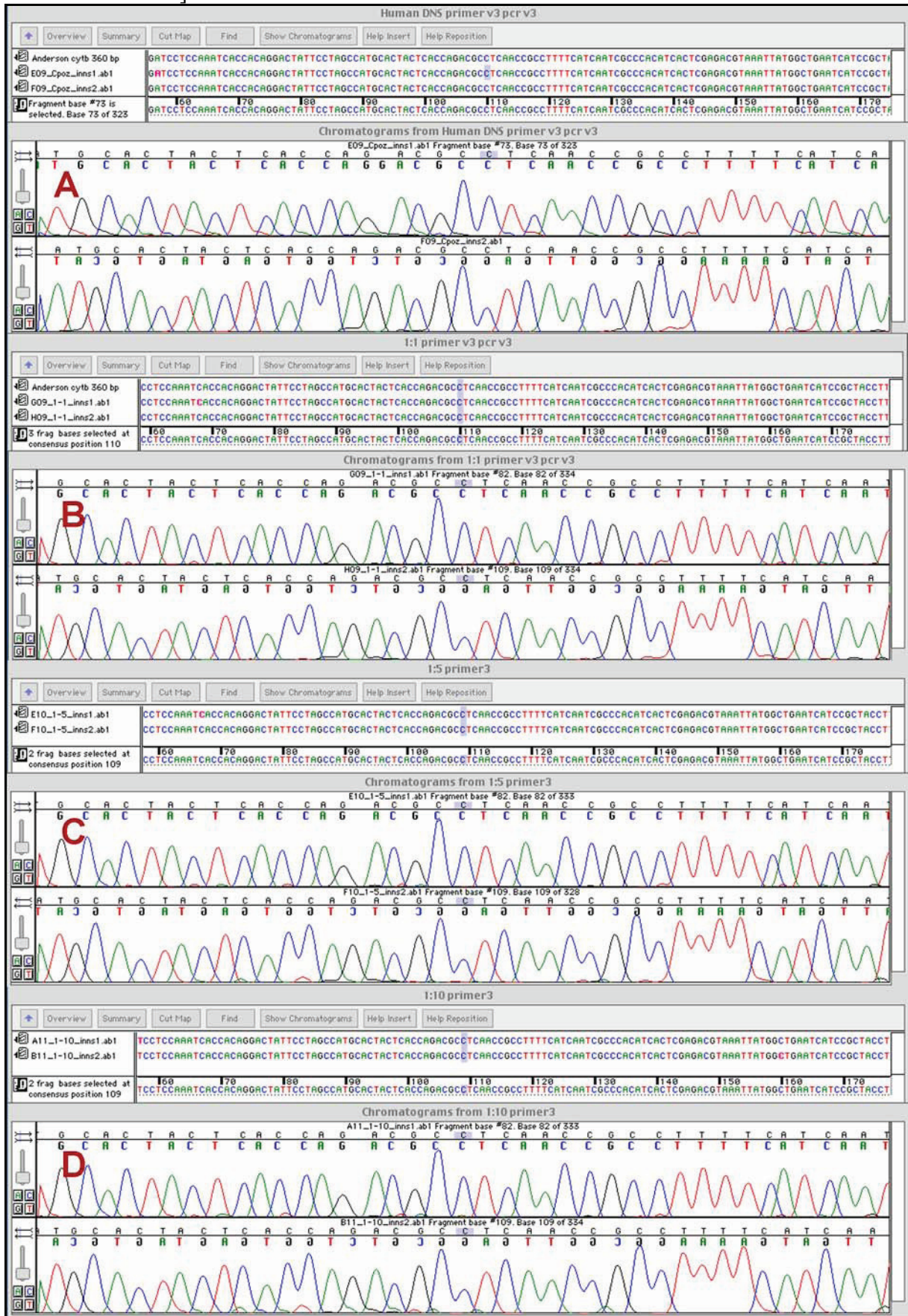
F37. ábra Kevert faji – *ember és kutya* – eredetű DNS vizsgálata degenerált (Egyed és mtsai, 2003) cytochrome b primerekkel [A: humán DNS, B : 1:1 keveredés, C: 1:2 keveredés, D: 1:10 keveredés]

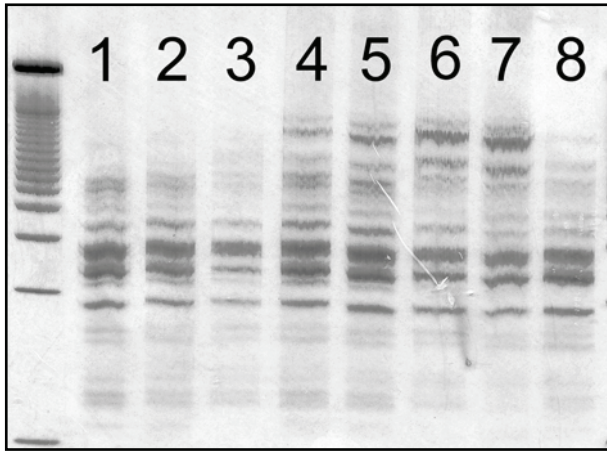


F38. ábra Kevert faji – ember és kutya – eredetű DNS vizsgálata konzervatív (Bartlett és mtsai, 1992) cytochrome b primerekkel [A: 1:1 keveredés, B: 1:6 keveredés, C: 1:10 keveredés, D: *kutya* DNS degenerált (Egyed és mtsai, 2003) primerekkel]

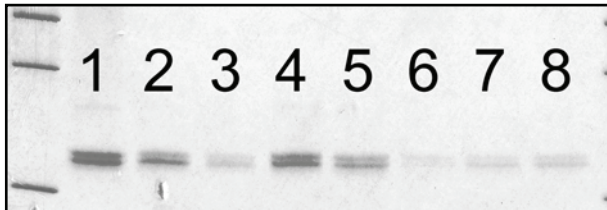


F39. ábra Kevertr fajji – *ember és kutya* – eredetű DNS vizsgálata konzervatív (Parson és mtsai, 2000) cytochrome b primerekkel [A: humán DNS, B : 1:1 keveredés, C: 1:5 keveredés, D: 1:10 keveredés]

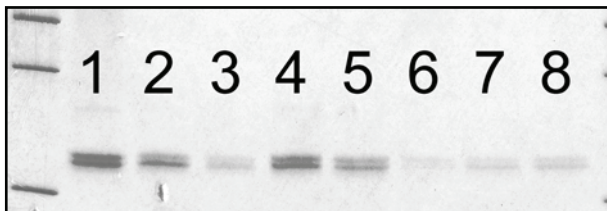




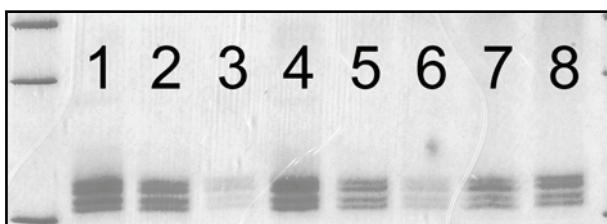
F40. ábra Kutya- illetve kevert faji eredetű – *kutya és ember* – DNS vizsgálata StockMarks® multiplex kittel, 35 PCR ciklussal [1: 0,5 ng kutya DNS, 2: 0,2 ng kutya DNS, 3: 0,1 ng kutya DNS, 4: 0,5 ng kutya DNS, 1:4 keveredés, 5: 0,2 ng kutya DNS, 1:10 keveredés, 6: 0,1 ng kutya DNS, 1:20 keveredés, 7: 0,1 ng kutya DNS, 1:40 keveredés, 8: 0,1 ng kutya DNS, 1:80 keveredés]



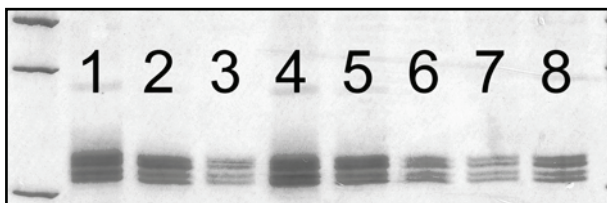
F41.a. ábra Kutya- illetve kevert faji eredetű – *kutya és ember* – DNS monoplex vizsgálata, PEZ1 lókuszon 30 PCR ciklussal [1-8: lásd F40. ábra]



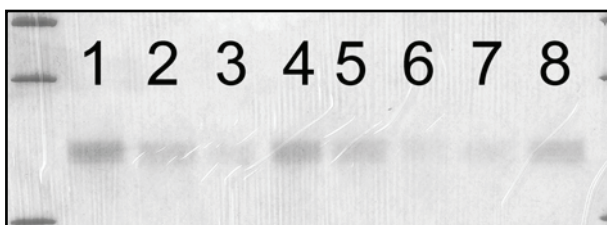
F41.b. ábra Kutya- illetve kevert faji eredetű – *kutya és ember* – DNS monoplex vizsgálata, PEZ1 lókuszon 32 PCR ciklussal [1-8: lásd F40. ábra]



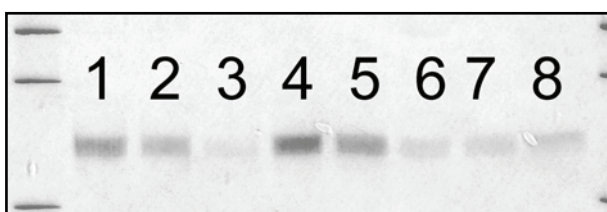
F42.a. ábra Kutya- illetve kevert faji eredetű – *kutya és ember* – DNS monoplex vizsgálata, PEZ5 lókuszon 30 PCR ciklussal [1-8: lásd F40. ábra]



F42.b. ábra Kutya- illetve kevert faji eredetű – *kutya és ember* – DNS monoplex vizsgálata, PEZ5 lókuszon 32 PCR ciklussal [1-8: lásd F40. ábra]

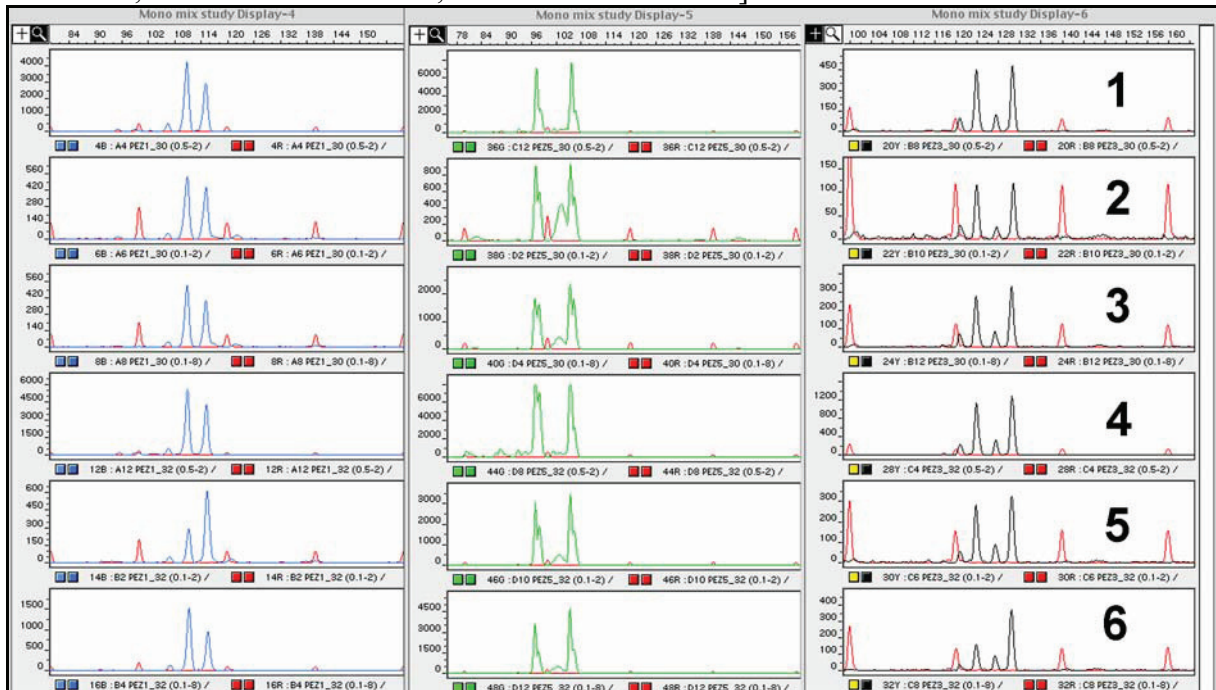


F43.a. ábra Kutya- illetve kevert faji eredetű – *kutya és ember* – DNS monoplex vizsgálata, PEZ3 lókuszon 30 PCR ciklussal [1-8: lásd F40. ábra]

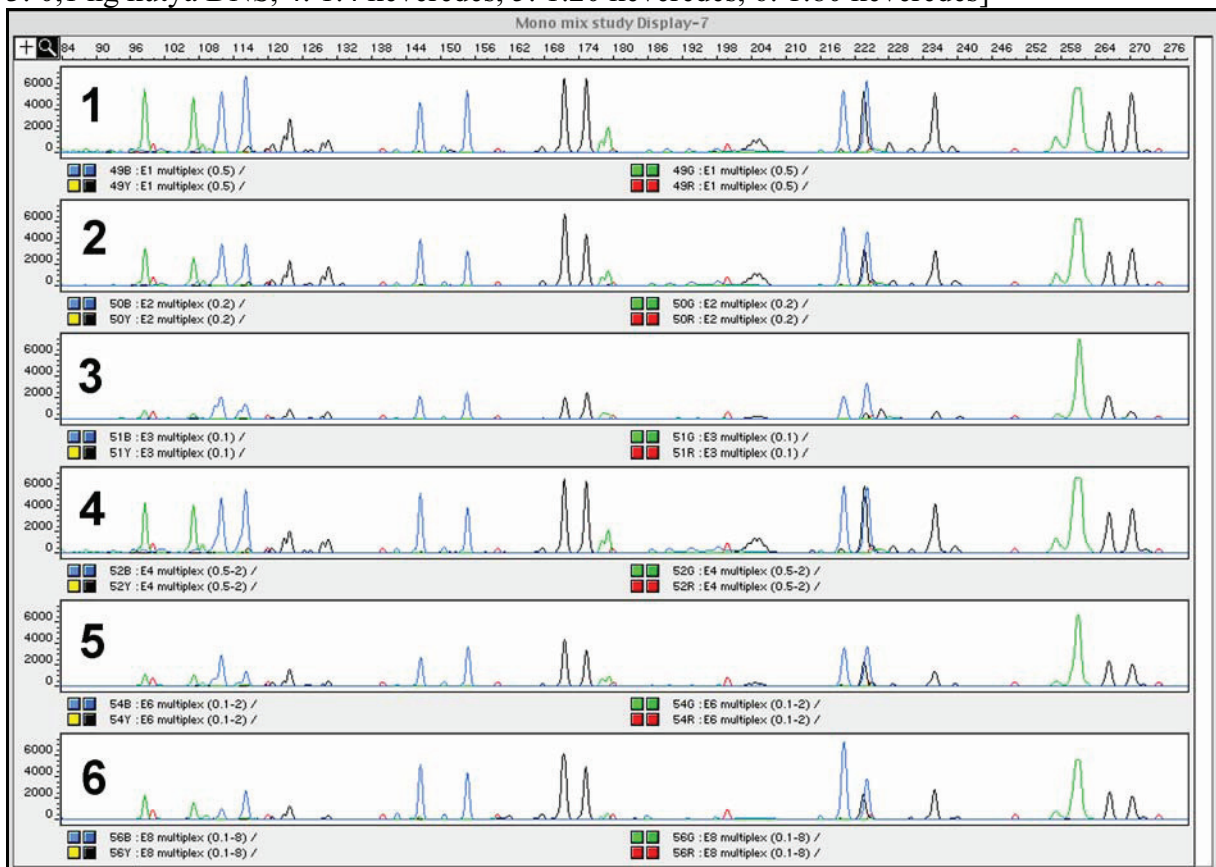


F43.b. ábra Kevert – *kutya és ember* – faji eredetű DNS monoplex vizsgálata, PEZ3 lókuszon 32 PCR ciklussal [1-8: lásd F40. ábra]

F44. ábra Kevert faji – kutya és ember – eredetű DNS monoplex vizsgálata PEZ1 (kék), PEZ5 (zöld) és PEZ3 (fekete) lókuszon [1-3: 30 PCR ciklus, 4-6: 32 PCR ciklus, 1és 4: 1:4 keveredés, 2 és 5: 1:20 keveredés, 3 és 6: 1:80 keveredés]



F45. ábra Kutya- illetve kevert faji – kutya és ember – eredetű DNS vizsgálata StockMarks® multiplex kittel, 35 PCR ciklussal [1: 0,5 ng kutya DNS, 2: 0,2 ng kutya DNS, 3: 0,1 ng kutya DNS, 4: 1:4 keveredés, 5: 1:20 keveredés, 6: 1:80 keveredés]



12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Napjainkban egy tudományos kutatás nemigen szorítható egyetlen személy korlátai közé. Ez a dolgozat sem születhetett volna meg mások segítőkészsége, közreműködése nélkül. Önmagában talán nem is maga az értekezés illetve az eredmények bírnak jelentőséggel számomra, hanem az út, ami idáig vezetett. Az a fejlődés, amit az új ismeretek megszerzése, az ismeretlen feltárulkozásának eufóriája, a hosszadalmas vizsgálatok fárasztó aprólékossága, a kudarcok töprengése, a tapasztalatok magabiztossággá váló ereje, a kétségek mardosó sarkallása, a véleményalkotást követő meglegedettség és nyugalom, a mások számára átadott tudás érdekfeszítő kibontakozása, melyek mind az élet – az életem részévé váltak. Mindezekért sokaknak tartozom köszönettel még akkor is, ha nevük említése figyelmetlenségem folytán elmarad.

Köszönöm dr. Lontainé dr. Santora Zsófiának, a Bűnügyi Szakértői és Kutatóintézet főigazgatójának, hogy az igazságügyi szakértő pályámon elindított, és mai napig kiáll véleményeim szakmai megalapozottsága és elfogadása mellett.

Köszönöm témavezetőmnek, dr. Zöldág Lászlónak, a SZIE ÁOTK Állattenyésztési és Genetikai Osztály vezetőjének szakmai és emberi támogatását, és azt, hogy mindenkinél – még nálam is jobban bízott abban, hogy ez a dolgozat valaha is elkészül.

Köszönet illeti dr. Fekete Sándort és dr. Csáky Istvánt a gondolatébresztő beszélgetésekért, Üvegesné Nagy Juditot a technikai segítségért.

Köszönöm barátaimnak, kollégáimnak, Zenke Petrának, Ősz Katalinnak, Szamosi Gabriellának, Gujdi Krisztinának, dr. Kemény Gabriellának, Rajnai Katalinnak, Egerszeginé Vágó Ilonának, Weszelitsné dr. Lakos Katalinnak, Egyed Balázsnak, dr. Füredi Sándornak, Horváth Zoltánnak, Lakits Gábornak, Woller Jánosnak, dr. Kiriakos Kontadakisnak, hogy időm, lehetőségem, tudásom és tehetségem korlátait önmagukat nem kímélve próbálták kitágítani.

Köszönettel tartozom az Applera Magyarország Kft kísérletek kivitelezésében nyújtott technikai támogatásáért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm azon barátaim bizalmát és emberségét, akik egyébként is zűrös természetem fokozott érvényesülését az elmúlt időszakban megértően fogadták. Ők tudják, mire gondolok...