

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**Mikroszatellita-polimorfizmusok vizsgálata kutya eredetű
anyagmaradványokból**

PhD értekezés tézisei

Készítette:

Zenke Petra

2010

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető:

Prof. Dr. Zöldág László DSc
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet
Állattenyésztési és Genetikai Osztály

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Az élő szervezetből kikerült, illetve elkülönített biológiai minták természetesen olyan kisebb-nagyobb mértékű roncsolódással járnak együtt, amelyek a polimeráz láncreakción alapuló mikroszatellita vizsgálatok sikerességét is csökkentik. A károsodott DNS vizsgálata során az analitikai jelerősség jelentősen csökkenhet, különösen a hosszabb méretű PCR termékek rövidebbekkel történő, egyidejű (multiplex) felsokszorozása esetén. Ez a jelenség a kb. 300 bázispárt meghaladó mérettartományban gyakran – a genotípus meghatározására forgalomban lévő standard „kit”-ek használatakor is – megfigyelhető.

A kutya eredetű eseti minták – pl. elpusztult nemző- illetve szülőállatok szövettani mintái, bűncselekmények helyszínén fellelt, kihullott szőrszálak és/vagy környezeti hatások által degradált, kis mennyiségű anyagmaradványok – a jelenleg használt vizsgálati markerekkel csak részben illetve egyáltalán nem értékelhető genetikai profilt eredményeznek.

A testi sejtek DNS szekvenciájában bekövetkező permanens változás (pl. szomatikus mutáció) hatására különböző allélikus formák jöhetnek létre az azonos lokuszokon, amelynek feltételezett bekövetkezésével számolni kell az egyed azonossága illetve a különbözőség, valamint a leszármazás megállapításának statisztikai értékelésekor. A magas mitotikus aktivitásnak köszönhetően a szomatikus mutáció bekövetkezésének lehetősége – a csontvelő mellett – a kültakaró sejteiben a legvalószínűbb. Tekintettel arra, hogy a kutyákkal kapcsolatos eseti minták többségét szőrszálak teszik ki, a genetikai elváltozások gyakoriságának felmérése érdemi tényező az eredmények interpretálásában.

Célom a kutya eredetű anyagmaradványok egyedi szintű azonosítására alkalmas, érzékeny vizsgálati módszer kidolgozása volt, amely a kellő mértékben stabil és informatív STR-lokuszok segítségével, kis mennyiségű és erősen bomlott mintákon is hatékonyan és eredményesen alkalmazható. Ehhez olyan, változatos STR markerek polimorfizmusának felmérése volt szükséges, amelyeknél a primerpárok tervezésével a sokszorozandó szakaszok hosszának minél nagyobb mértékű rövidítése érhető el. A polimorfizmus-fok és az allélméret mellett a lokuszok szerkezete szintén lényeges szempont, mivel a di- illetve trimer ismétlődő egységekből álló mikroszatelliták genotípus meghatározása több szempontból problémás.

A már ismert szekvenciával és megfelelő sokféleséggel rendelkező, rövid mikroszatellita lokuszok kombinálásával ún. „miniplexek” létrehozását terveztem, a kiindulási DNS minél kevesebb számú PCR reakcióval kivitelezhető felsokszorozása érdekében.

A kiválasztott STR lokuszok segítségével további célom volt a vizsgált, magyarországi kutyák genetikai profil alapján történő egyedi azonosítása a megfigyelt alléltípusok pontos meghatározása (ún. genotipizálása) révén. Mivel a precíz allél

meghatározáshoz az allélek méretbeli eltérése önmagában nem elégséges, a méret alapján elkülönülő csoportokból egy ill. több allél bázissorrendjét kell meghatározni. Az így nyert szekvencia-adatok segítségével megállapítható a mikroszatelliták szerkezete, valamint a repetíciós (ismétlődő DNS-motívum) szám alapján kialakítható a nemzetközi összehasonlításra is alkalmas allélnevezéktan. A szekvenálással igazolt méretű, referenciaallélekből összeállított alléllétrákkal lehetővé válik az esetleges interallélek pontos meghatározása, és a Genotyper 2.5.2 szoftver használatával lehetőség nyílik a genetikai profilok félautomata kiértékelésére is.

Statisztikai analízissel a multiplex rendszerekben alkalmazott lokuszok felhasználhatóságát, illetve korlátait terveztem felmérni, meghatározva azok heterozigotizációját (H_{exp} , H_{obs}), megkülönböztetési erélyét (PD), apasági kizárás erélyét (PE) és a polimorfizmus információs tartalmát (PIC).

Az eseti minták jelentős hányadára igen csekély mennyiségű DNS jellemző, ezért a PCR reakciók optimalizálásával a kimutathatósági küszöböt a lehető legalacsonyabb – akár néhány sejtnyi – határértékig kívántam csökkenteni.

Az összeállított mikroszatellita miniplexek gyakorlati alkalmazhatóságát leszármazástani- és bűnügyi esetekkel terveztem tesztelni.

Választ kerestem továbbá arra a kérdésre is, hogy egyetlen szőrszálból milyen eséllyel lehet a teljes vizsgált genetikai profilt kimutatni, illetve az milyen formában és mekkora valószínűséggel térhet el az egyed valós genetikai profiljától. Ennek felmérése céljából egyetlen egyed különböző testrészéről gyűjtött, a környezet (UV, vegyszerek, stb.) mutagén hatásainak leginkább kitett, nagyszámú szőrmintájának vizsgálatát terveztem. Mikroszkópi vizsgálattal elkülönített, eltérő fejlődési fázisokba sorolt szőrképletek egyedi vizsgálatával kívántam megbecsülni, milyen várható sikerességgel lehet teljes DNS-profil generálni a különböző mennyiségű gyökérhüvelyi sejtet tartalmazó eseti szőrmintákból. Az alacsony kópiaszámú szőrminták vizsgálatára szolgáló optimális preparálási eljárást három különböző DNS kivonási módszer tesztelésével választottam ki.

Az egyes markerek különböző típusú eltérésekre való hajlandóságát 10 STR lokuszt tartalmazó, standard multiplex vizsgálati rendszerrel terveztem meghatározni, illetve a szomatikus mutáció előfordulásának gyakoriságát az azonos egyedből gyűjtött szőrszálak vizsgálatával felmérni.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Rövid STR alapú vizsgálatok

Az irodalmi adatok és a Canine Genome Project interneten elérhető referencia szekvenciái alapján kiválasztott hét, potenciálisan polimorf mikroszatellita lokuszra (PEZ21, PEZ16, REN124F09, PEZ19, WILMS-TF, FH2584, vWF.X) primereket illetve primerpárokat terveztem, és így a keletkező PCR termékek hosszát 200 bázispárnál rövidebbre redukáltam. A markerek polimorfizmusát 75 különböző fajtába tartozó, 116 kutya vérmintájából tisztított DNS-sel, monoplex PCR technikával teszteltem. A potenciális allélként felsokszorozott termékeket kapilláris elektroforézissel választottam el, majd méretük alapján csoportosítottam.

Az alléltípusok meghatározásához és az allélek jellemzéséhez a méret alapján szignifikánsan elkülönülő csoportokból egy, a kevésbé diszkrét mérettartományok esetében több allél bázissorrend meghatározását végeztem el. A genotipizáláshoz szükséges alléllétrákat az ismert genotípusú egyedek szekvencia vizsgálatokkal igazolt PCR-termékeinek összekeverésével állítottam elő. A szekvencia adatok ismeretében az ismétlődő egységek számán alapuló allélnevezéktant nemzetközi összehasonlításra alkalmas módon alakítottam ki.

Az alléltípusok félautomata meghatározását a megfelelően módosított Genotyper[®] 2.5.2 szoftverrel a referencia alléllétra és a minta allélméreteinek összehasonlítása alapján végeztem.

A lokuszokon megfigyelt allélgyakoriságok alapján kalkuláltam a várható heterozigotizást, az apasági- és megkülönböztetési valószínűséget, valamint a polimorfizmus információs értéket. Az allélek lokuszon belüli függetlenségének vizsgálatát, azaz a Hardy-Weinberg egyensúly meglétét exact-teszttel, az allélek lokuszok közötti lehetséges kapcsoltságát permutációs valószínűségi hányados teszteléssel végeztem.

A polimorfizmus vizsgálatokkal felmért, hét STR lokuszt kiegészítettem a már korábban leírt, megfelelően rövid és kellő változatosságot mutató PEZ1, PEZ3, PEZ5, FH2054 markerekkel, valamint az SRY lokusszal. Az összesen 12 markert két multiplex reakcióban állítottam össze. Mivel az egyes lokuszok mérettartománya átfedő, a megkülönböztetésüket eltérő színű fluoreszcens jelöléssel biztosítottam. A kifejlesztett két miniplex rendszer érzékenység-tesztelése 2–0,05 ng templát-tartományban történt, gyakorlati alkalmazhatóságukat tenyésztési és bűnügyi esettípusokon vizsgáltam.

Szomatikus mutáció vizsgálata

A szomatikus mutáció előfordulásának lehetőségét három éves, bullmasztiff fajtájú, nőstény kutya négy, különböző testrészéről kitépett, eltérő fejlődési stádiumban lévő, 600 db szőrmintáján végeztem. Az egyes szőrszálak kategorizálása a szőrhagymák fénymikroszkópos vizsgálata alapján történt, amely során három növekedési illetve degenerációs fázist (anagén, katagén, késői katagén) különítettem el. A gyökérhüvelyi sejteket vizuálisan nem tartalmazó, telogén fázisú szőrszálakat a vizsgálatba nem vontam be. A genetikai vizsgálatokhoz a szőrszálak levágott 0,3-0,5 cm hosszú, gyökérhüvelyi sejteket tartalmazó részét használtam fel, amelynek kis kópiaszámú DNS kivonására is alkalmas módszerét, három különböző eljárással (1. "Szerves extrakciós" módszer; 2. BioRobot EZ1; 3. Pellet Paint[®]) teszteltem. Kontroll mintaként a donor kutyától vett szájnyalvákahártya-törletet használtam.

Az egyes szőrszálakból kinyert DNS tisztításának sikerességét agaróz gélen ellenőriztem, majd a 10 kutya specifikus STR marker (PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ5, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8, FHC2079) együttes felsokszorosítását 10 µl reakció végtérfogatban, a gyártó ajánlásai alapján végeztem (StockMarks[®] for Dogs Canine Genotyping Kit). A sokszorozási hatékonyság ellenőrzését poliakrilamidgél-elektroforézissel (PAGE) és ezüsfestéssel végeztem. A fragmensek kapilláris elektroforézissel történő elválasztását ABI Prism[®] 310 genetikai analizátorral, a fluorofórokkal jelölt primerek lézergérezített detektálásának kiértékelését GeneScan[®] 3.1.2 szoftverrel, a szőrszálak genotípusának meghatározását a Genotyper v2.5.2. szoftverrel végeztem.

Azokat a tisztított DNS-mintákat, amelyekből a teljes DNS-profil egy vagy több markeren a kontrollként alkalmazott nyálmintából meghatározott genotípustól eltérést mutatott, ismételt, multiplex és/vagy monoplex PCR vizsgálattal ellenőriztem.

A szőrszálak genetikai profiljának meghatározása után az eredményeket a különböző DNS-tisztító eljárások, szőrfázisok és testtájak szerint csoportosítottam, majd a kapott arányszámokat az Instat statisztikai program Yate's korrekciós χ^2 -tesztjével vizsgáltam.

EREDMÉNYEK

Rövid mikroszatellita markerek és polimorfizmusuk vizsgálata

A kiválasztott hét mikroszatellita markerből ötnél a PCR termékek hosszának csökkentését, hogy azok ne haladják meg a 200 bp-os méretet, a forward és/vagy reverz primerek tervezésével valósítottam meg.

Az allélek bázismotívum ismétlődését, (repetíciós) struktúrájának megállapítását szekvencia analízis alapján végeztem. Eredményeimet publikált adatokkal hasonlítottam össze, és az allélek nevezéktanát nemzetközileg megfeleltethetően, az ismétlődő egységek száma alapján alakítottam ki. Szerkezeti jellegzetességük alapján a vizsgált öt tetramer (PEZ21, PEZ19, PEZ16, WILMS-TF, FH2584), az egy pentamer (REN124F09) és az egy hexamer (vWF.X) ismétlődéssel rendelkező lokusz két kategóriába volt csoportosítható. A PEZ21, PEZ19, vWF.X lokusz egyszerű repetíciókkal, a REN124F09, PEZ16, WILMS-TF, FH2584 marker pedig összetett ismétlődésekkel rendelkező allélekből áll.

A monoplex PCR termékekből kiválasztott referencia alléleket azok szekvencia meghatározását követően a nemzetközi génbank információs adatbázisában ellenőriztem, és az új, eddig nem ismert szerkezetű markerek reprezentáns alléljeinek bázisrendjét a GenBank-ban jegyeztettem [Ac. No.: FJ169896, FJ169897 (PEZ16); FJ169898 (PEZ21); FJ169899 (PEZ19); FJ169900, FJ169901 (REN124F09); FJ169902 (FH2584), GenBank, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)].

A genotipizáláshoz szükséges alléllétrákat az ismert genotípusú egyedek szekvencia vizsgálatokkal igazolt méretű, monoplex PCR-termékeinek összekeverésével állítottam elő. Az allélkórtélok a populációs mintában előforduló legkisebb és legnagyobb allél közötti tartományban az egész számú ismétlődéssel rendelkező referencia alléleket tartalmazzák.

Az átfedő mérettartományú lokuszokat – összesen 12 markert – eltérő színű fluorofór jelöléssel tettem megkülönböztethetővé, és két multiplex reakcióban – miniplex I. és miniplex II. – állítottam össze. A két rendszer tartalmazza a monoplex vizsgálatokkal felmért változatosságú hét STR lokuszt (PEZ21, PEZ16, REN124F09, PEZ19, WILMS-TF, FH2584, vWF.X), kiegészítve a már ismert polimorfizmusú, rövid PEZ1, PEZ3, PEZ5, FH2054 markerekkel valamint az SRY lokusszal. Mindkét multiplex reakció során megvalósíthatóvá vált – a részleges genetikai profil kockázatának figyelembe vételével – 50 pg kiindulási DNS genotípusának meghatározása, 20 µl végtérfogatú reakcióelegyben és 34 PCR ciklus alkalmazása mellett.

A genotípus meghatározása a referencia allélekből összeállított alléllétrák segítségével történt. A 116 egyed számláló minta vizsgálata során 12 lokuszon összesen 108 allélvariánst mutattam ki. A felmért állományban a 11 STR lokuszon megfigyelt (5–24) allélszám, az allélgyakorisági értékek (0,4% és 53,9% közötti) tartománya, megoszlása

valamint a heterozigotizációs értékek, a kizárhatósági-, megkülönböztethetőségi valószínűségek és polimorfizmus információ tartalom értékei az adott lokusz függvényében jelentősen eltértek. A várt heterozigotizációs értékei (H_{exp} : 0,57–0,92) és a megfigyelt heterozigotizációs értékek (H_{obs} : 0,31–0,78) változóak. Legalacsonyabb értékekkel többnyire a REN124F09 lokusz rendelkezett, amelynek egyúttal kizárási- és megkülönböztető valószínűségi szintje is a legkisebb volt. A legmagasabb értékek minden szempontból a WILMS-TF markert jellemezték. A 12 lokusz kombinált kizárási valószínűsége $\sum PE = 99,9953\%$ -nak, a kombinált megkülönböztetési valószínűsége pedig $\sum PD = 99,99999999507\%$ -nak bizonyult.

A Hardy-Weinberg egyensúly vizsgálatára irányuló analízis során az exact-teszt 11-ből nyolc lokuszon szignifikáns eltérést mutatott az egyensúlyi állapottól (a *Bonferroni-korrektúrával* meghatározott $P = 0,0046$ szignifikancia szint alkalmazásával). A lokuszpárok kapcsoltságára irányuló összehasonlító elemzéssel szignifikáns eltérést ($P = 0,0046$) mutató tesztek aránya (1/55) 1,82 %-nak bizonyult.

A miniplexekkel elvégzett eseti, alomellenőrző vizsgálatok összesített eredményei alapján a kérdéses kan biológiai apasága több (öt ill. hat) marker alapján kizárható volt, a bűnügyi – helyszínen fellelt – szőrmintából kimutatott teljes genetikai profil az összehasonlító mintával azonosnak bizonyult.

Mutáció lehetősége

Teljes genetikai profilként kezeltem mindazon analízisek eredményeit, amelyekben lokusz-kiesés nem volt kimutatható, azaz mind a 10 marker tekintetében eredményes volt a vizsgálat. A DNS tisztítási eljárások közül leghatékonyabb módszernek a szerves kivonás és a Microcon-30 ultraszűrés-koncentráció kombinálása bizonyult (74,7%), de a BioRobot EZ1 hasonlóan magas sikerességi arányt mutatott (73,4%). Bár a PelletPaint® ko-precipitációs technika használata valamivel kisebb (62,0%) sikerességgel járt, statisztikailag a három módszer közötti eltérések nem bizonyultak szignifikánsnak.

Az anagén fázisú szőrminták 86,7%-ban, a katagén fázisúak 79,4%-ban, a késői katagén fázisú szőrök 52,6%-ban adtak teljes – lokusz kiesés nélküli – genetikai profilt. Az eltérő testtájokról származó minták sikeres genotipizálásában nem tapasztaltam szignifikáns eltérést; a hátszőrök 74,2%-ban, a pofaszőrök 67,6%-ban, a mellső lábszőrök 72,9%-ban, a hátsó lábszőrök pedig 78,0%-ban adtak teljes genetikai profilt.

Az eltérő genotípusok felmérését az összesen 441, teljes – lokusz kiesés nélküli – DNS-profilt mutató szőrszál vonatkozásában végeztem el. A vizsgált 10 STR markeren összesen 74 esetben (12,3%) volt megfigyelhető különböző típusú eltérés (kiegyenlítetlen, allél-kiesést, extra-, vagy aberráns allélt mutató mintázatok) a tényleges genetikai profiltól.

A DNS tisztítási eljárások vonatkozásában a téves genetikai profil legnagyobb mértékben (21,9%) a BioRobot EZ1 eljárással volt tapasztalható, ami szignifikáns eltérést mutatott a szerves kémiai- (11,1%) módszerrel történt összevetés során. A robotikus eljárás a PelletPaint (12%) ko-precipitációs preparatív módszerrel összevetve nem adott szignifikáns különbséget. Az egyed valós genetikai profiljától eltérő genotípusok gyakorisága az anagén (9,5%) illetve katagén (16,5%) stádiumú szűrőket összehasonlítva a késői katagén (28,3%) állapotú szűrőkkel, szignifikáns eltérést mutatott. Az aberrációk eloszlásában megfigyelt, testtájak szerinti különbségek nem bizonyultak szignifikánsnak.

Az eltérések okának felderítése illetve a technikai hibák kiszűrése érdekében ismételt monoplex és/vagy új multiplex sokszorosításokat végeztem. Ezek eredményeként csak egyetlen szőrminta esetén volt igazolható a PEZ1 lokusz eltérése, a többi esetben az ismételt vizsgálatok eredménye a tényleges DNS-profiltól nem különbözött.

MEGVITATÁS

Az egyed azonosságának illetve leszármazásának genetikai alapon történő meghatározásához olyan markerek szükségesek, amelyek az adott populációban genetikai kapcsoltság nélkül, megfelelő szintű sokféleséggel rendelkeznek. Mindemellett standard módszerekkel egyértelműen és megismételhető formában, nemzetközi összehasonlításra alkalmas módon kell meghatározhatónak is lenniük. Különösen a degradált, csekély mennyiségben rendelkezésre álló minták analízisének elengedhetetlen a vizsgálati rendszer nagyfokú érzékenysége, az eredmények helyes értelmezése pedig csak megfelelő genetikai-statisztikai elemzésekkel együtt valósítható meg.

A mikroszatelliták ismétlődő egységen alapuló nevezéktanának kialakításához az allélok szekvencia meghatározása elengedhetetlen követelmény. A szekvencia eredmények alapján egyértelmű, a laboratóriumok közötti összehasonlításra alkalmas, a szakmai ajánlásoknak megfelelő allélnévezéktan alakítottam ki, amely törvényszéki alkalmazásra is javasolható. Az ismétlődő egységek számán alapuló, hivatkozott nevezéktan javaslatokat a WILMS-TF és vWF.X markerek esetében eredményeim nem módosítják, a többi, vizsgált lokusszal kapcsolatos nevezéktani ajánlás mindaddig nem állt rendelkezésre.

A marker-szelekció során az elsődleges szempontot – a variancia mellett – a mikroszatelliták mérete jelentette, ezért a szükséges esetekben a korábbi (referált) primerszekvenciáktól eltérő, új oligók tervezésével és használatával rövidítettem le a PCR termékek hosszát. Az allélek mérettartománya így egyik vizsgálati rendszerben (miniplex I. és miniplex II.) sem haladja meg a 200 bázispárt, aminek köszönhetően a különböző mértékben degradált minták mikroszatellita analízisének sikeressége javulhat.

Doktori munkám során kifejlesztett két, kutya-specifikus PCR multiplexben tizenegy „mini-STR” lokusz és egy Y kromoszómás marker sokszorosítható fel. A trimer PEZ3, a pentamer REN124F09 és a hexamer szerkezetű vWF.X kivételével a többi mikroszatellita lokusz tetramer ismétlődésekkel rendelkezik, amelyek – a széles körben alkalmazott dinukleotidokkal ellentétben – jóval pontosabb és egyértelműbb allélmeghatározást tesznek lehetővé. Az Y kromoszómán elhelyezkedő SRY ivar-specifikus marker a kan kutyák esetén az MP II. reakcióban mutatható ki, míg nőstény kutyákban ebben a pozícióban kimutatási jel (csúcs) nem tapasztalható.

Az ismeretlen eredetű minták korrekt allélmeghatározása a referencia allélekből összeállított, kontrollként használt alléllétrákkal történő összehasonlítással végezhető el. Ennek jelentősége elsősorban az összetett szerkezetű, nagyszámú allélvariánst tartalmazó STR lokuszok esetében kiemelkedő. Az alléllétrák összeállításához főként a nagyobb előfordulási gyakoriságú, egész számú ismétlődéseket tartalmazó, szekvenált alléleket alkalmaztam. Az általam előállított, reprodukálható allélokotélok valamint a módosított

genotipizáló szoftver alkalmazásával a köztes allélek meghatározása is biztonságosan kivitelezhetővé vált.

A miniplex I. és miniplex II. vizsgálórendszer érzékenységét 20 µl végtérfogatú PCR reakcióban teszteltem, és mindkét reakció elegendő az 50 pg DNS templát mennyiség – kb. 10 darab diploid sejt – elegendőnek bizonyult a teljes DNS-profil meghatározására.

Csekély mennyiségű kezdeti DNS koncentráció alkalmazása esetén azonban a polimeráz láncreakció folyamán véletlenszerű hatások is felléphetnek, amelyek kiegyenlítetlen lokusz- illetve allél-sokszorozódáshoz, esetlegesen kieséshez (drop-out) vezethetnek. A standardizálási optimumot el nem érő, alacsony kópiaszámú minták ezért az alkalmazott módszerektől függetlenül is speciális vizsgálati stratégiát, megfelelési és minőségirányítási szempontokat igényelhetnek. A sztochasztikus hatások mérlegeléséhez, a téves genotípus-meghatározás elkerülése érdekében a kapott eredményeket – lehetőség szerint – párhuzamos vagy ismételt vizsgálatokkal ajánlott ellenőrizni.

Az egyedi azonosításhoz illetve a leszármazás vizsgálatához alkalmazni kívánt 11 STR marker allélgyakorisági eloszlását és az ebből számított statisztikai alapértékeket 116 kutya mintáján mértem fel. Az általában igazságügyi szempontból is megfelelőnek minősíthető markerek magas ($H_{(obs)} = 0,6-0,8$) heterozigotitási értékkel rendelkeznek, amely az általam alkalmazott markerkészletben öt lokusznál figyelhető meg. A várt és megfigyelt heterozigotitáció között észlelt szignifikáns különbségek a felmért kutyacsoport genetikai egyensúlyának hiányára utalnak, az FH2584 marker esetében pedig az X-kromoszómális lokalizáció adhat magyarázatot. A 11 lokuszra számított kombinált kizárási- (PE) és megkülönböztetési valószínűségeket (PD) értékei az azonos elvű humán kriminalisztikai elvárásokhoz viszonyítva hasonlóságot mutatnak. A felmért kutyaállományban az egyensúlyi állapottól (Hardy-Weinberg- és kapcsoltsági egyensúly) való szignifikáns eltérések a csoport heterogén jellegének köszönhetőek, hiszen a random párosodás és ezzel együtt a génkicserélődés lehetősége nem csak a fajták között, de még a fajtákon belül is igen korlátozott (Wahlund-hatás). Az eredmények alapján levonható az a következtetés, hogy a statisztikai elemzésekhez a viszonylag sok, különböző fajtából álló adatbázis megbízható módon, a vizsgálatok téves értékelésének lehetősége nélkül nem használható fel.

Leszármazási esettanulmányom kapcsán a 12 markerből összeállított készlet gyakorlati alkalmazhatósága olyan kutyafajtán (tenyészetben) belüli kérdéses apaság eldöntésében is bizonyíthatóvá vált, ahol a beltenyésztettség – az irányított keresztezéseknek köszönhetően – nagyobb mértékben jelenik meg, mint a felmért, vegyes fajtákat tartalmazó csoportban. Hatósági esettanulmányom alátámasztja a kifejlesztett miniplex vizsgálórendszerek megfelelő specifikitását és érzékenységét helyszíni szőrminták sikeres vizsgálhatóságában. Az azonosító vizsgálatok mellett a polimorf mikroszatellitákra alapozott felmérések alkalmasak lehetnek a beltenyésztett vagy a beltenyésztettségi

leromlás jeleit mutató fajtatiszta kutyaállományok valós genetikai állapotának megítélésére is, és segíthetnek a génfrissítő keresztezések előkészítésében valamint tervezésében.

Alkalmazási korlátok

A késői katagén stádiumú kutyaszőrökből nyert teljes- illetve hibás DNS-profilok arányában az anagén és katagén szőrökhöz képest szignifikáns eltérést tapasztaltam, ami korrelál a szárvég morfológiája alapján becsülhető sikeres nukleáris genotipizálás várható eredményességével. Mivel az egyes szőrképletek – különösen a hullott, telogén fázisúak – extrém alacsony mennyiségű sejtmagi DNS-t tartalmazhatnak, rendkívüli jelentőséggel bír a genetikai anyag kinyerésére irányuló technikák közül a legmegfelelőbb kiválasztása. A munkám során tesztelt három DNS-kivonási eljárás közül a további vizsgálatok szempontjából legalkalmasabbnak a proteináz K enzimmel történő emésztést és szerves oldószeres kivonást követő ultraszűrés-koncentráció („szerves kémiai” módszer) bizonyult.

Az elvégzett statisztikai elemzések alapján az egyes testrészekről gyűjtött szőrök DNS vizsgálatának eredményeiben nincs szignifikáns különbség, ugyanakkor a mintagyűjtés során azt tapasztaltam, hogy a pofáról gyűjtött szőrök közt nagyobb arányban található telogén állapotú minták. Amennyiben eseti mintaként – pl. harapásnyomok környékéről – pofaszőr áll rendelkezésre, számolni kell a megnövekedett arányú sikertelen vizsgálatok lehetőségével.

A vizsgált, összesen 600 tépett szőrszálból nyert 441 teljes DNS-profilból 74 esetében a valódi genetikai profillal nem minden lokuszon egyező – aberráns, kiegyenlítetlen, allél kiesést vagy extra allélt mutató – mintázatot figyeltem meg. Ellenőrző vizsgálatokkal ezek azonban – egyetlen mutációs esemény kivételével – technikai okokra és korlátokra vezethetők vissza. Egyetlen mintán tapasztalt, ismételt vizsgálatokkal is alátámasztott allélkiesés illetve extra allél jelenléte nagymértékben valószínűsíti a mutációs eseményt. Vizsgálataimmal a PEZ1 lokuszon a „13”-as allél kiesése multi- és monoplex vizsgálatokkal is igazolható volt, így az szomatikus mutációra vezethető vissza. Ez a vizsgált állat kültakarójának különböző genotípusú sejtcsoportokból álló genetikai mozaikosságát támasztja alá.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Hét új, Magyarországon eddig nem vizsgált mikroszatellita marker (PEZ21, PEZ16, REN124F09, PEZ19, WILMS-TF, FH2584 és vWF.X) polimorfizmusának felmérése hazai kutya mintákon (76 fajta 116 egyedéből álló kutyaállományban).
2. Öt marker (PEZ16, REN124F09, PEZ19, WILMS-TF, FH2584) PCR termék-méretének lerövidítése 200 bázispárt nem meghaladó mérettartományra primer-szekvenciák tervezésével, figyelembe véve azok specifikusságát, stabilitását és több lokusz együttes felsokszorozhatóságának (koamplifikációjának) lehetőségét.
3. 11 rövid (90-200 bp mérettartományú), kutya specifikus STR koamplifikációjának megvalósítása multiplex PCR reakciókban, kiegészítve az ivar meghatározására szolgáló, Y kromoszómán elhelyezkedő markerrel, két – MiniSTR I. (PEZ1, PEZ5, PEZ3, PEZ21, PEZ16, REN124F09) és MiniSTR II. (PEZ19, WILMS-TF, FH2054, PEZ19, FH2584, SRY) miniplexben.
4. A PEZ21, PEZ16, REN124F09, PEZ19, FH2584 markerek szekvencia szerkezetének jellemzése, és az ismétlődő egységek számán alapuló allélnevezéktan kialakítása. A típus-szekvenciák FJ169896, FJ169897; FJ169898; FJ169899; FJ169900, FJ169901; FJ169902 katalógusszámú, génbanki bejegyzése (GenBank, 2008).
5. A magyarországi kutyaállományban megfigyelt, meghatározott bázissorrendű referencia allélek keverékéből összeállított alléllétrák kialakítása az alkalmazott lokuszokhoz.
6. A Genotyper 2.5.2. genotipizáló szoftver átalakítása az alkalmazott allélkötélekhöz és a miniplexek lokuszaihoz, amelynek segítségével a detektált genotípusok félautomata módon meghatározhatók.
7. Genetikai statisztikai analízisek elvégzése a populációs mintában megfigyelt allélek gyakoriságából kiindulva, meghatározva a lokuszok egyes-, illetve kombinált alkalmazásának hatékonyságát, leszármazási és egyedi azonosítással kapcsolatos kérdésekben.
8. A kifejlesztett két miniplex reakció alacsony kópiaszámú kiindulási mintákhoz történő érzékenyítésével kb. 10-20 testi sejtől kivont, 0,05-0,1 ng DNS elegendő a genetikai profil megállapítására.
9. A kidolgozott két miniplex vizsgálórendszer származásellenőrzési- és bűnügyi esetekben történő sikeres használata, ami igazolja a megfelelő érzékenység és kizárási valószínűség alkalmasságát a DNS vizsgálatokkal is alátámasztott genetikai szakértői vélemények elkészítésében, még degradált, kis mennyiségű minták esetében is.

- 10.** Kutya eredetű szőrökben az STR markerekben bekövetkező szomatikus mutáció felmérésére irányuló vizsgálatok azt igazolták, hogy nagyszámú (600 db), egyetlen egyedtől gyűjtött szőrszál közül egy mintában szomatikus mutáció fordult elő. Ennek alapján, habár csekély valószínűséggel is, de számolni kell a vizsgálatra kerülő kutyaszőr minták genotípusának megállapításakor annak a lehetőségével, hogy a donor egyed szőrzetének potenciális genetikai mozaikossága a kifejlesztett vizsgálati módszerrel érvényre juthat.
- 11.** Az egyes szőrszálak genotipizálásakor a kis kópiaszámú minták esetén megfigyelt számos (16,8%), az egyed valós genetikai profiljától eltérő mintázat a jelenleg nemzetközileg alkalmazott, 10 lokuszos kutya kit (StockMarks® for Dogs Canine Genotyping Kit, Applied Biosystems) körültekintő használatára hívja fel a figyelmet.

A kutatási témában megjelent szakkikkek

Zenke P., Egyed B., Zöldág L., Pádár Zs.: Population genetic study in Hungarian canine populations using forensically informative STR loci.
Forensic Science International: Genetics (2010) doi:10.1016/j.fsigen.2010.03.013.

Zenke P., Maróti-Agóts Á., Zöldág L., Pádár Zs.: Characterization of the WILMS-TF microsatellite marker in Hungarian dog populations.
Acta Biologica Hungarica (2009) 60(3):329-32

Zenke P., Egyed B., Szabolcsi Z., Zöldág L., Pádár Zs.: Assessing the frequency of somatic mutation from single dog hairs – Forensic testing of StockMarks Canine I Ver3 kit.
Forensic Science International: Genetics Supplement Series (2008) 1:633-4

Zenke P., Maróti-Agóts Á., Pádár Zs., Gáspárdi A., Komlós I., Zöldág L.: Adatok a kutyaállományok beltenyésztettségének értékeléséhez.
Magyar Állatorvosok Lapja (2007) 8:484-9

Zenke P., Pádár Zs., Zöldág L.: Molekuláris genetika és kutyatenyésztés.
Magyar Állatorvosok Lapja (2006) 9:544-50

Pádár Zs., **Zenke P.**, Egyed B., Ósz K., Kontadakis K., Zöldág L., Fekete S.: STR-Analyse bei Hunden - Forensische Anwendung und Erfahrungen.
Rechtsmedizin (2004) 4:342

A kutatási témában tartott előadások és poszterek

Zenke P., Pádár Zs., Egyed B., Zöldág L.: STR multiplexes for genotyping low amount of highly degraded canine DNA.
Poszter bemutatva: 23rd Congress of the International Society for Forensic Genetics, Ancona, 2008. 05. 27-30.

Zenke P., Leposa T., Pádár Zs., Zöldág L.: Egyedazonosítás és származásellenőrzés hiperpolimorf mikroszatellita markerrel kutyában.
Előadás: I. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok, Gödöllő, 2008. április 11-12.

Zenke P., Egyed B., Szabolcsi Z., Zöldág L., Pádár Zs.: Assessing the frequency of somatic mutation from single dog hairs – Forensic testing of StockMarks Canine I Ver3 kit.
Poszter bemutatva: 22nd Congress of the International Society for Forensic Genetics, Kopenhága, 2007. 08. 22-25.

Pádár Zs., **Zenke P.**, Egyed B., Ósz K., Kontadakis K., Zöldág L., Fekete S.: STR-Analyse bei hunden forensische anwendung und erfahrungen.
Poszter bemutatva: 83. Jahrestagung der Deutschen Gessellschaft für Rechtsmedizin, Göttingen, 2004. 09. 22-25.

Pádár Zs., **Zenke P.**, Egyed B., Ósz K., Kontadakis K., Zöldág L., Fekete S.: Experience in the application of commercially available canine-STR kit in Hungarian forensic practice.
Poszter bemutatva: 82. Jahrestagung der Deutschen Gessellschaft für Rechtsmedizin, Münster, 2003. 09. 22-25.

Pádár Zs., Egyed B., **Zenke P.**, Ósz K., Zöldág L., Fekete S.: Genetikai polimorfizmusok alkalmazhatósága kriminálkynológiai esetekben – STR-vizsgálatok magyarországi kutyapopulációban.
Előadás: V. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, 2003. 04. 13-15.

Egyéb közlemény referált lapban

Szabolcsi Z., Egyed B., **Zenke P.**, Padar Zs., Zöldág L., Búzás Zs., Raskó I., Orosz L.:
Genetic identification of red deer using autosomal STR markers.
Forensic Science International: Genetics Supplement Series (2008) 1:623-624

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Prof. Dr. Zöldág Lászlónak, az Állattenyésztési és Genetikai Osztály vezetőjének, hogy munkám során szakmailag és emberileg mindvégig támogatott, és tudományos eredményeim közlésében segítően közreműködött.

Köszönöm Prof. Dr. Szabó Józsefnek és Dr. Hullár Istvánnak, a SZIE ÁOTK Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet volt és jelenlegi vezetőjének, hogy kutatásaimat az Állatorvos Tudományi Kar berkein belül lehetővé tették.

Köszönöm Dr. Pádár Zsoltnak, a BSzKI Hemogenetikai Szakértői Osztály vezetőjének, hogy figyelmemet az igazságügyi állatgenetika fontosságára irányította, ösztönzött kutatásaim megkezdésére, szakmai tanácsaival tudományos eredményeim elérésében és közlésében segítően közreműködött.

Dr. Egyed Balázs pontos és gyakorlatias válaszai rengeteget segítettek a vizsgálatok során fölmerült valamennyi elméleti- és technikai kérdés megoldásában, publikációim megírása során értékes tanácsokkal látott el.

Köszönöm Woller Jánosnak az allénevezéktan kialakításában, Szabolcsi Zoltánnak a klónozásban és Dr. Szentgyörgyi Viktornak a statisztikai analízisek kivitelezésében nyújtott segítségét.

Köszönöm volt és jelenlegi kollégáimnak, Rajnai Katalinnak, Gujdi Krisztinának, dr. Maróti-Agóts Ákosnak és Üvegesné Nagy Juditnak a technikai közreműködést.

Köszönöm Dr. Veresegyházi Tamás és Dr. Füredi Sándor opponens uraknak, hogy munkám gondos áttanulmányozásával, kritikus meglátásaikkal és építő javaslataikkal segítették a dolgozat végső formájának kialakítását.

Végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, hogy szeretetteljes hozzáállásukkal mindig és mindenben támogattak és mellettem álltak.