Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

# Mikroszatellita-polimorfizmusok vizsgálata kutya eredetű anyagmaradványokból

PhD értekezés

Zenke Petra

2010

Témavezető:

……

Prof. Dr. Zöldág László DSc

SZIE, Állatorvos-tudományi Kar

Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet,

Állattenyésztési és Genetikai Osztály

Készült 8 példányban. Ez a n. …. sz. példány.

……..

Zenke Petra

TARTALOMJEGYZÉK……3
IDEGEN SZAVAK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE..... 5
1 ÖSSZEFOGLALÁS..... 7
2 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS..... 9
2.1 Rövid mikroszatellita multiplex .....10
2.2 Genotipizálás .....10
2.3 Populáció-statisztikai vizsgálat.....10
2.4 Kimutatási érzékenység .....11
2.5 Eseti alkalmazás .....11
2.6 Alkalmazási korlátok, mutációs lehetőségek .....11
3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....12
3.1 Degradált biológiai anyagmaradványok .....12
3.2 DNS alapú vizsgálatok .....13
3.2.1 Mikroszatellita markerek.....13
3.2.2 Szőrképletek genetikai vizsgálata.....14
3.2.3 STR tipizálás során fellépő anomáliák.....16
3.2.4 Az eltérések genetikai alapjai .....16
3.2.5 Szomatikus mutáció vizsgálata szőrben .....17
3.2.6 A Canine Genome Project.....18
3.2.7 Alkalmazott kutyagenetika.....19
3.2.7.1 Individualizáció .....20
3.2.7.2 Kriminalisztikai célú egyedazonostás.....20
3.2.7.3 Leszármazás vizsgálata .....21
3.2.7.4 Állományfelmérés.....22
4 ANYAG ÉS MÓDSZER .....23
4.1 Rövid STR alapú vizsgálatok .....23
4.1.1 *Canine* specifikus lokuszok kiválasztása .....23
4.1.2 Primerek tervezése .....24
4.1.3 Célfragmensek monoplex felsokszorozása – a markerek polimorfizmusának felmérése.....24
4.1.4 Genotípus-meghatározás.....25
4.1.4.1 Fragmensek elválasztása, meghatározása, szelektálása .....25
4.1.4.2 A kiválasztott fragmensek szekvencia-analízise .....25
4.1.4.3 Allélétrák készítése.....27
4.1.5 Populációgenetikai statisztikai analízisek .....28
4.1.5.1 Populációgenetikai alapértékek .....28
4.1.5.2 Hardy-Weinberg egyensúly (HWE) meghatározása.....29
4.1.5.3 Linkage disequilibrium (LD) meghatározása.....29
4.1.5.4 Tesztsorozatok, Bonferroni-eljárás .....30
4.1.6 Multiplex rendszerek létrehozása .....30
4.1.7 A módszer érzékenyítése.....31
4.1.8 Eseti alkalmazás .....32
4.1.8.1 Leszármazás vizsgálata .....32
4.1.8.2 Degradált minta azonosítása .....32
4.2 Szomatikus mutáció vizsgálata .....33
4.2.1 Szőrminták gyűjtése és csoportosítás .....33
4.2.2 DNS kivonása, a vizsgálandó szakaszok multiplex sokszorosítása és genotipizálása .....34
4.2.3 Ellenőrző PCR vizsgálatok .....35
4.2.4 Statisztikai elemzés.....35

5 EREDMÉNYEK ..... 36
5.1 Rövid mikroszatellita markerek és polimorfizmusuk vizsgálata ..... 36
5.2 Genotipizálás ..... 36
5.2.1 A kiválasztott fragmensek szekvencia-analízise ..... 37
5.2.2 Alléllétrák készítése ..... 37
5.2.3 Multiplex PCR vizsgálórendszer ..... 38
5.2.4 Félautomata kiértékelés ..... 39
5.2.5 Lokuszok jellemzése ..... 39
5.2.5.1 Egyszerű ismétlődéseket tartalmazó lokuszok ..... 41
5.2.5.2 Összetett ismétlődéseket tartalmazó lokuszok ..... 41
5.3 Statisztikai ellenőrzés ..... 42
5.3.1 Allélgyakoriság, populációgenetikai alapértékek ..... 43
5.3.2 Genetikai egyensúly ..... 44
5.4 Érzékenység ..... 44
5.5 Eseti alkalmazás ..... 45
5.5.1 Tenyésztői megkeresés (alomellenőrzés) ..... 45
5.5.2 Hatósági eljárás (rongálással okozott kár) ..... 46
5.6 Mutáció lehetősége ..... 47
5.6.1 Szőrszálak csoportosítása fejlődési fázisuk alapján ..... 47
5.6.2 Genotipizálás eredményessége ..... 48
5.6.2.1 Teljes genetikai profil ..... 48
5.6.2.2 Eltérő genetikai profil ..... 49
5.6.3 Ismételt vizsgálatok ..... 52
6 MEGVITATÁS ..... 53
6.1 Az új, rövid markerek meghatározása és leírása ..... 53
6.2 A multiplexek technikai jellemzői, genetikai profil meghatározása, érzékenység ..... 54
6.3 Statisztikai jellemzők ..... 55
6.4 Gyakorlati alkalmazások ..... 57
6.5 Alkalmazási korlátok ..... 57
6.5.1 Szőrfejlődési fázisok meghatározása ..... 58
6.5.2 DNS kivonási technikák összehasonlítása ..... 58
6.5.3 Különböző testrészekről gyűjtött szőrszálak analízise ..... 59
6.5.4 A valós genetikai profiltól eltérő genotípusok detektálása ..... 59
6.5.5 Szomatikus mutáció előfordulása kutyaszőrben ..... 59
7 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ..... 61
7.1 Rövid mikroszatellita multiplexek tervezése ..... 61
7.2 Genotipizálás ..... 61
7.3 Populációgenetikai alkalmazás ..... 61
7.4 Kimutatási érzékenység ..... 62
7.5 Gyakorlati alkalmazhatóság ..... 62
7.6 Alkalmazási korlátok meghatározása ..... 62
8 IRODALOM ..... 63
9 A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI ..... 76
10 MELLÉKLETEK ..... 79
11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ..... 100

## IDEGEN SZAVAK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | |
|---|---|
| amplifikálás | DNS szakasz PCR alapú felsokszorozása |
| amplikon | PCR technikával sokszorosított DNS szakasz (termék) |
| bp | bázispár |
| CFA | Canis familiaris autoszóma |
| deléció | kiesés |
| EM | Expectation-Maximization algoritmus |
| FH | Fred Hutchinson (Cancer Research Center) |
| flanking régió | határoló szakasz (itt a mikroszatellita marker ismétlődő szekvenciáját közrefogó rész) |
| fluorofór | fény kibocsájtásért felelős molekula(rész) |
| haplotípus | kapcsolt szekvenciák és gének együttesen öröklődő csoportja |
| $H_{exp}$ | Expected Heterozigosity - becsült heterozigozitás |
| $H_{obs}$ | Observed Heterozigosity - megfigyelt heterozigozitás |
| HWE | Hardy-Weinberg egyensúly |
| kb | kilobázis |
| LCN | Low Copy Number – kis kópiaszámú (DNS-minta) |
| LE | Linkage Equilibrium – kapcsoltsági egyensúly |
| LD | Linkage Disequilibrium – kapcsoltsági egyensúlytalanság |
| miniplex | olyan multiplex PCR vizsgálórendszer, mely rossz minőségű (töredezett), kis kópiaszámú DNS vizsgálatát teszi lehetővé több rövid STR lokusz egyidejű vizsgálatával |
| monoplex | monoplex PCR vizsgálórendszer, mely egy lokusz egyidejű vizsgálatát teszi lehetővé úgy, hogy a reakció-elegyben egyetlen primer-párt alkalmaz |
| MPI, MPII | Miniplex vagy Multiplex vizsgálórendszerek |
| multiplex | multiplex PCR vizsgálórendszer, mely a több lokusz egyidejű vizsgálatát teszi lehetővé úgy, hogy a felhasznált primer-párokat egyetlen reakció-elegyben alkalmazza |
| mtDNS | mitokondriális DNS |
| n | allélek (kromoszómák) száma |
| N | egyedek száma |
| oligo | másnéven oligomer, a biokémiában olyan rövid, egyszálú DNS-darabokat jelent, melyek a DNS-hibridizációs eljárásokban általánosan elterjedtek (pl. primer) |
| PAGE | poliakrilamidgél-elektroforézis |
| PCR | Polymerase Chain Reaction – polimeráz láncreakció |

| | |
|---|---|
| PD | Power of Discrimination – (igazságügyi) megkülönböztető erő |
| PE | Power of Exclusion - (igazságügyi) szülőségi kizáró erő |
| PEZ | Perkin Elmer Zoogene |
| PIC | Polymorphic Information Content – polimorfizmus információ tartalom |
| PMA | Premia Media Advertising |
| primer | PCR technikában használatos, kb. 20 bp méretű oligonukleotid szakasz, mely komplementer DNS-szekvenciája révén kijelöli a sokszorosítani kívánt markert |
| reamplifikálás | DNS szakasz ismételt sokszorozása PCR technikával |
| REN | renális, vesespecifikus |
| repeat | ismétlődő szekvencia egység a DNS-ben |
| RFLP | Restriction Fragment Length Polymorphism – restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus |
| RFU | Relative Fluorescent Unit – relatív fluoreszcencia egység |
| SE | Standard Error – standard hiba |
| SINE | Short Interspersed Nuclear Element – rövid közbeékelt nukleáris rész |
| SNP | Single Nucleotid Polymorphism – egy nukleotidos polimorfizmus |
| SRY | Sex determining Region on Y-chromosome – Y-kromoszómán elhelyezkedő ivart meghatározó szakasz |
| stepwise | lépésenkénti |
| STR | Short Tandem Repeat – rövid tandemszerű ismétlődés |
| templát | (itt) PCR technikánál a reakcióba bevitt kiindulási DNS, mely mintaként szolgál a sokszorosítás folyamán |
| VNTR | Variable Number of Tandem Repeat – változó számú tandemszerű ismétlődés |
| vWF.X | von Willebrandt faktor X-hez kötött változata |
| WILMS-TF | Wilms-féle tumorfaktor |

# 1 ÖSSZEFOGLALÁS

A kutyák mikroszatellita (STR) alapú polimorfizmus-vizsgálata tenyésztési (leszármazási) vagy igazságügyi (egyedazonossági) célból az utóbbi időkben egyre inkább elterjedt. Az eseti minták nagy része azonban a forgalomban lévő „kutya kit”-ekkel vizsgálva csak részben, illetve egyáltalán nem értékelhető genetikai profilt eredményez. A fiziológiás állapotukat vesztett, bomlásnak indult vagy már bomlott anyagmaradványokban a fizikailag hosszabb lokuszok nagyobb valószínűséggel károsodnak, így a töredezett DNS vizsgálata során a nagyobb méretű (kb. 300 bázispárt meghaladó) szakaszok amplifikálása PCR technikával sokszor ellehetetlenül. Vizsgálatom olyan újabb mikroszatellitákra irányult, amelyek e problémát kiküszöbölendő, megfelelő változatossággal valamint kellően rövid mérettel rendelkeznek.

Munkám során öt mikroszatellita marker (PEZ19, PEZ16, REN124, WILMS-TF, FH2584) – amelyek hossza az új primerek tervezésével nem haladja meg a 200 bázispárt – , valamint két, eredendően rövid (PEZ21, vWF.X) marker polimorfizmusát mértem fel 75 fajtába tartozó, 116 egymástól genetikailag független kutya mintáján. A PCR technikával sokszorozott, fluoreszcensen jelölt termékek elválasztását és méretének meghatározását kapilláris elektroforézissel végeztem. Az adott allélek szekvencia analízisével meghatároztam szerkezetüket, és az ismétlődő egységek alapján nemzetközi összehasonlításra is alkalmas allélnevezéktant alakítottam ki. A szekvenálással igazolt méretű referencia allélekből összeállított alléllétrákkal és az alkalmazott kutya markerekre megírt Genotyper 2.5.2 szoftver használatával lehetővé tettem az allélek félautomata kiértékelését (genotipizálását). Az allélgyakorisági adatok alapján statisztikai analízist végeztem, meghatározva az egyes lokuszok heterozigozitását ($H_{exp}$, $H_{obs}$), a megkülönböztetési megbízhatóságot (PD), az apasági kizárás megbízhatóságát (PE) és a polimorfizmus információs tartalmat (PIC).

A vizsgált hét STR lokusz-készletet kiegészítettem a már korábban leírt PEZ1, PEZ3, PEZ5, FH2054 markerrel valamint az SRY lokusszal, és az összesen 12 markert két miniplex reakcióként állítottam össze. A két vizsgálórendszert kis mennyiségű DNS mintákra érzékenyítettem, amelynek eredményeként alkalmasnak bizonyultak akár 0,1 ng össz-DNS tartalmú, degradált minta genetikai profiljának meghatározására. A két miniplex rendszer gyakorlati alkalmazhatóságát bűnügyi helyszínről biztosított szőrminta azonosításán, valamint kérdéses leszármazás eldöntése kapcsán igazoltam.

Mivel az eseti minták nagy része szőrszálakra korlátozódik – a kutyák közkedveltségéből és széles körű tartásából adódóan –, háttérvizsgálatként teszteltem, milyen sikerességgel generálható egyetlen szőrszálból az adott egyed valós genetikai profilja.

A szomatikus mutáció megléte kutyaszőrben is igazolt, de előfordulási gyakorisága valamint a genotipizálás során fellépő, az eredetitől eltérő DNS-mintázatok megjelenésére vonatkozó adatok nem állnak rendelkezésre.

A bullmasztiff fajtájú donortól biztosított, összesen 600, különböző testrészekről kitépett szőrszálak gyökérhüvelyi részének fénymikroszkópos ellenőrzése alapján az eltérő növekedési fázisban lévő szőrképleteket három kategóriába soroltam (anagén, katagén, késői katagén). A levágott szőrhagymákból három különböző preparálási eljárással teszteltem az alacsony kópiaszámú DNS izolálására alkalmas technikákat. A StockMarks® Dog Genotyping Kit segítségével 10 STR lokusz (PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ5, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8, FHC2079) együttes sokszorozását végeztem el, az elektroforézishez és a genotípus meghatározásához ABIPrism 310 Genetic Analyzer készüléket, Genescan 3.1 és Genotyper 2.5.2. szoftvereket használtam.

A teljes genetikai profilt adó szőrszálakból meghatároztam az egyed valós genotípusától eltérő – allélkiesést, erőteljes kiegyensúlyozatlanságot mutató vagy extra-alléles – DNS-mintázatokat. Az adott lokuszokon megfigyelt eltéréseket monoplex és/vagy új multiplex vizsgálatokkal ellenőriztem, amelynek eredményeként a szőrminták többségében az egyed valós genotípusa volt kimutatható. Egy esetben az ismételt analízisek ellenére is eltérő allélmintázatot mutattam ki, amelynek következtében igazolhatóvá vált, hogy a vizsgált egyed szomatikusan mozaikos.

Megfigyeléseim összességében a szőrszálak DNS-vizsgálatán alapuló egyedazonosítás nehézségeire hívják fel a figyelmet. Az alacsony kópiaszámú minták analízisekor a felerősödő technikai egyenetlenségek hibás genetikai profil meghatározásához vezethetnek, és tized-ezrelékes nagyságrendű gyakorisággal szomatikus mutációk is előfordulhatnak. A tényleges genotípus meghatározása érdekében – ha lehetőség van rá – ajánlatos az ellenőrző mono- vagy multiplex PCR vizsgálatok elvégzése.

## 2 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Az élő szervezetből kikerült, illetve elkülönített biológiai minták természetszerűleg olyan kisebb-nagyobb mértékű roncsolódást szenvednek el, 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) sokszorozása 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 (Pfeiffer és mtsai, 2004). Vizsgálatom ezért olyan újabb polimorf mikroszatelliták alkalmazásba történő bevonására irányult, amelyek mérete a sokszorosításuk után sem haladja meg a 200 bázispárnyi hosszúságot. A rövidebb DNS szakaszok a töredezett DNS-ből nagyobb valószínűséggel mutathatók ki, ami a sikeres vizsgálatok arányát jelentős mértékben megnövelheti.

A testi sejtek DNS szekvenciájában bekövetkező permanens változás (szomatikus mutáció) és a kimérizmus hatására azonban különböző allélikus formák jöhetnek létre az azonos lokuszokon, amelynek feltételezett bekövetkezésével számolni kell az egyedi azonosság, illetve különbözőség, valamint a leszármazás megállapításának statisztikai értékelésekor. A magas mitotikus aktivitásnak köszönhetően a szomatikus mutáció bekövetkezésének lehetősége – a csontvelő mellett – a kültakaró sejtjeiben a legvalószínűbb (Linch, 2001). Mivel az eseti minták többségét szőrszálak teszik ki, a genetikai elváltozások gyakoriságának felmérése érdemi tényező az eredmények interpretálásában. Tenyésztői szempontból az alom leszármazásának genetikai vizsgálatára legegyszerűbben szőrmintát lehet biztosítani, ugyanakkor a választás előtti kiskutyáknál a levett szájnyálkahártya-törletben még az anya hámsejtjei is megjelenhetnek, amelynek következtében téves vagy kevert DNS-profil határozható meg. Kriminalisztikiai szempontból a kutyák, mint átvihető, azonosítható mikronyomok leképzői, kedveltségük és nagy számuk miatt a bűnüldözési gyakorlatban is egyre nagyobb jelentősséggel bírnak. Napjainkban több olyan súlyos bűncselekmény felderítése van folyamatban, amelyekben kutyaszőrök szolgálhatnának helyszínek és személyek kapcsolatának igazolására.

## 2.1 Rövid mikroszatellita multiplex

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, valószínűsíthetően változatos STR markerek polimorfizmusának felmérése szükséges, amelyeknél új primerpárok tervezésével a sokszorozandó szakaszok hosszának minél nagyobb mértékű rövidítése érhető el. A polimorfizmus-fok és az allélméret mellett a lokuszok szerkezete szintén lényeges szempontként merült fel, mivel a di-, illetve trimer ismétlődő egységekből álló mikroszatelliták genotípus meghatározása több szempontból is problémás (Walsh, 1996). Ezt kiküszöbölendő, tetramer vagy ennél több bázispár (penta-, hexamer) ismétlődésből felépülő STR lokusz kiválasztását céloztam meg.

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

## 2.2 Genotipizálás

További célom volt a kiválasztott STR lokuszok segítségével a vizsgált magyarországi kutyák genetikai profil alapján történő egyedazonosságának megállapítása, amelyhez nélkülözhetetlen a megfigyelt alléltípusok meghatározása, a genotipizálás. Mivel a precíz allélmeghatározáshoz az allélek méretbeli eltérése önmagában nem elégséges, a méret alapján elkülönülő csoportokból egy-, összetett szerkezetű lokuszok esetén több allél bázissorrendjét kell meghatározni. Az így nyert szekvencia-adatok segítségével megállapítható a mikroszatelliták szerkezete, valamint a repetíciós (ismétlődő DNS-motívum) számuk alapján kialakítható a nemzetközi összehasonlításra is alkalmas allélnevezéktan. A szekvenálással igazolt méretű, referenciaallélekből összeállított alléllétrákkal lehetővé válik az esetleges interallélek pontos meghatározása is, amelyek segítségével és a megfelelő genotipizáló szoftver kialakításával a DNS-profilok félautomata módon kiértékelhetők.

## 2.3 Populáció-statisztikai vizsgálat

Olyan csoporton kívántam felmérni a mikroszatelliták allélgyakorisági értékeit, amely minél több fajtából áll és lehetőség szerint tükrözi a magyarországi kutyák genetikai összetételét.

Statisztikai analízissel a multiplex rendszerekben alkalmazott lokuszok felhasználhatóságát, illetve korlátait terveztem jellemezni, meghatározva azok heterozigozitását ($H_{exp}$, $H_{obs}$), megkülönböztetési erélyét (PD), apasági kizárás erélyét (PE) és a polimorfizmus információs tartalmát (PIC). A Hardy-Weinberg és *linkage* egyensúlyi teszteléssel választ vártam arra a kérdésre, hogy a vizsgált kutyapopulációban van-e jelentős mértékű allélikus kapcsoltság a lokuszok között, illetve a lokuszokon belül.

## 2.4 Kimutatási érzékenység

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.

## 2.5 Eseti alkalmazás

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

## 2.6 Alkalmazási korlátok, mutációs lehetőségek

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 testrészeiről gyűjtött, a környezet (UV, vegyszerek, stb.) mutagén hatásainak leginkább kitett, nagyszámú szőrmintájának vizsgálatát terveztem. Mikroszkópos vizsgálattal elkülönített, eltérő fejlődési fázisokba sorolt szőrképletek egyedi vizsgálatával kívántam megbecsülni, milyen várható sikerességgel lehet teljes DNS-profilt 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. Célom volt egyúttal azt is felmérni, mekkora a szomatikus mutáció előfordulásának gyakorisága az azonos egyedből gyűjtött szőrszálak vizsgálata során.

# 3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 3.1 Degradált biológiai anyagmaradványok

A biológiai anyagok a szervezetből kikerülve elveszítik fiziológiás környezetüket és a különböző jellegű, mértékű környezeti hatások az anyagmaradványokat – szövettípusuktól függően gyorsabban vagy lassabban, de mindenképpen - károsítják. Az összetett külső (nedvesség, hőmérséklet, ultraibolya sugárzás, mikrobiális háttér, stb.) és belső (endogén nukleázok) befolyásoló tényezők hatására a minta eredeti DNS tartalma csökken, romlik az állapota és szekvenciájában is változások következhetnek be (depurinálódás). Ezen folyamatok eredménye, hogy a DNS-lánc random töréseket szenved el és hosszabb-rövidebb (kb. 100-500 bp) fragmensekre darabolódik. A szerves molekulák bomlási folyamataira ható körülmények, például a magasabb hőmérséklet és nedvességi szint a minta azonosíthatóságát kedvezőtlenül befolyásolják. Az elhaló biológiai szövetek még optimális megtartási körülmények között is autolízisen mennek keresztül, amelynek következtében molekuláris szerkezetük roncsolódik. Az elhalt biológiai szövet típusától függően eltérő időintervallumban mutatható ki a még analizálható mennyiségű DNS (Bär és mtsai, 1988), amely az eredeti állapothoz képest korlátozott vizsgálati sikerességgel bír.

Mivel minden analitikai vizsgálatot jellemez egy vizsgálhatósági minimum érték, a bomlás mértéke (konzerváló tényezők nélkül akár rövid idő alatt is) a minta vizsgálhatóságának ellehetetlenüléséhez vezethet. Az eredendően csekély, adott esetben csak néhány tucat sejtet tartalmazó biológiai anyagok – pl. hullott szőrszálak – károsodása azonos degradációs ráta mellett hamarabb eredményezi a minimum érték elérését a nagy kópiaszámú szövetekhez képest.

A környezeti károsító hatások és az autolízis eredményeképpen tehát a biológiai anyagmaradványok – esetenként eredendően is kevés – DNS tartalma tovább csökkenhet. E két folyamat hatása korlátozza a megfelelő hosszúságú, épen maradt genetikai anyag mennyiségét, azaz a PCR- (Polymerase Chain Reaction) sokszorozás sikerességét. Az ilyen, eseti gyakorlatban gyakran előforduló minták PCR-technikán alapuló sikeres vizsgálata csak a kellőképpen rövid – kb. százötven bázispár – méreten belül is polimorf, sok-kópiás markerekkel (Balogh és mtsai, 2003) vagy a sokszorozandó szakaszok (*amplikon*ok) méretének csökkentésével növelhető (Butler és mtsai, 2003, Chung és mtsai, 2004, Asamura és mtsai, 2007, Schmid és mtsai, 2008, Wurmb-Schwark és mtsai, 2009).

## 3.2 DNS alapú vizsgálatok

Minden egyes élőlény genetikai anyagában az azt egyedivé tevő, sajátságos „DNS-aláírás” rejtőzik, amely megfelelő technikákkal kimutatható, azonosítható. A rohamosan fejlődő molekuláris genetikai módszerek a genom specifikus szakaszainak – ún. markerek, lokuszok – közvetlen vizsgálatát teszik lehetővé. A kezdeti DNS vizsgálatoknál, mint az ezredforduló előtt széles körben használt, több lokuszos RFLP (restrikciós fragmenthossz polimorfizmus) eljárás alkalmazásánál még számos korlátozó tényezőt kellett figyelembe venni. A mikrogrammnyi mennyiségű, jó állapotú DNS-igény, az eredmények minősége, esetleges pontatlansága és a laboratóriumok közötti összehasonlíthatatlanság korlátozta a módszer előnyeit. Bár ezek a polimorf régiók informatív megkülönböztetési képességgel bírtak, és leszármazási vizsgálatoknál igen sikeresnek bizonyultak, a kapott mintázatok rendkívül bonyolult statisztikai interpretációja, valamint a technikai egyenetlenségekből fakadó hibridizációs hibák háttérbe szorították az eljárást.

1985-ben a PCR technika megvalósításával kiszélesedett a sikeresen vizsgálható minták spektruma. Az RFLP eljáráshoz képest 3-4 nagyságrenddel kevesebb kiindulási DNS (*templát*) koncentráció bevitele sikeres vizsgálatok elvégzését tette lehetővé, akár töredezett genetikai anyagból is. A reakció előnye továbbá az RFLP-hez képest, hogy a PCR-termékek diszkrét tulajdonságokként határozhatók meg, és egyidejűleg akár több tucat marker is sokszorosítható. Specifikus primerek használatával a különböző eredetű, keveredett biológiai minták analízise eredményesebbé vált. Megfelelő primertervezéssel és a multifluoreszcens technika segítségével olyan multiplex PCR-kiteket fejlesztettek ki, amelyek alkalmazásával egyetlen vizsgálattal kivitelezhetővé vált az egyedi szintű azonosítás állatokban is (Applied Biosystems, 2001).

A VNTR-ek (Variable Number of Tandem Repeats) PCR alapú vizsgálatát 1989-ben vezették be. A VNTR-ek ismétlődő szakaszai 15-70 bp hosszúak voltak, ezért LTRs (Large Tandem Repeats) néven váltak ismertté (Kasai és mtsai, 1990). Ezeknek a viszonylag hosszú fragmenseknek azonban korlátozott a sokszorozhatósága, degradált minták vizsgálatánál pedig jelentősen csökken tipizálhatóságuk sikeressége.

### 3.2.1 Mikroszatellita markerek

A DNS-molekula köztudottan számos olyan, nem átíródó régióval rendelkezik, amely több-kevesebb nukleotid különböző számú ismétlődéséből – repetíciójából – áll (Edwards és mtsai, 1991). A kutya genetikai anyagában éppúgy, mint más eukarióta genomban nagyon sok ilyen ismétlődő szakasz található, amelyeket szatellit-DNS-nek neveznek. A

kromoszómák centromerjei körül helyezkednek el, méretük meghaladhatja az 1000 bázispár hosszúságot. A repetitív szekvencia rövidülése folytán kialakult, közepesen hosszú miniszatelliteket VNTR-nek is nevezik, néhány tucatszor ismétlődő egységei 10-100 bp hosszúak. Az ennél rövidebb ismétlődésekből felépülő mikroszatelliták az STR-ek (Short Tandem Repeat) vagy más néven az SSR-ek (Simple Sequence Repeat).

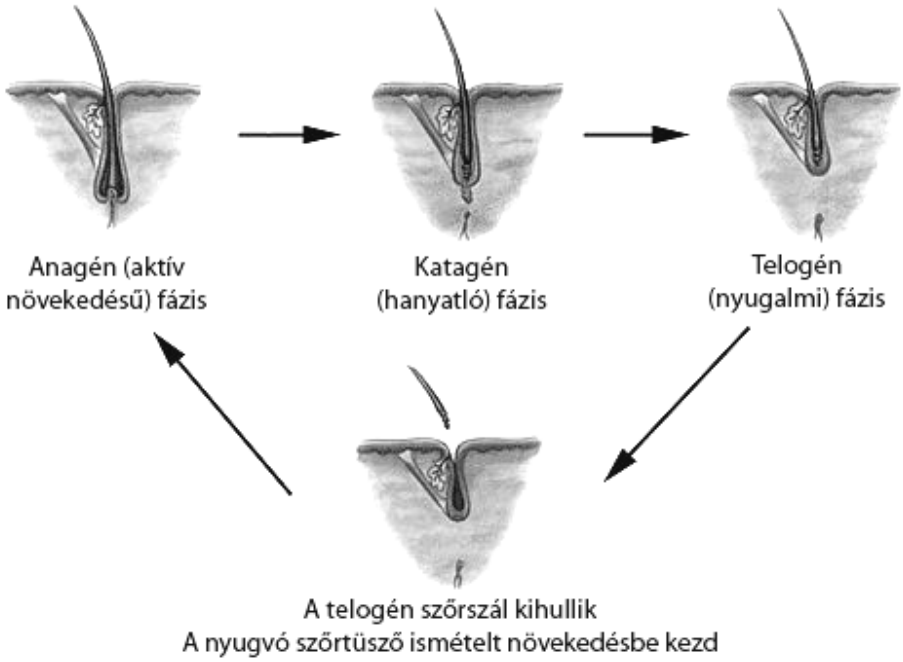
Az STR mikroszatelliták olyan 80-350 bp mérettartományú régiók, amelyekben 2-6 bázispárból álló rövid szakaszok tandemszerűen ismétlődnek egymás után (Weber és mtsa, 1989). Az ismétlődések száma 2-50 kópiaszámban figyelhető meg, és mivel ez a szám az egyes egyedek között nagy változatosságot mutat, valamint kodominánsan öröklődik, alkalmazhatóak genetikai egyedazonosítási célokra (Butler, 2005). A nem kódoló régiókon kívül intronok részeként, génekben is megtalálhatók, így marker alapú szelekcióra (MAS, Marker Assisted Selection) és egyes tulajdonságok illetve betegségek közvetett diagnózisára is alkalmasak.

Az ismétlődések hossza alapján di-, tri-, tetra-, penta- és hexamer egységeket különböztetünk meg, amelyekből különböző struktúrájú allélek épülhetnek fel. Az egyszerű szerkezetű mikroszatelliták azonos hosszúságú és szekvenciájú egységekből, míg az összetettek két vagy több, különböző, egymással szomszédos, egyszerű ismétlődésekből állnak. A komplex struktúrájú markerekben a különböző, változó hosszúságú, illetve szekvenciájú egységeket változó méretű közbeiktatott szakasz osztja meg. Az STR allélek mérete nemcsak az egységek egész számú többszörösének feleltethető meg, ugyanis mind az ismétlődő, mind pedig a határoló régiókban előfordulhatnak megváltozott nukleotidok, amelyek a mikrovariáns allélek létrejöttéért felelősek (Ellegren, 2004). Ilyen allélvariánsok kialakulása az egy/néhány nukleotidot érintő illetve az ismétlődő egységek számát változtató mutációknak köszönhető (Nadir és mtsai, 1996). Mikroszatelliták esetén a repetíciók számában megfigyelhető polimorfizmus oka az elcsúszott szál helytelen párosodása (*slipped strand mispairing*), míg miniszatellitáknál az egyenlőtlen crossing over következtében létrejövő inzerciók/deléciók, illetve a génkonverzió felelős a nagyobb ismétlődő egységek számának változatosságáért.

### 3.2.2 Szőrképletek genetikai vizsgálata

Két fő részre lehet felosztani egy szőrképletet – élő tövi vége a növekedésért felelős, míg a száli rész elhalt, keratinizálódott sejtekből épül föl (Chatt és mtsa, 1988). Az emlősök szőrtüszői három növekedési fázison mennek keresztül. Az optimális kísérlettervezés szempontjából fontos lehet annak ismerete, hogy a vizsgálandó szőrszál milyen fejlődési stádiumban van, azaz milyen mennyiségű gyökérhüvelyi sejtet tartalmaz.

Fénymikroszkópos megtekintéssel anagén (aktív növekedésű), katagén (hanyatló) és telogén (nyugalmi) fázisok, illetve ezek átmeneti szakaszai különböztethetők meg (**1. ábra**). Az anagén stádiumban lévő szőrhagymákon nagy mennyiségű sejt figyelhető meg, fénymikroszkóppal vizsgálva áttetsző gyökérhüvelyi tok formájában (**F1. ábra**), míg a katagén szőrökre a tok hiánya és kevesebb sejtszám jellemző (Bourguignon és mtsai, 2008). A végső, telogén állapotban csak a szőr alapi részének epitéliális sejtektől mentes germinális dudora látszik, ebben az állapotban történik meg a szőrszálak spontán kihullása.

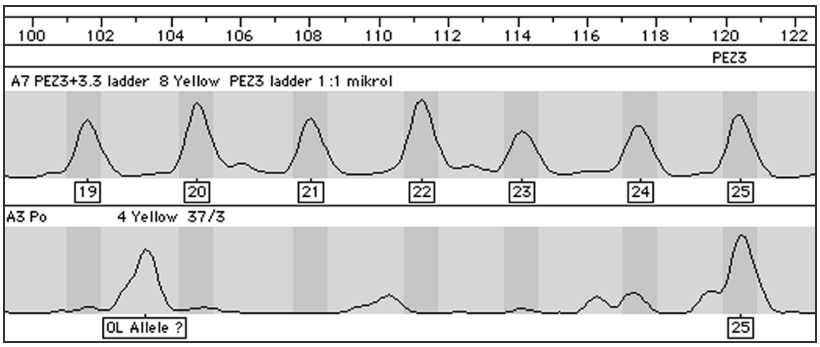



**1. ábra** Szőrszál növekedési ciklusának sematikus ábrázolása
(www.newportskincare.com/images/hairstages.jpg)

A szőrszálak gyökérhüvelyi sejtjeiből végzett nukleáris-DNS alapú, sikeres genotipizálás már régóta ismert és alkalmazott eljárás (Higuchi és mtsai, 1988). Eltérő fejlődési stádiumú szőrök vizsgálatánál azt találták, hogy a szőrhagymával rendelkező anagén/katagén valamint a rátapadt follikuláris sejteket tartalmazó telogén szőrök sejtmagi genotípus meghatározásra egyaránt alkalmasak (Linch és mtsai, 1998). Ugyanakkor a gyökérhüvelyi sejtektől mentes telogén állapotú, illetve tövi résszel nem rendelkező szőrtöredékek esetén általában csak mitokondriális DNS analízissel számíthatunk sikeres eredményre (Wilson és mtsai, 1995a-b).

### 3.2.3 STR tipizálás során fellépő anomáliák

Az autoszómás STR markerek polimeráz láncreakción alapuló sokszorosítása, és a fluoreszcens jelölésű PCR termékek méret szerinti, elektroforézissel történő elválasztása során a heterozigóta lokuszok mindkét alléljánál nagyjából azonos intenzitású jelet figyelhetünk meg (Gill és mtsai, 1997a). A kiegyensúlyozott kimutatási jelerősségtől való eltérést több tényező is eredményezheti, amelyek genetikai és egyéb (pl. PCR technika, DNS minta minősége, degradáltsága) okokra vezethetők vissza (Whitaker és mtsai, 1995). Amennyiben a reakció körülményei optimálisak, és a minta sem bomlott, a megjelenő eltérések a sokszorosítás során keletkező, különböző típusú műtermékek kimutatásának köszönhetők (Walsh és mtsai, 1996, Clark, 1998), és ismételt analízissel kiszűrhetők. A nem specifikus artefaktumok létrejöhetnek a primer szekvenciák véletlenszerű feltapadásával – ún. *„random priming”* –, amelyek könnyen felismerhetők atipikus csúcsmorfológiájukról (Gill és mtsai, 1997a), és általában nem allélikus pozícióban illetve az alléltartományon kívül helyezkednek el (**2. ábra**).

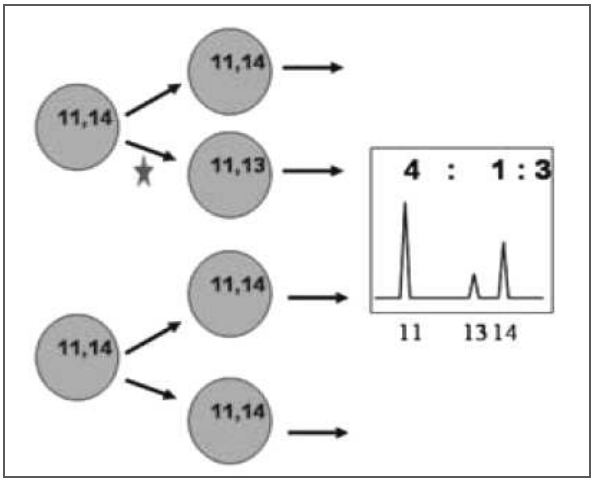



**2. ábra** Alléllétrához (felső sor) viszonyított, nem allélikus pozícióban lévő melléktermék (alsó sor, baloldali csúcs), valamint specifikus PCR termék (alsó sor, jobboldali csúcs)

### 3.2.4 Az eltérések genetikai alapjai

A mikroszatelliták meghatározásakor előfordulhat, hogy lokusz- vagy allélkiesés, illetve két-, három alléles anomáliák figyelhetők meg a DNS mintázatban, melyek sem a fent leírt technikai okokból, sem a minta gyenge minőségéből nem származtathatók. Ilyen esetekben, multiplex rendszerek alkalmazásakor, az aberráció általában csak egy lokuszt érint, és az – alléllétrához viszonyított – extraszignál allélikus helyzetben található. Az aberráns diallélikus jelek egyik formája, amikor a heterozigótának látszó lokusz két allélcsúcsa közt jelentős (> 60%) intenzitásbeli különbség van. Másik formájában, tetramer egységekből álló mikroszatelliták esetén, a homozigótának látszó marker négy bázispárral

kisebb pozíciójában megjelenő minor jel szokatlanul – > 15% – erős (Gill és mtsai, 1997a). Ezen elváltozások genetikai alapjaként a primer-kötő régióban bekövetkező szomatikus mutáció, vagy a sejtosztódás során egy tetramer szerkezetű ismétlődő egység addíciója illetve elvesztése – *stepwise* modell - valószínűsíthető (Brinkmann és mtsai, 1998, Clayton és mtsai, 2004). Az allélek egymáshoz viszonyított jelerőssége alapján kétféle triallélikus mintázat is előfordulhat. Szomatikus mutáció következményeként gyakrabban tapasztalható az allélek egyenlőtlen intenzitása (**3. ábra**), míg a jóval ritkábban megfigyelhető, három, azonos erősségű csúcs az STR lokuszt tartalmazó kromoszómális hely megkettőződésének eredménye (Clayton és mtsai, 2004).




**3. ábra** Szomatikus mutáció létrejöttének sematikus ábrázolása. A mitotikus osztódás során az egyik kiindulási sejt (csillaggal jelölve) mutáción megy keresztül, így a progenitor sejt 14-es allélje elveszít egy tetramer ismétlődést, létrehozva a 13-as mutáns allélt. A négy leánysejt azonos osztódási számát feltételezve, genotipizálás után (jobb oldali ábra) eltérő intenzitású csúcsok jelölik az egyes alléleket (Clayton és mtsai, 2004)

### 3.2.5 Szomatikus mutáció vizsgálata szőrben

Szomatikus mutációnak nevezünk minden olyan maradandó változást a genomiális DNS szekvenciájában, amely csak a testi sejtekben mutatható ki, és a termelődő ivarsejtek genomiális anyagát nem befolyásolja. Az ilyen szekvencia-módosulások csak a mutációt hordozó egyedben jelennek meg, amelynek következtében eltérő geno- vagy kariotípusú sejtvonalak alakulhatnak ki (genetikai mozaik). Mutáció a sejtben bármikor végbemehet, leggyakrabban mégis a DNS replikációja során jön létre. A szomatikus mutáció bekövetkezésének lehetősége a környezeti hatások mellett az egyes szövetféleségek mitotikus aktivitásának függvénye. A szervezetben ilyen szomatikus mutáció a csontvelő mellett a hámszövetben és a növekedési fázisban lévő szőrtüsző sejtekben a legnagyakoribb

(Linch és mtsai, 2001). Szőrképletekből nagyobb eséllyel mutathatók ki a mitózis során bekövetkező genetikai elváltozások, mivel a szőrfejlődés kisszámú progenitor sejt klonális osztódásából indul ki, ezért a mutáns sejtek aránya relatíve feldúsul az adott gyökérhüvelyi sejtek között (Linch és mtsai, 2001). A szomatikus mozaikosság megfigyelésének gyakorisága így kapcsolatban áll a vizsgált lokuszok mutációs rátájával, amit a mikroszatelliták hossza valamint szerkezete befolyásol (Brinkmann és mtsai, 1998).

### 3.2.6 A Canine Genome Project

A kutya genomot az elmúlt 10 év alatt behatóan tanulmányozták, így mára kiterjedt markerkészlet és genomtérképek állnak rendelkezésre (Breen és mtsai, 1999, 2001, 2004, Guyon és mtsai, 2003, Klukowska és mtsai, 2004). Az újabb kutatások a kutya teljes genetikai anyagának bázissorrend meghatározására irányultak (Kirkness és mtsai, 2003, Lindblad-Toh és mtsai, 2005, Ostrander és mtsa, 2005), az első szekvenciaadatok már 2004-ben nyilvánossá váltak a National Human Genome Research Institute (http://research.nhgri.nih.gov/dog_genome/) jóvoltából. A kutya genom feltérképezését elsősorban olyan adatbázis létrehozásának céljából kezdeményezték, amely a kutatók által is világszerte elérhető és nyilvános, emellett az öröklődő betegségek genetikai alapjait illetve markerekkel való kapcsolatát kívánták felmérni (Ostrander és mtsa, 2005). A kiválasztott referenciaegyed – Tasha nevű nőstény boxer – teljes genetikai állományának szekvenciája publikálásra került (Lindblad-Toh és mtsai, 2005). A választás azért esett erre a fajtára, mivel a többi fajtához képest a boxer genomjában tapasztalták a legalacsonyabb variációs rátát. A vizsgálatok igazolták a korai háziasítást és a jelenlegi fajták kialakítása során létrejött kifejezett palacknyak hatást (*bottleneck-effect*) is (Lindblad-Toh és mtsai, 2005). További, kilenc kutyafajtából, négy farkasból és egy prérifarkasból származó minta segítségével olyan markerek meghatározása is folyamatban van, amelyek más kutyafajták betegségeinek kapcsoltsági vizsgálatához biztosítanak alapot. A teljes genomiális bázissorend meghatározásával egyúttal lehetőség nyílik a diagnosztikai jellegű DNS tesztek kifejlesztésére is, amelyek éppúgy segítséget nyújthatnak az állatorvosoknak a gyógyászatban, mint a tenyésztőknek a nemkívánt mutációt hordozó egyedek tenyészállományból való kiszűrésében (Mellersh, 2008).

A diploid kutyagenom 38 pár autoszómája – CFA: Canis Familiaris Autosome – valamint X és Y ivari kromoszómája az egér genomhoz hasonlóan mintegy 2500 megabázisból épül föl. Génjeinek száma kb. 19 ezerre tehető – az emberi 22 ezerrel szemben –, amelyek 70%-ának létezik humán megfelelője, és ezekből 5% teljesen azonos. Az emberi genomnál kb. fél gigabázissal kisebb, konzerválódott szekvenciákat tartalmazó euchromatikus genom kb. 31%-a ismétlődő (repetitív) elemeket tartalmaz, amelyet a

specifikus *repeat*-, retrovirális és transzpozon szekvenciák alacsonyabb száma valamint a SINE (Short Interspersed Nuclear Element) szekvenciák viszonylagos rövidsége jellemez. A kevés transzpozábilis eredetű elem közt megtalálható a Carnivora-specifikus SINEC_Cf család (Kirkness és mtsai, 2003), amely nem fixálódott beépülései polimorf jellegként különülhetnek el. Az egyeden belüli SINEC_Cf heterozigozitás mellett a fajták között tovább bővül ez a variancia (Wang és mtsa, 2005), jelentős mértékben megnövelve ezzel a szelektíven tenyésztett modern kutyafajták genetikai különbözőségét. A két fő populációs palacknyak-hatás következtében (kb. 7-50 ezer generációval ill. 50-100 generációval ezelőtt) jellegzetes genetikai mintázat alakult ki a fajtákon belül és a fajták között egyaránt. Az egy-nukleotidos mutációkat (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) tartalmazó szakaszok egy része szinte teljesen homozigóta, más részük heterozigóta haplotípus blokkokban található. Ez a különbözőség a fajták között sokkal kifejezettebb, mint egy fajtán belül (Lindblad-Toh és mtsai, 2005). A mintegy 10 kilobázisnyi „ősi blokkok” 4-5 jól megkülönböztethető haplotípussal (kapcsolt, együtt öröklődő szekvenciákkal) rendelkeznek, a hosszabb haplotípusok között néhány fajrajellemző is lehet. A nagy, 100 kilobázist meghaladó haplotípusok eloszlása igen változatos lehet az eltérő fajtáknál, ami a genetikai rizikófaktorok fajták közötti megoszlására utal. A jellemzően homozigozitást mutató SNP szakaszok elhelyezkedése az egyedek közötti összehasonlításban eltérő, lehetővé téve így az egyedazonosítási vizsgálatokat. A Canine Genome Project eredményeként bővült az egyedi azonosításra is használt polimorf STR markerek csoportja, amelyek alkalmazása sokszor – pl. kevert minták vizsgálatánál – nem váltható ki az esetlegesen költséghatékonyabb SNP analízissel. Az új, informatív polimorfizmusok (SNP-k, mikroszatelliták) definiálása nagymértékben hozzájárul a különböző fajták rokonsági kapcsoltának feltárásához, és a megfelelő, egyedi szintű azonosításra is alkalmas genetikai markerek kiválasztásához.

### 3.2.7 Alkalmazott kutyagenetika

„Drezdában tudományos alapon próbálják rendezni a *kutyagumiügyet*. A javaslat szerint adatbázist kellene létrehozni, amely a városban élő kutyák genetikai kódjait rögzíti. A kutyától nyálmintát vesznek, s ha közterületen kutyaürüléket találnak, a DNS-teszt alapján könnyen azonosítható a gazdája. A bírság 180-600 euró lenne, egy DNS-teszt költsége 75 euró” (Varga, 2005).

Ez a példa is rámutat arra, hogy számos – esetenként talán furcsának tűnő – kérdés válaszolható meg a molekuláris genetika segítségével. Magyarországon a kutyák száma kb. 2 millióra tehető (PMA), ebből kifolyólag számos területen jelentkezik az igény az adott egyed(ek) illetve a kutya eredetű anyagmaradványok egyedi szintű azonosítására.

#### 3.2.7.1 Individualizáció

A “DNA-fingerprint”, vagyis a vonalkód-szerű mintázattal rendelkező DNS ujjlenyomat tudományos megalapozását Sir Alec Jeffreys és munkatársai az ember illetve kutya vonatkozásában közel egyidőben végezték (Jeffreys és mtsai, 1985, 1987). A kutyagenom mikroszatellitáit kezdetben géntérképezési szempontból humán miniszatellita-próbákkal vizsgálták (Rothuizen és mtsai, 1994, Joseph és mtsa, 1994), a tetranukleotid ismétlések jelenlétét először 1996-ban írták le (Francisco és mtsai, 1996). A térképezési programok és a PCR technika fejlődése rövid időn belül számos mikroszatellita lokusz leírását eredményezte (Neff és mtsai, 1999). A megfelelő szintű polimorfizmust mutató lokuszok a különböző fajtáknál eltérő mértékben nyilvánulnak meg, ami szükségszerűvé teszi a helyi fajtapopulációk vizsgálatát (Zajc és mtsai, 1997, Halverson és mtsai, 1999). A módszer biztosította előnyöket a közelmúltban bűnügyi esetekre és anyagmaradványokra Magyarországon is sikerült kiterjeszteni (Pádár és mtsai, 2001, 2002). A populációs vizsgálatoknak köszönhetően a nem megfelelő fokú polimorfizmust mutató, technikai szempontból problémás lokuszok szelektálásával folyamatosan bővül az olyan tetramer repetíciós STR-eszköztár, amely az egyedi azonosításhoz is megfelelő lehet (Eichmann és mtsai, 2004a, Weller és mtsai, 2006). Ez azonban csak akkor használható megbízhatóan, ha a DNS-profilokat alkotó allélek között nincs számottevő asszociáció (Evett és mtsa, 1998). A jelenleg Magyarországon rendelkezésre álló standardizált és validált genetikai markerekkel a kutyák egyedi azonosítása nem minden esetben érhető el, valamint a fajtapopulációkra vonatkozó STR allélgyakorisági adatbázisok is igen hiányosak (Pádár, 2006).

#### 3.2.7.2 Kriminalisztikai célú egyedazonostás

A genetikai alapú pedigréelemzés mellett egyre fontosabbá válik a kutyáktól származó biológiai anyagok azonosítása bűnügyi esetekben is. Hazánkban évente kb. 5000 kutyaharapást regisztrálnak (átlagosan 13 sérülés naponta), és az utóbbi 10 évben 25 halálos áldozata volt azoknak a kutyatámadásoknak, amelyek – a nemzetközi tapasztalatokhoz hasonlóan – tartási elégtelenségből fakadnak (Siegel és mtsai, 2000, Overall és mtsa, 2001, De Munnynck és mtsa, 2002, Tsuji és mtsai, 2008).

A kutyák kriminalisztikai szerepe eleinte csak közvetlen érintettségük során merült fel (Weiss és mtsai, 1998), de a kutyatámadások mellett az állatviadalok, a kutyák bántalmazása illetve ellopása, valamint a kutyák által okozott közlekedési balesetek, továbbá számos gazdasági károkozás igazolja az egyedi azonosítás igényét. A jelenlegi bűnüldözési gyakorlatban a kutyák, mint az átvihető, azonosítható biológiai nyomok leképzői nyernek egyre fokozódó jelentősséget. A háztartások nagy részében előforduló házi kedvencek

szőrszálai ugyanis a potenciális nyomátvitel következtében, mint közvetlenül egyedhez köthető elemi szálak játszhatnak szerepet a bűnügyek felderítésében és bizonyításában. Az utóbbi években ezért egyre növekvő hazai és nemzetközi igény mutatkozik a kutyák igazságügyi célú vizsgálatára (Pádár, 2006, Halverson és mtsa, 2005a), ami az eddig felderítetlen esetek megőrzött helyszíni mintáinak újravizsgálata kapcsán kiemelkedő jelentősségű lehet. A törvényszéki szakértéssel szemben támasztott magas követelményeknek azonban érvényre kell jutniuk, miszerint a kutyák igazságügyi szempontú azonosítása csak standard és kompatibilis módon, egységesített nevezéktan alapján történhet meg (Hellmann és mtsai, 2003, 2006; Eichmann és mtsai, 2004a-b).

#### 3.2.7.3 Leszármazás vizsgálata

A leszármazás ellenőrzésének igénye a szülő(k) pontos ismeretének hiányában merülhet fel. Mivel csekély mennyiségű biológiai anyagból is nyerhető DNS-profil, az igazságügyi tapasztalatok a tenyésztés során – például nagy értékű származási vonalak és almok ellenőrzése – is hasznosíthatók, így az állítólagos tenyészkan elhullása után annak megőrzött szőrszálai is elegendőek lehetnek a kölykök mikroszatellita vizsgálatokon alapuló, sikeres származásellenőrzésére (Pádár és mtsai, 2001a). Több lehetséges nemző kan esetén a kölykök egyedi leszármazásának egzakt megállapítása éppúgy, mint a mesterséges termékenyítésnél az apaállat csak a genetikai profilok – pl. fajtagyőztes kanok lefagyasztott spermájának DNS-profilja – összehasonlításával igazolható.

A származás biztos meghatározása – ahogy az egyedi azonosításé is – olyan genetikai rendszer használatát igényli, amely nagyfokú polimorfizmussal rendelkezik az adott faj/fajtapopuláció szintjén. Minél nagyobb számú allélváltozat figyelhető meg megfelelő eloszlásban a populációban, annál informatívabb az adott marker. A kutya genom feltérképezésével a DNS-alapú polimorfizmusok (mini- és mikroszatelliták) gyorsan felváltották a kezdeti, vérben található fehérjék változatosságán alapuló biokémiai polimorfizmus vizsgálatokat. Mivel az egyedek genotípusát meghatározó allélek kodominánsan öröklődnek, az egyik szülő – általában az anya – tulajdonságainak ismeretében a szükségszerűen másik szülőtől származó allélek könnyen – kizárásos alapon - levezethetők.

Az első, DNS markereken alapuló származásellenőrzést kutyáknál 1987-ben végezték, a szuka, a kan és a kölyök miniszatellitáinak vizsgálatával kapott „DNS-ujjlenyomatok” összehasonlításával (Jeffreys és mtsa, 1987). Az alkalmazott eljárás azonban nagyon nehezen standardizálható, és az így nyert mintázatok kiértékelése is meglehetősen problematikus, mivel csak az egymás mellett futtatott minták hasonlíthatók össze, és az egyes sávok azonos allélikus eredete is megkérdőjelezhető. Ezen problémák kiküszöbölése

céljából váltottak át a mikroszatelliták vizsgálatán alapuló származásellenőrzésre. Az STR markerek sikeres alkalmazása – a miniszatellitákhoz viszonyított alacsonyabb szintű polimorfizmusuk ellenére – 1994 óta folyamatosan bizonyítja a módszer előnyeit, így lehetőség nyílt egy viszonylag egyszerű, érzékeny, PCR technikán alapuló és automata módon kiértékelhető rendszer létrehozására (Zajc és mtsai, 1994, Binns és mtsai, 1995, Fantin és mtsai, 1996, Pádár és mtsai, 2001).

#### 3.2.7.4 Állományfelmérés

A genetikai felmérés fontos szerepet játszhat a tenyésztés során a szülőpárok rokonsági fokának meghatározásánál, és az egyes fajták, fajtatiszta állományok beltenyésztettségi állapotának megállapításánál. A tenyésztők a párosításokat általában a vérfrissítésre tekintettel, a beltenyésztés elkerülésével vagy éppen azt növelve tervezik meg. A vérfrissítő tenyésztés alapvető célja az, hogy a beltenyésztés során a fajtából elveszett génkészleteket visszajuttassa az állományba, mivel a kevés számú alapító egyeddel létrehozott fajtákban a genetikai változatosság jelentős mértékben lecsökkenhet a genetikai drift és palacknyakhatás következtében (Zöldág, 2008). A genetikai leromlás leglényegesebb hatása abban rejlik, hogy a különböző élet- és fajfenntartó képességek negatív tulajdonságai a homozigozitás következtében konzerválódhatnak. A káros hatások ilyenkor főleg termékenységi zavarokban, alomszám-csökkenésben, növekvő kölyökveszteségben és a genetikai betegségek megjelenésében mutatkoznak meg (Zöldág, 2003).

Polimorf mikroszatellita markerek használatával fel lehet mérni egy adott – beltenyésztettségi leromlást mutató – állomány genetikai jellemzőit, vizsgálva azt is, hogy ilyen esetekben milyen mértékben lehetséges a populáción belüli származásellenőrzés megbízhatósága (Zenke és mtsai, 2007, 2009).

# 4 ANYAG ÉS MÓDSZER

## 4.1 Rövid STR alapú vizsgálatok

### 4.1.1 *Canine* specifikus lokuszok kiválasztása

A markerek kiválasztásánál három szempontot vettem figyelembe. A mikroszatelliták ismétlődő egységei minimum négy bázisból álljanak (tetramer repetíciók), több allélváltozatban forduljanak elő és amennyiben sokszorosítás utáni méretük meghaladja a 200 bázispárt, új primer(ek) tervezésével lerövidíthetőek legyenek megfelelő hosszúságúra. Ennek megfelelően irodalmi adatok (Neff és mtsai, 1999, DeNise és mtsai, 2004, Halverson és mtsa, 2005b, Eichmann és mtsai, 2004a, 2005) és a Canine Genome Project interneten elérhető (http://research.nhgri.nih.gov/dog_genome) referencia szekvenciái alapján hét potenciálisan polimorf mikroszatellita markert választottam ki (**1. táblázat**). Az ivar meghatározása céljából az Y-kromoszómán elhelyezkedő SRY lokuszt vontam be a tesztelésbe.

**1. táblázat** Kutya specifikus mikroszatellita markerek és azonosító adataik

| Marker | Primer szekvencia (5'-3') | Kromoszomális hely | Referencia |
|---|---|---|---|
| PEZ21 | AACCGGTTGTGATTTCTGGG<br>GTCTGTGTCATTAGTGACATC | CFA2:36438658-36438750 | Halverson és mtsai (2005b) |
| PEZ19 | GACTCATGATGTTGTGTATC<br>TTTGCTCAGTGCTAAGTCTC | CFA20:4491447-4491576 | Neff és mtsai (1999) |
| PEZ16 | GCTCTTTGTAAAATGACCTG<br>GTGGGAATCGTCCTAAAACCC | CFA27:10305692-10305864 | DeNise és mtsai (2004) |
| REN124F09 | AGCCTGCTTCTCCTTCTTT<br>ACGCAGGACTCCGATAATA | CFA3:93135714-93135854 | http://research.nhgri.nih.gov |
| WILMS-TF | CCCAATCTCCAGAGATTTTCC<br>CCAGTCTCAGCTGTGTCCAA | CFA18:38163822-38163993 | Eichmann és mtsai (2004a) |
| FH2584 | GTTAGGTTCACAGTGGGCGT<br>ACTCAAAGACCTGGAGGGGT | CFX:103978820-103978985 | http://research.nhgri.nih.gov |
| vWF.X | CTCCCCTTCTCTACCTCCACCTCTAA<br>CAGAGGTCAGCAAGGGTACTATTGTG | CFA27:41977918-41978074 | Eichmann és mtsai (2004a) |
| SRY | GAACGCATTCTTGGTGTGGTCTC<br>GGCCATTTTTCGGCTTCTGTAAG | CFY | Eichmann és mtsai (2005) |

### 4.1.2 Primerek tervezése

A kiválasztott lokuszokra, amennyiben szükséges és lehetséges volt, új primereket illetve primerpárokat terveztem a *Primer Designer 4* szoftver (http://www.scied.com) segítségével, és így a keletkező PCR termékek hosszát 200 bázispárnál rövidebbre redukáltam (**2. táblázat**). A kezdő szakaszok tervezése során figyelembe vettem, hogy az új oligonukletid szekvenciák az adott markerre specifikusak legyenek, valamint azt a szempontot, hogy több marker egyidejű, egy polimeráz láncreakcióban történő sokszorosítása – multiplex PCR rendszer – is kivitelezhetővé váljon. Az alkalmazni kívánt primerek GC arányát – amely meghatározza az optimális tapadási hőmérsékletet, az ún „annellációt" – közel azonos szintre állítottam be, valamint kiküszöböltem az egyes primerek dimerizálódásának és az ún. „hairpin" struktúrák kialakulásának esélyét, amelyek a primer DNS-szálhoz való kötődését gátolnák.

**2. táblázat** Tervezett primer szekvenciák (***dőlt betűkkel***)

| Marker | | Szekvencia (5'-3') |
|---|---|---|
| PEZ19 | forvard | GACTCATGATGTTGTGTATC |
| | reverz | ***TCTCTACTGTCTTGCTCTCT*** |
| PEZ16 | forvard | GCTCTTTGTAAAATGACCTG |
| | reverz | ***ATCAGGGCAGTTTGGCACACT*** |
| REN124F09 | forvard | ***CAAGGGTCCCCCATATTGC*** |
| | reverz | ***CTGGCTCTATCTCTCTGTC*** |
| WILMS-TF | forvard | CCCAATCTCCAGAGATTTTCC |
| | reverz | ***CCCACTGTTCTGTGGTTTGC*** |
| FH2584 | forvard | ***TCCCTCTGCTTACTTGCAAA*** |
| | reverz | ***GCAGAAAGTATGTTGCTCCT*** |

### 4.1.3 Célfragmensek monoplex felsokszorozása – a markerek polimorfizmusának felmérése

A kiválasztott hét mikroszatellita marker polimorfizmusát 75 különböző fajtába tartozó – a SZIE ÁOTK klinikai anyagából származó – 116 kutya vérmintájából tisztított DNS-sel teszteltem (**F1. táblázat**). A vizsgálat monoplex PCR technikával, az alábbi reakció-mix használatával történt:

| | | | |
|---|---|---|---|
| 10×PCR Buffer II | : | 2,5 µl | 1× |
| $MgCl_2$ (25 mM) | : | 2,5 µl | 2,5 mM |
| Primer Mix (10 pM) | : | 2 µl | 0,4 pM |
| dNTPs (10 mM) | : | 2 µl | 800 µM |
| Taq polim. (5 U/µl) | : | 0,5 µl | 5 U |
| Σ | | 9,5 µl | |
| DNS templát | : | 1 µl | 1 ng |
| Ionmentes steril víz | : | 14,5 µl | |
| Σ | | 25 µl | |

Az alkalmazott PCR-program:

95°C -1 perc, (94°C - 30 mp, 58°C - 30 mp, 72°C - 30 mp) × 30, 72°C - 45 perc.

A sokszorosítás hatékonyságának ellenőrzését illetve a fragmensek szeparálását poliakrilamidgél-elektroforézissel (PAGE) végeztem, és ezüstfestéses eljárással határoztam meg (Budowle és mtsai, 1991).

### 4.1.4 Genotípus-meghatározás

#### 4.1.4.1 Fragmensek elválasztása, meghatározása, szelektálása

A monoplex formában sokszorozott termékeket kapilláris elektroforézissel, ABI Prism® 310 genetikai analizátor készülékkel választottam el, és a mintákhoz kevert belső méretstandard – GeneScan™-500 LIZ™ Size Standard (Applied Biosystems) – segítségével meghatároztam a pontos allélméretet. A fluoreszcens festékekkel jelölt kezdő szakaszok lézergerjesztett detektálásának kiértékelését GeneScan® 3.1.2 szoftverrel (Applied Biosystems) végeztem, a potenciális allélként sokszorozott termékeket méretük alapján csoportosítottam.

#### 4.1.4.2 A kiválasztott fragmensek szekvencia-analízise

Az alléltípusok meghatározásához és az allélek jellemzéséhez a pusztán méretbeli különbségek önmagukban nem elégendőek, ezért a méret alapján szignifikánsan elkülönülő csoportokból egy, a kevésbé diszkrét mérettartományok esetében több allél bázissorrend meghatározását végeztem el.

Az STR allélek szekvenáláshoz való sokszorozását a megfelelő, fluoreszcens jelöléstől mentes („*sequence detection*”) primerpárral végeztem, a 4.1.3. fejezetben leírt PCR protokollnak megfelelően. A sokszorosítás hatékonyságának ellenőrzését, a fragmensek elkülönítését (PAGE) és ezüstfestéses kimutatását heterozigóta allélek esetén a termékek gélből, Microcon YM-100 (Amicon, Millipore) koncentrátorral történő tisztítása és reamplifikálása (ismételt felsokszorozása) követte.

Az ismételt sokszorosításnál alkalmazott PCR-program:
95 °C - 10 mp, (94 °C - 1 perc, 58 °C - 1 perc, 72 °C - 1 perc) × 26, 72 °C - 45 perc.

Mivel bizonyos – az alléllétrák összeállításához szükséges – alléleket csak heterozigóta formában figyeltem meg, és egyes esetekben ezek PAGE-el történő elválasztása és gélből való elkülönült izolálása nem volt megfelelően kivitelezhető (csak egy, vagy néhány bázis különbség volt a két allél között), a TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, 2004) klónozó protokolljával különítettem el a kérdéses szakaszokat. A plazmidok izolálásához a telepeket steril vízben szuszpendáltam és lizáltam, majd az alábbi PCR-paraméterekkel reamplifikáltam:

| | | |
|---|---|---|
| 10×PCR Buffer II | : 2,5 µl | 1× |
| $MgCl_2$ (25 mM) | : 1,5 µl | 1,5 mM |
| M13 primer pár (10 pM) | : 2 µl | 0,8 pM |
| dNTPs (10 mM) | : 0,5 µl | 200 µM |
| TaqGold (5 U/µl) | : 0,2 µl | 1 U |
| Σ | 6,7 µl | |
| Plazmid DNS | : 5 µl | |
| Ionmentes steril víz | :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.

Az (ismételten) amplifikált allélek tisztítása és szekvenálása standard protokoll szerint, QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) és BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, 2003) felhasználásával történt. A szekvenált termékek tisztítása Centri-Sep (Princeton Separations, 2004) oszlopon, elválasztásuk ABI Prism® 310 genetikai analizáló készüléken (Applied Biosystems) történt. A szekvenciák szerkesztését és

illesztését a Sequencing Analysis Software 3.4.1 (Applied Biosystems) és Sequencher™ 4.1.2 (Gene Codes Corp.) szoftverek segítségével végeztem.

#### 4.1.4.3 Allélletrák készítése

A genotipizáláshoz szükséges allélletrákat (allélsorokat) az ismert genotípusú egyedek szekvencia vizsgálatokkal igazolt PCR-termékeinek összekeverésével állítottam elő. A kiválasztott allélek kapilláris elektroforézissel (ABI Prism® 310) meghatározott RFU értékei alapján készítettem el a megfelelő arányú keveréket, így biztosítva a létrafokok detektálási jelerősségének kiegyensúlyozottságát.

A kész létrát a genotipizálásokhoz szükséges mennyiségben protokoll szerinti tisztítással (QIAquick PCR Purification Kit) illetve ismételt amplifikálással hoztam létre.

Az alkalmazott PCR-program:

95°C -11 perc, (94°C – 1 perc, 58°C - 1 perc, 72°C – 1 perc) × 16, 72°C - 45 perc.

Felhasznált reakció-mix:

| | | | |
|---|---|---|---|
| 10×PCR Buffer II | : | 5 µl | 1× |
| $MgCl_2$ (25 mM) | : | 5 µl | 2,5 mM |
| Primer Mix (10 pM) | : | 4 µl | 0,8 pM |
| dNTPs (10 mM) | : | 4 µl | 800 µM |
| TaqGold (5 U/µl) | : | 1 µl | 5 U |
| Σ | | 19 µl | |
| Tisztított létra | : | 1 µl | |
| Ionmentes steril víz | : | 30 µl | |
| Σ | | 50 µl | |

Az amplifikálás hatékonyságának ellenőrzését illetve a fragmensek szeparálását poliakrilamidgél-elektroforézissel végeztem, és ezüstfestéses eljárással detektáltam.

##### 4.1.4.3.1 Repetíciós struktúrák megállapítása, elnevezése

A szekvencia adatok ismeretében az allélnevezéktant nemzetközi összehasonlításra is alkalmas módon, az alábbi ajánlások szerint alakítottam ki (Eichmann és mtsai, 2004a):

- A DNS-szekvenciát 5'-3' irányban kell olvasni, és az alléltípus meghatározásához az irodalomban leírt, illetve a nyilvános adatbázisba először bejegyzett szálat kell alapul venni.
- Az allélek elnevezése a teljes ismétlődési egységek (repetíció) száma alapján történik.
- Nem teljes repetíciót is tartalmazó szekvencia esetén (interallél, mikrovariáns allél) a teljes egységek száma után egy ponttal elválasztva kell feltüntetni a hiányos ismétlődés bázisainak számát.
- Az STR markerek alléljait a repetitív régióban található variáns és nem variáns ismétlődési egységek együttes számának alapján kell elnevezni.

#### 4.1.4.3.2 A genotipizáló szoftver kialakítása

A genotipizálás, azaz az allélek mérete alapján azok félautomata meghatározása és felcímkézése (*allele calling*) a Genotyper® 2.5.2 szoftverrel (Applied Biosystems) történt. Figyelembe véve a referencia létrák allélméreteit, az alkalmazott belső méretstandard típusát és az egyes markerek fluoreszcens jelölését megírtam az adott lokuszokra vonatkozó genotipizáló makrókat, amelyekben kialakítottam az allél-ablakok mérettartományát a populációs mintában megfigyelt allélek szórási adatai alapján. Ez a PCR-termék analizáló rendszer így alkalmassá vált az alléllétra és a minta allélméreteinek összehasonlítása alapján azoknak a fragment-típusoknak a megfelelő allélnévvel való ellátására, amelyek mérete egy adott allél-ablak mérettartományán belül esik.

### 4.1.5 Populációgenetikai statisztikai analízisek

Bár a genetikai polimorfizmusok populációgenetikai szempontból számos értékkel jellemezhetők, az általam alkalmazott eljárások csak néhány, igazságügyi és leszármazástani szempontból is fontos érték vizsgálatára terjedtek ki.

#### 4.1.5.1 Populációgenetikai alapértékek

A lokuszokon megfigyelt allélgyakoriságok alapján a következő értékeket határoztam meg (Nei, 1973):

**$H_{obs}$** – (*Observed Heterozigosity*) az adott lokuszon ténylegesen megfigyelt heterozigóták aránya a populációs mintában.

**$H_{exp}$** – (*Expected Heterozigosity*) a populációs mintában az allélek megfigyelt gyakoriságából számított heterozigóták várt aránya.

$$H_{\exp} = 1 - \frac{n}{n-1} \sum p_i^2$$

ahol $p_i$: az i-edik allél megfigyelt gyakorisága (Nei, 1973), $n$: a vizsgált kromoszómák száma.

**PD** – (*Power of Discrimination*, megkülönböztetési valószínűség) az igazságügyi genetikában annak a kifejezésére szolgál, hogy mekkora az átlagos valószínűsége annak, hogy a két egyed – melyek a populációból véletlenszerűen lettek kiválasztva – a vizsgált lokuszon eltérő genotípust mutat.

$PDi = 1 - \sum x_i^2$ több lokuszra kombinálva $PD_{komb} = 1 - \prod (1 - PD_i)$

ahol $x_i$: az i-edik genotípus megfigyelt gyakorisága (Jones, 1972).

**PE** – (*Power of Exclusion*, kizárhatósági valószínűség) az igazságügyi genetikában annak a kifejezésére szolgál, hogy mekkora az átlagos valószínűsége annak, hogy a kérdéses egyed – a populációból véletlenszerűen kiválasztva – adott szülő-utód relációból, mint másik lehetséges szülő kizárható.

$PEi = 2\left(\sum p_i^2\right)^2 - \sum p_i^4$ több lokuszra kombinálva $PE_{komb} = 1 - \prod (1 - PE_i)$

ahol $p_i$: az i-edik allél megfigyelt gyakorisága (Ohno és mtsai, 1982).

**PIC** – (*Polymorphic Information Content*) polimorfizmus információ tartalom (Botstein és mtsai, 1980); az adott lokusz sokalakúságából adódó informatív érték.

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

ahol $p_{i,j}$:a megfigyelt allélek gyakorisága.

#### 4.1.5.2 Hardy-Weinberg egyensúly (HWE) meghatározása

Az allélek lokuszon belüli függetlenségének vizsgálatát, azaz a Hardy-Weinberg egyensúly meglétét exact-teszttel (Guo és mtsa, 1992), az Arlequin ver.2000 szoftver (Schneider és mtsai, 2000) felhasználásával végeztem. Az alkalmazott tesztparamétereket a szoftver által ajánlott határértékek között állítottam be (Markov-lánc lépés-száma: 1000000; dememorizáció lépés-száma: 1000).

#### 4.1.5.3 Linkage disequilibrium (LD) meghatározása

Az allélek lokuszok közötti függetlenségét illetve lehetséges kapcsoltságát, azaz a „kapcsoltságból fakadó kiegyensúlyozatlanság” vizsgálatát permutációs valószínűségi

hányados teszteléssel (Slatkin és mtsa, 1996), az Arlequin ver.2000 szoftver felhasználásával végeztem. A teszt lokuszpárokra alkalmazott paramétereit a szoftver által ajánlott határértékek között állítottam be (permutációk száma: 10000; kezdeti feltételek száma: 10).

#### 4.1.5.4 Tesztsorozatok, Bonferroni-eljárás

Amennyiben az egyensúlyi tesztelés során az egyensúlyt a lokuszok összességén vizsgáljuk, akkor a lokuszok ugyanazon a hipotézisen elvégzett tesztsorozatban vesznek részt. Ebben az esetben a tesztsorozat szignifikancia-szintje (az ún. *kísérleti jellegű hibaráta*) annak a valószínűsége, hogy a tesztek közül legalább egy a nullhipotézis elvetését okozza, ha a nullhipotézis igaz. A kísérleti jellegű hibaráta (α') a következőképpen fejezhető ki:

$$\alpha' = 1 - (1 - \alpha)^L \approx L\alpha,$$

ahol α az egyedi teszt szignifikancia-szintje és L a tesztek száma.

A fenti procedúrát Bonferroni-eljárásnak hívjuk (Weir, 1996). Annak érdekében, hogy elkerüljük a hipotézis hamis elvetését, minden egyedi tesztelést szorosabbá kell tenni a fenti képlet átalakított formája szerint, amely:

$$\alpha \approx \alpha'/L.$$

Ezek alapján a 11 STR marker tesztsorozata esetén az α' = 0,05 kísérleti hibarátához α = 0,0046 egyedi szignifikancia-szintet alkalmaztam.

### 4.1.6 Multiplex rendszerek létrehozása

A polimorfizmus vizsgálatokkal felmért hét STR lokuszt kiegészítettem a már korábban leírt, megfelelően rövid és kellő változatosságot mutató PEZ1, PEZ3, PEZ5, FH2054 (Pádár, 2006) markerekkel, valamint az SRY lokusszal, és az összesen 12 markert két multiplex reakcióban állítottam össze. Mivel az egyes lokuszok mérettartománya átfedő, megkülönbözetésüket eltérő színű fluoreszcens jelöléssel (Applied Biosystems) biztosítottam (**3. táblázat**).

**3. táblázat** STR markerek csoportosítása két multiplex (miniplex, MP I, MP II.) PCR reakcióban és az alkalmazott fluoreszcens jelölés típusa (a kimutatás során észlelt színnel)

| **MP I.** | PEZ1 | PEZ5 | PEZ3 | PEZ21 | PEZ16 | REN124F09 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Jelölés** | **6-FAM** | **VIC** | **NED** | **PET** | **6-FAM** | **VIC** |
| **MP II.** | FH2054 | PEZ19 | FH2584 | WILMS-TF | vWF.X | SRY |
| **Jelölés** | **6-FAM** | **VIC** | **NED** | **PET** | **VIC** | **NED** |

Az előzetes vizsgálatok alapján az allélcsúcsok erőteljes „vállasodását” tapasztaltam, ezért a reverz primerek 5’ végét hozzáadott – ún. „pig-tail” szekvenciával (GTTCTT) – módosítottam (Brownstein, 1996).

### 4.1.7 A módszer érzékenyítése

A vizsgáló multiplex kitek – kielégítő eredményre vezető – kiindulási (templát) DNS minta igényét (standard protokoll szerint 10-100 ng) a különböző mértékben degradált, alacsony kópiaszámú helyszíni minták általában nem tudják biztosítani. Az általam összeállított, két miniplex rendszerben sokszorozott lokuszokat ennél lényegesen – két nagyságrenddel – kisebb, 0,05-2 ng templát-tartományban teszteltem.

Az optimalizált PCR-program és kondíciók:

95°C -11 perc, (94°C – 45 mp, 58°C - 45 mp, 72°C – 45 mp) × 34, 72°C - 20 perc.

| **Miniplex I. reakció-mix** | | **Miniplex II. reakció-mix** | |
|---|---|---|---|
| BSA (2 mg/ml) | : 0,6 µl | BSA (2 mg/ml) | : 0,6 µl |
| 10×PCR Buffer II | : 2 µl | 10×PCR Buffer II | : 2 µl |
| $MgCl_2$ (25 mM) | : 2 µl | $MgCl_2$ (25 mM) | : 2 µl |
| Prim. mix I. (20 pM) | : 5 µl | Prim. mix II. (20 pM) | : 1 µl |
| dNTPs (10 mM) | : 2 µl | dNTPs (10 mM) | : 2 µl |
| TaqGold (5 U/µl) | : 0,4 µl | TaqGold (5 U/µl) | : 0,4 µl |
| Σ | 12 µl | Σ | 8 µl |
| Templát DNS | : 1 µl | Templát DNS | : 1 µl |
| Ionmentes steril víz | : 7 µl | Ionmentes steril víz | :11 µl |
| Σ | 20 µl | Σ | 20 µl |

Az amplifikálás hatékonyságát poliakrilamidgél-elektroforézissel ellenőriztem, és ezüstfestéssel mutattam ki. A multiplex formában sokszorozott fragmensek kapilláris elektroforézissel történő elválasztását ABI Prism® 310 genetikai analizátorral, a fluorofórokkal jelölt primerek lézergerjesztett detektálásának kiértékelését GeneScan® 3.1.2 szoftverrel végeztem.

### 4.1.8 Eseti alkalmazás

Kutya eredetű, degradált minták vizsgálatára leginkább két területen mutatkozik igény. Egyrészt a tenyésztők, másrészt a különböző hatóságok – bíróság, rendőrség, önkormányzat – felől érkeznek megkeresések és kirendelések genetikai azonosító vizsgálat elvégzésére. A kifejlesztett miniplex kitek alkalmazhatóságát ezekkel összhangban tenyésztési és bűnügyi esettípusokon vizsgáltam.

#### 4.1.8.1 Leszármazás vizsgálata

Előzmény: Cane corso fajtatenyésztő két kölyök vonatkozásában a lehetséges nemző kan biológiai apaságának megállapítását kérte.

Vizsgálat: A szuka és a feltételezett kan szájnyálkahártya-törletéből illetve egy kan és egy szuka kölyökkutya levágott farokvégéből DNS kivonást végeztem proteolitikus emésztés, szerves kémiai extrakció és ultrakoncentráció módszerrel (Comey és mtsai, 1994). A minták DNS-tartalmának szemikvantitatív meghatározására agaróz gélelektroforézist és etídium-bromid fluorofór festést alkalmaztam standard protokoll szerint. A kinyert DNS-ből az összeállított két multiplex PCR segítségével az ivart meghatározó SRY lokuszt a 11 rövid mikroszatellita markerrel együtt sokszoroztam. A fluoreszcens jelölésű amplikonok lézeres kimutatását és kiértékelését ABI Prism 310 genetikai analizátor készüléken a GeneScan® 3.1.2 szoftver segítségével végeztem, a genotípusok meghatározására a kutya mikroszatellitákra módosított Genotyper® 2.5.2 szoftvert használtam.

#### 4.1.8.2 Degradált minta azonosítása

Előzmény: Nyíradony város jegyzője, mint elsőfokú szabálysértési hatóság, egy „rongálással okozott” kár (47 anyajuh és öt bárány megölése) elkövetőjének megállapítása céljából a helyszíni birkakarám kerítésén fellelt szőrcsomó és a feltételezett támadó kutyától biztosított szőrminta genetikai összehasonlító vizsgálatát kérte.

Vizsgálat: A helyszíni- és a feltételezett támadó kutyától származó szőrminták gyökérhüvelyi részéből fénymikroszkópos ellenőrző vizsgálatot végeztem. A DNS kivonást, multiplex PCR sokszorosítást valamint a fluoreszcens jelölésű amplikonok lézeres detekcióját és kiértékelését az 4.1.8.1. fejezetben leírtakkal megegyező módon végeztem.

## 4.2 Szomatikus mutáció vizsgálata

### 4.2.1 Szőrminták gyűjtése és csoportosítás

A szomatikus mutáció előfordulásának lehetőségét három éves, bullmasztiff fajtájú, nőstény kutya négy, különböző testrészéről kitépett, eltérő fejlődési stádiumban lévő 600 db szőrmintáján végeztem (**4. táblázat**).

Az egyes szőrszálak kategorizálása a szőrhagymák fénymikroszkópos vizsgálata alapján történt, amely során három növekedési/degenerációs fázist különítettem el (**4. ábra**). A gyökérhüvelyi sejteket vizuálisan nem tartalmazó, telogén fázisú szőröket a vizsgálatba nem vontam be.

**4. ábra** Anagén (a), katagén (b) és késői katagén (c) szőrszálak fénymikroszkópos képe (saját felvételek)

**4. táblázat** Négy testrészről gyűjtött szőrszálak száma fejlődési stádiumonként

| Testrész | Fejlődési stádium | Szőrszálak száma (db) |
|---|---|---|
| Hát | anagén | 58 |
| | katagén | 125 |
| | késői katagén | 78 |
| Pofa | anagén | 27 |
| | katagén | 34 |
| | késői katagén | 44 |
| Mellső lábak | anagén | 31 |
| | katagén | 55 |
| | késői katagén | 21 |
| Hátsó lábak | anagén | 42 |
| | katagén | 53 |
| | késői katagén | 32 |
| **Összesen** | **anagén** | **158** |
| | **katagén** | **267** |
| | **késői katagén** | **175** |

Az objektív csoportkialakítás ellenőrzésére 40 db, különböző fejlődési stádiumú kutyaszőr ismételt fénymikroszkópos meghatározását végeztem el.

### 4.2.2 DNS kivonása, a vizsgálandó szakaszok multiplex sokszorosítása és genotipizálása

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 teszteltem (**5. táblázat**):

**1., "Szerves extrakciós" módszer:** emésztés proteináz K enzimmel, tisztítás fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú keverékével, ultraszűrés és koncentrálás Microcon-30 (Millipore) membránokon (Pádár és mtsai, 2001);

**2., BioRobot EZ1:** emésztés proteináz K enzimmel, etanolos precipitáció, tisztítás és koncentrálás szilika oszlopon (Qiagen, 2008; Anslinger, 2005);

**3., Pellet Paint©:** alkoholos ko-precipitáción alapuló módszer (Novagen, 2003).

**5. táblázat** Három különböző DNS tisztítási módszerrel preparált, különböző növekedési fázisú szőrszálak száma

| Szőr fázis | Szőrszálak száma (db) | | |
|---|---|---|---|
| | Szerves | BioRobot | Pellet Paint |
| **Anagén** | 114 | 24 | 20 |
| **Katagén** | 234 | 18 | 15 |
| **Késői katagén** | 138 | 22 | 15 |

Kontroll mintaként a donor kutyától vett szájnyálkahártya-törletet használtam, amelynél a „szerves extrakciós" DNS preparálási eljárást alkalmaztam.

A DNS-tisztítás sikerességét agaróz gélen ellenőriztem, majd a tíz, kutya specifikus STR marker (PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ5, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8, FHC2079) együttes sokszorozását 10 µl reakció végtérfogatban, a gyártó ajánlásai alapján végeztem (StockMarks® Dog Genotyping Kit, Applied Biosystems, Inc. Foster City, CA). A sokszorozási hatékonyság ellenőrzését poliakrilamidgél-elektroforézissel és ezüstfestéssel végeztem. A fragmensek kapilláris elektroforézissel történő elválasztását ABI Prism® 310 genetikai analizátorral, a fluorofórokkal jelölt primerek lézergerjesztett detektálásának kiértékelését GeneScan® 3.1.2 szoftverrel, a szőrszálak genotípusának meghatározását a Genotyper v2.5.2. szoftverrel végeztem.

### 4.2.3 Ellenőrző PCR vizsgálatok

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. Az egyes lokuszok monoplex sokszorosítása az alábbi reakció-mix használatával történt:

| | | |
|---|---|---|
| 10×PCR Buffer II | : 2,5 µl | 1× |
| $MgCl_2$ (25 mM) | : 2,5 µl | 2,5 mM |
| Primer Mix (10 pM) | : 2 µl | 0,8 pM |
| dNTPs (10 mM) | : 2 µl | 800 µM |
| Taq polim. (5 U/µl) | : 0,5 µl | 0,1 U |
| Σ | 9,5 µl | |
| DNS templát | : 1 µl | 1 ng |
| Ionmentes steril víz | :14,5 µl | |
| Σ | 25 µl | |

Az alkalmazott PCR-program:

95°C -1 perc, (94°C - 30 mp, 56°C - 30 mp, 72°C - 30 mp) × 32, 72°C - 30 perc.

A reakció hatékonyságát poliakrilamidgél-elektroforézissel ellenőriztem és ezüstfestéses eljárással mutattam ki. A monoplex formában sokszorozott fragmensek elválasztását és meghatározását ABI Prism® 310 genetikai analizátorral, GeneScan® 3.1.2 és Genotyper v2.5.2. szoftverrel végeztem.

### 4.2.4 Statisztikai elemzés

A szőrszálak genetikai profiljának meghatározása után az eredményeket a különböző DNS-tisztító eljárások, szőrfázisok és testtájak szerint csoportosítottam, majd az összehasonlított arányszámokat az Instat statisztikai program Yate's korrekciós $\chi^2$-tesztjével elemeztem (http://www.rdg.ac.uk/SSC/software/instat/instat.html).

# 5 EREDMÉNYEK

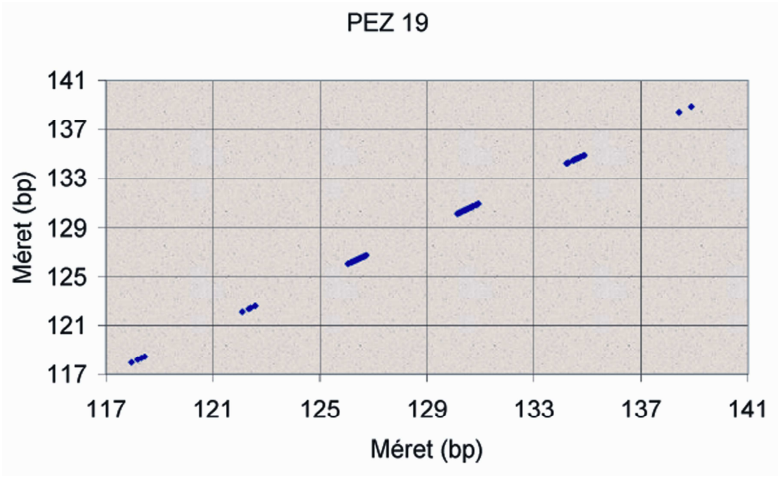
## 5.1 Rövid mikroszatellita markerek és polimorfizmusuk vizsgálata

A kiválasztott hét mikroszatellita markerből ötnél a PCR termékek hosszának csökkentését, hogy azok ne haladják meg a 200 bp-os méretet, új forvard és/vagy reverz primerek tervezésével valósítottam meg (**6. táblázat**).

**6. táblázat** A tervezett forvard és/vagy reverz primerek használatával keletkező amplikonok rövidítésének mértéke

| Marker | PEZ19 | PEZ16 | REN124F09 | WILMS-TF | FH2584 |
|---|---|---|---|---|---|
| Rövidítés mértéke (bp) | -64 | -132 | -100 | -119 | -149 |

Az így kialakított rövid markerek változatosságát monoplex PCR reakcióval mértem fel a vizsgált magyarországi kutyaállományban. Az adott lokuszokon belül a sokszorozott allélek hosszúságának csoportosításával diszkrét illetve kevésbé diszkrét alléltartományokat kaptam (**F2.a-b. ábra**). A csoportok méret szerinti elkülönülése egyértelmű allélazonosításra nem alkalmas, ugyanakkor megfelelőek a lokusz mérettartományának becsléséhez és az alléllétrát alkotó fragmensek kiválasztásához (**5. ábra**).




**5. ábra** Allélek méretbeli eloszlása a PEZ19 lokuszon GS500 LIZ belső méretstandard használatával

## 5.2 Genotipizálás

A genotípus meghatározása a referencia allélekből összeállított alléllétrák segítségével történt. A 116 egyedet számláló kutyacsoport vizsgálata során a 12 lokuszon összesen 108 allélt illetve allélvariánst mutattam ki (**7. táblázat**).

**7. táblázat** Összesen megfigyelt alléltípusok száma lokuszonként

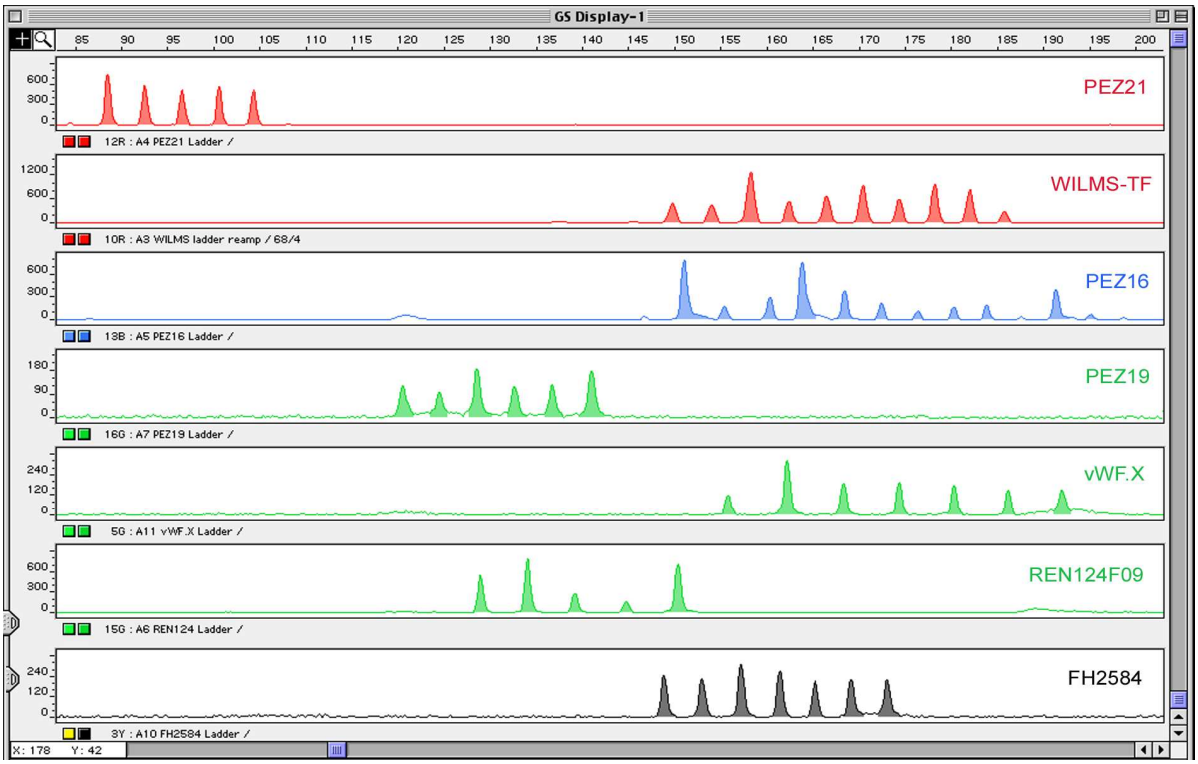
| Lokusz (MP I.) | PEZ1 | PEZ5 | PEZ3 | PEZ21 | PEZ16 | REN124F09 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Alléltípusok száma | 7 | 6 | 11 | 5 | 11 | 5 |
| Lokusz (MP II.) | PEZ19 | WILMS-TF | FH2054 | FH2584 | vWF.X | SRY |
| Alléltípusok száma | 6 | 24 | 11 | 14 | 7 | 1 |

### 5.2.1 A kiválasztott fragmensek szekvencia-analízise

A monoplex PCR termékekből kiválasztott referencia alléleket azok szekvencia meghatározását követően a nemzetközi génbank információs adatbázisában ellenőriztem (Altschul, 1997), és az új, eddig nem ismert szerkezetű markerek reprezentáns alléljeinek bázissorendjét 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/)].

### 5.2.2 Alléllétrák készítése

A genotipizáláshoz szükséges allélsorokat az ismert genotípusú egyedek szekvencia vizsgálatokkal igazolt méretű, monoplex PCR-termékeinek összekeverésével állítottam elő. Az allélkoktélok tartalmazzák a vizsgálati csoportban előforduló legkisebb és legnagyobb allél közötti tartományban megfigyelt, többnyire minden egész számú ismétlődéssel rendelkező referencia allélt (**6.**, **F3. ábra**).

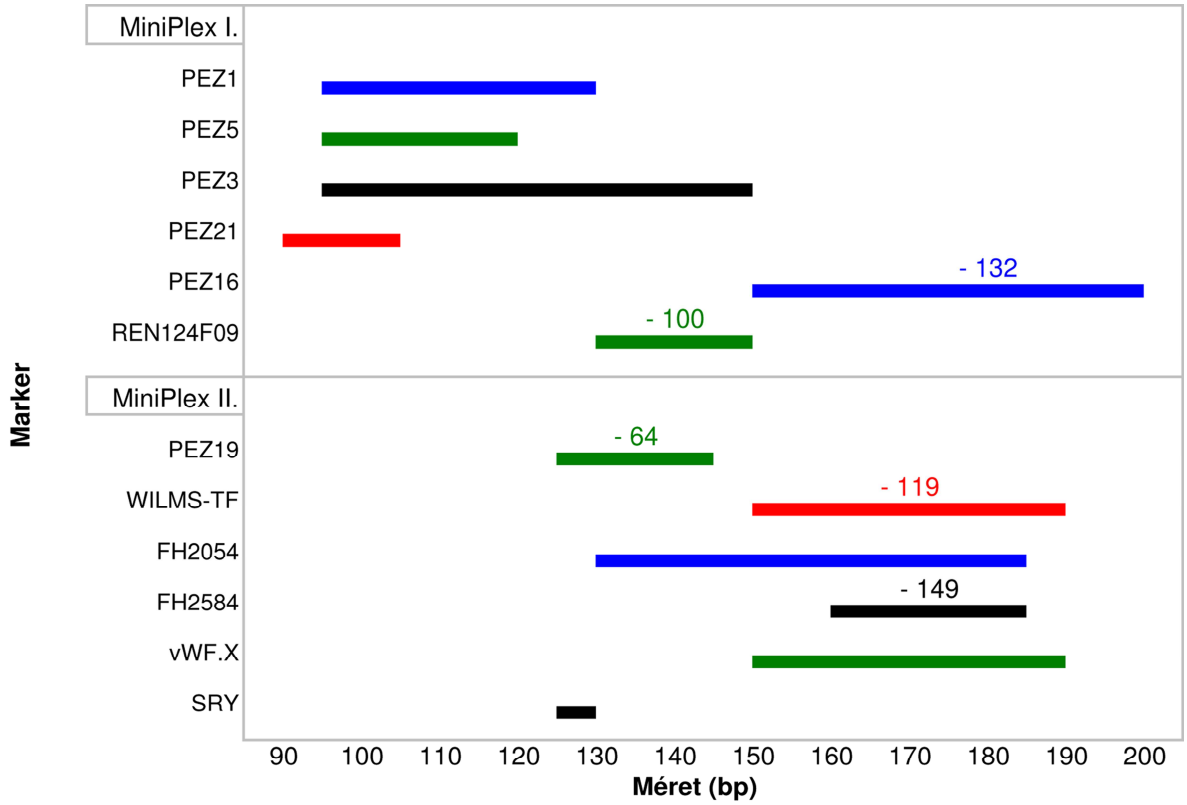



**6. ábra** Hét STR marker fluoreszcens jelölésű alléllétrája kapilláris elektroforézis után

### 5.2.3 Multiplex PCR vizsgálórendszer

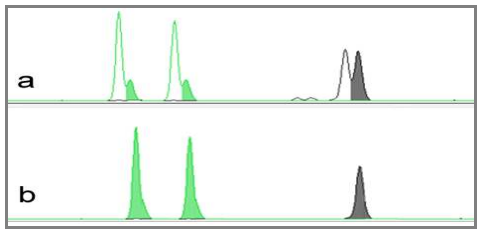
Az átfedő mérettartományú lokuszokat – összesen 12 markert – eltérő színű fluorofór jelöléssel tettem megkülönböztethetővé, és két multiplex reakcióban – Miniplex I. (MP I.) és Miniplex II. (MP II.) – állítottam össze (**7.**, **F4.a-b. ábra**).

Az MP I. és MP II. rendszer tartalmazza a monoplex vizsgálatokkal felmért változatosságú hét STR lokuszt (PEZ21, PEZ16, REN124F09, PEZ19, WILMS-TF, FH2584, vWF.X), kiegészítetve a már ismert polimorfizmusú, rövid PEZ1, PEZ3, PEZ5, FH2054 markerekkel (Pádár, 2006), valamint az SRY lokusszal.




**7. ábra** Miniplex I. és II. rendszer STR lokuszai, PCR termékeik mérettartománya, az eredeti allélméretekhez viszonyított rövidítésük mértéke és az átfedő alléltartományok eltérő színű fluoreszcens jelölése

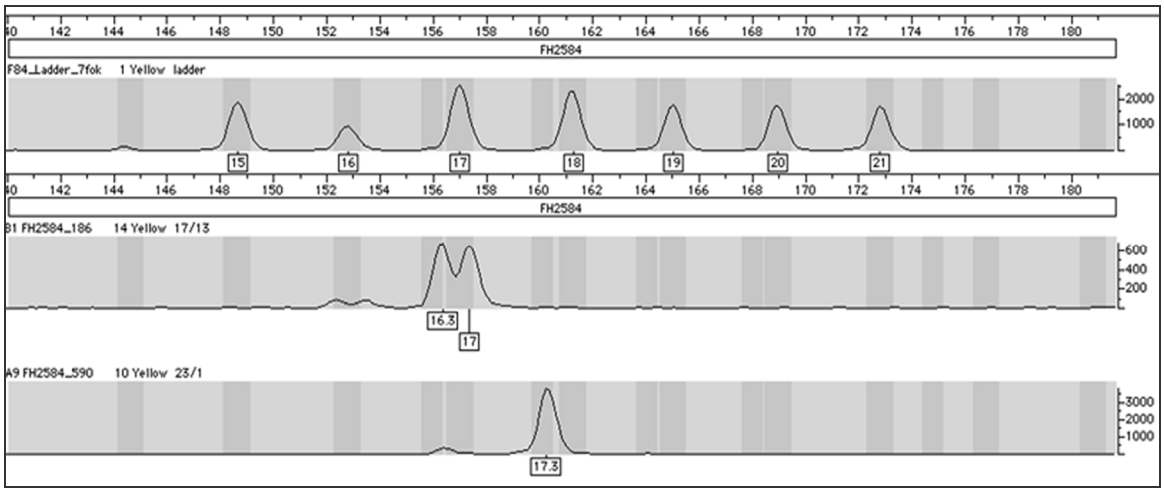
Az allélek „vállasodásának” kiküszöbölésére módosított primereket – „pig-tailed primer” – alkalmaztam, így elkerülhetővé vált a részleges láncvégi adenilációból adódó kettős csúcsok téves, interallélként való azonosítása (**8. ábra**).




**8. ábra** Két marker alléljeinek „vállasodása” (a) és a „pig-tailed” primerek használatával kapott, teljesen adenilált (+ A) termékek (b) – színezett csúcsok

### 5.2.4 Félautomata kiértékelés

Az allélek elválasztása és kimutatása során a fragmensméretek kiértékeléséhez GS500 LIZ belső standardot használtam. A Genotyper® 2.5.2 szoftver beállításait, algoritmusait a méretezési- és szórásértékeknek megfelelően átalakítottam, és segítségével valamint a referencia allélek (alléllétrák) alkalmazásával meghatároztam az egyedek genotípusát, lecsökkentve így az elektroforetikus futás ingadozásaiból és a manuális kiértékelésből fakadó hibalehetőségeket (**9.**, **F5.a-f. ábra**).




**9. ábra** Két minta genotípusának meghatározása az FH2584 lokuszon a Genotyper® 2.5.2 szoftver alkalmazásával

### 5.2.5 Lokuszok jellemzése

Az allélek bázismotívum ismétlődését, (repetíciós) struktúrájának megállapítását szekvencia analízis alapján végeztem. Eredményeimet a publikált adatokkal (Eichmann, 2004a) hasonlítottam össze, és az allélek nevezéktanát nemzetközileg megfeleltethetően, az ismétlődő egységek száma alapján alakítottam ki. A **10. ábra** szemlélteti az eddig még feltáratlan szerkezetű allélek bázissorrendjét, a **F6. ábrán** a már ismert felépítésű, de saját

szekvencia-vizsgálatokkal is megerősített eredmények láthatók (amelyek nélkülözhetelenek voltak az alléllétrák összeállításához).

| Marker | Allél | bp | Ismétlődés szerkezete |
|---|---|---|---|
| **PEZ21** | **8** | **90** | 33bp **(TAAA)$_8$** 25bp |
| | **9** | **94** | 33bp **(TAAA)$_9$** 25bp |
| | **10** | **98** | 33bp **(TAAA)$_{10}$** 25bp |
| | **11** | **102** | 33bp **(TAAA)$_{11}$** 25bp |
| **PEZ19** | **11** | **136** | 23bp **(AAAT)$_{11}$** 69bp |
| | **12** | **140** | 23bp **(AAAT)$_{12}$** 69bp |
| **REN124F09** | **8** | **136** | 44bp **(TTTTA)$_2$TTTA(TTTTA)$_6$** 48bp |
| | **9** | **141** | 44bp **(TTTTA)$_2$TTTA(TTTTA)$_7$** 48bp |
| | **9** | **141** | 44bp **(TTTTA)$_3$ TTTA (TTTTA)$_6$** 48bp |
| | **11** | **151** | 44bp **(TTTTA)$_3$TTTA(TTTTA)$_8$** 48bp |
| **FH2584** | **15** | **158** | 20bp **(CTTT)$_{15}$** 78bp |
| | **16** | **162** | 20bp **(CTTT)$_{16}$** 78bp |
| | **16.3** | **165** | 20bp **(CTTT)$_{16}$ CTT** 78bp |
| | **17** | **166** | 20bp **(CTTT)$_{17}$** 78bp |
| | **17.3** | **169** | 20bp **(CTTT)$_{17}$ CTT**78bp |
| | **18.3** | **173** | 20bp **(CTTT)$_{18}$ CTT** 78bp |
| | **20.2** | **180** | 20bp **(CTTT)$_{19}$ (CTT)$_2$** 78bp |
| **PEZ16** | **16** | **157** | 43bp **GAAA)$_{11}$ (GGAA)$_3$ (GAAA)$_2$** 50bp |
| | **17** | **161** | 43bp **(GAAA)$_6$ (GGAA)$_{10}$ GAAA** 50bp |
| | **17** | **161** | 43bp **(GAAA)$_{12}$ (GGAA)$_4$ GAAA** 50bp |
| | **18** | **165** | 43bp **(GAAA)$_7$ (GGAA)$_{10}$ GAAA** 50bp |
| | **19** | **169** | 43bp **(GAAA)$_7$ (GGAA)$_{11}$ GAAA** 50bp |
| | **19** | **169** | 43bp **(GAAA)$_{12}$ (GGAA)$_6$ GAAA** 50bp |
| | **20** | **173** | 43bp **(GAAA)$_7$ (GGAA)$_{12}$ GAAA** 50bp |
| | **20** | **173** | 43bp **(GAAA)$_{13}$ (GGAA)$_6$ GAAA** 50bp |
| | **26** | **197** | 43bp **(GAAA)$_{12}$ (GGAA)$_{13}$GAAA** 50bp |
| | **26** | **197** | 43bp **(GAAA)$_{13}$ (GGAA)$_{12}$ GAAA** 50bp |
| | **27** | **201** | 43bp **(GAAA)$_{12}$ (GGAA)$_{14}$ GAAA** 50bp |

**10. ábra** Öt kutyaspecifikus STR marker allélváltozatainak szerkezete a szekvenálási adatok alapján - a markerszerkezet összetettségének függvényében lokuszonként eltérő számú allélt vizsgáltam

Szerkezeti jellegzetességük alapján az öt tetramer, egy pentamer és egy hexamer ismétlődéssel rendelkező lokusz két kategóriába volt csoportosítható. A markerek közül három – PEZ21, PEZ19, vWF.X,– egyszerű repetíciókkal, négy – REN124F09, PEZ16, WILMS-TF, FH2584 – pedig összetett nukleotid varianciát tartalmazó ismétlődésekkel rendelkező alléleket tartalmaz.

#### 5.2.5.1 Egyszerű ismétlődéseket tartalmazó lokuszok

**PEZ21 lokusz:** Alléljait a „*TAAA*” ismétlődésű tetramer struktúra jellemzi. A vizsgált kutyaminták 90-106 bp hosszú fragmenstartományában öt allélt figyeltem meg, interallélikus variánst nem találtam. Egy adott allél – „X” – elnevezése

$$X \rightarrow (TAAA)_x$$

alapján történt. Az allélgyakoriság 4,7% („12” allél) és 44% („11” allél) között változott (**F7.a. ábra**).

**PEZ19 lokusz:** Alléljait a „*AAAT*” ismétlődésű tetramer struktúra jellemzi. A vizsgált kutyaminták 124-144 bp hosszú fragmenstartományában hat allélt figyeltem meg, interallélikus variánst nem találtam. Egy adott allél – „X” – elnevezése

$$X \rightarrow (AAAT)_x$$

alapján történt. Az allélgyakoriság 2,2% („13” allél) és 44% („11” allél) között változott (**F7.b. ábra**).

**vWF.X lokusz:** Alléljait a „*AGGAAT*” ismétlődésű hexamer struktúra jellemzi (Eichmann, 2004a). A vizsgált kutyaminták 151-189 bp hosszú fragmenstartományában hét allélt figyeltem meg, interallélikus variánst nem találtam. Egy adott allél – „X” – elnevezése

$$X \rightarrow (AGGAAT)_x$$

alapján történt (Eichmann, 2004a). Az allélgyakoriság 0,4% („14” allél) és 53,9% („9” allél) között változott (**F7.c. ábra**).

#### 5.2.5.2 Összetett ismétlődéseket tartalmazó lokuszok

**REN124F09 lokusz:** Alléljait a „*TTTTA*” ismétlődésű pentamer struktúra jellemzi, amelyet egy „TTTA” egység két részre oszt. E közbeékelődött egység helyzete azonos hosszúságú fragmensekben (pl. „9” allél) eltérő lehet (**10. ábra**). A vizsgált kutyaminták 131-151 bp hosszú fragmenstartományában öt allélt figyeltem meg, interallélikus variánst nem találtam. Egy adott allél – „X” – elnevezése

$$X_{(n+m)} \rightarrow (TTTTA)_n\ TTTA\ (TTTTA)_m$$

alapján történt. Az allélgyakoriság 1,3% („10” és „11” allél) és 49,6% („8” allél) között változott (**F7.d. ábra**).

**PEZ16 lokusz:** Alléljait a „*GAAA*” és „*GGAA*” ismétlődésű tetramer struktúra jellemzi. Mindkét blokk minden allélban megfigyelhető változó számban és az azonos hosszúságú allélek (pl. „20” allél) különböző szerkezetűek – ún. mobilitási variánsok - lehetnek (**10. ábra**).

A vizsgált kutyaminták 149-201 bp hosszú fragmenstartományában 14 allélt figyeltem meg, interallélikus variánst nem találtam. Egy adott allél – „X” – elnevezése

$$X_{(n+m)} \rightarrow (GAAA)_{n-z}\ GGAA_{m}\ (GAAA)_{z}$$

alapján történt. Az allélgyakoriság 0,4% („14”, „15” és „25” allél) és 26,7% („20” allél) között változott (**F7.g. ábra**).

**WILMS-TF lokusz:** Alléljait a „*GAAA*” ismétlődésű tetramer struktúra jellemzi (Eichmann, 2004a). A vizsgált kutyaminták 152-191 bp hosszú fragmenstartományában 24 allélt figyeltem meg, amelyek közt 14 interallélikus variánst („X.1, X.2, X.3” allélek) találtam.

Egy adott allél – „X” – elnevezése

$$X \rightarrow (GAAA)_{x},$$

$$X.1 \rightarrow (GAAA)_{3}\ G\ (GAAA)_{x-3}$$

$$X.2 \rightarrow (GAAA)_{x+1}\ (DEL)$$

$$X.3 \rightarrow (GAAA)_{x-3}\ GAA\ (GAAA)_{3}$$

alapján történt. Az X.2 interallélikus variáns létrejöttét a 3’ flanking régióban található kettő bázispár (CT) kiesése okozza, míg a X.1 és X.3 interallél közbeékelt guanint illetve inkomplett (GAA) repetíciós egységet tartalmaz (Eichmann, 2004a). Az allélgyakoriság 0,4% („9”, „11.2” „15.1”, „16.2” allél) és 16,4% („14” allél) között változott (**F7.h. ábra**).

**FH2584 lokusz:** Alléljait alapvetően a „C*TTT*” ismétlődésű tetramer struktúra jellemzi. A vizsgált kutyaminták 158-191 bp hosszú fragmenstartományában 14 allélt figyeltem meg, amelyek közt hat interallélikus variánst találtam. Egy adott allél – „X” – elnevezése

$$X \rightarrow (CTTT)_{x},$$

$$X.2 \rightarrow (CTTT)_{x-1}\ (ADD)_{2}$$

$$X.3 \rightarrow (CTTT)_{x}\ (ADD)$$

alapján történt. Az X.2 és X.3 interallélikus variánsok létrejöttét a 3’ flanking (határoló) régióban található 3 bázispár (CTT) dupla-, illetve szimpla addíciója okozza. Az X.1 interallél struktúrájának meghatározásához további szekvenciaadatok szükségesek. Az allélgyakoriság 0,4% („20.2” allél) és 18,5% („17” allél) között változott (**F7.e. ábra**).

## 5.3 Statisztikai ellenőrzés

A statisztikai elemzésre szolgáló adatokat a vizsgált 116 kutya 11 STR markeren – Miniplex I. és II. – történő genotípusának meghatározásával nyertem (**F2. táblázat**). A részleges genotípusokat (három minta összesen három lokuszán tapasztalt allélkiesést

illetve tartományon kívül detektált allélt) a számítógépes programok hiányos profilként kezelték.

### 5.3.1 Allélgyakoriság, populációgenetikai alapértékek

A 116 egyedet számláló vizsgálati mintában a 11 lokuszon megfigyelt allélszám (5-24), az allélgyakorisági értékek tartománya (0,4% és 53,9% között) és megoszlása, a heterozigozitási értékek ($H_{obs}$, $H_{exp}$), a kizárhatósági- illetve megkülönböztetési valószínűségek (PE, PD) valamint a polimorfizmus információ tartalom (PIC) értékei az egyes lokuszok vonatkozásában jelentősen eltértek (**8.**, **F3. táblázat**, **F7.a-k. ábra**).

**8. táblázat** Miniplex I. és II. (MP I., MP II.) markerek heterozigozitási (H) értékei, kizárhatósági- (PE) illetve megkülönböztetési valószínűsége (PD) és polimorfizmus információ tartalma (PIC) a vizsgált kutyaállományban

| MP I. | PEZ1 | PEZ5 | PEZ3 | PEZ21 | PEZ16 | REN124F09 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $H_{obs}$ | 0,60 | 0,43 | 0,66 | 0,42 | 0,71 | 0,48 |
| $H_{exp}$ | 0,78 | 0,63 | 0,87 | 0,69 | 0,83 | 0,57 |
| PE | 0,57 | 0,39 | 0,74 | 0,43 | 0,66 | 0,28 |
| PD | 0,92 | 0,79 | 0,96 | 0,84 | 0,94 | 0,72 |
| PIC | 0,75 | 0,58 | 0,86 | 0,63 | 0,81 | 0,47 |

| MP II. | PEZ19 | WILMS-TF | FH2054 | FH2584 | vWF.X |
|---|---|---|---|---|---|
| $H_{obs}$ | 0,57 | 0,78 | 0,72 | 0,31 | 0,48 |
| $H_{exp}$ | 0,68 | 0,92 | 0,85 | 0,89 | 0,59 |
| PE | 0,42 | 0,83 | 0,70 | 0,76 | 0,32 |
| PD | 0,84 | 0,98 | 0,96 | 0,94 | 0,76 |
| PIC | 0,62 | 0,91 | 0,83 | 0,87 | 0,51 |

A várt heterozigozitás értékei ($H_{exp}$) 0,57−0,92, a megfigyelt heterozigozitás értékek ($H_{obs}$) pedig 0,31-0,78 között változtak. 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 legalacsonyabb megfigyelt heterozigozitási értéket a FH2584 lokuszon tapasztaltam ($H_{obs}$ = 0,31), a kombinált kizárási valószínűség $PE_{komb}$ = 99,9953%-nak, a kombinált megkülönböztetési valószínűség pedig $PD_{komb}$ = 99,999999999507%-nak bizonyult.

### 5.3.2 Genetikai egyensúly

A Hardy-Weinberg egyensúly vizsgálatára irányuló, Arlequin szoftverrel végzett analízis során az exact-teszt 11-ből nyolc lokuszon szignifikáns – P ≤ 0,0046 – eltérést mutatott az egyensúlyi állapottól. A PEZ19, vWF.X és FH2054 markeren (7-es, 9-es illetve 11-es számmal jelölve) a Bonferroni-korrekció alkalmazásával nem tapasztaltam devianciát az egyensúlytól.

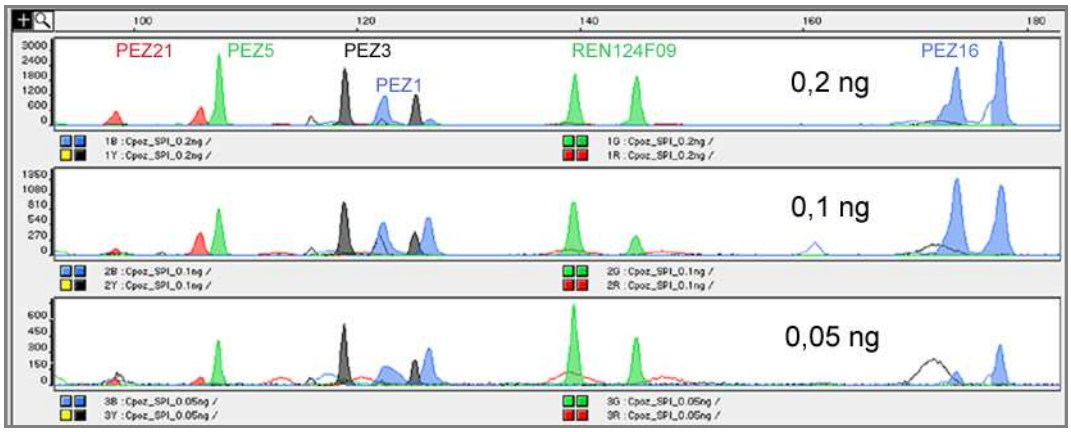
A lokuszpárok kapcsoltságára irányuló összehasonlító elemzés az Arlequin szoftver permutációs valószínűségi hányados tesztjének „Expectation-Maximization" algoritmusával, 55 teszttel történt. Mindössze egy lokuszpár esetén kaptam a Bonferroni-korrekcióval is szignifikáns eltérést az egyensúlyi állapottól (1/55 - 1,82%) (**11. ábra**).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **HWE** | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ | | ■ | |
| **1-PEZ1** | | | | | | | | | | | |
| **2-PEZ5** | | | | | | | | | | | |
| **3-PEZ3** | | | | | | | | | | | |
| **4-PEZ21** | | | | | | | | | | | |
| **5-PEZ16** | | | | | | | | | | | |
| **6-REN124F09** | | ■ | | | | | | | | | |
| **7-PEZ19** | | | | | | | | | | | |
| **8-WILMS-TF** | | | | | | | | | | | |
| **9-FH2054** | | | | | | | | | | | |
| **10-FH2584** | | | | | | | | | | | |
| **11-vWF.X** | | | | | | | | | | | |

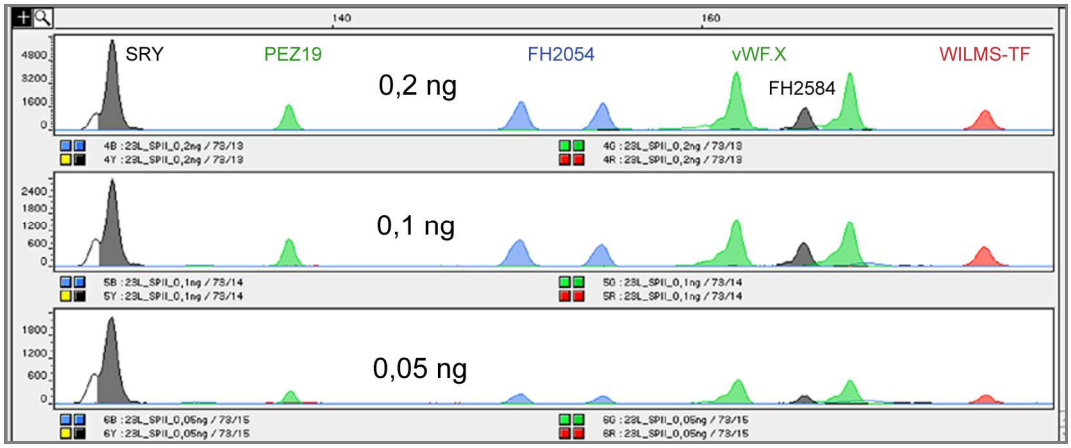
**11. ábra** A 11 lokusz Hardy-Weinberg-egyensúlyának (felső sor) és páronkénti kapcsoltságának vizsgálata [■ : szignifikáns (P ≤ 0,0046) eltérés a HWE ill. a kapcsoltsági egyensúly – Linkage Equilibrium, LE – meglététől]

## 5.4 Érzékenység

A 12 rövid lokusz két multiplex rendszerben történő érzékenységét 2−0,05 ng kiindulási DNS tartományban teszteltem, és kapilláris elektroforézissel határoztam meg (**12.a-b. ábra**).




**12.a. ábra** Miniplex I. PCR érzékenyítése különböző kiindulási DNS mennyiségekkel




**12.b. ábra** Miniplex II. PCR érzékenyítése különböző kiindulási DNS mennyiségekel

A MP I. reakció tesztelése során az alacsony DNS koncentráció (50 pg) kiegyenlítetlen felsokszorozódást (PEZ16 lokusz), valamint bizonytalan genotípus meghatározást (PEZ1 lokusz) eredményezett. Az MP II. reakció esetében az MP I.-hez hasonló érzékenységet csak a bevitt primerkoncentráció csökkentésével sikerült elérni (lásd 5.1.7.fejezet). Így mindkét reakcióban megvalósíthatóvá vált – a részleges genetikai profil kockázatának figyelembe vételével – 50 pg kiindulási DNS genotípusának meghatározása 34 PCR ciklus alkalmazása mellett.

## 5.5 Eseti alkalmazás

### 5.5.1 Tenyésztői megkeresés (alomellenőrzés)

Az elvégzett alomellenőrző vizsgálatok összesített eredményét a **9.a-b. táblázat** tartalmazza. A kérdéses kan biológiai apasága hat marker (PEZ1, PEZ21, PEZ16, REN124F09, WILMS-TF, FH2054) alapján a kan kölyökkutya vonatkozásában, illetve öt marker (PEZ16, REN124F09, WILMS-TF, FH2054, FH2584) alapján a szuka kölyökkutya vonatkozásában kizárható.

**9.a. táblázat** Genetikai profilok meghatározásának eredménye alomellenőrző vizsgálatban MP I. lokuszkészlettel. A kölyökkutyák genotípusában sárga kiemelés jelöli azokat a lehetséges apai alléleket, amelyek alapján a feltételezett kan biológiai apasága kizárható

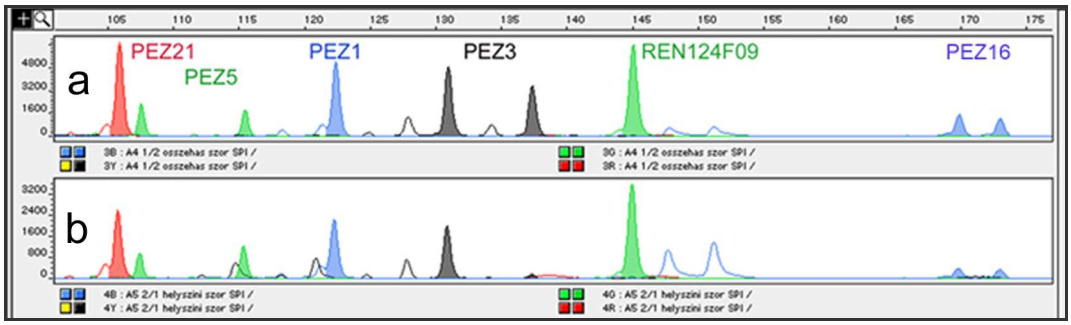
| MP I. | PEZ1 | PEZ5 | PEZ3 | PEZ21 | PEZ16 | REN124F09 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Szuka** | 14/14 | 8/8 | 27/29 | 9/10 | 17/20 | 7/8 |
| **Kan** | 14/14 | 8/8 | 27/27 | 9/9 | 21/21 | 9/9 |
| **Kölyök ♂** | 12/14 | 8/8 | 27/29 | 9/11 | 17/20 | 8/8 |
| **Kölyök ♀** | 14/14 | 8/8 | 27/29 | 9/9 | 17/20 | 7/8 |

**9.b. táblázat** Genetikai profilok meghatározásának eredménye alomellenőrző vizsgálatban MP II. lokuszkészlettel. A kölyökkutyák genotípusában sárga kiemelés jelöli azokat a lehetséges apai alléleket, amelyek alapján a feltételezett kan biológiai apasága kizárható

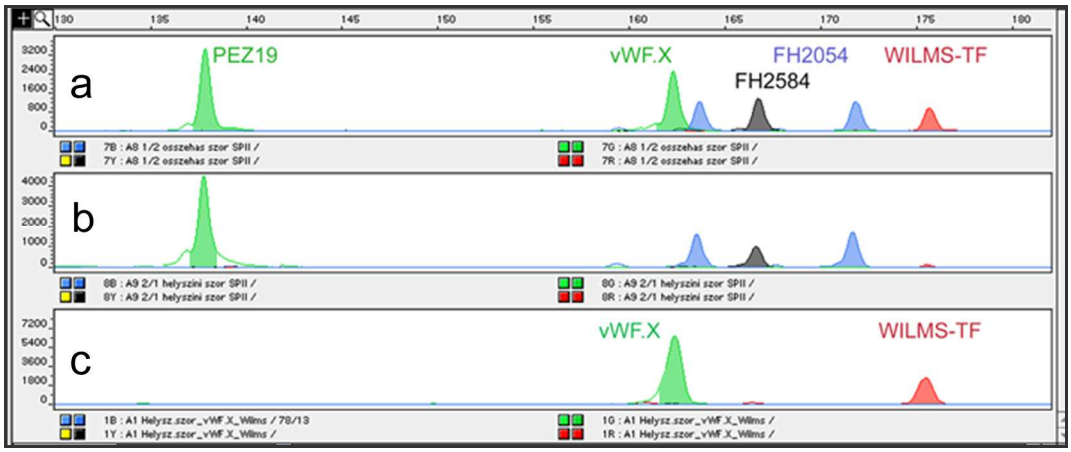
| MP II. | PEZ19 | WILMS-TF | FH2054 | FH2584 | vWF.X | SRY |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Szuka** | 10/10 | 14.2/16.1 | 16/17 | 19/19 | 9/10 | - |
| **Kan** | 10/10 | 13.2/18 | 11/15 | 18 | 9/10 | Y |
| **Kölyök ♂** | 10/10 | 15/16.1 | 16/16 | 19 | 10/10 | Y |
| **Kölyök ♀** | 10/10 | 15/16.1 | 16/17 | 19/21 | 10/10 | - |

### 5.5.2 Hatósági eljárás (rongálással okozott kár)

Az elvégzett, egyedi szintű azonosításra irányuló vizsgálatok összesített eredményét, a felsokszorozott allélek kapilláris elektroforézissel történő elválasztását és kimutatását a **13.** és **14. ábra** szemlélteti.




**13. ábra** Miniplex I. reakcióval végzett vizsgálatok elektroferogramja [a: összehasonlító szőrminta, b: helyszíni szőrminta]




**14. ábra** Miniplex II. (a-b) és diplex (c) reakcióval végzett vizsgálatok elektroferogramja [a: összehasonlító szőrminta, b: helyszíni szőrminta, c: helyszíni szőrminta ismételt vizsgálata két lokuszon]

A Miniplex I. reakcióban a PEZ3 lokusz kivételével, amelynek két allélja erőteljes detektálási (RFU) értékkülönbséget produkált a helyszíni szőrmintában (**13. ábra b**), kiegyensúlyozott sokszorozódást tapasztaltam. A Miniplex II. reakcióban a WILMS-TF marker nagyon kis mértékben amplifikálódott a helyszíni minta esetén, a vWF.X lokusz pedig „kiesett" (*locus drop-out*) (**13. ábra b**). Az érintett két markert diplex vizsgálattal megismételve azonban a helyszínről biztosított szőrmintából is teljes genetikai profilt kaptam (**13. ábra c**).

Mivel az összehasonlító és a helyszínen fellelt szőrmintából megegyező genetikai profilt mutattam ki, igen nagymértékben valószínűsíthető, hogy a vizsgált szőrképletek egyazon kutyától származnak. A meghatározott genotípus pontos, számszerű valószínűsítése (valószínűségi hányadosa) csak a fajtapopuláció genetikai-statisztikai felmérésének birtokában történhet meg.

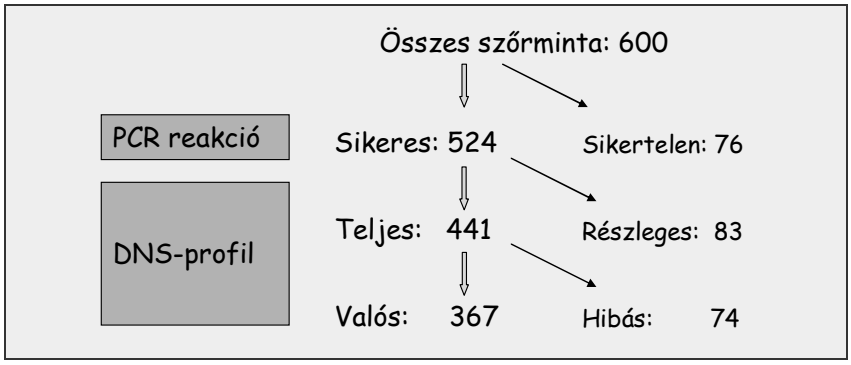
## 5.6 Mutáció lehetősége

### 5.6.1 Szőrszálak csoportosítása fejlődési fázisuk alapján

Tesztelve a három kategória – anagén, katagén, késői katagén (**F8.a-c. ábra**) – szubjektív kialakításának lehetőségét 40, véletlenszerűen újra kiválasztott szőrminta ismételt fénymikroszkópos vizsgálatát végeztem el, amely során 39 esetben az egyes szőrök azonos kategóriájú besorolást kaptak. Az egyetlen eltérést az első sorozatban anagénként dokumentált szőrszál ismételt vizsgálattal katagénként történő besorolása okozta.

### 5.6.2 Genotipizálás eredményessége

Az eredmények csoportosításánál az egyes kategóriákat a szőrfázisok, preparáló eljárások és testtájak, illetve ezek arányszámai közötti eltérések mértékét hasonlítottuk össze (**15. ábra**, **F4.**, **F5. táblázat**).




**15. ábra** Folyamatábra a szőrszálak DNS vizsgálatának főbb eredményeiről

A következő két alfejezetben feltüntetett százalékos számok az adott csoporton belüli összes mintaszámmal való összehasonlításra vonatkoznak.

#### 5.6.2.1 Teljes genetikai profil

Teljes genetikai profilként kezeltem mindazon analízisek eredményei, amelyekben lokuszkiesés nem volt kimutatható, azaz mind a tíz STR marker (StockMarks® Dog Genotyping Kit) tekintetében eredményes volt a vizsgálat.

A DNS tisztítási eljárások közül leghatékonyabb módszernek a szerves kivonás kombinálása a Microcon-30 ultraszűrés-koncentrációval bizonyult (74,7%), de a BioRobot EZ1 is 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 (**10.**, **F4. táblázat**, **F9. ábra**).

**10. táblázat** Különböző DNS-tisztító eljárásokkal kezelt szőrminták száma és a belőlük nyert PCR termékek, teljes DNS-profilok és hibás profilok száma

| Szőr fázis | Összes | PCR termék | Teljes profil | Hibás profil |
|---|---|---|---|---|
| **Szerves** | 486 | 431 | 363 | 54 |
| **BioRobot** | 64 | 55 | 47 | 14 |
| **PelletPaint** | 50 | 38 | 31 | 6 |

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 (**11. táblázat**).

**11. táblázat** Különböző fejlődési stádiumban lévő szőrminták száma és a belőlük nyert PCR termékek, teljes DNS-profilok és hibás profilok száma

| Szőr fázis | Összes | PCR termék | Teljes profil | Hibás profil |
|---|---|---|---|---|
| **Anagén** | 158 | 152 | 137 | 13 |
| **Katagén** | 267 | 243 | 212 | 35 |
| **Késői katagén** | 175 | 129 | 92 | 26 |

A különböző testrészekről gyűjtött, eltérő növekedési fázisú szőrszálak analízisének eredményeit a **12. táblázat** és **16. ábra** foglalja össze. Az eltérő testtájakról származó minták sikeres genotipizálásában nem tapasztaltam szignifikáns eltérést (**F4. táblázat**); a hátszőrök 73,9%-ban, a pofaszőrök 67,6%-ban, a mellső lábszőrök 72,9%-ban, a hátsó lábszőrök pedig 78,0%-ban adtak teljes genetikai profilt.

**12. táblázat** Különböző testtájakról gyűjtött szőrminták száma és a belőlük nyert PCR termékek, teljes DNS-profilok és hibás profilok száma

| Testrész | Összes | PCR termék | Teljes profil | Hibás profil |
|---|---|---|---|---|
| **Hát** | 261 | 237 | 193 | 37 |
| **Pofa** | 105 | 84 | 71 | 8 |
| **Mellső lábak** | 107 | 96 | 78 | 13 |
| **Hátsó lábak** | 127 | 107 | 99 | 16 |

#### 5.6.2.2 Eltérő genetikai profil

Az eltérő genotípusok felmérését az összesen 441, teljes – lokusz kiesés nélküli – DNS-profilt mutató szőrszál kapcsán végeztem el. A vizsgált 10 STR markeren összesen 74 esetben (12,3%) volt megfigyelhető különböző típusú eltérés a tényleges genetikai profiltól (**13. táblázat**, **F10.a-b. ábra**).

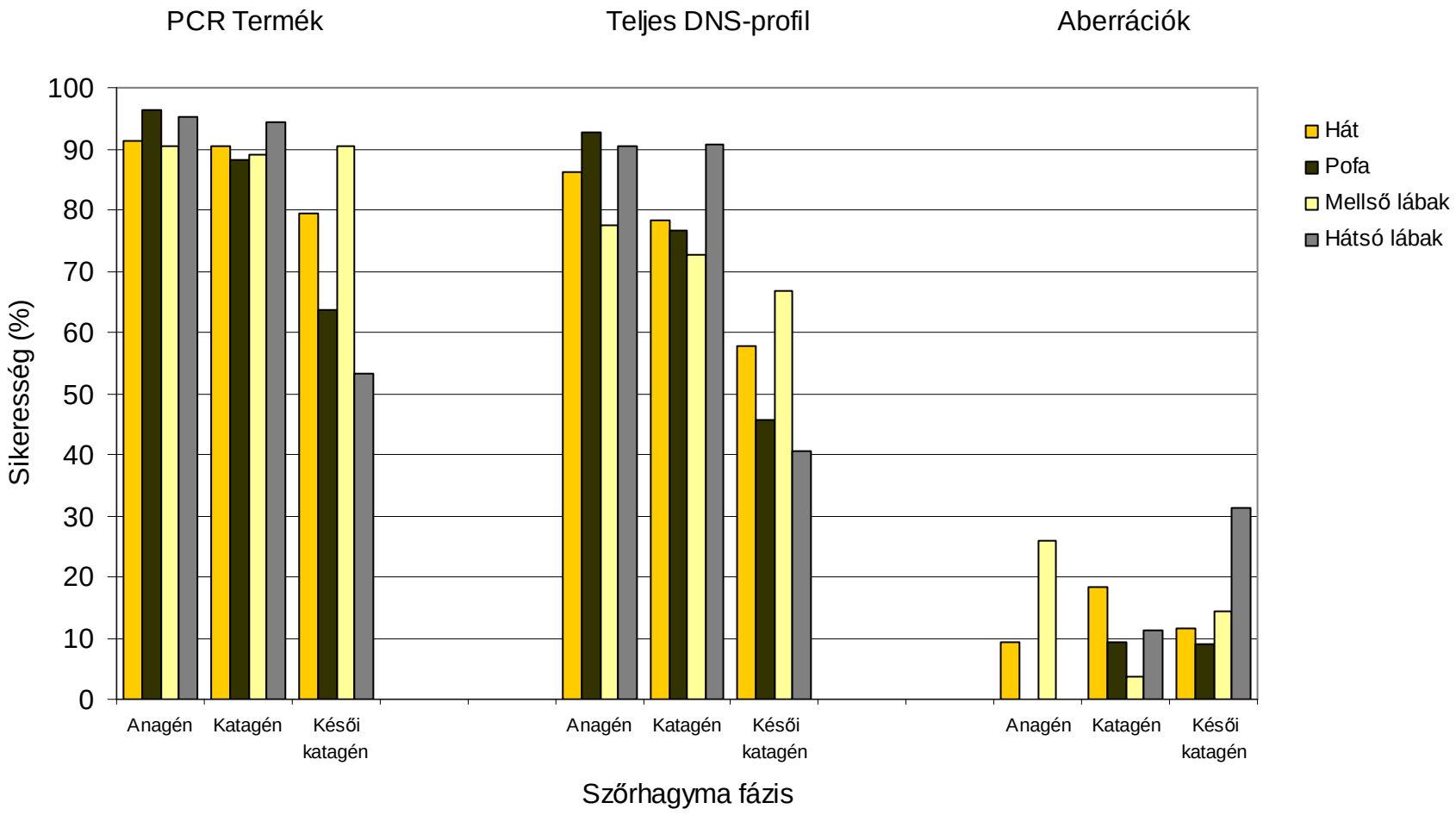
**13. táblázat** Az egyed valós genetikai profiljához viszonyított kiegyenlítetlen, allél-kiesést, extra-, vagy aberráns allélt mutató mintázatok száma 10 STR markeren

| | PEZ1 | FH2054 | FH2010 | PEZ5 | PEZ20 | PEZ12 | PEZ3 | PEZ6 | PEZ8 | FH2079 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Valós DNS-profil** | **12/13** | **11/16** | **10/10** | **10/10** | **13/13** | **12/17** | **25/25** | **24/27** | **13/14** | **6/6** | **∑** |
| Imbalansz | 9 | 3 | | | | 2 | | 1 | 4 | | 19 |
| Allélkiesés | 3 | 1 | | | | 3 | 6 | 2 | 1 | | 16 |
| Extra allél | 5 | 5 | 2 | 1 | 3 | 7 | 11 | 3 | 1 | | 38 |
| Aberráns | | | | | | 1 | | | | | 1 |
| **Összes (db)** | **17** | **9** | **2** | **1** | **3** | **13** | **17** | **6** | **6** | **0** | **74** |

Kiegyenlítetlen – imbalansz – allélekként azonosítottam azokat a heterozigóta alléleket, amelyek allélpárjait az elektroforézis során kimutatott jelerősség közötti, 65%-ot meghaladó különbség jellemzett. Extra allélként kategorizáltam azokat a műtermékeket, melyek pozíciójuk és csúcsmagasságuk alapján az összehasonlító minta genotípusának ismerete nélkül valós allélként kerülhettek volna meghatározásra. Aberráns profilként soroltam be az egy lokuszon belül megfigyelt, valós allél-kieséssel párhuzamosan megjelenő extra allél együttest. Két szőrminta kivételével a valós allélektől eltérő mintázattípusokat mintánként csak egy-egy lokuszon figyeltünk meg.

A BioRobot EZ1 illetve PelletPaint módszerrel tisztított mintáknál a PEZ3 lokuszon összesen hat esetben volt megfigyelhető a 25-ös allél kiesése, de mivel a többi kilenc markeren jellemzően kifejezett (RFU > 6000) és kegyensúlyozott jeleket kaptam, ezeket a profilokat nem a részleges (lokuszkiesést mutató) hanem aberráns típusként soroltam be. A PEZ1 lokusz mellett a PEZ3 marker mutatta összességében is a legtöbb, tévesen vagy egyáltalán nem meghatározható alléltípusokat a 10 tesztelt mikroszatellita közül. A PEZ3 markeren figyeltem meg legtöbbször extra allélt (11/17 - 65%), illetve a PEZ1 lokuszon volt leggyakrabban kimutatható az egy lokuszon belüli kiegyenlítetlen allél-sokszorozódás (9/17 - 53%) (**13. táblázat**).

A DNS tisztítási eljárások vonatkozásában téves genetikai profil legnagyobb mértékben (21,9%) a BioRobot EZ1 eljárással volt tapasztalható (**10. táblázat**), ami szignifikáns eltérést (11,1%) mutatott a szerves kémiai-, nem szignifikáns különbséget pedig a PelletPaint (12%) módszerrel történt összevetés során (**F4. táblázat**, **F9. ábra**). Az egyed valós genetikai profiljától eltérő genotípusok gyakorisága az anagén (9,5%) illetve katagén (16,5%) stádiumú szőröket összehasonlítva, a késői katagén (28,3%) állapotú szőrökben szignifikáns eltérést mutatott (**11.**, **F4. táblázat**).

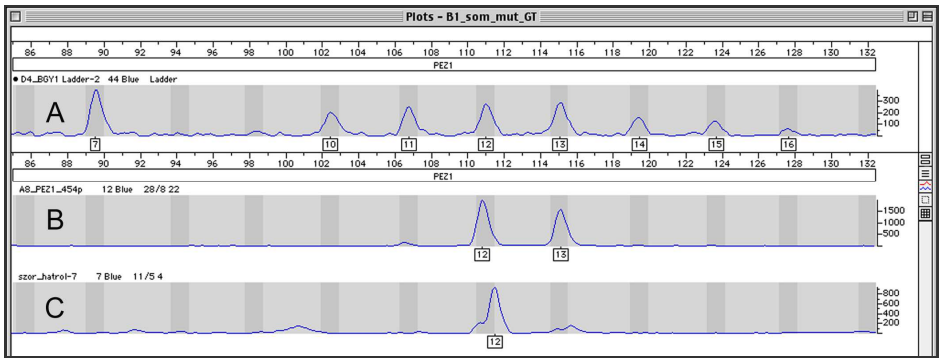



**16. ábra** Négy különböző testrészről (hát, pofa, mellső lábak, hátsó lábak) gyűjtött, eltérő növekedési fázisú (anagén, katagén, késői katagén) szőrökön elvégzett PCR és genotipizálás sikeressége, valamint az aberráns allélek megjelenésének gyakorisága

Az aberrációk százalékos eloszlásában megfigyelt, testtájak szerinti különbségek – hát 19,2%, pofa 11,3, mellső lábak 16,7%, hátsó lábak 16,2% (**12. táblázat**) – nem bizonyultak szignifikánsnak (**16. ábra**, **F4. táblázat**).

### 5.6.3 Ismételt vizsgálatok

Az eltérések okának felderítése, valamint a technikai hibák kiszűrése érdekében ismételt monoplex és/vagy új multiplex sokszorosításokat végeztem. Ezek eredményeként csak egyetlen szőrminta esetén volt igazolható eltérés (PEZ1 lokusz), a többi esetben az ismételt vizsgálatok eredménye a tényleges DNS-profiltól nem különbözött (**17. ábra**).




**17. ábra** Szomatikus mutáció a PEZ1 lokuszon [A: alléllétra, B: a donor egyed valós genotípusa, C: a 13-as allél kiesése hátszőrben (ismételt monoplex PCR)]

# 6 MEGVITATÁS

Az egyed azonosságának illetve leszármazásának genetikai alapon történő meghatározásához olyan markerek szükségesek, amelyek az adott populációban megfelelő szintű sokféleséggel rendelkeznek és genetikai kapcsoltsági viszonyaik ismertek (Halverson, 2005b). Mindemellett standard módszerekkel egyértelműen és megismételhető formában nemzetközi összehasonlításra alkalmas módon kell meghatározhatónak lenniük. Különösen a bomlott, csekély mennyiségben rendelkezésre álló minták analízisénél elengedhetetlen a vizsgálati rendszer nagyfokú érzékenysége. Azonossági vagy leszármazási kérdések tisztázásakor a genetikai vizsgálati eredmények helyes értelmezése pedig csak megfelelő genetikai-statisztikai elemzésekkel együtt valósítható meg.

## 6.1 Az új, rövid markerek meghatározása és leírása

A mikroszatelliták ismétlődő egységein alapuló nomenkletúrájának kialakításához az allélok szekvenciájának meghatározása elengedhetetlen követelmény (Gill és mtsai, 1994, 1997, Bär és mtsai, 1997). A munkám során vizsgált hét STR lokuszból három marker szerkezete egyszerű ismétlődésű mintázattal (PEZ21, PEZ19, vWF.X), négy pedig összetett motívummal (PEZ16, REN124F09, WILMS-TF, FHC2584) rendelkezik. Az összetett struktúrára az ismétlődő egységekben az egy-bázispáros variancia illetve a köztes allélek – interallélek – megjelenése jellemző (**10.**, **F6. ábra**). A PEZ16 marker esetében számos, egy bázispár eltéréssel reprezentált változatosságot mutattam ki az ismétlődő régióban, amelynek következményeként az azonos hosszúságú, de eltérő konformációjú allélek elektroforetikus mozgása is különböző. Ennek ismeretében – bár kimutatásuk során méretükben akár 1,5 bázispárnyi „lötyögés” is tapasztalható – ezeket az egy bázispáros eltéréseket mutató alléleket – ún. mobilitási variánsokat - azonos névvel azonosítottam. Esetenként az interallélek megjelenése a határoló régiók deléciós és addíciós változatainak (FH2584) illetve magukban az ismétlődő egységekben megnyilvánuló deléciós, inszerciós mutációknak köszönhető (WILMS-TF). Azonos allélhossz mellett megfigyelhető szekvenciális változékonyság a határoló régiókban nem volt kimutatható.

A szekvencia eredmények alapján egyértelmű, a laboratóriumok közötti összehasonlításra alkalmas, a szakmai ajánlásoknak megfelelő allélnevezéktant (Budowle, 2005) alakítottam ki, amely törvényszéki alkalmazásra is javasolható. Az ismétlődő egységek számán alapuló, hivatkozott nevezéktan javaslatokat (Eichmann és mtsai, 2004a, Coyle, 2007) a WILMS-TF és vWF.X markerek esetében eredményeim nem módosítják, a többi vizsgált lokusszal kapcsolatos nevezéktani ajánlás mindeddig nem állt rendelkezésre.

## 6.2 A multiplexek technikai jellemzői, genetikai profil meghatározása, érzékenység

Az idő- és költséghatékonyság érdekében, valamint – kis kópiaszámú minták esetén – a korlátozott mennyiségben rendelkezésre álló DNS-minták következtében, a vizsgálandó STR lokuszok minél kevesebb számú PCR reakcióban történő sokszorosítása szükséges. A multiplex rendszerek létrehozásánál olyan markereket célszerű kombinálni, ahol a genetikai változatosság lehetőség szerint a legnagyobb. Az ilyen, általában hosszú fragmensmérettel is rendelkező, hiperpolimorf lokuszok meghatározása azonban legtöbbször problematikus, és általában csak a jó minőségű biológiai minta vizsgálatára korlátozza felhasználhatóságukat.

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 a PCR termékek hosszát lerövidítettem (**2.**, **6. táblázat**). A detektált allélek mérettartománya így egyik vizsgáló rendszerben (MP I. és MP II.) sem haladja meg a 200 bázispárt (**7. ábra**), aminek köszönhetően a különböző mértékben degradált minták mikroszatellita analízisének sikeressége javulhat (Wiegand és mtsa, 2001, Butler és mtsai, 2003). Eredményeim másik, hasonló törekvésű külföldi munkával (Coyle, 2007) összehasonlítva innovatív fejlesztésnek tekinthetők. A hivatkozott munkacsoport új primerek tervezésével négy mikroszatellita markerből álló, 100-240 bp tartományt lefedő multiplex rendszert alakított ki.

A PCR technika sajátsága, hogy nem minden esetben következik be a késztermékek szál végi adenilációja (adenin addíciója), ami miatt egy bázispárral rövidebb méretű termékek – ún. „vállas”, vagy kettős csúcsok - is képződnek a reakció során (**8. ábra**). Ezek az elektroforetikus elválasztás során detektált melléktermékek az eredmények helyes kiértékelését, valamint az egy bázispárnyi különbséggel rendelkező interallélek megkülönböztetését nagymértékben megnehezítik, illetve ellehetetlenítik. Ezt kiküszöbölendő a reverz primerek 5’ végét GTTCTT szekvenciával („PIG-tailing”) toldottam meg. A meghosszabbított szál segítségével a Taq-polimeráz enzim az adenin hozzáadását a kész fragmenshez minden esetben elvégzi, így a valójában azonos allélek hossza megegyezővé, a téves genotipizálás pedig elkerülhetővé válik (Brownstein és mtsai, 1996).

A doktori munkám során kifejlesztett, két, kutya-specifikus multiplex PCR-ben tizenegy „mini-STR” lokusz és egy Y kromoszómás marker sokszorosítható fel (**3. táblázat**, **7. ábra**). A trimer PEZ3 (Pádár, 2006), a pentamer REN124F09 és a hexamer szerkezetű vWF.X kivételével az összes többi mikroszatellita lokusz tetramer ismétlődésekkel rendelkezik. Mivel ezek a struktúrák a széles körben alkalmazott dinukleotidokkal ellentétben kevésbé hajlamosak a polimeráz enzim ”csúszásából” adódó műtermékek képzésére, jóval pontosabb és egyértelműbb allélmeghatározást tesznek lehetővé (Meldgaard és mtsa,

1997). Az Y kromoszómán elhelyezkedő SRY ivar-specifikus marker a kan kutyák esetén az MP II. reakcióban mutatható ki, míg nőstény kutyák vizsgálatánál 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 (Gill, 1995). Ennek jelentőssége elsősorban az összetett szerkezetű, nagyszámú allélvariánst tartalmazó STR lokuszok esetében kiemelkedő. Az alléllétrák összeállításánál főként a nagyobb előfordulási gyakoriságú, egész számú ismétlődéseket tartalmazó, szekvenált alléleket alkalmaztam. Az általam előállított reprodukálható allélkoktélok, valamint a módosított genotipizáló szoftver alkalmazásával a köztes allélek meghatározása is biztonságosan kivitelezhetővé vált.

A két vizsgálórendszer (MP I. és MP II.) érzékenységét – mivel a csökkentett térfogat növeli a szenzitivitást (Leclair és mtsai, 2003) – 20 µl végtérfogatú PCR reakcióban teszteltem, és mindkét reakcióelegyben az 50 pg DNS templát mennyiség – kb. 10 diploid sejt – elegendőnek bizonyult a teljes DNS-profil generálására (**12. ábra**). Az a megfigyelésem, hogy az MP II. miniplex rendszer maximális érzékenysége az MP I.-hez képest csak 80%-kal csökkentett primerkoncentrációval volt elérhető, arra utal, hogy a két miniplex rendszer eltérő optimális primer koncentráció igényét feltehetőleg az MP II. primereinek kompetíciós gátlása eredményezi.

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 (Lederer és mtsai, 2001). A standardizálási optimumot el nem érő, alacsony kópiaszámú (LCN) minták ezért az alkalmazott módszerektől függetlenül is speciális vizsgálati stratégiát, megfelelési és minőségirányítási követelményeket igényelhetnek. A sztochasztikus hatások mérlegeléséhez – a genotípus téves meghatározásának elkerülése érdekében – a kapott eredményeket lehetőség szerint párhuzamos vagy ismételt vizsgálatokkal ajánlott ellenőrizni (Gill, 2001, The Crown Prosecution Service, 2008, Graham, 2008).

## 6.3 Statisztikai jellemzők

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 (**F7.a-k. ábra**, **8. táblázat**). Az általában igazságügyi szempontból is megfelelőnek minősíthető markerek magas ($H_{obs} \geq 0,6$) heterozigozitási értékkel rendelkeznek, amely az általam alkalmazott markerkészletben öt lokusznál figyelhető meg.

A várt és megfigyelt heterozigozitás között mind a 10 lokuszon észlelt szignifikáns - a kalkulált standard hibánál nagyobb - különbség a felmért kutyacsoport genetikai egyensúlyának hiányára utalnak. Az FH2584 marker esetében a szembetűnő ($H_{exp}$ = 0,89, $H_{obs}$ = 0,31) eltérésre az X-kromoszómális lokalizáció adhat magyarázatot.

A legmagasabb értékeket minden szempontból a WILMS-TF lokusz mutatta, ami szerkezetbeli összetettségének, valamint nagyszámú – a markerek közötti legtöbb, 14 megfigyelt – köztes alléljának köszönhető. Ugyanezen lokuszon kimutattam a magyarországi kutyaállományban a „9”-es allélt, amely külföldi hivatkozásokban nem szerepel (Zenke, 2009). A legkisebb heterozigozitási értékekkel bíró lokuszokat jelen vizsgálatban a viszonylag alacsony allélszám (n ≤ 6) és az allélgyakoriságok egyenlőtlen eloszlása jellemzi, amelynek extrém példája a vWF.X-8 allél 53,9%-os megfigyelt előfordulási gyakorisága.

A polimorfizmus információ (PIC) értékét a mikrovariáns allélek megjelenése növelheti (Moller és mtsai, 1994, Brinkmann és mtsai, 1995), ezzel szemben a PEZ3 lokusz – amely köztes alléleket nem, viszont sok, egész számú allélvariánst tartalmaz – az interallélekkel rendelkező FH2584 lokuszéval közel azonos PIC értékkel bír.

A 11 lokuszra számított kombinált kizárhatósági- (PE) és megkülönböztetési valószínűségek (PD) az azonos elvű humán kriminalisztikai értékeléshez viszonyítva ($PE_{min}$ > 99,9953% és $PD_{min}$ > 99,999999999%) hasonlóan magas értékeket mutatnak. Az általam összeállított lokuszkészlet összevetve 79 fajta egyedeinek (n = 614) mintáján felmért 10 STR marker PE és PD értékeivel (Zenke, 2010) hasonlóan megbízható kizárhatóságot illetve megkülönböztethetőséget tesz lehetővé. Részben eltérő markerkészlete miatt kiegészítő alkalmazásával az egyedi azonosítás és leszármazás nagyobb valószínűséggel állípítható meg. Mindazonáltal egyes – különösen az erősen beltenyésztett – fajtákon belül a bővített markerkészlet használata javasolt. További vizsgálatokat igényelne a magyarországi kutyapopuláción már felmért, nagy változatosságot mutató lokuszok kombinálási lehetősége, valamint új, ún. „hiperpolimorf” markerek – pl. FH2132, ZUBECA6, C38 – további bevonása (Asch és mtsai, 2009) is.

A vizsgált markerek – a PEZ19, FH2054 és vWF.X lokuszok kivételével – szignifikánsan eltértek a Hardy-Weinberg egyensúlytól, ami a 75 különböző fajta együttes vizsgálata miatt a populáció heterogén voltával (Wahlund-hatás) illetve a lehetséges beltenyésztéssel magyarázható (Evett és mtsa, 1998). Az 55 lokuszpáronkénti összehasonlításból egy esetben megfigyelt (PEZ5 és REN124F09 lokuszok közötti) asszociáció nem fizikai jellegű – hiszen az adott párok különböző kromoszómán lokalizálódnak –, így az elvetett függetlenségi hipotézist az előbbekben említett lehetőségeken kívül a HW-egyensúlytól való jelentős eltérés is magyarázhatja (Excoffier és mtsa, 1998).

A felmért kutyaállományban – annak heterogén jellege következtében – nem meglepő az egyensúlyi állapottól való szignifikáns eltérés, hiszen a random párosodás és ezzel együtt a génkicserélődés lehetősége nem csak a fajták (mint alpopulációk) között, de még a fajtákon belül is igen korlátozott. Az eredmények alapján levonható az a következtetés, hogy a statisztikai elemzésekhez a viszonylag sok, különböző fajták összevonása révén felállított adatbázis megbízható módon, a vizsgálatok téves értékelésének lehetősége nélkül nem használható fel. A származási valószínűség statisztikai megállapításával szemben támasztott követelményeknek biztonsággal ezért csak az adekvát (fajta)populációkból álló referencia adatbázisok felelhetnek meg (Zenke és mtsai, 2006, Kanthaswamy és mtsai, 2009).

## 6.4 Gyakorlati alkalmazások

Az utóbbi években – a *Canine Genome Project* előrehaladtával – egyre növekvő igény tapasztalható a kutya eredetű anyagmaradványok azonosítására a tenyésztői- és jogalkalmazói gyakorlatban egyaránt (Eichmann és mtsai, 2004b, Halverson és mtsa, 2005a). Napjainkra már a legtöbb ebtenyésztő klub a DNS-vizsgálatokat minden olyan esetben kötelezővé teszi, amikor a vélt származással kapcsolatban vétlen vagy szándékolt tévedés gyanúja felmerül.

Leszármazási esettanulmányom kapcsán a 12 markerből összeállított készletet olyan kutyafajta (tenyészet) kérdéses származásának eldöntésében is sikerrel alkalmaztam, ahol a beltenyésztettség – az irányított párosításoknak köszönhetően – nagyobb mértékben jelenik meg, mint a felmért, vegyes fajtákat tartalmazó csoportban. Hatósági esettanulmányom alátámasztja a kifejlesztett miniplex vizsgálórendszerek megfelelő specifitását és érzékenységét helyszíni szőrminták sikeres vizsgálhatóságára.

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 és tervezésében is (Zenke és mtsai, 2007).

## 6.5 Alkalmazási korlátok

Mivel az egyes kutyaszőrök genotípusának meghatározása sok esetben sikertelen, a szőrhagyma növekedési fázisának mikroszkópos meghatározása, valamint az optimális DNS-kinyerési és sokszorozási technikák alkalmazása alapvetően befolyásolhatja az eredményességet (Linch és mtsai, 1998, Vigilant, 1999, Pfeiffer és mtsai, 2004). Bár a szőrképletek STR vizsgálata során sok esetben figyelhető meg hibás allélmintázat (Rolf és

mtsai, 2002, Clayton és mtsai, 2004), mindössze néhány kutatás foglalkozik a szőr(ök)ből kimutatott genetikai profil megbízhatóságával (Silvia és mtsai, 2006, Zenke és mtsai, 2008).

### 6.5.1 Szőrfejlődési fázisok meghatározása

A késői katagén stádiumú kutyaszőrökből nyert teljes DNS-profilok száma szignifikánsan alacsonyabbnak, ezen belül az eltérő genotípusok aránya viszont jelentősen nagyobbnak bizonyult az anagén és katagén szőrökhöz képest (**F4. táblázat**). Eredményem – a humán hajvizsgálatokhoz hasonlóan (Linch és mtsai, 1998) – korrelál a szárvég morfológiája alapján becsülhető sikeres nukleáris genotipizálás várható eredményességével. Általában a telogén fázisú, rátapadt gyökérhüvelyi sejteket nem tartalmazó szőrszálak és a hagymával nem rendelkező szőrtöredékek genetikai tipizálása elfogadható sikerességgel csak mitokondriális DNS-ből kiindulva történhet (Wilson és mtsai, 1995a-b), ezért az adott szőrképlet típusának előzetes mikroszkópos ellenőrzése elengedhetetlen. A hullott, telogén stádiumban lévő szőrök is rendelkezhetnek rátapadt gyökérhüvelyi sejtekkel, ezek analízise azonban változó sikerességű. Majom eredetű hullott szőrök vizsgálatánál például 28%-ban sikerült a nukleáris mikroszatelliták sokszorozása – míg a mitokondriális DNS-nél 85%-ban (Vigilant, 1999). Hullott emberi hajszálak esetén azonban csak 8,3%-ban kaptak nukleáris PCR terméket, míg a mtDNS meghatározására tett kísérletek eredményessége 96% volt (Allen és mtsai, 1998).

### 6.5.2 DNS kivonási technikák összehasonlítása

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-koncentrálás („szerves kémiai” módszer) bizonyult. Eredményeim a korábbi adatokat – miszerint hullott szőrök esetén a Chelex gyantás DNS-kivonás hatékonyabb mind a szerves, mind pedig a Qiagen kémián alapuló izolálásoknál (Vigilant, 1999) – nem támasztják alá. Tapasztalatom szerint a szerves kémiai tisztítási mód engedi meg leginkább azokat az adekvát módosításokat (pl. beavatkozás az egyes lépések inkubációs idejébe, az alkalmazott kemikáliák és a végső extraktum térfogatába), amelyek a szőrminták egyedi analízisét optimálissá tehetik.

### 6.5.3 Különböző testrészekről gyűjtött szőrszálak analízise

Az elvégzett statisztikai elemzések alapján (**F4. táblázat**) az egyes testrészekről gyűjtött szőrök DNS vizsgálatának eredményeiben nincs szignifikáns különbség, ugyanakkor a mintagyűjtés során azt tapasztaltam, hogy a pofáról gyűjtött szőrök közt telogén állapotú minták nagyobb arányban találhatók. Amennyiben eseti mintaként – pl. harapásnyomok környékéről – pofaszőr áll rendelkezésre, számolni kell a megnövekedett arányú sikertelen vizsgálatok lehetőségével.

### 6.5.4 A valós genetikai profiltól eltérő genotípusok detektálása

Az STR genotípusok meghatározása során megfigyelt abnormális mintázatok okának intenzív tanulmányozása (Rolf és mtsai, 2002, Clayton és mtsai, 2004, Tvedebrink és mtsai, 2009) ellenére az egyedek szőrképleteiben előforduló szomatikus mutáció gyakoriságának felmérése nemzetközileg csak humán vonatkozásban hivatkozható. Valós mutációként azonosított – a személy valós DNS-profiljától eltérő di-, illetve triallélikus mintázatként megnyilvánuló – eseményt 190 teljes genotípust adó emberi haj- és nemi szőrszál mikroszatellita meghatározása kapcsán összesen hat (3,16%) esetben mutattak ki (Silvia és mtsai, 2006).

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, amelyek azonban az ellenőrző vizsgálatokkal kiküszöbölhető módon – egyetlen mutációs esemény kivételével – technikai okokra és korlátokra vezethetők vissza.

### 6.5.5 Szomatikus mutáció előfordulása kutyaszőrben

Az ismételt vizsgálatokkal is alátámasztott allélkiesés, illetve extra allél jelenléte – mely egy repetíciós egységgel tér el a valós profiltól – nagymértékben valószínűsíti az ún. *stepwise* mutációs eseményt, amelynek bekövetkezésével az eseti minták analízisekor számolni kell (Pádár és mtsai, 2002). Ezért az igen hasonló genetikai profilok származásának mérlegelésénél – a téves kizárás elkerülése érdekében – az eredményt, ha van rá lehetőség, egy másik mintán történő vizsgálattal ajánlott megerősíteni. Amennyiben erre nincs mód, célszerű lenne a mozaikosság - mutáció és kimérizmus - esélyét beleépíteni a statisztikába.

Vizsgálataimmal a PEZ1 lokuszon a „13”-as allél kiesése multi- és monoplex vizsgálatokkal is igazolható volt, így az szomatikus mutációra vezethető vissza (**17. ábra**). Ez a vizsgált állat kültakarójának különböző genotípusú sejtcsoprtokból álló genetikai

mozaikosságát támasztja alá. A szőrmintából kinyert DNS extraktum csekély mennyisége nem tette lehetővé a mutáció típusának pontos – pl. repetíciós vagy határoló régióban történt mutáció – meghatározását célzó újabb vizsgálatok elvégzését, amelyekkel tisztázhatóvá vált volna, hogy a primer kötőhelyét érintő módosulás vagy egy ismétlődő egység elvesztése történt a DNS replikáció során.

# 7 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

## 7.1 Rövid mikroszatellita multiplexek tervezése

- Hét új, Magyarországon eddig nem vizsgált mikroszatellita marker (PEZ21, PEZ16, REN124F09, PEZ19, WILMS-TF, FH2584 és vWF.X) polimorfizmusának felmérése hazai kutyamintákon (75 fajta 116 egyedéből álló kutyapopulációban).
- Öt marker (PEZ16, REN124F09, PEZ19, WILMS-TF, FH2584) PCR termék-méretének lerövidítése 200 bázispárt nem meghaladó mérettartományra új primer-szekvenciák tervezésével, figyelembe véve azok specifikusságát, stabilitását és több lokusz együttes sokszorosításának (koamplifikációjának) lehetőségét.
- 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, FH2584, vWF.X, SRY) – miniplexben.

## 7.2 Genotipizálás

- 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).
- A magyarországi kutyaállományban megfigyelt, meghatározott bázissorrendű referencia allélek keverékéből összeállított alléllétrák kialakítása az alkalmazott lokuszokhoz.
- A Genotyper 2.5.2. genotipizáló szoftver megírása az alkalmazott allélkoktélokhoz és a miniplexek lokuszaihoz, amelynek segítségével a detektált genotípusok félautomata módon meghatározhatók.

## 7.3 Populációgenetikai alkalmazás

- 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.

## 7.4 Kimutatási érzékenység

- A kifejlesztett két miniplex reakció alacsony kópiaszámú kiindulási mintákhoz történő érzékenyítésével kb. 10-20 testi sejtből kivont, 0,05-0,1 ng DNS elegendő a genetikai profil megállapítására.

## 7.5 Gyakorlati alkalmazhatóság

- 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.

## 7.6 Alkalmazási korlátok meghatározása

- Kutya eredetű szőrökben az STR markerekben bekövetkező szomatikus mutáció felmérésére irányuló vizsgálatokból azt igazolják, 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.
- 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® Dog Genotyping Kit) körültekintő használatára hívja fel a figyelmet.

# 8 IRODALOM

**Allen, M.,** Engström, AS., Meyers, S., Handt, O., Saldeen, T., von Haeseler, A., Pääbo, S., Gyllensten, U. **(1998)** Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. Journal of Forensic Sciences 43:453-64

**Altschul, SF.,** Madden, TL., Schäffer, AA., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, DJ. **(1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new genewration of protein database search programs. Nucleid Acid Res. 25:3389-402

**Anslinger, K,** Bayer, B., Rolf, B., Keil, W., Eisenmenger, W. **(2005)** Application of the BioRobot EZ1 in a forensic laboratory. Legal Medicine. 7(3):164-68

**Applied Biosystems (2001)** StockMarks® Canine I Ver Paternity PCR Typing Kit Protocol. PN 4307481. Foster City, CA

**Applied Biosystems (2003)** BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit Protocol. Foster City, CA

**Applied Biosystems (2005)** StockMarks® Dog Genotyping Kit Protocol. PN 4307481. Foster City, CA

**Asamura, H.,** Sakai, H., Ota, M., Fukushima, H. **(2007)** MiniY-STR quadruplex systems with short amplicon lengths for analysis of degraded DNA samples. Forensic Science International: Genetics 1:56-61

**Asch, B.,** Alves, C., Gusmao, L., Pereira, V., Pereira., F., Amorim, A. **(2009)** A new autosomal STR nineplex for canine identification and parentage testing. Electrophoresis, 30(2):417-23

**Balogh, MK.,** Burger, J., Bender, K., Schneider, PM., Alt, KW**. (2003)** STR genotyping and mtDNA sequencing of latent fingerprint on paper. Forensic Science International 137:188-95

**Bär, W.,** Kratzer, A., Machler, M., Schmid, W. **(1988)** Postmortem stability of DNA. Forensic Science International 39(1):59-70

**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. International Journal of Legal Medicine 110:175-76

**Binns, MM.,** Holmes, NG., Marti, E., Bowen, N. **(1995)** Dog parentage testing using canine microsatellites. Journal of Small Animal Practice 36:493-97

**Botstein, D.,** White, RL., Skolnick, M., Davis, RW. **(1980)** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics. 32:314-31

**Bourguignon, L.,** Hoste, B., Boonen, T., Vits, K., Hubrecht, F. **(2008)** A fluorescent microscopy-screening test for efficient STR-typing of telogen hair roots. Forensic Science International: Genetics 3:27-31

**Breen, M.,** Langford, CF., Carter, NP., Holmes, NG., Dickens, HF., Thomas, R. **(1999)** FISH mapping and identification of canine chromosomes. Journal of Heredity 90:27-30

**Breen, M.,** Bullerdiek, J., Langford, CF. **(1999)** DAPI banded karyotype of the domestic dog (Canis familiaris) generated using chromosome-specific paint probes. Chromos. Res. 7:401-06

**Breen, M.,** Jouquand, S., Reiner, C., Mellersh, CS., Hitte, C., Holmes, NG. **(2001)** Chromosome-specific single-locus FISH probes allow anchorage of an 1800-marker integrated radiation-hybrid/linkage map of the domestic dog genome to all chromosomes. Genome Res. 11:1784-95

**Breen, M.,** Hitte, C., Lorentzen, TD., Thomas, R., Cadieu, E., Sabacan, L. **(2004)** An integrated 4249 marker FISH/RH map of the canine genome. BMC Genom. 5:65

**Brinkmann, B.**, Moller, A., Wiegand, P. **(1995)** Structure of new mutations in 2 STR systems. International Journal of Legal Medicine 111:267-72

**Brinkmann, B.,** Klintshar, M., Neuhuber, F., Huhne, J., Burkhard, R. **(1998)** Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. American Journal of Human Genetics 62:1408-15

**Brownstein, MJ.**, Carpten, D., Smith, JR. **(1996)** Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA Polymerase: Primer modification that facilitate genotyping. BioTechniques. 20:1004-10

**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. American Journal of Human Genetics 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. International Journal of Legal Medicine 119(5):295-02

**Butler, J.,** Shen, Y., McCord, B. **(2003)** The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. Journal of Forensic Sciences 48:1054-64

**Butler, JM. (2005)** Forensic DNA typing. Biology technology, and genetics of STR markers (Chapter 5.). Second edition. Elsevier Academic Press, ISBN 0-12-147952-8

**Chatt, A.,** Katz, SA. **(1988)** Hair analysis, applications in the biomedical and environmental sciences. VCH Publishers, New York

**Chung, DT.,** Drábek, 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. Journal of Forensic Sciences 49(4):733-39

**Clark, JM. (1998)** Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. Nucleic Acid Res. 16:9677-86

**Clayton, TM.,** Guest, JL., Urquhart, AJ., Gill, PD. **(2004)** A genetic basis for anomalous band patterns encountered during DNA STR profiling. Journal of Forensic Sciences 49(6):1207-14

**Comey, CT.,** Koons, BW., Presley, KW., Smerick, JB., Sobieralski, CA., Stanley, DM., Baechtel, FS. **(1994)** DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. Journal of Forensic Sciences 39:1254-69

**Coyle, HM.** (edit) **(2007)** Nonhuman DNA Typing: Theory and Casework Applications (Chapter 4.). CRC Press ISBN 978-0-8247-2593-8

**De Munnynck, K.,** Van de Voorde, W. **(2002)** Forensic approach of fatal dog attacks: a case report and literature review. International Journal of Legal Medicine 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. Animal Genetics 35:14-17

**Edwards, A.,** Civitello, A., Hammond, HA., Caskey, CT. **(1991)** DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. American Journal of Human Genetics 49:746-56

**Eichmann, C.,** Berger, B., Parson, W. **(2004a)** A proposed nomenclature for 15 canine specific polymorphic canine STR loci for forensic purposes. International Journal of Legal Medicine 118:249-66

**Eichmann, C.,** Berger, B., Reinhold, M., Lutz, M., Parson, W. **(2004b)** Canine specific STR typing of saliva traces on dog bite wounds. International Journal of Legal Medicine 118:337-42

**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 Science International 151:37-44

**Ellegren, H. (2004)** Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics 5(6):435-45

**Excoffier, L.,** Slatkin, M. **(1998)** Incorporating genotypes of relatives into a test of linkage disequilibrium. American Journal of Human Genetics 62:171-80

**Evett, IW.,** Weir, BS. **(1998)** Interpreting DNA evidence (Chapter 4.). Sinauer Associates Inc. Publishers ISBN 0-87983-155-4

**Fantin, D.,** Bozzini, M., Gaiser, C., Halverson, J., Bates, S., Ziegle, J. **(1996)** Automating canine parentage verification. Animal Genetics 27(Suppl. 2):30

**Francisco, LV.,** Langston AA., Mellersh, CS., Neal, CL., Ostrander, EA. **(1996)** A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for genetic mapping. Mammalian Genome 7(5):359-62

**Gill, P.,** Kimpton, CP., d'Aloja, E., Andersen, JF., Bär, W., Brinkmann, B., Holgersson, S., Johnsson, V., Kloosterman, AD., Lareu, MV., Nellemann, 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 Science International 65:51-59

**Gill, P.,** Kimpton, CP., Urquhart, A., Oldroyd, N., Millica, ES., Watson, SK., Downes, TJ. **(1995)** Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework – a strategy for the future. Electrophoresis. 16:1543-52

**Gill, P.,** Sparkes, RL., Kimpton, CP. **(1997a)** Development of guidelines to designate alleles using an STR multiplex system. Forensic Science International 89:185-97

**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. **(1997b)** Consideration from the European DNA Profiling Group (EDNAP) concerning STR nomenclature. Forensic Science International 87:185-92

**Gill P. (2001)** Application of low copy number DNA profiling. Croatian Medical Journal 42(3):229-32

**Graham, EAM., (2008)** DNA reviews: low level DNA profiling. Forensic Sci. Med. Pathol. 4:129-31

**Guo, SW.,** Thompson, EA. **(1992)** Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics 48:361-72

**Guyon, R.,** Lorentzen, TD., Hitte, C., Kim, L., Cadieu, E., Parker, HG. **(2003)** A 1-Mb resolution radiation hybrid map of the canine genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:5296-01

**Halverson, J.,** Edwards, J **(1999)** Microsatellite polymorphism in major dog breeds. PE Applied Biosystems Bulletin

**Halverson, J.,** Basten, C. **(2005a)** Forensic DNA identification of animal-derived trace evidence: tools for linking victims and suspects. Croatian Medical Journal 46(4):598-05

**Halverson, J.,** Basten, C. **(2005b)** A PCR multiplex and database for forensic DNA identification of dogs. Journal of Forensic Sciences 50(2):1-12

**Hellmann, A.,** Schleenbecker, U., Rohleder, U., Demmelmeyer, H. **(2003)** DNA typing of canine samples – allele frequencies and standardization of the STR marker. Forensic Science International 136:66

**Hellmann, A.,** Rohleder, U., Eichmann, C., Pfeiffer, I., Parson, W., Schleenbecker, U. **(2006)** A proposal standardization in forensic canine DNA typing: Allele nomenclature of six Canine-specific STR loci. Journal of Forensic Science 51(2):274-81

**Higuchi, R.,** Beroldingen, CHv., Sensabugh, GF., Erlich, HA. **(1988)** DNA-typing from single hairs. Nature 332:534-46

**Instat statisztikai program:** http://www.rdg.ac.uk/SSC/software/instat/instat.html

**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. Animal Genetics 18:1-15.

**Jones, DA. (1972)** Blood samples: probability of discrimination. Journal of Forensic Sciences Society 12:355-59

**Joseph, S.,** Sampson, J. **(1994)** Identification, isolation, and characterisation of canine microsatellite sequences. Animal Genetics 25:307-21

**Kanthaswamy, S.,** Tom, BK., Mattila, AM., Johnston, E., Dayton, M., Kinaga, J., Erickson, BJ., Halverson, J., Fantin, D., DeNise, S., Kou, A., Malladi, V., Satkoski, J., Budowle, B., Smith, DG., Koskinen, MT. **(2009)** Canine population data generated from a multiplex STR kit for use in forensic casework. Journal of Forensic Sciences 54(4):829-40

**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. Journal of Forensic Sciences 35:1196-00

**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):1898-03

**Klukowska, J.,** Szczerbal, I., Rickli, O., Switonski, M., Dolf, G., Schelling, C. **(2004)** Seven bacterial artifical chromosome-derived canine microsatellitre-linking physical and genetic maps. Animal Genetics 35:252-3

**Leclair, B.,** Sgueglia, JB., Wojtowicz, PC., Juston, AC., Frégeau, CJ., Fourney, RM. **(2003)** STR DNA typing: increased sensitivity and efficient sample consumption using reduced PCR reaction volumes. Journal of Forensic Sciences 48(5):1001-13

**Lederer, T.,** Betz, P., Seidl, S. **(2001)** DNA analysis of fingernail debris using different multiplex systems: a case report. International Journal of Legal Medicine 114(4-5):263-66

**Linch, CA.,** Smith, SL., Prahlow, JA. **(1998)** Evaluation of the human hair root for DNA typing subsequent to microscopic comparison. Journal of Forensic Sciences 43:305-14

**Linch, CA.,** Whiting DA., Holland, MM. **(2001)** Human hair histogenezis for the mitochondrial DNA forensic scientist. Journal of Forensic Sciences 46:844-53

**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

**Meldgaard, M.,** Morling, N. **(1997)** Detection and quantitative characterization of artificial extra peaks following polymerase chain reaction amplification of 14 short tandem repeat systems used in forensic investigations. Electrophoresis 18(11):1928-35

**Mellersh, C. (2008)** Give a dog a genome. The Veterinary Journal 178:46-52

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

**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 Human Genome Research Institute (2007)** http://research.nhgri.nih.gov/

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

**Nei, M. (1973)** Analysis of gene diversity in subdivided population. Proc. Nat. Acad. Sci. 70:3321-23

**Novagen (2003)** Pellet Paint® Co-Precipitant. User Protocol TB146 Rev. A 0204. EMD Biosciences, Inc., an affiliate of Merck KgaA, Darmstadt, Germany

**Ohno Y,** Sebetan IM, Akaishi S **(1982)** A simple method for calculating the probability of excluding paternity with any number of codominant alleles. Forensic Sciences International 19:93-98

**Ostrander, EA.,** Lindblad-Toh, K., Lander ES. and The Canine Genome Mapping Community **(2004)** Sequencing the Genome of the Domestic Dog Canis familiaris. http://research.nhgri.nih.gov/dog_genome/ 2004.

**Ostrander, EA.,**Wayne, RK. **(2005)** The canine genome. Genome Res. 15:1706-16

**Overall, K.,** Love, M. **(2001)** Dog bite-related of humans – demography, epidemiology, injury and risk. J. Am. Vet. Med. Assoc. 218:1923-34

**Pádár, Zs.,** Egyed, B., Kontadakis, K., Zöldág, L., Fekete S. **(2001a)** 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. **(2001b)** Canine microsatellite polymorphisms as the resolution of an illegal animal death case in a Hungarian Zoological Gardens. International Journal of Legal Medicine 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 in a dog hair. International Journal of Legal Medicine 116:286-88

**Pádár, Zs. (2006)** Kutya eredetű anyagmaradványok igazságügyi genetikai vizsgálata. PhD értekezés, SZIE ÁOTK

**Pfeiffer, I.,** Völker, I., Täubert, H., Brenig, B. **(2004)** Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification. Forensic Science International 141:149-51

**Primer Designer 4** http://www.scied.com

**Princeton Separation Inc. (2004)** Centri-Sep Protocol. Ver. 7.0 2/04

**Qiagen (2008)** EZ1 DNA Handbook 4/2008, DNA Investigator Kit Protocoll

**Rolf, B.,** Wiegand, P., Brinkmann, B. **(2002)** Somatic mutation at STR loci - a reason for three-allele pattern and mosaicism. Forensic Science International 126:200-02

**Rothuizen, J.,** Wolfswinkel, J., Lenstra, J., Frants, R. **(1994)** The incidence of mini- and microsatellite repetitive DNA in the canine genome. Theoretical and Applied Genetics 89:403-06

**Schmid, D.,** Bayer, B., Anslinger, K. **(2008)** Comparison of telogen hair analyses: genRES® MPX-2SP kit versus genRES® MPX-SP1 and genRES® MPX-2SP kits. Forensic Science International: Genetics 3:22-26

**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

**Silvia, ML.,** Pomposini, DA., Rhee, HN., Greenspoon, SA. **(2006)** Somatic mutation study of hair roots in an individual. Profiles In DNA 9(1):6-7 http://www.promega.com./

**Slatkin, M.,** Excoffier, L. **(1996)** Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. Heredity 76:377-83

**Tsuji, A.,** Ishiko, A., Kimura, H. **(2008)** Unusual death of a baby: a dog attack and confirmation using human and canine STRs. International Journal of Legal Medicine 122:59-62

**The Crown Prosecution Service (2008)** Low Copy Number DNA analysis (LCN) – Prosecutors checklist of question. http://www.cps.gov.uk/publications/prosecution/lcn_checklist.html

**Tvedebrink T,** Eriksen PS, Mogensen HS, Morling N. **(2009)** Estimating the probability of allelic drop-out of STR alleles in forensic genetics. Forensic Science International Genetics 3(4):222-26

**Varga, A. (2005)** Kampányfüst és kutyapiszok. Magyar Nemzet, 2005. Szeptember 15. 4.

**Vigilant, L. (1999)** An evaluation of techniques for the extraction and amplification of DNA from naturally shed hairs. Biological Chemistry 380:1329-31

**Walsh, PS.,** Fildes, NJ., Reynolds, R. **(1996)** Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. Nucleic Acid Res 24:2807-12

**Wang, W.,** Kirkness, EF. **(2005)** Short interspersed elements (SINEs) are a major source of canine genomic diversity. Genome Research 15:1798-08

**Weber, JL.,** May, PE., **(1989)** Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed by the polymerase chain reaction. American Journal of Human Genetics 44:388-96

**Weir, BS. (1996)** Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts

**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. Animal Genetics 37:387-9

**Whitaker, JP.,** Clayton, TM., Urquhart, AJ., Millican, ES., Downes, TJ., Kimpton, CP., Gill, PD. **(1995)** STR typing of bodies from a mass disaster: High success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples. BioTechniques 18:670-77

**Wiegand, P.,** Kleiber, M. **(2001)** Less is more – length reduction of STR amplicons using redesigned primers. International Journal of Legal Medicine 114:285-87

**Wilson, MR.,** DiZinno, JA., Polenskey, D., Replogie, J., Budowle, B. **(1995a)** Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. International Journal of Legal Medicine 108:68-74

**Wilson, MR.,** Polanskey, D., Butler, J., DiZinno, JA., Replogle, J., Budowle, B. **(1995b)** Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. Biotechniques 18(4):662-69

**Wurmb-Schwark, N.,** Preusse-Prange, A., Heinrich, A., Simeoni, E., Bosch, T., Schwark, T. **(2009)** A new multiplex-PCR comprising autosomal and y-specific STRs and mitochondrial DNA to analyze highly degraded material. Forensic Science International: Genetics 3(2):96-03

**Zajc, I.,** Mellersh, C., Kelly, EP., Sampson, J. **(1994)** A new method paternity testing for dogs, based on microsatellite sequences. The Veterinary Record 135:545-47

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

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

**Zenke, P.,** Maróti-Agóts, Á., Pádár, Zs., Gáspárdi, A., Komlósi, I., Zöldág, L. **(2007)** Adatok a kutyaállományok beltenyésztettségének értékeléséhez. Magyar Állatorvosok Lapja 8: 484-89

**Zenke, P.,** Egyed, B., Szabolcsi, Z., Zöldág, L., Pádár, Zs. **(2008)** Assessing the frequency of somatic mutation from single dog hairs – Forensic testing of StockMarks Canine I Ver3 kit. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 1:633-34

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

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

**Zöldág, L.** (szerk.) **(2003)** A háziállatok öröklődő betegségei (7.4.2. fejezet). Mezőgazda Kiadó ISBN 963-286-063-2

**Zöldág, L.** (szerk.) **(2008)** Állatorvosi genetika és állattenyésztés (II. rész, 3.2.2. fejezet). Szent István Egyetem Állatorvos Tudományi Kar ISBN 978-963-269-010-0

# 9 A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI

## Magyar nyelvű közlemények

Zenke P., Maróti-Agóts Á., Pádár Zs., Gáspárdi A., Komlósi I., Zöldág L.: Adatok a kutyaállományok beltenyésztettségének értékeléséhez. Magyar Állatorvosok Lapja (2007) 8:484-89

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

*Zenke P., Pádár Zs., Egyed B., Zöldág L.: Kutya eredetű degradált anyagmaradványok genotípus meghatározása saját fejlesztésű mikroszatellita miniplexekkel.*
*Előadás: MTA Állatorv. Tud. Biz. Kut. Beszámoló, Budapest, 2009. 01. 28.*

*Zenke Petra, Leposa Tamás, Pádár Zsolt, Zöldág László: Egyedazonosítás és származásellenőrzés hiperpolimorf mikroszatellita markerrel kutyában.*
*Előadás: I. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok, Gödöllő, 2008. április 11-12.*

*Zenke P., Pádár Zs., Egyed B., Szabolcsi Z., Zöldág L.: Kutya eredetű degradált anyagmaradványok vizsgálati lehetőségének kiszélesítése újabb mikroszatellita lokuszok bevonásával*
*Előadás: MTA Állatorv. Tud. Biz. Kut. Beszámoló, Budapest, 2008. 01. 23.*

*Pádár Zs., Zenke P., Egyed B., Zöldág L.: Állatorvos-tudomány és igazságügyi genetika*
*Előadás: MTA Állatorv. Tud. Biz. Kut. Beszámoló, Budapest, 2008. 01. 23.*

*Zenke P., Pádár Zs., Zöldág L.: Szomatikus mutáció vizsgálata kutyaszőrben.*
*Előadás: MTA Állatorv. Tud. Biz. Kut. Beszámoló, Budapest, 2007. 01. 20.*

*Zenke P., Egyed B., Ősz K., Pádár Zs., Zöldág L.: Magyarországi kutyafajták populációgenetikai elemzése.*
*Előadás: MTA Állatorv. Tud. Biz. Kut. Beszámoló, Budapest, 2006. 01. 20.*

*Pádár Zs., Kontadakis K., Egyed B., Ősz K., Zenke P., Maróti-Agóts Á., Zöldág L.: Kutya-STR vizsgálatok kriminalisztikai célú alkalmazása.*
*Előadás: MTA Állatorv. Tud. Biz. Kut. Beszámoló, Budapest, 2005. 01. 20.*

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

*Pádár Zs., Kontadakis K., Egyed B., Zenke P., Ősz K., Zöldág L., Fekete S.: Kereskedelmi forgalmazásban levő kutya STR kit igazságügyi alkalmazásának tapasztalatai*
*Előadás: MTA Állatorv. Tud. Biz. Kut. Beszámoló, Budapest, 2002. 01. 26.*

**Idegen nyelvű közlemények**

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) 1:633-34

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

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

*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, Koppenhága, 2007. 08. 22-25.*

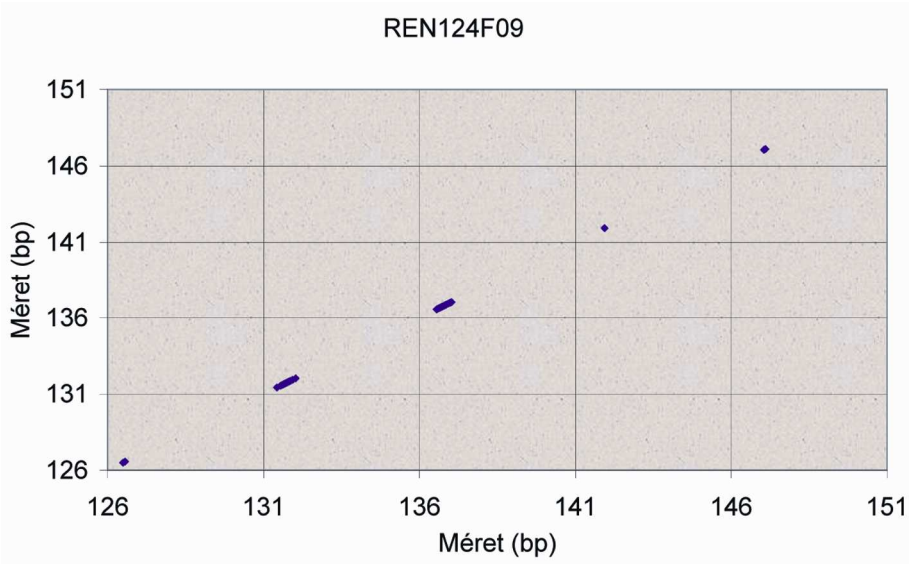
*Pádár Zs., Zenke P., Egyed B., Ősz K., Kontadakis K., Zöldág L., Fekete S.: Experience in the application of commercially available canine-STR kit in Hungarian forensic practice. Poszter bemutatva: 82. Jahrestagung der Deutschen Geselschaft für Rechtsmedizin, Münster, 2003. 09. 22-25.*

## 10 MELLÉKLETEK

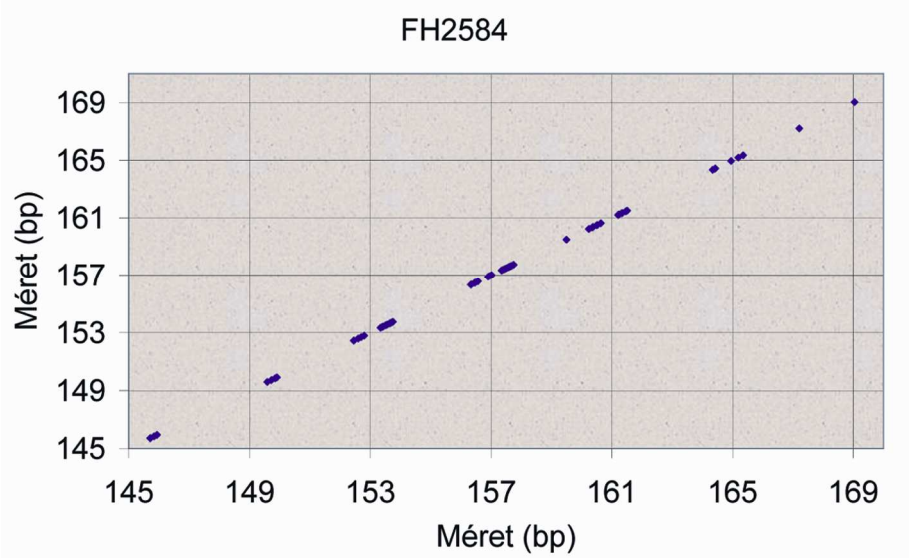
**F1. ábra** Anagén fejlődési fázisban lévő, tépett kutyaszőr fénymikroszkópos képe (saját felvétel)

**F1. táblázat** A vizsgált kutyaállomány megoszlása fajtánként

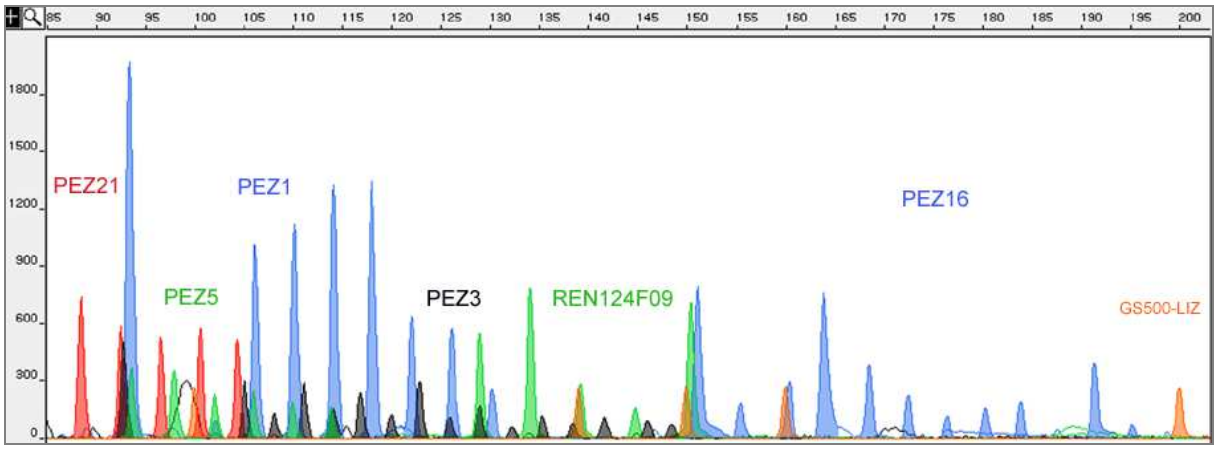
| Fajta | Mintaszám | Fajta | Mintaszám | Fajta | Mintaszám |
|---|---|---|---|---|---|
| Afgán agár | 1 | Erdélyi kopó | 2 | Német spicc | 1 |
| Agár | 1 | Fila brasileiro | 2 | Német vizsla | 1 |
| Airedale terrier | 2 | Fox terrier | 1 | Óangol juhászkutya | 2 |
| Alaszkai malamut | 2 | Francia bulldog | 2 | Orosz agár | 1 |
| Am. cocker spániel | 2 | Hannoveri véreb | 2 | Pekingi palotakutya | 1 |
| Am. staff. terrier | 2 | Hovawart | 2 | Pireneusi hegyikutya | 1 |
| Angol bulldog | 2 | Ír szetter | 1 | Pointer | 2 |
| An. cocker spániel | 1 | Jagd terrier | 2 | Puli | 1 |
| Angol szetter | 1 | Kaukázusi juhászk. | 1 | Rottweiler | 3 |
| Arany retriever | 2 | Kerry blue terrier | 1 | Sarplaninai juhászk. | 2 |
| Basset hound | 1 | Keverék | 1 | Schnauzer | 2 |
| Beagle | 2 | Kínai harcikutya | 3 | Sealyham terrier | 1 |
| Bernáthegyi | 2 | Komondor | 1 | Si-cu | 2 |
| Berni pásztor | 2 | Kuvasz | 1 | Skót juhászkutya | 1 |
| Bichon frise | 1 | Labrador retriever | 2 | Szamojéd | 2 |
| Bordeauxi dog | 2 | Leonbergi | 1 | Szibériai husky | 1 |
| Brie-i juhászkutya | 1 | Magyar agár | 1 | Szibériai lajka | 2 |
| Bullmasztiff | 2 | Magyar vizsla | 1 | Tacskó | 1 |
| Cane corso | 2 | Mopsz | 2 | Tibeti terrier | 1 |
| Coton de tulear | 1 | Moszkvai őrkutya | 1 | Törpe pincser | 1 |
| Csau-csau | 1 | Mudi | 2 | Újfundlandi | 1 |
| Csivava | 2 | Nápolyi masztiff | 2 | Uszkár | 2 |
| Dalmata | 1 | Német boxer | 2 | Weimari vizsla | 1 |
| Délorosz juhászk. | 1 | Német dog | 2 | W. H. White terrier | 2 |
| Dobermann | 3 | Német juhászkutya | 1 | Yorkshire terrier | 2 |
| | | | | **Összesen** | **116 egyed** |



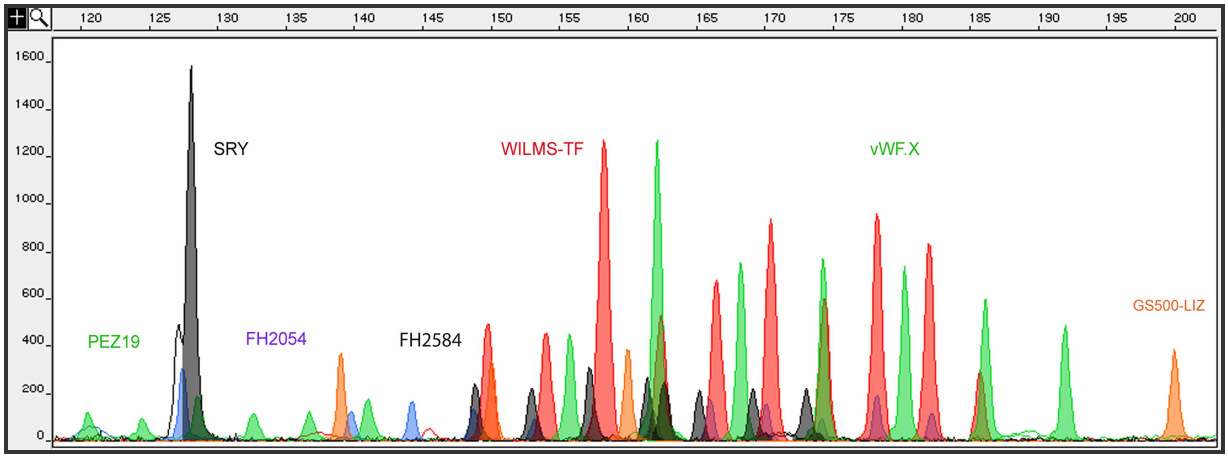

**F2.a. ábra** A populációs minták méretbeli eloszlása a REN124F09 lokuszon, GS500 LIZ belső méretstandard alkalmazásával



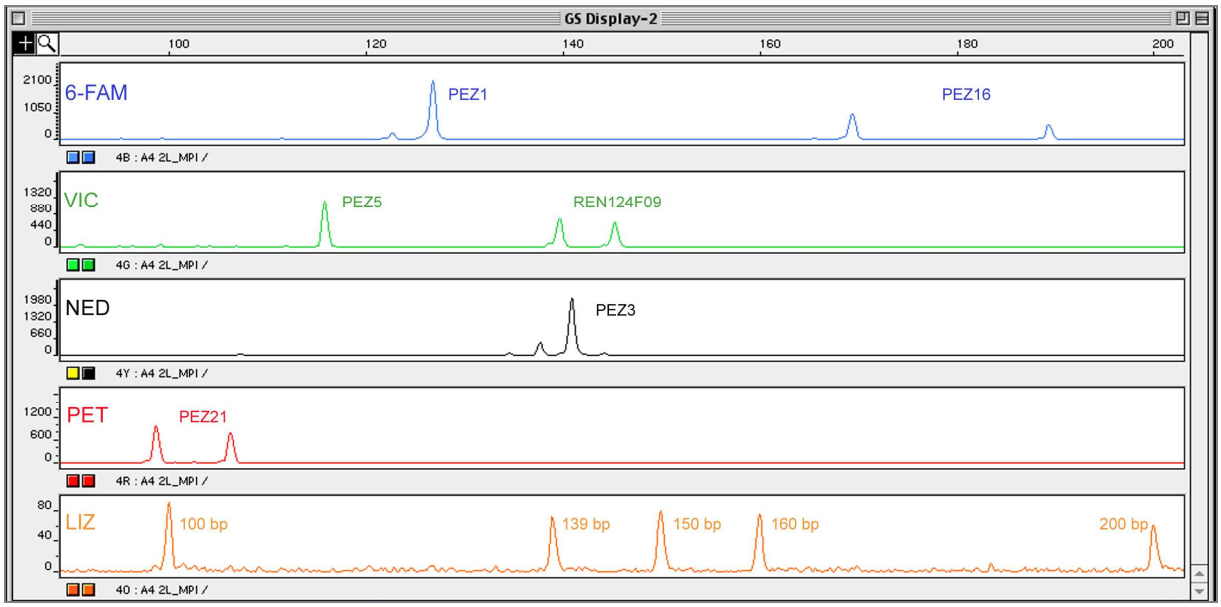

**F2.b. ábra** A populációs minták méretbeli eloszlása az FH2584 lokuszon. GS500 LIZ belső méretstandard alkalmazásával



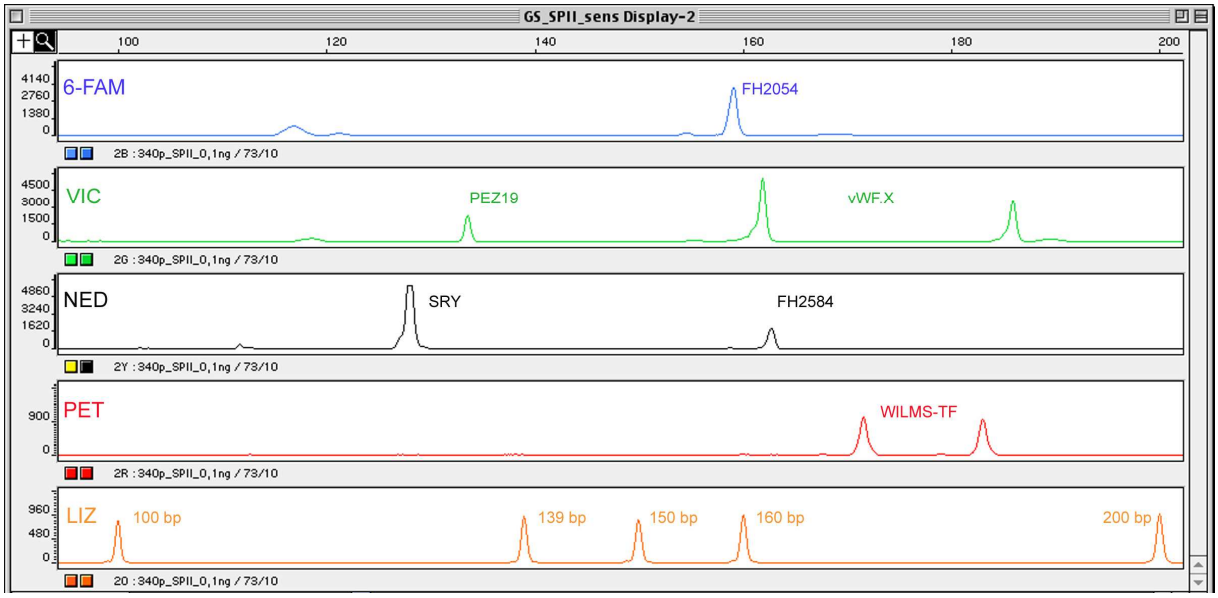

**F3.a. ábra** Alléllétrák keveréke a Miniplex I. rendszerben GS500-LIZ méretstandard alkalmazásával



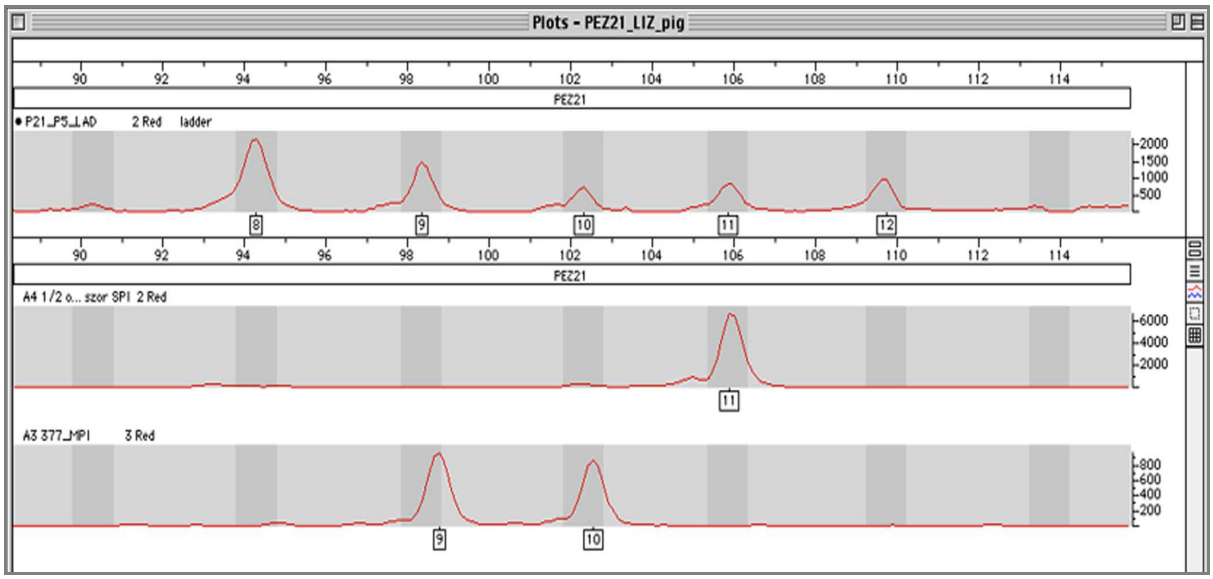

**F3.b. ábra** Alléllétrák keveréke a Miniplex II. rendszerben GS500-LIZ méretstandard alkalmazásával



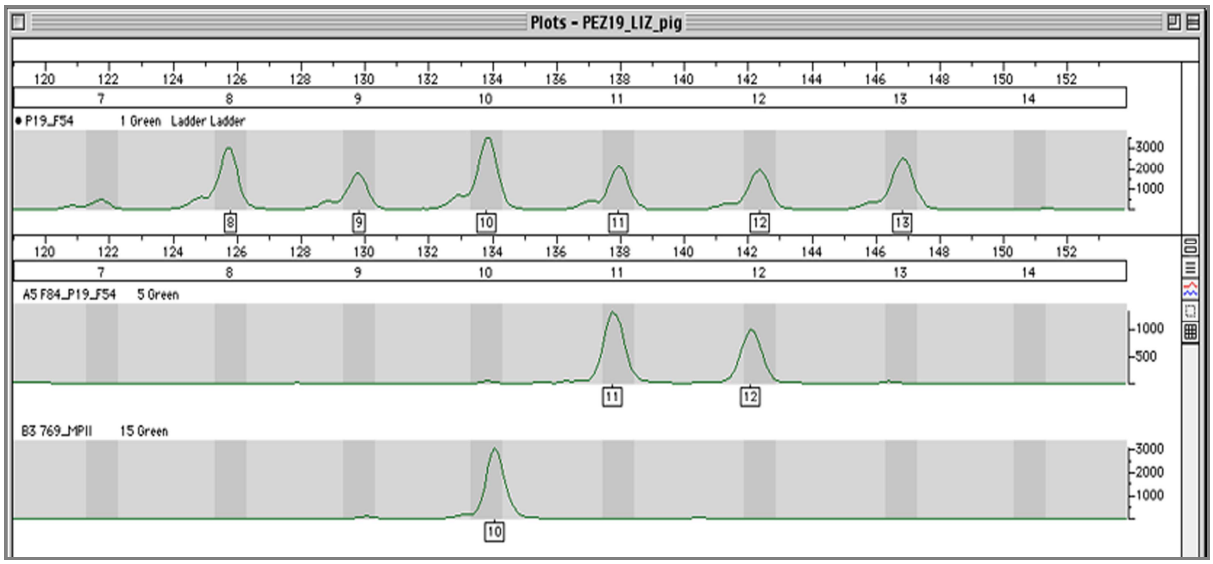

**F4.a. ábra** Egy minta öt színcsatornás elektroferogramja hat lokuszon a Miniplex I. rendszerben GS500-LIZ belső méretstandard használatával



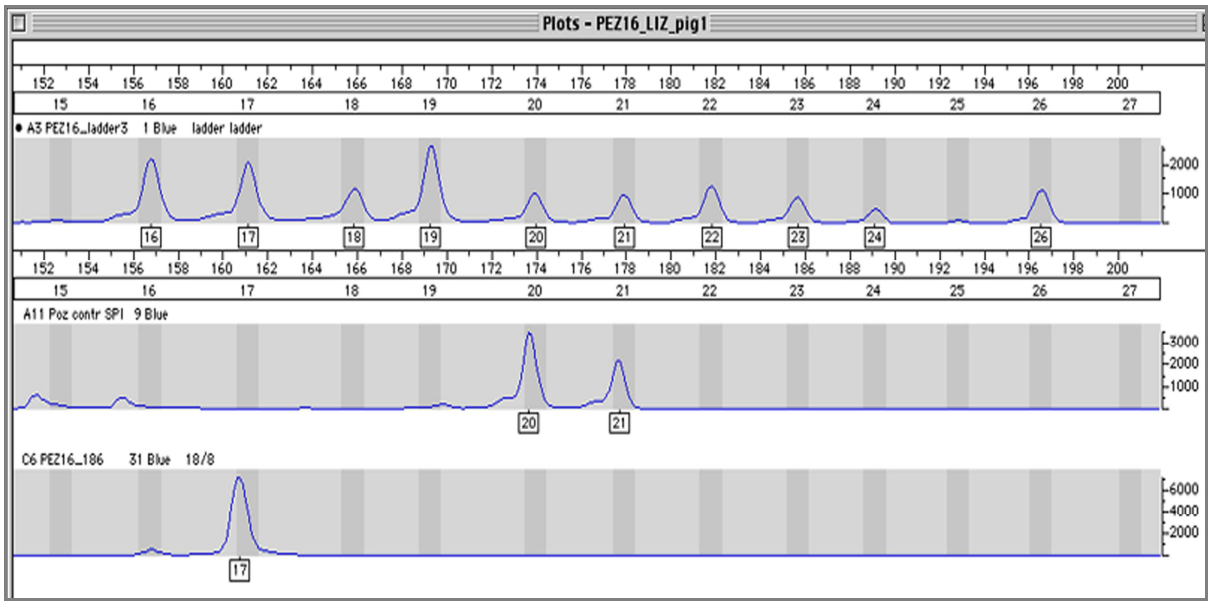

**F4.b. ábra** Egy minta öt színcsatornás elektroferogramja hat lokuszon a Miniplex II. rendszerben GS500-LIZ belső méretstandard használatával



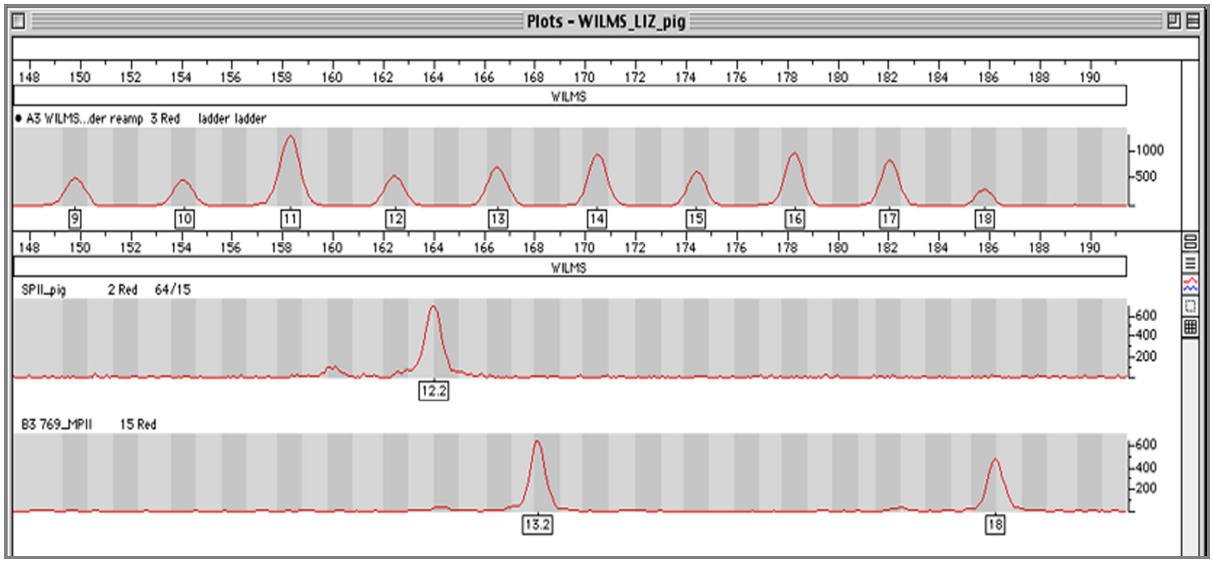

**F5.a. ábra** Két minta genotípus meghatározása a PEZ21 markeren a Genotyper® 2.5.2 szoftver alkalmazásával



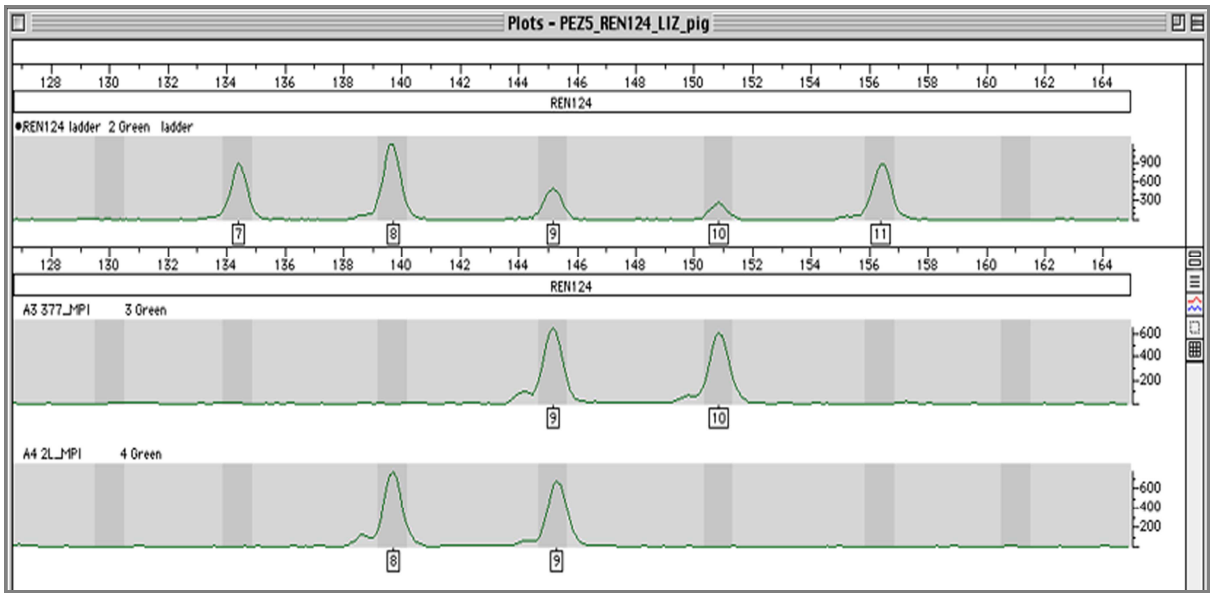

**F5.b. ábra** Két minta genotípus meghatározása a PEZ19 markeren a Genotyper® 2.5.2 szoftver alkalmazásával



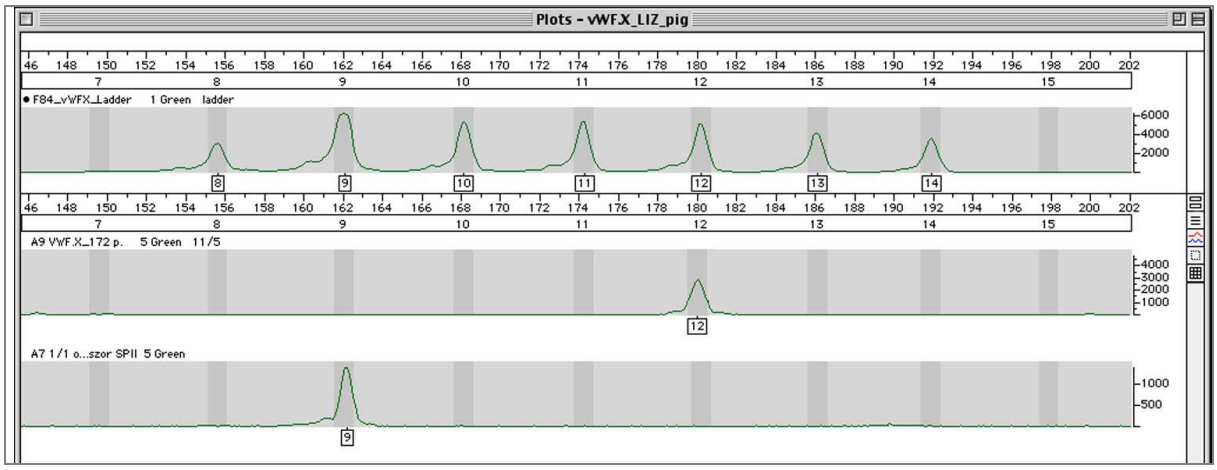

**F5.c. ábra** Két minta genotípus meghatározása a PEZ16 markeren a Genotyper® 2.5.2 szoftver alkalmazásával




**F5.d. ábra** Két minta genotípus meghatározása a WILMS-TF markeren a Genotyper® 2.5.2 szoftver alkalmazásával




**F5.e. ábra** Két minta genotípus meghatározása a REN124F09 markeren a Genotyper® 2.5.2 szoftver alkalmazásával

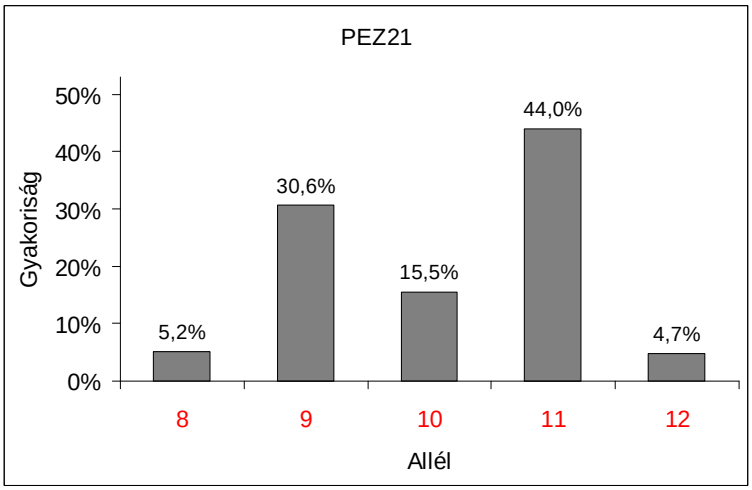



**F5.f. ábra** Két minta genotípus meghatározása a vWF.X markeren a Genotyper® 2.5.2 szoftver alkalmazásával

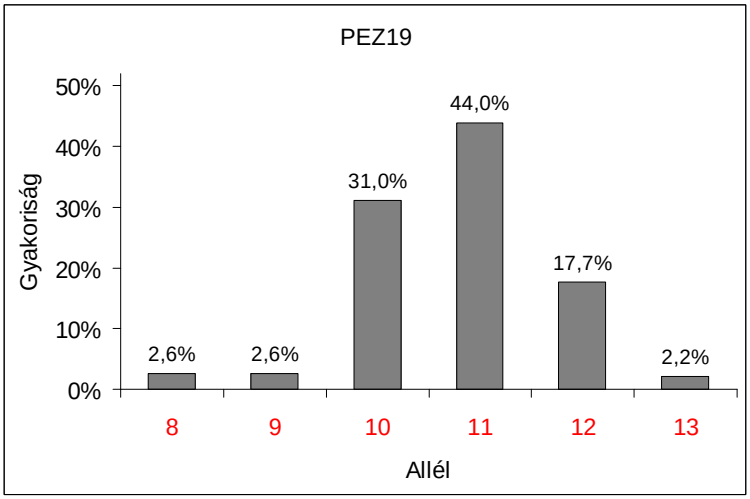
| Marker | Allél | bp | Ismétlődés szerkezete |
|---|---|---|---|
| **vWF.X** | **8** | **151** | 44bp**(AGGAAT)**$_{8}$7bp |
| | **10** | **163** | 44bp**(AGGAAT)**$_{10}$7bp |
| | **13** | **183** | 44bp**(AGGAAT)**$_{13}$7bp |
| **WILMS-TF** | **9** | **152** | 68bp**(GAAA)**$_{9}$48bp |
| | **10** | **156** | 68bp**(GAAA)**$_{10}$48bp |
| | **11** | **160** | 68bp**(GAAA)**$_{11}$48bp |
| | **11.2** | **162** | 68bp**(GAAA)**$_{12}$48bp *CT*del* |
| | **12** | **164** | 68bp**(GAAA)**$_{12}$48bp |
| | **12.3** | **167** | 68bp**(GAAA)**$_{9}$**GAA(GAAA)**$_{3}$48bp |
| | **13** | **168** | 68bp**(GAAA)**$_{13}$48bp |
| | **13.3** | **171** | 68bp**(GAAA)**$_{10}$**GAA(GAAA)**$_{3}$48bp |
| | **14** | **172** | 68bp**(GAAA)**$_{14}$48bp |
| | **14.3** | **175** | 68bp**(GAAA)**$_{11}$**GAA(GAAA)**$_{3}$48bp |
| | **15** | **176** | 68bp**(GAAA)**$_{15}$48bp |
| | **15.2** | **178** | 68bp**(GAAA)**$_{16}$48bp *CT*del* |
| | **15.3** | **179** | 68bp**(GAAA)**$_{12}$**GAA(GAAA)**$_{3}$48bp |
| | **16** | **180** | 68bp**(GAAA)**$_{16}$48bp |
| | **16.3** | **183** | 68bp**(GAAA)**$_{13}$**GAA(GAAA)**$_{3}$48bp |
| | **17** | **184** | 68bp**(GAAA)**$_{17}$48bp |
| | **17.3** | **187** | 68bp**(GAAA)**$_{14}$**GAA(GAAA)**$_{3}$48bp |
| | **18** | **188** | 68bp**(GAAA)**$_{18}$48bp |
| | **18.3** | **191** | 68bp**(GAAA)**$_{15}$**GAA(GAAA)**$_{3}$48bp |

**F6. ábra** A vWF.X és a WILMS-TF marker allélváltozatainak szerkezete a szekvenálási adatok alapján (a markerszerkezet összetettségének függvényében lokuszonként eltérő számú allélt vizsgáltunk)

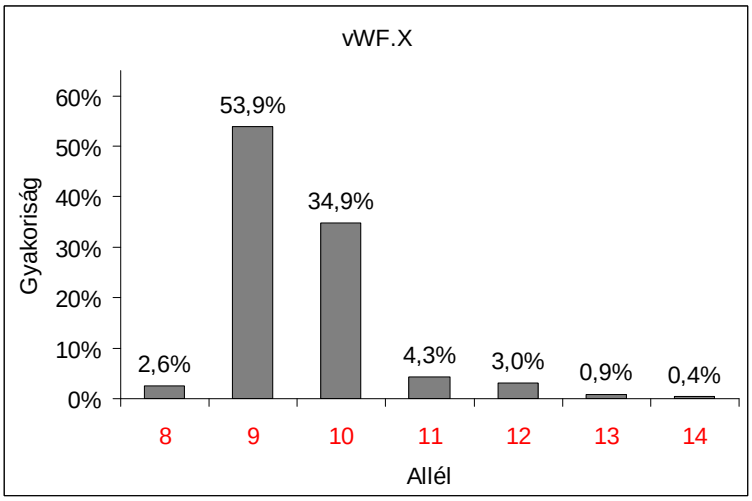
*CT*del*: két bázispár kiesése (deléciója) a 3’ határoló (flanking) régióban



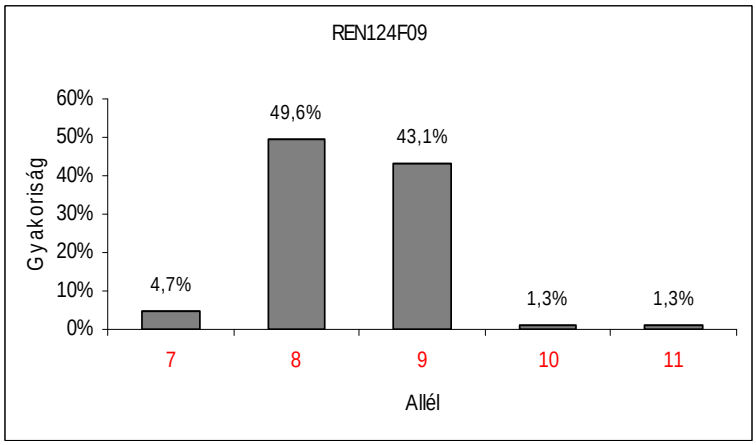

**F7.a. ábra** PEZ21 lokuszon megfigyelt allélgyakoriság (n = 232)



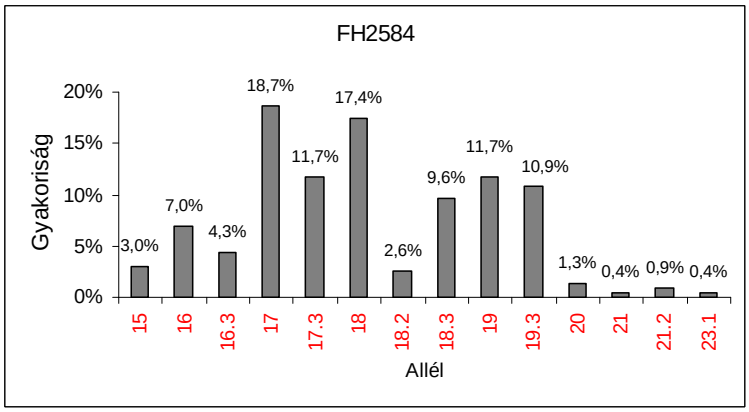

**F7.b. ábra** PEZ19 lokuszon megfigyelt allélgyakoriság (n = 232)



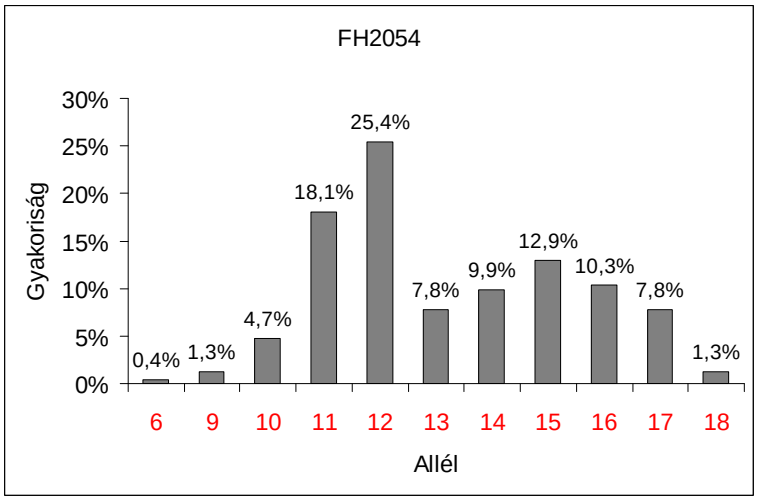

**F7.c. ábra** vWF.X lokuszon megfigyelt allélgyakoriság (n = 232)



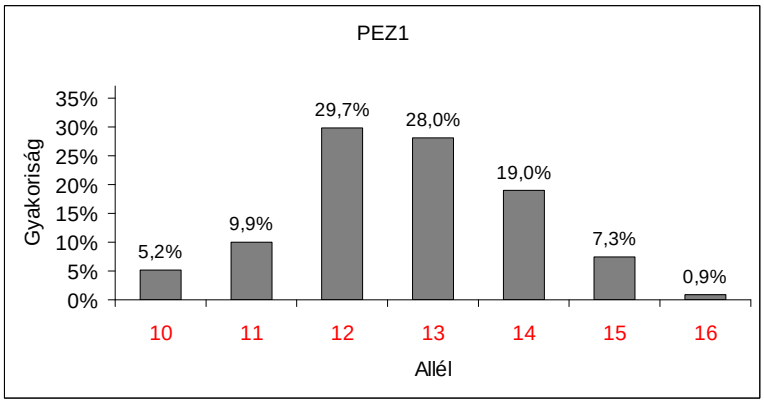

**F7.d. ábra** REN124F09 lokuszon megfigyelt allélgyakoriság (n = 232)



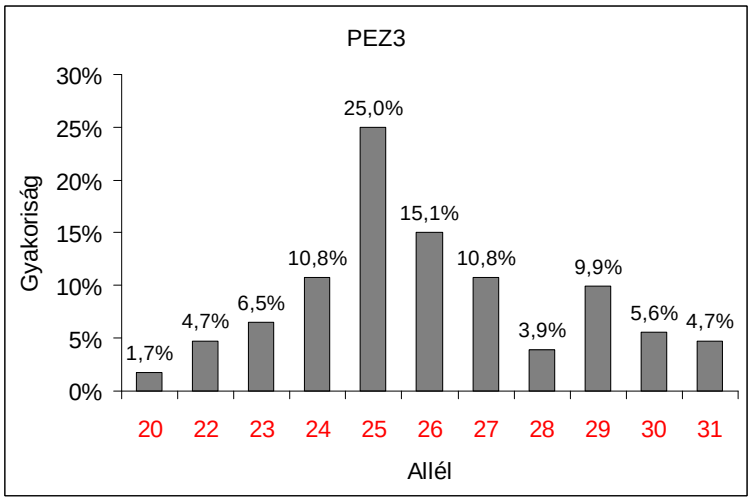

**F7.e. ábra** FH2584 lokuszon megfigyelt allélgyakoriság (n = 229)



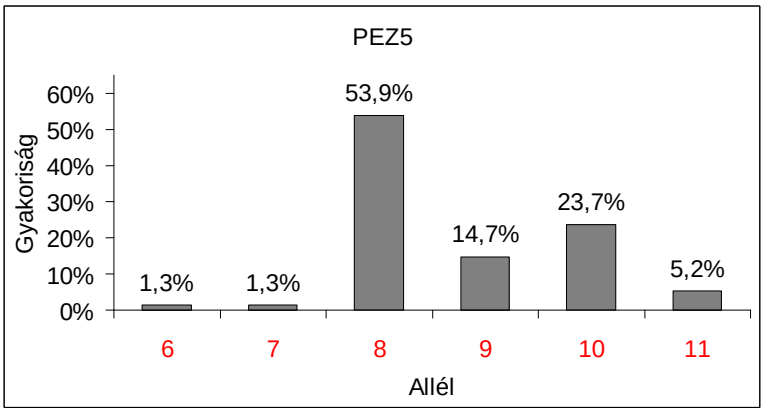

**F7.f. ábra** FH2054 lokuszon megfigyelt allélgyakoriság (n = 232)



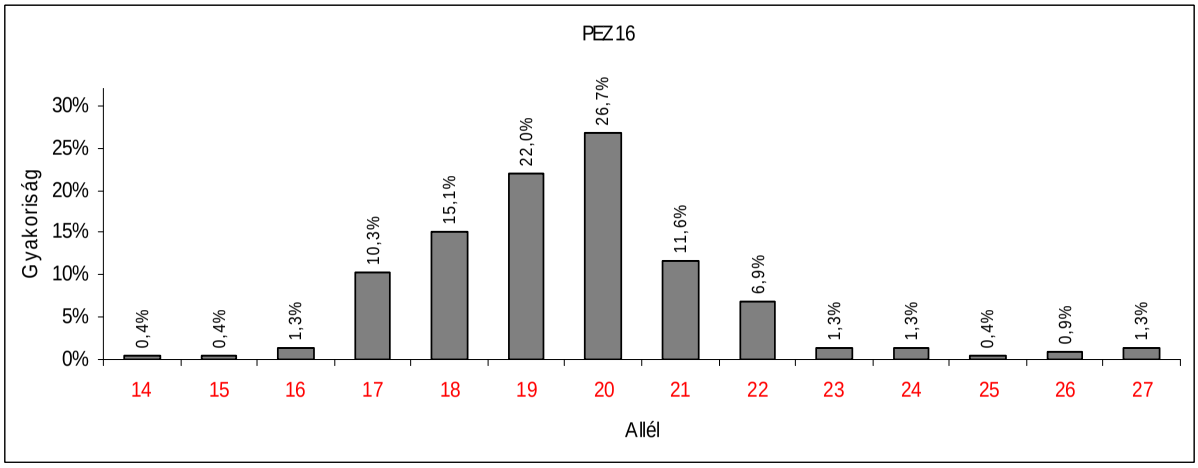

**F7.i. ábra** PEZ1 lokuszon megfigyelt allélgyakoriság (n = 232)



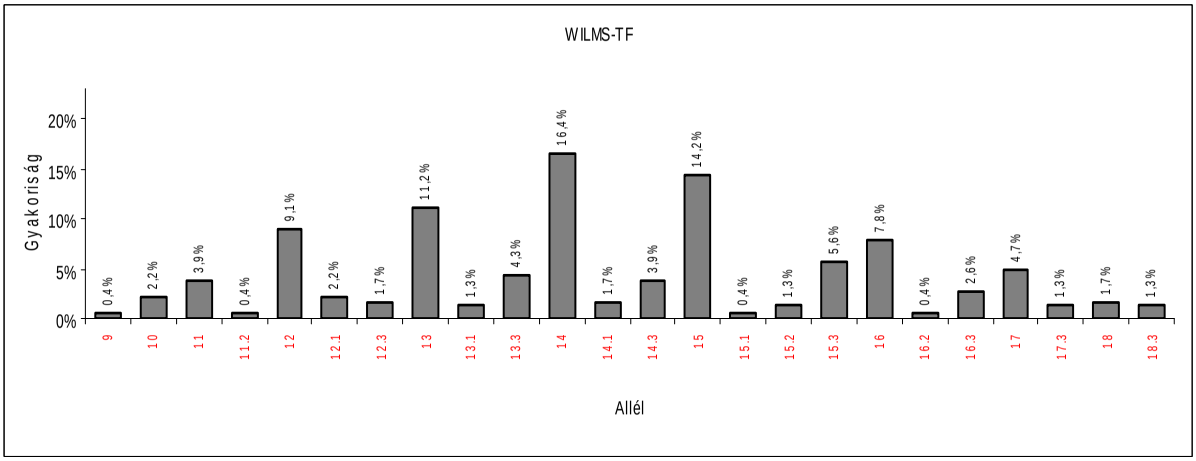

**F7.j. ábra** PEZ3 lokuszon megfigyelt allélgyakoriság (n = 230)




**F7.k. ábra** PEZ5 lokuszon megfigyelt allélgyakoriság (n = 232)




**F7.g. ábra** PEZ16 lokuszon megfigyelt allélgyakoriság (n = 232)




**F7.h. ábra** Wilms-TF lokuszon megfigyelt allélgyakoriság (n = 232)

| | Minta | PEZ1 | | PEZ5 | | PEZ3 | | PEZ21 | | PEZ16 | | REN124F09 | | PEZ19 | | WILMS-TF | | FF2054 | | FH2584 | | vWF.X | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | West H. White terrier | 13 | 13 | 9 | 9 | 29 | 29 | 11 | 11 | 17 | 21 | 8 | 9 | 11 | 13 | 13 | 14 | 10 | 12 | 19 | 19 | 9 | 10 |
| 2. | West H. White terrier | 13 | 13 | 9 | 9 | ? | ? | 9 | 11 | 17 | 17 | 8 | 9 | 11 | 13 | 13 | 16 | 10 | 12 | 19 | 19.3 | 9 | 10 |
| 3. | Kerry blue terrier | 12 | 13 | 10 | 10 | 25 | 26 | 11 | 11 | 17 | 20 | 9 | 9 | 11 | 13 | 12.1 | 13.1 | 12 | 14 | 17.3 | 17.3 | 9 | 10 |
| 4. | Berni pásztor | 12 | 14 | 8 | 10 | 25 | 25 | 11 | 11 | 17 | 17 | 8 | 8 | 11 | 11 | 12 | 16.3 | 12 | 14 | 18 | 18 | 9 | 9 |
| 5. | Bordeauxi dog | 12 | 13 | 8 | 8 | 25 | 25 | 8 | 8 | 20 | 24 | 8 | 8 | 12 | 12 | 14 | 15 | 16 | 17 | 16.3 | 16.3 | 9 | 9 |
| 6. | Arany retriver | 12 | 12 | 8 | 8 | 25 | 25 | 11 | 11 | 18 | 20 | 8 | 9 | 12 | 12 | 12.3 | 13 | 12 | 16 | 16 | 16 | 10 | 10 |
| 7. | Pointer | 14 | 15 | 8 | 11 | 27 | 28 | 9 | 11 | 18 | 21 | 8 | 8 | 10 | 11 | 15 | 15.3 | 12 | 12 | 18 | 19 | 9 | 9 |
| 8. | Erdélyi kopó | 12 | 13 | 8 | 10 | 28 | 30 | 10 | 11 | 20 | 25 | 8 | 9 | 11 | 11 | 12 | 14 | 11 | 14 | 16.3 | 16.3 | 9 | 9 |
| 9. | Hannoveri véreb | 12 | 13 | 8 | 8 | 26 | 26 | 9 | 11 | 19 | 22 | 8 | 8 | 10 | 11 | 14 | 15 | 13 | 17 | 19.3 | 19.3 | 10 | 10 |
| 10. | Francia bulldog | 11 | 12 | 8 | 8 | 24 | 31 | 11 | 11 | 18 | 18 | 9 | 9 | 11 | 11 | 15 | 16 | 11 | 16 | 18 | 18 | 9 | 12 |
| 11. | Am. staffordshire terrier | 10 | 12 | 8 | 8 | 25 | 26 | 11 | 11 | 19 | 20 | 8 | 8 | 11 | 12 | 14.3 | 15 | 11 | 13 | 17 | 17 | 9 | 9 |
| 12. | Fila brasileiro | 13 | 13 | 9 | 9 | 22 | 22 | 9 | 11 | 18 | 20 | 9 | 9 | 10 | 10 | 10 | 16.3 | 13 | 14 | 17.3 | 17.3 | 9 | 10 |
| 13. | Sarplaninai juhászkutya | 11 | 11 | 8 | 8 | 25 | 25 | 11 | 11 | 22 | 22 | 9 | 9 | 10 | 11 | 13 | 14 | 11 | 12 | 17.3 | 17.3 | 9 | 9 |
| 14. | Alaszkai malamut | 11 | 13 | 8 | 8 | 30 | 30 | 10 | 11 | 18 | 21 | 8 | 9 | 10 | 10 | 12.1 | 14.3 | 14 | 16 | 18.3 | 18.3 | 9 | 12 |
| 15. | Óangol juhászkutya | 13 | 14 | 8 | 10 | 23 | 25 | 9 | 11 | 18 | 27 | 9 | 9 | 10 | 10 | 12.1 | 13 | 11 | 17 | 17 | 19 | 9 | 10 |
| 16. | Mudi | 12 | 12 | 8 | 10 | 26 | 27 | 9 | 9 | 20 | 20 | 8 | 9 | 10 | 11 | 14 | 14 | 13 | 14 | 17 | 17 | 10 | 11 |
| 17. | Nápolyi masztiff | 12 | 14 | 8 | 8 | 25 | 25 | 8 | 11 | 18 | 18 | 7 | 7 | 10 | 10 | 14.3 | 14.3 | 12 | 17 | 17 | 17 | 9 | 11 |
| 18. | Német boxer | 12 | 13 | 8 | 8 | 26 | 26 | 9 | 9 | 21 | 21 | 8 | 9 | 10 | 12 | 14 | 15.3 | 16 | 16 | 17 | 17 | 10 | 10 |
| 19. | Kínai harcikutya | 11 | 14 | 8 | 8 | 26 | 30 | 10 | 10 | 14 | 19 | 8 | 9 | 11 | 11 | 12 | 14 | 11 | 14 | 18 | 18 | 9 | 10 |
| 20. | Német dog | 10 | 10 | 8 | 10 | 24 | 26 | 9 | 11 | 17 | 22 | 8 | 8 | 10 | 11 | 17 | 17 | 12 | 13 | 17.3 | 17.3 | 9 | 10 |
| 21. | Óangol juhászkutya | 13 | 14 | 8 | 8 | 29 | 29 | 9 | 9 | 18 | 27 | 7 | 9 | 10 | 11 | 12.1 | 13 | 11 | 17 | 17 | 19 | 9 | 12 |
| 22. | Labrador retriever | 10 | 14 | 10 | 11 | 23 | 25 | 11 | 12 | 19 | 21 | 8 | 8 | 11 | 11 | 14 | 15 | 10 | 12 | 17 | 17 | 9 | 10 |
| 23. | Jagd terrier | 12 | 14 | 10 | 10 | 24 | 31 | 9 | 11 | 18 | 18 | 9 | 9 | 10 | 11 | 13 | 16 | 12 | 12 | 19.3 | 19.3 | 10 | 11 |
| 24. | Yorkshire terrier | 12 | 12 | 8 | 8 | 20 | 25 | 9 | 9 | 19 | 19 | 8 | 8 | 11 | 11 | 11 | 17 | 10 | 10 | 19 | 19 | 9 | 9 |
| 25. | Sealyham terrier | 15 | 15 | 8 | 9 | 23 | 24 | 9 | 9 | 18 | 21 | 7 | 8 | 10 | 12 | 12 | 12 | 12 | 13 | 19 | 19 | 9 | 10 |
| 26. | An. cocker spániel | 13 | 15 | 10 | 10 | 26 | 27 | 9 | 11 | 20 | 20 | 8 | 8 | 11 | 12 | 11 | 16 | 12 | 14 | 18.3 | 18.3 | 9 | 9 |
| 27. | Berni pásztor | 12 | 13 | 8 | 8 | 25 | 25 | 11 | 11 | 19 | 20 | 8 | 9 | 10 | 11 | 18.3 | 18.3 | 12 | 12 | 18 | 18 | 9 | 9 |
| 28. | Beagle | 11 | 13 | 6 | 9 | 25 | 30 | 11 | 11 | 20 | 21 | 8 | 10 | 11 | 11 | 14 | 17.3 | 12 | 15 | 17.3 | 18 | 9 | 9 |
| 29. | Mudi | 11 | 13 | 8 | 8 | 25 | 26 | 9 | 9 | 18 | 19 | 8 | 8 | 11 | 11 | 14 | 14.3 | 11 | 14 | 18 | 18 | 9 | 10 |
| 30. | Német vizsla | 11 | 16 | 8 | 9 | 22 | 29 | 9 | 10 | 19 | 19 | 9 | 9 | 11 | 12 | 11 | 14 | 12 | 16 | 18 | 18 | 9 | 10 |
| 31. | Rottweiler | 14 | 14 | 8 | 8 | 26 | 27 | 11 | 11 | 18 | 21 | 9 | 9 | 11 | 11 | 12 | 13.3 | 13 | 15 | 17 | 19.3 | 10 | 12 |
| 32. | Ít szetter | 10 | 10 | 8 | 10 | 25 | 28 | 11 | 11 | 20 | 20 | 8 | 9 | 8 | 12 | 16 | 16 | 11 | 12 | 19 | 19 | 10 | 10 |
| 33. | Am. cocker spániel | 12 | 15 | 8 | 10 | 27 | 29 | 11 | 11 | 19 | 20 | 8 | 9 | 11 | 12 | 13.3 | 14.3 | 14 | 16 | 19.3 | 19.3 | 9 | 11 |
| 34. | Skót juhászkutya | 14 | 14 | 11 | 11 | 23 | 24 | 9 | 10 | 17 | 21 | 11 | 11 | 12 | 12 | 14 | 16 | 17 | 17 | 17 | 18 | 10 | 10 |
| 35. | Schnauzer | 13 | 13 | 8 | 11 | 24 | 29 | 11 | 11 | 18 | 20 | 9 | 9 | 10 | 12 | 13 | 13.3 | 12 | 12 | 18 | 21 | 9 | 9 |
| 36. | Am. cocker spániel | 11 | 14 | 8 | 10 | 22 | 25 | 10 | 11 | 18 | 21 | 9 | 9 | 12 | 13 | 15 | 16 | 10 | 11 | 17 | 18.2 | 9 | 9 |
| 37. | Schnauzer | 13 | 14 | 8 | 8 | 23 | 29 | 11 | 11 | 18 | 20 | 8 | 8 | 11 | 12 | 15 | 15 | 15 | 16 | 17.3 | 23.1 | 11 | 12 |
| 38. | Afgán agár | 13 | 15 | 9 | 11 | 23 | 26 | 11 | 11 | 19 | 19 | 8 | 9 | 10 | 13 | 15.2 | 16.2 | 12 | 14 | 17.3 | 18 | 9 | 9 |
| 39. | Weimari vizsla | 13 | 13 | 8 | 8 | 28 | 31 | 9 | 9 | 15 | 21 | 7 | 7 | 11 | 11 | 16.3 | 16.3 | 15 | 15 | 18 | 19.3 | 9 | 9 |

**F2. táblázat** A vizsgált kutyák genetikai profilja tíz STR lokuszon

| | Minta | PEZ1 | | PEZ5 | | PEZ3 | | PEZ21 | | PEZ16 | | REN124 | | PEZ19 | | WILMS | | FF2054 | | FH2584 | | vWF.X | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 40. | Német juhászkutya | 12 | 13 | 8 | 9 | 24 | 25 | 11 | 11 | 17 | 20 | 8 | 9 | 10 | 11 | 14 | 15 | 9 | 11 | 16 | 18.3 | 9 | 10 |
| 41. | Német dog | 12 | 14 | 9 | 10 | 25 | 29 | 9 | 9 | 19 | 20 | 9 | 9 | 11 | 12 | 12 | 15 | 11 | 13 | 16.3 | 17 | 8 | 9 |
| 42. | Angol bulldog | 11 | 11 | 10 | 10 | 24 | 24 | 9 | 10 | 20 | 20 | 8 | 9 | 11 | 12 | 12 | 14 | 10 | 10 | 17 | 17 | 8 | 10 |
| 43. | Sarplaninai juhászkutya | 13 | 15 | 8 | 10 | 25 | 29 | 9 | 9 | 17 | 26 | 9 | 9 | 9 | 10 | 9 | 12 | 11 | 15 | 17.3 | 18 | 10 | 10 |
| 44. | Orosz agár | 10 | 13 | 8 | 10 | 22 | 22 | 11 | 11 | 17 | 21 | 8 | 9 | 11 | 11 | 12 | 13.3 | 11 | 11 | 18 | 18 | 10 | 10 |
| 45. | Magyar agár | 11 | 13 | 8 | 8 | 23 | 31 | 10 | 11 | 20 | 20 | 8 | 9 | 11 | 12 | 14 | 18.3 | 11 | 12 | 18 | 18 | 10 | 10 |
| 46. | Airedale terrier | 13 | 14 | 8 | 8 | 24 | 30 | 10 | 11 | 20 | 20 | 9 | 9 | 10 | 11 | 12 | 12 | 12 | 12 | 17.3 | 18.2 | 9 | 9 |
| 47. | Hovawart | 13 | 14 | 8 | 9 | 24 | 25 | 10 | 10 | 18 | 19 | 8 | 8 | 11 | 11 | 13 | 14.3 | 14 | 14 | 19.3 | 19.3 | 9 | 9 |
| 48. | Komondor | 14 | 14 | 8 | 8 | 26 | 26 | 9 | 10 | 17 | 19 | 9 | 9 | 11 | 11 | 12 | 14 | 13 | 14 | 19 | 19 | 9 | 9 |
| 49. | Francia bulldog | 12 | 12 | 9 | 9 | 25 | 27 | 9 | 10 | 17 | 19 | 9 | 9 | 10 | 12 | 13 | 14.3 | 16 | 16 | 17 | 18 | 10 | 10 |
| 50. | Leonbergi | 13 | 13 | 8 | 9 | 31 | 31 | 8 | 8 | 19 | 20 | 8 | 9 | 10 | 11 | 15.3 | 15.3 | 13 | 13 | 17 | 17 | 9 | 10 |
| 51. | Beagle | 13 | 13 | 6 | 6 | 24 | 27 | 10 | 12 | 20 | 20 | 8 | 10 | 10 | 12 | 14 | 15.3 | 12 | 14 | 19 | 20 | 9 | 9 |
| 52. | Mopsz | 14 | 14 | 8 | 8 | 24 | 25 | 10 | 12 | 17 | 22 | 8 | 8 | 10 | 12 | 14 | 14 | 12 | 15 | 19 | 19 | 9 | 10 |
| 53. | Dobermann | 11 | 12 | 8 | 8 | 26 | 29 | 11 | 11 | 22 | 22 | 9 | 9 | 11 | 11 | 13 | 16 | 11 | 11 | 18.3 | 18.3 | 9 | 9 |
| 54. | Moszkvai őrkutya | 12 | 13 | 8 | 8 | 22 | 22 | 9 | 10 | 19 | 20 | 8 | 8 | 11 | 11 | 11 | 13.1 | 13 | 13 | 19.3 | 19.3 | 10 | 10 |
| 55. | Hannoveri véreb | 14 | 14 | 8 | 10 | 22 | 28 | 9 | 9 | 20 | 20 | 8 | 8 | 10 | 11 | 13 | 12.3 | 16 | 16 | 15 | 15 | 9 | 9 |
| 56. | Szibériai husky | 13 | 13 | 7 | 10 | 28 | 30 | 11 | 11 | 19 | 20 | 8 | 8 | 10 | 10 | 10 | 10 | 15 | 16 | 15 | 15 | 9 | 9 |
| 57. | Szamojéd | 14 | 14 | 8 | 10 | 25 | 29 | 9 | 11 | 19 | 20 | 8 | 9 | 10 | 11 | 13.1 | 14.1 | 15 | 17 | 16 | 16 | 9 | 10 |
| 58. | Kínai harcikutya | 13 | 13 | 8 | 10 | 26 | 26 | 9 | 11 | 17 | 21 | 9 | 9 | 8 | 10 | 13 | 18 | 16 | 17 | 17 | 18 | 9 | 10 |
| 59. | Bichon frise | 12 | 14 | 8 | 8 | 23 | 29 | 8 | 10 | 19 | 20 | 8 | 9 | 10 | 11 | 16 | 17 | 12 | 12 | 16 | 17 | 10 | 10 |
| 60. | Csau-csau | 12 | 12 | 9 | 10 | 25 | 26 | 8 | 8 | 16 | 26 | 8 | 8 | 8 | 10 | 10 | 13 | 14 | 14 | 18 | 18 | 10 | 10 |
| 61. | Kuvasz | 14 | 14 | 8 | 8 | 25 | 30 | 9 | 9 | 18 | 19 | 9 | 9 | 11 | 12 | 13 | 13.3 | 14 | 16 | 17.3 | 18 | 9 | 10 |
| 62. | Angol szetter | 11 | 12 | 9 | 9 | 27 | 27 | 9 | 10 | 19 | 21 | 8 | 8 | 10 | 11 | 15 | 15.3 | 11 | 12 | 17.3 | 17.3 | 9 | 10 |
| 63. | Rottweiler | 11 | 13 | 8 | 10 | 24 | 24 | 9 | 11 | 18 | 20 | 9 | 9 | 11 | 12 | 15 | 15 | 12 | 12 | 17.3 | 18 | 9 | 10 |
| 64. | Coton de tulear | 12 | 15 | 8 | 10 | 26 | 27 | 10 | 10 | 22 | 22 | 8 | 8 | 12 | 12 | 11 | 11 | 15 | 17 | 19 | 19 | 9 | 10 |
| 65. | Dobermann | 11 | 11 | 8 | 8 | 23 | 26 | 11 | 11 | 21 | 21 | 9 | 9 | 10 | 11 | 13 | 15.1 | 11 | 15 | 17.3 | 18.3 | 9 | 9 |
| 66. | Kaukázusi juhászk. | 11 | 13 | 8 | 10 | 25 | 31 | 9 | 9 | 19 | 20 | 8 | 9 | 10 | 12 | 13.3 | 15 | 9 | 11 | 16 | 16 | 9 | 10 |
| 67. | Pekingi palotakutya | 10 | 10 | 10 | 11 | 22 | 22 | 9 | 10 | 20 | 20 | 8 | 9 | 11 | 11 | 11 | 15.2 | 11 | 12 | 18 | 20 | 9 | 10 |
| 68. | Agár | 12 | 13 | 8 | 10 | 26 | 27 | 8 | 9 | 17 | 19 | 8 | 9 | 8 | 9 | 13 | 15.3 | 6 | 11 | 18 | 18 | 9 | 11 |
| 69. | Fox terrier | 12 | 12 | 8 | 10 | 25 | 27 | 9 | 11 | 19 | 23 | 8 | 9 | 8 | 10 | 12 | 14 | 15 | 18 | 18.3 | 18.3 | 10 | 10 |
| 70. | Délorosz juhászk. | 12 | 12 | 8 | 8 | 24 | 25 | 10 | 12 | 19 | 27 | 8 | 8 | 11 | 11 | 15 | 16 | 10 | 12 | 15 | 15 | 9 | 9 |
| 71. | Rottweiler | 12 | 13 | 8 | 8 | 25 | 25 | 9 | 9 | 18 | 18 | 8 | 9 | 10 | 10 | 13 | 15.3 | 12 | 12 | 17 | 17 | 9 | 13 |
| 72. | Shar-pei | 11 | 13 | 8 | 8 | 25 | 25 | 11 | 12 | 17 | 21 | 8 | 9 | 9 | 10 | 13 | 13.3 | 16 | 17 | 17.3 | 19.3 | 10 | 10 |
| 73. | Pointer | 12 | 12 | 9 | 9 | 25 | 25 | 11 | 11 | 20 | 20 | 8 | 8 | 10 | 11 | 16 | 16 | 12 | 12 | 17 | 19 | 9 | 9 |
| 74. | Puli | 14 | 15 | 8 | 10 | 26 | 27 | 8 | 9 | 19 | 21 | 8 | 9 | 11 | 11 | 12 | 15 | 15 | 15 | 19.3 | 19.3 | 9 | 9 |
| 75. | Erdélyi kopó | 12 | 12 | 10 | 10 | 28 | 31 | 11 | 11 | 19 | 20 | 8 | 9 | 10 | 10 | 12 | 17.3 | 11 | 17 | ? | ? | 10 | 11 |
| 76. | Uszkár | 12 | 13 | 8 | 8 | 26 | 29 | 11 | 11 | 17 | 19 | 8 | 9 | 10 | 12 | 12.3 | 14.3 | 14 | 18 | 16 | 18.3 | 10 | 11 |
| 77. | Pireneusi hegyikutya | 12 | 15 | 8 | 8 | 24 | 29 | 11 | 11 | 18 | 20 | 8 | 9 | 11 | 12 | 15.3 | 15.3 | 13 | 15 | 19.3 | 19.3 | 9 | 9 |
| 78. | Bernáthegyi | 13 | 13 | 8 | 8 | 26 | 27 | 11 | 11 | 17 | 21 | 8 | 9 | 11 | 12 | 13.3 | 15 | 11 | 12 | 17.3 | 17.3 | 9 | 11 |

**F2. táblázat (folyt.)** A vizsgált kutyák genetikai profilja tíz STR lokuszon

| | Minta | PEZ1 | | PEZ5 | | PEZ3 | | PEZ21 | | PEZ16 | | REN124 | | PEZ19 | | WILMS | | FF2054 | | FH2584 | | vWF.X | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 79. | Bernáthegyi | 13 | 14 | 8 | 8 | 23 | 26 | 11 | 12 | 20 | 21 | 9 | 9 | 11 | 11 | 13.3 | 15 | 11 | 12 | 16 | 18 | 9 | 12 |
| 80. | Bordeauxi dog | 11 | 12 | 8 | 8 | 25 | 25 | 10 | 10 | 20 | 20 | 8 | 9 | 12 | 12 | 12 | 17 | 16 | 16 | 16.3 | 16.3 | 9 | 10 |
| 81. | Szamojéd | 12 | 14 | 9 | 10 | ? | 26 | 11 | 11 | 20 | 20 | 8 | 9 | 9 | 9 | 11 | 16.3 | 15 | 17 | 16 | 16 | 9 | 9 |
| 82. | Nápolyi masztiff | 12 | 14 | 8 | 11 | 20 | 20 | 9 | 12 | 18 | 19 | 7 | 9 | 10 | 11 | 15 | 16 | 12 | 15 | 17 | 17 | 10 | 10 |
| 83. | Uszkár | 13 | 15 | 8 | 8 | 26 | 26 | 9 | 11 | 19 | 20 | 8 | 8 | 10 | 11 | 13 | 15 | 13 | 13 | 17 | 16.3 | 9 | 10 |
| 84. | Bullmasztif | 15 | 15 | 8 | 10 | 25 | 26 | 10 | 10 | 19 | 19 | 8 | 8 | 11 | 11 | 12 | 15 | 11 | 15 | 17 | 17 | 10 | 10 |
| 85. | Kerry blue terrier | 12 | 14 | 10 | 11 | 24 | 25 | 11 | 11 | 19 | 22 | 7 | 9 | 10 | 10 | 14 | 15 | 11 | 16 | 19.3 | 19.3 | 10 | 13 |
| 86. | Alaszkai malamut | 13 | 13 | 9 | 10 | 30 | 31 | 10 | 11 | 19 | 22 | 8 | 11 | 10 | 11 | 11.2 | 15.2 | 11 | 14 | 16 | 16 | 9 | 10 |
| 87. | Brie juhászk. | 12 | 14 | 8 | 8 | 23 | 28 | 11 | 11 | 22 | 22 | 7 | 9 | 10 | 10 | 15 | 15 | 10 | 15 | 17 | 17 | 9 | 9 |
| 88. | Német boxer | 12 | 13 | 8 | 8 | 25 | 26 | 9 | 9 | 20 | 21 | 8 | 8 | 10 | 10 | 12.1 | 12 | 11 | 18 | 17.3 | 20 | 9 | 10 |
| 89. | Törpe pincser | 12 | 16 | 9 | 11 | 27 | 27 | 12 | 12 | 18 | 18 | 8 | 9 | 10 | 11 | 14 | 17 | 12 | 15 | 18.3 | 18.3 | 9 | 10 |
| 90. | Angol bulldog | 13 | 13 | 8 | 8 | 29 | 29 | 11 | 11 | 19 | 20 | 9 | 10 | 10 | 11 | 14.1 | 15 | 14 | 15 | 19.3 | 19.3 | 9 | 9 |
| 91. | Magyar vizsla | 14 | 15 | 10 | 11 | 25 | 31 | 9 | 9 | 18 | 19 | 8 | 9 | 10 | 10 | 14 | 18 | 12 | 15 | 17 | 17 | 9 | 10 |
| 92. | Dalmata | 12 | 12 | 9 | 10 | 27 | 27 | 11 | 11 | 20 | 21 | 8 | 9 | 8 | 10 | 15.3 | 17 | 12 | 16 | 16.3 | 16.3 | 9 | 10 |
| 93. | Csivava | 12 | 14 | 8 | 8 | 26 | 30 | 8 | 10 | 18 | 23 | 8 | 9 | 11 | 11 | 15 | 16 | 11 | 12 | 17.3 | 17.3 | 9 | 9 |
| 94. | Basset hound | 13 | 13 | 8 | 8 | 23 | 23 | 9 | 9 | 18 | 19 | 8 | 8 | 10 | 10 | 13 | 14 | 12 | 12 | 17.3 | 19.3 | 9 | 9 |
| 95. | Hovawart | 14 | 14 | 8 | 9 | 24 | 25 | 11 | 11 | 18 | 19 | 8 | 8 | 11 | 12 | 14 | 14 | 15 | 15 | 19.3 | 19.3 | 9 | 9 |
| 96. | Német spicc | 12 | 13 | 8 | 9 | 28 | 29 | 9 | 9 | 18 | 19 | 8 | 9 | 11 | 11 | 17 | 18 | 11 | 15 | 19 | 20 | 9 | 14 |
| 97. | Si-cu | 11 | 12 | 9 | 10 | 25 | 25 | 9 | 12 | 16 | 19 | 8 | 8 | 11 | 11 | 12 | 14 | 15 | 17 | 18.3 | 18.3 | 9 | 9 |
| 98. | Airedale terrier | 12 | 14 | 8 | 8 | 30 | 30 | 9 | 11 | 17 | 20 | 8 | 9 | 10 | 11 | 13 | 13.3 | 12 | 12 | 18.2 | 18.2 | 9 | 10 |
| 99. | Tibeti terrier | 12 | 12 | 8 | 9 | 23 | 24 | 11 | 12 | 19 | 20 | 8 | 8 | 11 | 11 | 13 | 18 | 12 | 17 | 18.3 | 18.3 | 9 | 10 |
| 100. | Tacskó | 12 | 12 | 8 | 8 | 25 | 27 | 11 | 11 | 20 | 21 | 8 | 8 | 10 | 11 | 15 | 15 | 9 | 12 | 18.3 | 18.3 | 9 | 10 |
| 101. | Mopsz | 14 | 14 | 10 | 10 | 27 | 27 | 10 | 10 | 17 | 21 | 8 | 8 | 12 | 12 | 14 | 14 | 11 | 12 | 18 | 18 | 10 | 10 |
| 102. | Fila brasileiro | 11 | 12 | 10 | 10 | 29 | 31 | 9 | 11 | 19 | 19 | 9 | 9 | 11 | 12 | 14 | 15 | 14 | 15 | 17 | 17 | 9 | 9 |
| 103. | Újfundlandi | 10 | 14 | 7 | 8 | 27 | 29 | 8 | 11 | 17 | 19 | 8 | 8 | 10 | 11 | 17 | 17 | 11 | 14 | 17 | 17 | 10 | 10 |
| 104. | Arany retriver | 13 | 13 | 9 | 9 | 24 | 25 | 10 | 11 | 18 | 18 | 8 | 8 | 11 | 11 | 12.3 | 13 | 15 | 15 | 17 | 17 | 9 | 10 |
| 105. | Jagd terrier | 12 | 12 | 9 | 10 | 24 | 25 | 11 | 11 | 18 | 20 | 7 | 9 | 11 | 12 | 16.3 | 17.3 | 17 | 17 | 18 | 18 | 10 | 10 |
| 106. | Si-cu | 10 | 13 | 9 | 11 | 23 | 26 | 11 | 11 | 19 | 24 | 8 | 9 | 11 | 11 | 14 | 14 | 12 | 16 | 19 | 19 | 9 | 9 |
| 107. | Am. staffordshire terrier | 12 | 12 | 10 | 10 | 20 | 25 | 9 | 9 | 20 | 20 | 8 | 8 | 10 | 12 | 13 | 15.3 | 12 | 13 | 15 | 17 | 9 | 9 |
| 108. | Dobermann | 12 | 13 | 8 | 8 | 26 | 30 | 11 | 11 | 17 | 22 | 8 | 9 | 11 | 11 | 15 | 16 | 11 | 11 | 18.3 | 18.3 | 9 | 9 |
| 109. | Szibériai lajka | 12 | 15 | 10 | 10 | 24 | 24 | 9 | 11 | 19 | 22 | 8 | 9 | 9 | 10 | 14 | 14 | 11 | 16 | 17 | 18 | 10 | 11 |
| 110. | Szibériai lajka | 11 | 13 | 7 | 10 | 26 | 27 | 9 | 11 | 21 | 23 | 8 | 9 | 10 | 10 | 12 | 16 | 13 | 17 | 21.2 | 21.2 | 9 | 9 |
| 111. | Yorkshire terrier | 12 | 13 | 8 | 8 | 24 | 25 | 9 | 9 | 20 | 20 | 9 | 9 | 12 | 12 | 10 | 11 | 10 | 11 | 17.3 | 17.3 | 9 | 9 |
| 112. | Cane corso | 10 | 12 | 8 | 8 | 25 | 27 | 9 | 11 | 17 | 20 | 7 | 9 | 10 | 10 | 13 | 16 | 11 | 12 | 18.2 | 18.2 | 9 | 10 |
| 113. | Cane corso | 13 | 15 | 8 | 8 | 25 | 25 | 9 | 9 | 16 | 21 | 8 | 9 | 10 | 11 | 14 | 15.3 | 12 | 15 | 16 | 16 | 9 | 12 |
| 114. | Csivava | 12 | 15 | 8 | 9 | 27 | 29 | 10 | 10 | 20 | 20 | 9 | 9 | 11 | 11 | 15 | 15 | 12 | 12 | 16 | ? | 8 | 8 |
| 115. | Labrador retriever | 14 | 14 | 10 | 10 | 29 | 29 | 9 | 11 | 19 | 24 | 8 | 9 | 11 | 12 | 14.1 | 14.1 | 11 | 11 | 19 | 19 | 8 | 8 |
| 116. | Bullmasztif | 12 | 13 | 10 | 10 | 25 | 25 | 10 | 10 | 19 | 22 | 8 | 9 | 10 | 11 | 14 | 17 | 11 | 16 | 18 | 18.3 | 9 | 10 |

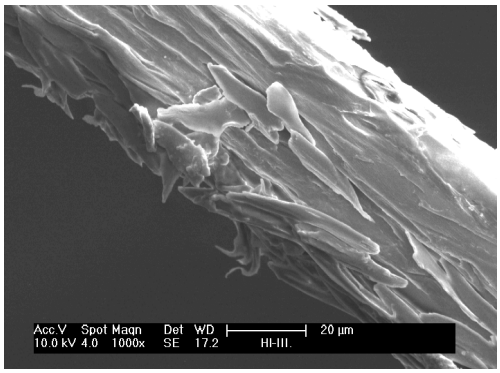
**F2. táblázat (folyt.)** A vizsgált kutyák genetikai profilja tíz STR lokuszon

**F3. táblázat** Allélgyakorisági értékek és populációgenetikai jellemzők a vizsgált kutyacsoportban (N = 116)

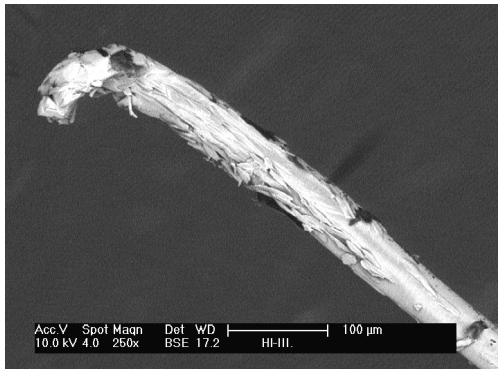
| Allél | PEZ1 | PEZ5 | PEZ3 | PEZ21 | PEZ16 | REN124 | PEZ19 | WILMS | FH2054 | FH2584 | vWF.X |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6 | | 0,013 | | | | | | | 0,004 | | |
| 7 | | 0,013 | | | | 0,047 | | | | | |
| 8 | | 0,539 | | 0,052 | | 0,496 | 0,026 | | | | 0,026 |
| 9 | | 0,147 | | 0,306 | | 0,431 | 0,026 | 0,004 | 0,013 | | 0,539 |
| 10 | 0,052 | 0,237 | | 0,155 | | 0,013 | 0,310 | 0,022 | 0,047 | | 0,349 |
| 11 | 0,099 | 0,052 | | 0,440 | | 0,013 | 0,440 | 0,039 | 0,181 | | 0,043 |
| 11.2 | | | | | | | | 0,004 | | | |
| 12 | 0,297 | | | 0,047 | | | 0,177 | 0,091 | 0,254 | | 0,030 |
| 12.1 | | | | | | | | 0,022 | | | |
| 12.3 | | | | | | | | 0,017 | | | |
| 13 | 0,280 | | | | | | 0,022 | 0,112 | 0,078 | | 0,009 |
| 13.1 | | | | | | | | 0,013 | | | |
| 13.3 | | | | | | | | 0,043 | | | |
| 14 | 0,190 | | | | 0,004 | | | 0,164 | 0,099 | | 0,004 |
| 14.1 | | | | | | | | 0,017 | | | |
| 14.3 | | | | | | | | 0,039 | | | |
| 15 | 0,073 | | | | 0,004 | | | 0,142 | 0,129 | 0,030 | |
| 15.1 | | | | | | | | 0,004 | | | |
| 15.2 | | | | | | | | 0,013 | | | |
| 15.3 | | | | | | | | 0,056 | | | |
| 16 | 0,009 | | | | 0,013 | | | 0,078 | 0,103 | 0,073 | |
| 16.2 | | | | | | | | 0,004 | | | |
| 16.3 | | | | | | | | 0,026 | | 0,043 | |
| 17 | | | | | 0,103 | | | 0,047 | 0,078 | 0,185 | |
| 17.3 | | | | | | | | 0,013 | | 0,116 | |
| 18 | | | | | 0,151 | | | 0,017 | 0,013 | 0,168 | |
| 18.2 | | | | | | | | | | 0,026 | |
| 18.3 | | | | | | | | 0,013 | | 0,095 | |
| 19 | | | | | 0,220 | | | | | 0,108 | |
| 19.3 | | | | | | | | | | 0,108 | |
| 20 | | | 0,017 | | 0,267 | | | | | 0,017 | |
| 20.2 | | | | | | | | | | 0,004 | |
| 21 | | | | | 0,116 | | | | | 0,009 | |
| 21.2 | | | | | | | | | | | |
| 22 | | | 0,047 | | 0,069 | | | | | | |
| 23 | | | 0,065 | | 0,013 | | | | | | |
| 23.1 | | | | | | | | | | 0,004 | |
| 24 | | | 0,108 | | 0,013 | | | | | | |
| 25 | | | 0,250 | | 0,004 | | | | | | |
| 26 | | | 0,151 | | 0,009 | | | | | | |
| 27 | | | 0,108 | | 0,013 | | | | | | |
| 28 | | | 0,039 | | | | | | | | |
| 29 | | | 0,099 | | | | | | | | |
| 30 | | | 0,056 | | | | | | | | |
| 31 | | | 0,047 | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PE | 0,573 | 0,385 | 0,740 | 0,433 | 0,661 | 0,275 | 0,420 | 0,825 | 0,704 | 0,763 | 0,317 |
| PD | 0,918 | 0,788 | 0,958 | 0,835 | 0,939 | 0,722 | 0,841 | 0,975 | 0,958 | 0,937 | 0,763 |
| PIC | 0,746 | 0,579 | 0,855 | 0,631 | 0,806 | 0,472 | 0,621 | 0,906 | 0,834 | 0,871 | 0,511 |
| $H_{obs}$ | 0,603 | 0,431 | 0,664 | 0,422 | 0,707 | 0,483 | 0,569 | 0,784 | 0,716 | 0,310 | 0,483 |
| $H_{exp}$ | 0,783 | 0,632 | 0,872 | 0,687 | 0,831 | 0,568 | 0,680 | 0,917 | 0,854 | 0,886 | 0,587 |
| SE | 0,038 | 0,045 | 0,031 | 0,043 | 0,035 | 0,046 | 0,043 | 0,026 | 0,033 | 0,030 | 0,046 |

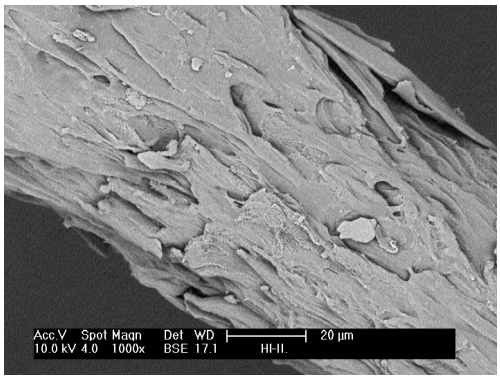
a.1.



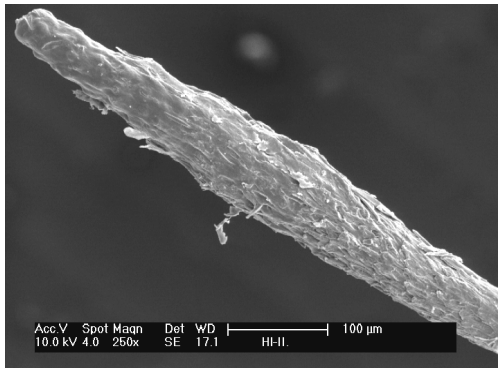

a.2.



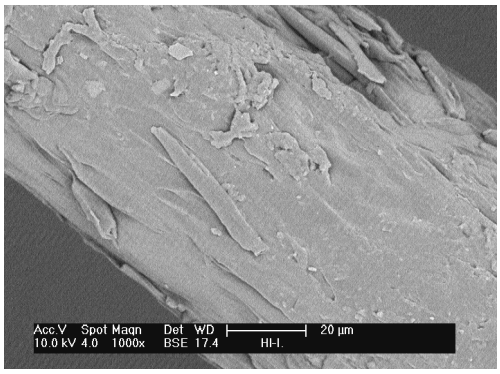

b.1.



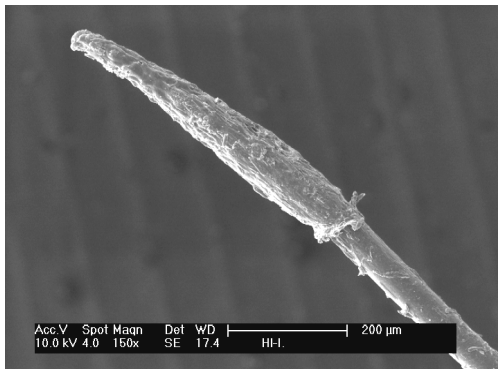

b.2.




c.1.




c.2.




**F8.a-c. ábra** Anagén (a.1.-a.2.), katagén (b.1.-b.2.) és késői katagén (c.1.-c.2.) kategóriába sorolt kutyaszőrök pásztázó elektronmikroszkópos képe (saját felvételek)

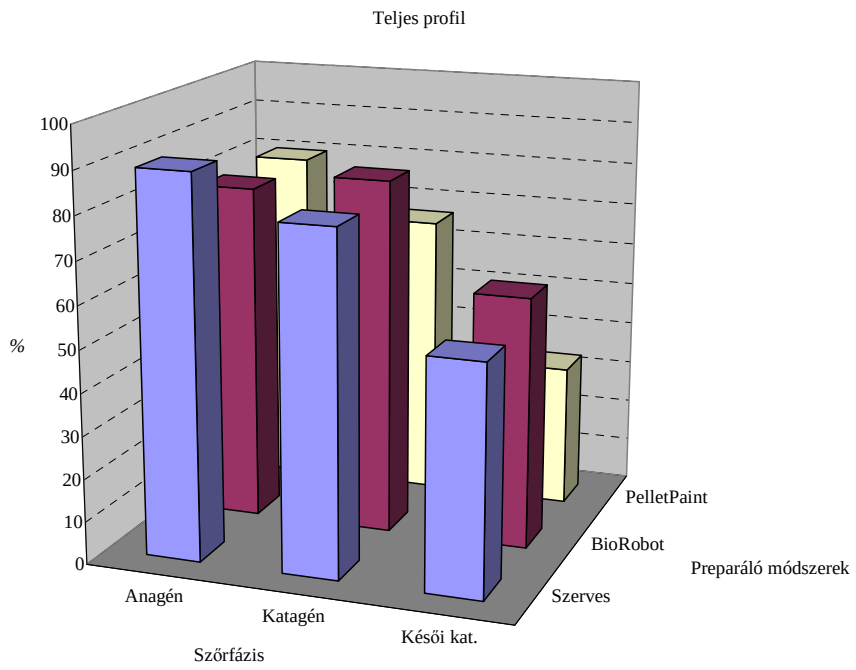
**F4. táblázat** DNS kinyerési módszereknek, szőrminták testtáji eredetének és fejlődési fázisának páronkénti összehasonlító elemzése, a teljes DNS-profil (fent) illetve ezeken belül az aberráns genotípusok (lent) generálásának függvényében (a szignifikáns eltérések piros színnel kiemelve)

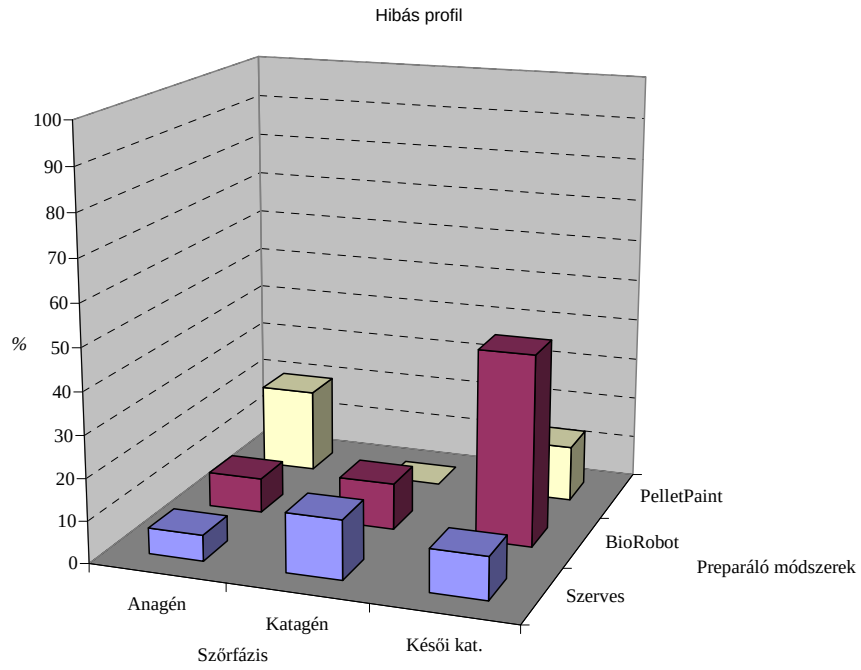
| | Páronkénti összehasonlítás | Eltérés a gyakoriságok arányaiban | Standard hiba | 95%-os konfidencia intervallum |
|---|---|---|---|---|
| TELJES DNS-PROFIL | **DNS-tisztító eljárások összehasonlítása** | | | |
| | Szerves-BioRobot | 0,01254 | 0,05793 | mín0,1010-0,1261 |
| | Szerves-PelletPaint | 0,1269 | 0,06554 | mín0,0016-0,2554 |
| | BioRobot-PelletPaint | 0,1144 | 0,08773 | mín0,0576-0,2864 |
| | **Különböző testtájról gyűjtött szőrminták összehasonlítása** | | | |
| | Hát-Pofa | 0,06327 | 0,05181 | mín0,03831-0,1649 |
| | Hát-Első lábak | 0,01049 | 0,05057 | mín0,08866-0,1096 |
| | Hát-Hátsó lábak | 0,04006 | 0,04669 | mín0,05146-0,1316 |
| | Pofa-Hátsó lábak | 0,1033 | 0,05837 | mín0,01109-0,2178 |
| | Pofa-Első lábak | 0,05278 | 0,06278 | mín0,07029-0,1759 |
| | Hátsó lábak-Első lábak | 0,05056 | 0,05633 | mín0,05987-0,1610 |
| | **Eltérő növekedési fázisú szőrök összehasonlítása** | | | |
| | Anagén-Katagén | 0,07308 | 0,03846 | mín0,002323-0,1485 |
| | Anagén-Késői katagén | 0,3414 | 0,05086 | 0,2417-0,4411 |
| | Katagén-Késői katagén | 0,2683 | 0,04507 | 0,1799-0,3567 |

| | Páronkénti összehasonlítás | Eltérés a gyakoriságok arányaiban | Standard hiba | 95%-os konfidencia intervallum |
|---|---|---|---|---|
| ELTÉRŐ DNS-PROFIL | **DNS-tisztító eljárások összehasonlítása** | | | |
| | Szerves-BioRobot | 0,1491 | 0,05766 | 0,03607-0,2622 |
| | Szerves-PelletPaint | 0,04479 | 0,06723 | mín0,08701-0,1766 |
| | BioRobot-PelletPaint | 0,1043 | 0,101 | mín0,09374-0,3024 |
| | **Különböző testtájról gyűjtött szőrminták összehasonlítása** | | | |
| | Hát-Pofa | 0,07903 | 0,05219 | mín0,02329-0,1814 |
| | Hát-Első lábak | 0,02504 | 0,05204 | mín0,07699-0,1271 |
| | Hát-Hátsó lábak | 0,03009 | 0,04765 | mín0,06332-0,1235 |
| | Pofa-Hátsó lábak | 0,04894 | 0,05415 | mín0,05722-0,1551 |
| | Pofa-Első lábak | 0,05415 | 0,05707 | mín0,05790-0,1659 |
| | Hátsó lábak-Első lábak | 0,005051 | 0,05604 | mín0,1048-0,1149 |
| | **Eltérő növekedési fázisú szőrök összehasonlítása** | | | |
| | Anagén-Katagén | 0,0702 | 0,03775 | mín0,003811-0,1442 |
| | Anagén-Késői katagén | 0,203 | 0,05117 | 0,1027-0,3033 |
| | Katagén-Késői katagén | 0,1328 | 0,0501 | 0,03455-0,2310 |

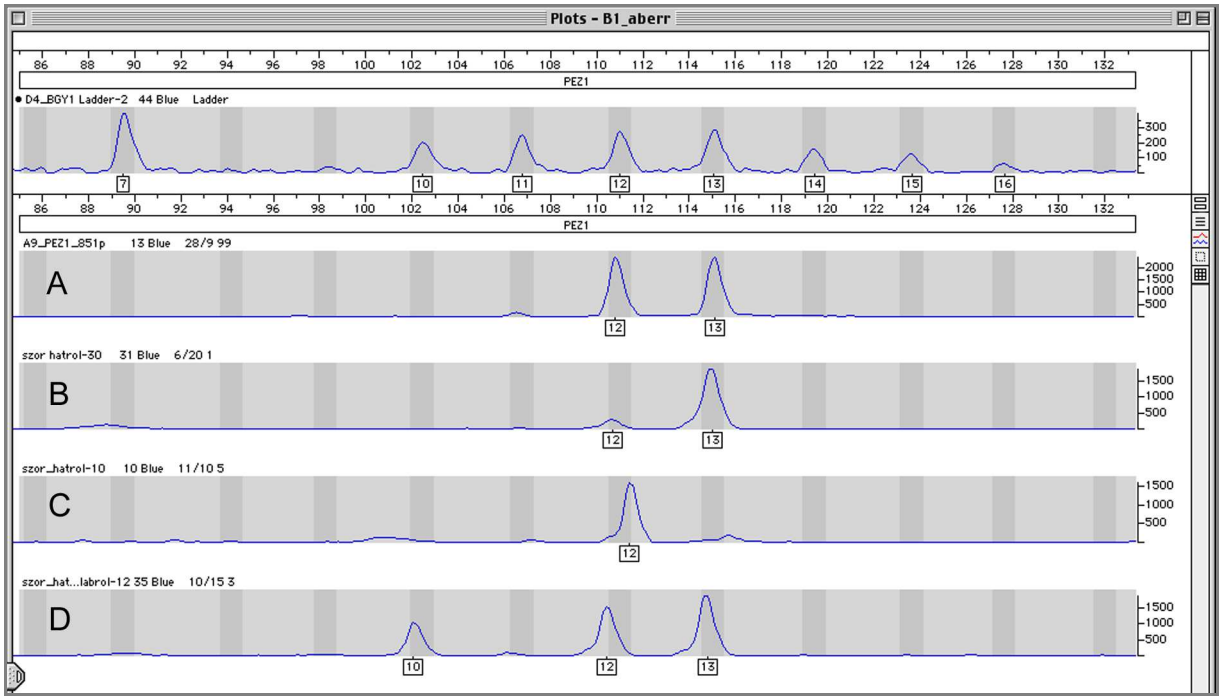
**F5. táblázat** Összesített táblázat a négy különböző testrészről gyűjtött szőrök darabszámáról és fejlődési stádiumáról, a három alkalmazott DNS-kivonási technika sikerességéről és a valódi genotípustól megfigyelt eltérések számáról

| | | 3 módszer összesítve | | | | 1. Szerves | | | | 2. BioRobot | | | | 3. Pellet Paint | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Testrész** | **Szőrfejl. fázis** | **Össz.** | **PCR termék** | **Teljes profil** | **Eltérés** | **Össz.** | **PCR termék** | **Teljes profil** | **Eltérés** | **Össz.** | **PCR termék** | **Teljes profil** | **Eltérés** | **Össz.** | **PCR termék** | **Teljes profil** | **Eltérés** |
| **HÁT** | **Összes** | **261** | **237** | **193** | **37** | **249** | **228** | **187** | **37** | **0** | **0** | **0** | **0** | **12** | **9** | **6** | **0** |
| | Anagén | **58** | 58 | 50 | 5 | **53** | 53 | 46 | 5 | **0** | 0 | 0 | 0 | **5** | 5 | 4 | 0 |
| | Katagén | **125** | 114 | 98 | 23 | **123** | 113 | 97 | 23 | **0** | 0 | 0 | 0 | **2** | 1 | 1 | 0 |
| | Késői kat. | **78** | 65 | 45 | 9 | **73** | 62 | 44 | 9 | **0** | 0 | 0 | 0 | **5** | 3 | 1 | 0 |
| **POFA** | **Összes** | **105** | **84** | **71** | **8** | **77** | **60** | **51** | **5** | **16** | **13** | **11** | **2** | **12** | **11** | **9** | **1** |
| | Anagén | **27** | 26 | 25 | 0 | **16** | 16 | 16 | 0 | **6** | 5 | 5 | 0 | **5** | 5 | 4 | 0 |
| | Katagén | **34** | 30 | 26 | 4 | **26** | 23 | 20 | 4 | **3** | 2 | 2 | 0 | **5** | 5 | 4 | 0 |
| | Késői kat. | **44** | 28 | 20 | 4 | **35** | 21 | 15 | 1 | **7** | 6 | 4 | 2 | **2** | 1 | 1 | 1 |
| **MELSŐ LÁBAK** | **Összes** | **107** | **96** | **78** | **13** | **80** | **74** | **60** | **9** | **14** | **12** | **9** | **5** | **13** | **10** | **9** | **5** |
| | Anagén | **31** | 28 | 24 | 8 | **21** | 18 | 17 | 0 | **5** | 5 | 3 | 0 | **5** | 5 | 4 | 4 |
| | Katagén | **55** | 49 | 40 | 2 | **47** | 44 | 35 | 5 | **4** | 2 | 2 | 1 | **4** | 3 | 3 | 0 |
| | Késői kat. | **21** | 19 | 14 | 3 | **12** | 12 | 8 | 4 | **5** | 5 | 4 | 4 | **4** | 2 | 2 | 1 |
| **HÁTSÓ LÁBAK** | **Összes** | **127** | **107** | **99** | **16** | **80** | **69** | **65** | **3** | **34** | **30** | **27** | **7** | **13** | **8** | **7** | **0** |
| | Anagén | **42** | 40 | 38 | 0 | **24** | 24 | 23 | 2 | **13** | 12 | 11 | 2 | **5** | 4 | 4 | 0 |
| | Katagén | **53** | 50 | 48 | 6 | **38** | 36 | 35 | 1 | **11** | 11 | 11 | 1 | **4** | 3 | 2 | 0 |
| | Késői kat. | **32** | 17 | 13 | 10 | **18** | 9 | 7 | 0 | **10** | 7 | 5 | 4 | **4** | 1 | 1 | 0 |
| **Összesen** | | **600** | **524** | **441** | **74** | **486** | **431** | **363** | **54** | **64** | **55** | **47** | **14** | **50** | **38** | **31** | **6** |

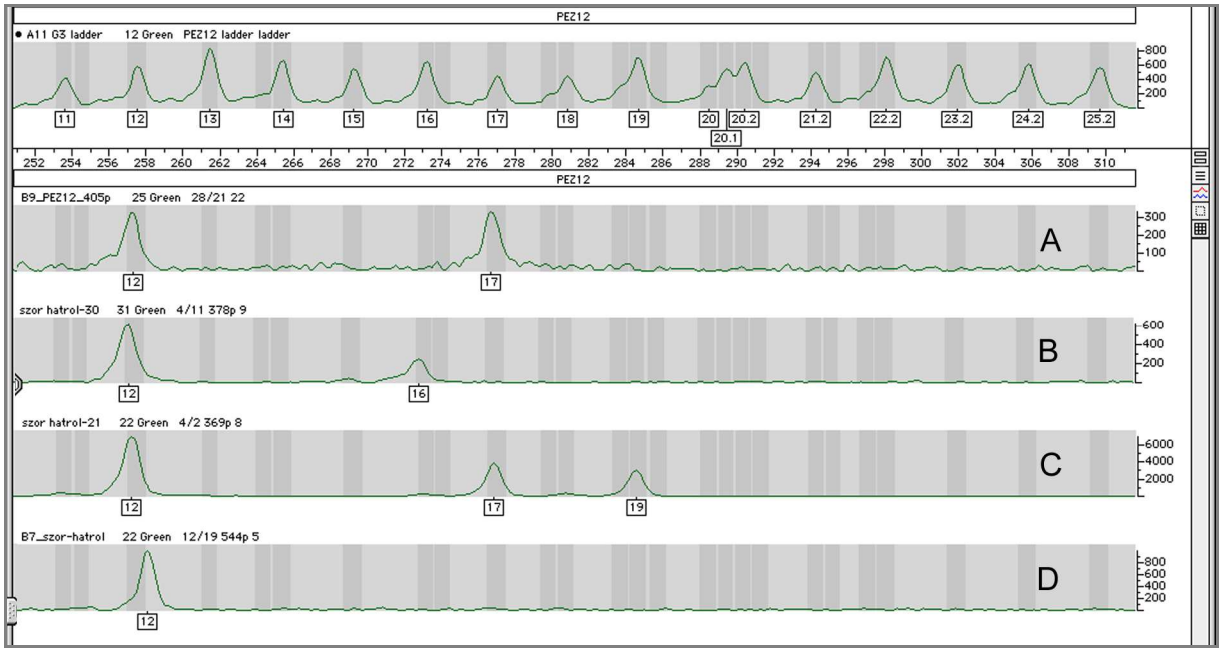



**F9. ábra** DNS-kivonási módszerek sikerességének összehasonlítása eltérő növekedési fázisú szőrökből: teljes genetikai profilt adó szőrök aránya az összes vizsgált szőrhöz képest (fent) és ezen belül az eltérőként kimutatott genotípusok aránya (lent)




**F10.a. ábra** Az egyed valós genotípusától (A) eltérő allélmintázatok [B: kiegyenlítetlen, C: allélkiesés, D: extra allél] az első multiplex PCR után a PEZ1 lokuszon




**F10.b. ábra** Az egyed valós genotípusától (A) eltérő allélmintázatok [B: aberráns, C: extra allél, D: allélkiesés] az első multiplex PCR után a PEZ12 lokuszon

## 11 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.

Köszönőm Woller Jánosnak az allélnevezéktan 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.