

Nyugat - magyarországi Egyetem Savaria Egyetemi Központ
Természettudományi és Műszaki Kar

Biológia Intézet
Állattani Tanszék

Biológiai nem meghatározása humán szövetekből és archeológiai mintákból molekuláris biológiai módszerekkel



Konzulens:
Dr. Molnár Péter
Egyetemi docens

Készítette:
Draskóczy Lilla Gréta
Biológia BSc

Szombathely

2015.

Tartalom

1	Bevezetés.....	6
2	Célkitűzés.....	7
3	Irodalmi áttekintés.....	8
3.1	A régészet.....	8
3.2	Kriminálisztika.....	9
3.3	A molekuláris biológia a régészetben és a kriminálisztikában.....	10
3.4	Molekuláris biológiai módszerek alkalmazása.....	10
3.5	A nemi hovatartozás meghatározása.....	19
3.6	PCR módszer.....	21
3.6.1	A DNS szerkezete.....	22
3.7	A vér anatómiája.....	23
3.7.1	Vörösvértestek.....	24
3.7.2	Fehérvérsejtek.....	24
3.7.3	Vérlemezkék.....	28
3.8	Kromoszómák és rendellenességek.....	28
3.9	Vércsoportok.....	29
3.10	A fog anatómiája.....	31
4	Anyag és Módszerek.....	34
4.1	Csontleletek.....	34
4.2	DNS kivonás vérből.....	34
4.3	PCR módszer alkalmazása a vérmintáknál.....	36
4.4	Agaróz gél elektroforézis a vérmintáknál.....	37
4.5	A fogminták előkészítése és a DNS kivonása.....	38
4.6	PCR alkalmazása a fogaknál.....	39

4.7	Agaróz gélelektroforézis a fogaknál.....	40
5	Eredmények.....	42
6	Megvitatás	44
7	Köszönetnyilvánítás	45
8	Felhasznált irodalom	45

Rövidítések jegyzéke:

°C	Celsius-fok
μl	Mikroliter
BAC	Bakteriális mesterséges kromoszóma
CO	Szén-monoxid
CO ₂	Szén-dioxid
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
FISH	Fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció
HAC	Humán mesterséges kromoszóma
NaCl	Nátrium-klorid
NaHCO ₃	Nátrium-hidrogénkarbonát
NH ₄ Cl	Ammónium-klorid
O ₂	Oxigén
'OH	Hidroxil-csoport
PAGE	Poliakrilamid gélelektroforézis
RNS	Ribonukleinsav
rpm	Percenkénti fordulatszám
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát
T _c	Citotoxikus T sejt
T _h	Segítő T sejt
Tris-HCl	Tris-Hidrogén-klorid
T _s	Szupresszáló T sejt
YAC	Élesztő mesterséges kromoszóma

"Minden csepp emberi vér a génjeink nyelvén íródott történelemkönyvet rejt."

Spencer Wells

1 Bevezetés

A régészet fő kérdésköre az ember, és célja, hogy megállapítsa, hogyan éltek a közeli és távoli múltban. Ennek a célnak az eléréséhez csak korlátozott eszközökkel rendelkezünk, így az emberi csontmaradványok alapos vizsgálata elengedhetetlen (Mays, 1998). Gyakran hasonló problémákkal és módszerekkel dolgozik a kriminalisztika is. Az ismeretlen személyazonosságú embereknél, így az emberi csontmaradványoknál is az egyik legfontosabb lépés a nem meghatározása. Teljes felnőtt csontváz esetén ez általában nem jelent problémát, de hiányos régészeti leletek esetére is számos meghatározási módot dolgoztak ki, például a fogak vizsgálata alapján (Vodanović, 2007). A közelmúltig csak a csontok méretéből és alakjából tudták meghatározni az emberi maradványok nemét mind régészeti mind törvényszéki keretek között.

A mai kor egyik felfedezése, hogy az ősi csontanyagokból visszamaradt DNS vizsgálatával laboratóriumi körülmények között pontosan megállapítható a biológiai nem a DNS-ből kimutatott X és Y kromoszóma segítségével. Ezeknek a vizsgálatoknak a hasznossága akkor nyilvánvaló, amikor hagyományos csonttani meghatározást nem lehet alkalmazni a nem megállapítására, mert az eredmények nem egyértelműek, mint pl. serdülő kor előtti csontvázaknál, ahol a másodlagos nemi jellegek nem alakultak ki vagy hiányos csontmaradványok esetében. A molekuláris biológiai módszerek fontos információkkal járulnak hozzá a törvényszéki esetekhez, valamint lehetővé teszik a régészeti elemzések bővítését (Stone, 1996). A polimeráz-láncreakció (PCR) módszer segítségével történik a nem meghatározása, ezt törvényszéki eseteknél is alkalmazzák, az eljárás során az X és Y kromoszómára jellemző régiók felerősítése történik (Morikawa, 2011).

Ennek a kísérletsorozatnak az volt a célja, hogy találjunk egy alkalmas molekuláris biológiai módszert, amellyel biztonságosan megállapítható a nem az ősi csontmaradványoknál, valamint ezeket az eredményeket felhasználva következtetéseket vonhassunk le régi korok temetkezési szokásaira és a népesség arányára.

2 Célkitűzés

- A molekuláris biológiai módszerek régészeti alkalmazásainak áttekintése az irodalom alapján.
- Egy biztonságosan alkalmazható molekuláris biológiai módszer kifejlesztése, amellyel meg lehet határozni a biológiai nemet archaikus mintákból.
- A módszer optimalizálása vér és fogmintákon.
- A módszer régészeti alkalmazásának demonstrálása.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 A régészet

A régészet vagy archeológia a régi kori emberekkel, kultúrákkal és azok maradványainak feltárásával foglalkozó humán és egyben történelmi tudományterület. A leggyakoribb módszer ezekre az ásatások, ahol a föld alól tárják fel a régi épületeket vagy sírokat. A régészeti feltárások történhetnek a perzselő sivatagoktól kezdve, az Atlanti-óceán mélyén át a fagyos Északi-sarkvidékig. A régész feladatainak körébe nem csak a feltárás és a feltárt anyagok értelmezés tartozik, hanem a világ kulturális örökségének a megőrzése is. Tehát a régész egyszerre végez fizikai munkát a terepen, dolgozik az irodában és a laboratóriumban. Mivel az ásatások során előkerült maradványok nem túl sokatmondóak a régésznek kell értelmezni azokat. A régészek által használt módszerek nagy mértékben hasonlítanak a természettudományokban alkalmazottakhoz, az adatgyűjtés utána kísérleteket végeznek, elméleteket állítanak fel melyeket más adatokkal összehasonlítanak majd ezek alapján felállítanak egy modellt ami reprezentálja a végső eredményeket (Renfrew, 1999).

A régészet egyik részterülete az antropológia vagy embertan, ami az ember fejlődését kutatja. Az antropológiának két részterülete van:

- a fizikai antropológia: vagy biológiai antropológia, amely az egyes embereket, mint élőlényeket kutatja, a fizikai és biológiai jellemvonásaik és kialakulásuk azaz a testi tulajdonságok az elsődleges megfigyelési szempont a kutatások során
- a kulturális antropológia: vagy szociálanropológia, amely az egyedülálló, nem-biológiai-jellemvonások összességét tanulmányozza. Az ember által kialakított kultúrát és társadalmat kutatja. Két fontos részterülete van az etnográfia (leíró) és az etnológia (összehasonlító).

A régészet célja, hogy egy egységes képet kapjunk a múlttól a régészek részletről részletre haladó munkája során (Renfrew, 1999).

3.2 Kriminálisztika

A kriminálisztika a bűnügyi nyomozás tudománya. A fő feladata a bűncselekményeknek a felderítése és bizonyítása, ezeknek az eszközeit és módszereit tárja fel és rendszerezi jogi keretek között. Bizonyos körülmények között a régészethez hasonló kihívásokkal néz szembe, amikor az áldozatokat például csontmaradványok alapján kell azonosítani. A kriminálisztikának három részterülete van (Tremmel, 2005):

- a krimináltechnika a tárgyi bizonyítékokkal foglalkozó tudományterület, azok a természettudományos és műszaki-technikai eszközök és eljárások tartoznak ide melyek a bűnfelderítés során célszerű és szakszerű felhasználásával elősegítik a nyomozás előrehaladását. Ide tartoznak olyan tudományterületek amik a kriminálisztika tovább-fejlődésével jöttek létre pl. szerológiai vizsgálatok, hangazonosítás stb. Más tudományterületeknek vagy azok egyes részterületeinek az eredményeinek a felhasználása pl. biológiai, fizikai, kémiai stb. amik segítik a nyomozást és olyan szakágak is ide tartoznak amiket a krimináltechnika hozott létre pl. ujjnyomatrendszeren alapuló nyilvántartás és személyazonosítás, igazságügyi írásvizsgálat és lőfegyvertan stb. annak érdekében, hogy a nyomozást elősegítse.
- a krimináltaktika a személyi jellegű (nem tárgyi pl. sértettek, elkövetők, tanúk stb.) bizonyítékok beszerzésével, sajátosságaival és azok összefüggéseivel foglalkozó tudomány. Ezekkel a tevékenységekkel segíti elő a sikeres és hatékony nyomozást. A bizonyítékok beszerzése során rámutat annak veszélyeire, olyan hiányosságokra melyeket a nyomozást végző szerv/személy végez, követelményekre, melyekre szükség van a nyomozás megtervezésénél. Összehangolja a vizsgálat során az adatok beszerzését és feldolgozását, illetve ezekhez tartozó műveleteket.
- a kriminálmetodika, mondhatjuk akár alkalmazott kriminálisztikának is, ami kimondottan bűncselekmények felderítésével és azoknak a bizonyításával pl. emberölés, betörés, robbantás stb. foglalkozik (Tremmel, 2005).

Az azonos célt szolgáló és azonos tevékenységet kiszolgáló ismeretek megfelelő csoportosítását elősegíti a kriminalisztika belső rendszerének a sikeres működése. Ezen kívül a nemzetközi együttműködés is hozzájárul a bűnözés elleni hatékonyabb harchoz. A más tudományterületekkel kialakult kapcsolatokhoz vezető utakat is kijelöli a még sikeresebb nyomozás érdekében (Bócz, 2014).

3.3 A molekuláris biológia a régészetben és a kriminalisztikában

Mind a kriminalisztikában, mind pedig a régészetben alkalmaznak molekuláris biológiai eljárásokat. A régészeti ásatások során az előkerült csontmaradványok vagy gyermek csontvázak nemének a megállapításához szükségesek a molekuláris biológiai eljárások. Ezeknél a leleteknél ugyanis kétséges a morfológiai vizsgálatokból eldönteni a nemi hovatartozást. A DNS kivonása után, X- és Y-kromoszóma specifikus primereket alkalmazunk a nem megállapításához.

A kriminalisztikában az ismeretlen személyazonosságú holttesteknél, testrészeknél és csontmaradványoknál lehet szükséges a molekuláris biológiai módszerek alkalmazására. Egy személy genotípusát az anyai és apai allélok együtt adják meg. Ha egy adott lókuszra nézve a személy ugyanolyan allélokat kapott akkor homozigóta ha eltérőeket akkor heterozigóta. Egy adott mintán a független lókuszok egymás után történő vizsgálatával majd a genotípusok összevonásával készítik el a DNS profilt, ami az egyént egyedileg jellemzi. Egy populációban egy adott DNS-profil többször is előfordulhat, így számszerűen meg kell adni a statisztikus gyakoriságot (Woller, 1995).

3.4 Molekuláris biológiai módszerek alkalmazása

A molekuláris biológiai nem egy elkülönült tudományterület hanem szoros összefüggésben van más tudományokkal. A molekuláris biológiai vizsgálatoknál főleg biológiai eredetű molekulákat vizsgálunk pl. szénhidrátok, zsírok, fehérjék és nukleinsavak. Ezek alkotják a sejteket és szöveteket melyek szintén lehetnek vizsgálat "alanyai".

A molekuláris biológia technikák a következők:

- elválasztási technikák,
- sejttenyészetek fenntartása, manipulálása,
- DNS-, RNS-, fehérjeizolálási technikák,
- nukleinsav-módosító enzimek,
- polimeráz láncreakció,
- szekvencia meghatározás,
- hibridizációs technikák,
- vektorok,
- klónozás, nukleinsav-könyvtárak,
- expressziós rendszerek,
- mutagenézis, géncsendesítés,
- fehérjék kimutatása,
- fehérje interakciók.

Elválasztás technikák

Az elválasztás technika lényege, hogy a molekulák fizikai és kémiai tulajdonságaiknál fogva különböznek és ezt kihasználva egymástól el tudjuk őket szeparálni. Az elválasztás technika alapja a hajtóerő pl. nyomás, gravitáció, elektromos- vagy mágnesen mezőtér, melyet önálló erőként vagy többet együtt alkalmazva használhatunk.

Az elválasztás technikák közé tartozik:

- a szűrés, melynek két speciális esete van:
 - a koncentráció és a dialízis,
- a centrifugálás,
- a kromatográfia ahol megkülönböztetünk:
 - kizárásos, adszorpciós (gázkromatográfia), megoszlási (papír- és vékonyrétekes kromatográfia), ioncserés és affinitásos kromatográfiát,
- a gélelektroforézis amiből alkalmazhatunk:

- agaróz, pulzáló erőterű, poliakrilamid (PAGE) vagy kétdimenziós (2D) gélelektroforézist,
- és a kapilláris elektroforézis.

Sejttenyészetek fenntartása, manipulálása

Gyakran a kutatások során szükségünk van élő organizmusra ilyenkor a sejttenyészetek adnak lehetőséget a vizsgálatok elvégzésére. Ezeket a sejteket izolálni tudjuk, *in vivo* vizsgálatoknál fel tudjuk használni illetve szaporítani tudjuk őket.

A tenyészet lehet:

- bakteriális,
- élesztőgombás,
- állati vagy emberi, ahonnan három féle sejt kultúrát származtathatunk:
 - immortalizált, őssejtek és primer sejt kultúrák,
- növényi,
- virális.

A különböző tenyészetek általában más eljárást igényelnek a tenyésztésnél és a transzformálásnál is.

DNS-, RNS-, fehérje izolálási technikák

A leggyakrabban a DNS-, RNS- és fehérjék izolálásával foglalkozik a molekuláris biológia. Az izolálásnál alkalmazott módszereknél figyelembe kell venni a fizikai behatásokat, a vegyszerekre való érzékenységet és a biológiai érzékenységet a három makromolekulánál, ugyanis máshogy reagálnak ezekre. Az, hogy ezeknek mennyire állnak ellen határozza meg az érzékenységüket.

A nukleinsavak izolálásának három lépése van, először a mintából el kell távolítani a más jellegű makromolekulákat, utána meg kell akadályozni, hogy a nukleázok működésbe lépjenek, de legalábbis minél kevesebb bontó enzim aktiválódjon, végül a sejt- és egyéb törmelékből ki kell nyerni a nukleinsavat. Az izolálásának több formája van, történhet hagyományos módszerrel, vegyszerekkel

pl. fenol, kloroform stb. de ezek az emberi szervezetre káros hatással vannak. Használhatunk kaotróp ionokat tartalmazó sókat is, így a nukleinsavakat üveg felületre tudnak kötődni, erre a legalkalmasabb a szilikagyöngy vagy -membrán, melyre specifikusak. Ez egy gyors és egyszerű eljárás, de a kivonáshoz szükséges még egy arra alkalmas kit is (Wunderlich, 2014).

Genomi DNS-t szövetekből, vérből és sejtkultúrákból is tudunk izolálni. Szövetek esetén a mintát homogenizálni kell, amihez különböző módszerek állnak rendelkezésünkre pl. potter, dörzsmozsár stb. attól függően, hogy milyen szövetből akarjuk kivonni a DNS-t. A sejtek líziséhez egy úgynevezett lízis buffer alkalmazunk melyben általában van Tris, kelátor (EDTA), detergens (SDS) és RN-áz. A fehérjék eltávolításához proteináz-K-t alkalmazunk. A tisztítás a továbbiakban történhet fenolos extrakcióval vagy gradiens centrifugával, majd alkoholos kicsapással vagy dialízissel hozzájutunk a tiszta DNS-hez.

A plazmid izolálásnál a sejteket lúgos sejtlyízissel tárjuk fel, így a DNS kettős szála szétválik, a lúgon kívül SDS is van az oldatban. A feltárás után semlegesíteni kell az oldatot kálium-acetáttal. Ennek hatására a genomi DNS a fehérjékkel komplexet alkotnak. Kálium-ionnal a kicsapott SDS-ben csapadék jelenik meg ami tartalmazza a fehérjét és a genomi DNS-t melyek centrifugálással elválaszthatók egymástól majd a felülúszóból ki tudjuk csapatni a plazmid DNS-t.

A DNS fragment izolálásnál csak egy bizonyos szakaszra van szükségünk, az elválasztás után ezt a szakaszt izolálnunk kell, melyre számos módszer rendelkezésünkre áll:

- elektroelúció,
- alacsony olvadáspontú (low melting point) agaróz,
- olvasztásos kaotróp sók,
- gélből való kipréseles.

A DNS izoláláson kívül még RNS-t és fehérjét is lehet izolálni, melyre szintén több-féle módszert alkalmazhatunk.

Nukleinsav-módosító enzimek

A nukleinsav módosító enzimek közé tartoznak a

- polimerázok: lehet DNS-polimeráz és RNS-polimeráz.
- nukleázok: ide tartoznak a dezoxiribónukleázok, melyből vannak:
 - aspecifikus DN-ázok, restrikciós endonukleázok és ribonukleázok.
- ligázok
- másodlagos módosító enzim: ezek lehetnek alkalikus foszfatázok, polinukleotid kinázok, és metilázok.
- térszerkezet módosító enzimek: a helikázok és topoizomerázok.

Polimeráz láncreakció

A PCR elve, működése, és a reakcióhoz szükséges elegyek az "Irodalmi áttekintés, 3.6"-os részében van leírva.

Szekvenciameghatározás

A szekvenciameghatározás során a nukleinsavak és fehérjék bázissorrendjét állapítjuk meg. A DNS bázissorend meghatározásához három klasszikus módszer van:

- a Sanger-féle lánctermináción alapuló DNS-szekvenálás,
- a Maxam- és Gilbert-féle kémiai hasításos módszer,
- és a Sanger-Coulson-féle DNS szekvenálás.

A technikák közül csak az legelső terjedt el egyszerűsége miatt. Még ennél is gyorsabb és egyszerűbb módszer az új generációs szekvenálás. Az eljárások még nem forrtak ki teljesen de mindegyiknél PCR segítségével erősítik fel a szekvenálni kívánt DNS-szakaszt majd egy nagy teljesítményű számítógép összeilleszti a töredezett DNS-szakaszokat.

A fehérjék szekvenciájának klasszikus módszere az Edman degradáció. Ennél van egy újabb módszer a tömegspektrométerrel történő szekvenálás.

Hibridizációs technikák

Ezen technika nyújt segítséget ahhoz, hogy a nukleinsavak méretét, elhelyezkedését és mennyiségét meg tudjuk határozni (Wunderlich, 2014). A technika során egy speciálisan kötődő jelölt egyszálú kb. 200-2000 nukleotidnyi nukleinsavat alkalmazunk ami a komplementer szálhoz kötődik. A jelölt nukleinsav jelenléte és mennyisége is kimutatható. A különböző eljárásokhoz különböző hibridizációs technikát fejlesztettek ki. A technikák a következők:

- Southern-blot,
- Northern-blot,
- dot blot és slot blot,
- nuclease-protection assay,
- DNS chip,
- kolónia hibridizáció,
- fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH).

Vektorok

A vektorokat a molekuláris biológiában arra használják, hogy idegen DNS-t élő sejtekbe juttatnak be. Általában a vektorok plazmidok vagy bakteriofágok, de használhatják a kombinációjukat amit kozmidnak nevezünk vagy, mesterséges kromoszómákat is alkalmazhatnak. A vektoroknak két csoportja van a klónozó és az expresszáló, de vannak olyan vektorok amik mind a két funkciót képesek betölteni.

A plazmidok közül három fajtát különböztetünk meg: az F plazmid (szexplazmid), az R plazmid (rezisztenciaplazmid), és a Col plazmid (antibiotikum termelő plazmid). Az egyik legrégebben felfedezett plazmid a pBR322, amit mesterséges úton létrehozott DNS-darabok összevarrására használnak. Ez a plazmid tartalmaz egy replikációs origót és két antibiotikum rezisztens gént is, tovább alkalmas pozitív és negatív szelekcióra is.

A bakteriofágok olyan vírusok amik a baktériumok felszínén vagy bennük élősködnek. Képesek módosítani a baktérium működését oly módon, hogy a

genetikai anyagukat beléjük juttatják. A bakteriofágokat így mint vektorokat is képesek vagyunk alkalmazni, hogy egy olyan DNS szakaszt juttassunk a baktériumba amit mi szeretnénk. A λ -fág tipikus klónozó vektor, az M13 fág pedig nem csak klónozó vektorként hanem expressziós vektorként is alkalmazhatjuk.

Az egyik legegyszerűbb mód kimutatni, hogy az idegen DNS beépült-e a plazmidba a kék-fehér szelekció. Ha az agaron kék termék keletkezik ép az enzim és a mestéségesen hozzáadott szubsztrátot (X-gal) elhasítja, viszont ha fehér termék keletkezik az enzim nem működő képes, nem tudja elhasítani a szubsztrátot. A kék-fehér szelekciónál a legrégebb óta alkalmazott vektor a pUC18/19.

A kozmidok alapvetően λ -fágok de hiányoznak belőle a λ -fág génjei, csak a DNS becsomagolásához szükséges cos-régió található meg bennük. A kozmidokon belül van egy csoport a fozmidok, amiknek az alapja bakteriális F-plazmid.

A mesterséges kromoszómákat genomi könyvtárak készítéséhez alkalmazzák ugyanis nagy-méretű DNS darabot képesek tárolni. Vannak olyan mesterséges kromoszómák, melyek az élesztőben történő replikációhoz szükséges szakaszokat tartalmazzák, ezeket YAC-nak (yeast artificial chromosome) nevezzük. A bakteriális mesterséges kromoszómákat BAC-nak (bacterial artificial chromosome), és az emberi mesterséges kromoszómákat HAC-nak (human artificial chromosome).

A virális vektorokkal képesek vagyunk vírusok segítségével transzgeneknek a bejuttatására. Attól függően, hogy a gazda milyen, a vírus vektorok integrálódhatnak (pl. retrovírus), a genomba vagy episzómaként (pl. Eppstein-Barr vírus), jelenhetnek meg. Ezek a vektorok nagy határfokkal tudnak bejutni a célsejtbe (Wunderlich, 2014).

Klónozás, nukleinsav-könyvtárak

A molekuláris biológiában klónozásnak nevezzük azt a folyamatot is amikor idegen DNS-t, valamilyen vektorba illesztünk, majd élő sejtben felszaporítjuk és

az akár egy ponton megváltoztatott genetikai állomány szaporodásával keletkeznek a klónok. A klónozás lehetséges:

- restrikciós enzimekkel
- és ligáz nélkül, melyből több különböző módszer van:
 - USER technológia
 - háromnukleotidos technológia
 - TOPO-klónozás
 - Rekombinációs klónozás

A nukleinsav-könyvtárak közül kettőt különböztetünk meg, a genomit és a cDNS-t. A genomi DNS-t kisebb-nagyobb szakaszokra daraboljuk ami lehet fizikai behatással vagy restrikciós endonukleázzal. Ezeket a DNS szakaszokat vektorokba kell ligálni, majd belejuttatni egy élő organizmus sejtjébe. A cDNS könyvtárak kiindulási alapja mRNS, egy sejt RNS-összetételét mutatja be. A cDNS könyvtárhoz először az első szál DNS-t kell megszintetizálni majd a második szálat.

Expressziós rendszerek

A génekkel fehérjéket tudunk termeltetni, ami az egyik legfontosabb feladat. Az expressziós vektorba először bele kell klónozni a fehérjét kódoló DNS-t, majd a fehérje termeléséhez hozzá kell adnunk valamilyen promótert. Speciális fehérjedoménokat is adhatunk a rendszerhez, annak érdekében, hogy a fehérje detektálását, tisztítását és vízzoldhatóságát megkönnyítsük.

Mutagenesis, géncsendesítés

A mutagenesis során egy generált genetikai változtatást értünk, ami az élőlény genomjában történik. Ez lehet véletlenszerű, de irányított is. Random mutációkat PCR segítségével is képesek vagyunk létrehozni. A mutagenesisnek több féléjét ismerjük, ami lehet:

- irányított pontmutáció,
- metiláción alapuló,
- restrikciós hasításon alapuló,

- megaprimer-módszerrel történő,
- láncközti primerrel történő.
- Deléciókat készíthetünk:
 - exonukleázokkal,
 - hiányos primerekkel,
 - PCR-rel,
 - és génfüziós PCR-rel.

Egy sejtből a fehérjéket nem csak génkiütéssel lehet eltüntetni, hanem géncsendesítéssel is, így épségben maradt az azt kódoló DNS szakasz. A géncsendesítés alapja, hogy a keletkezett RNS féléletidejét csökkenteni kell jelentős mértékben.

Fehérjék kimutatása

Mivel a fehérjék a szintézis során feltekerednek és felveszik térszerkezetüket, nem alkalmas a hibridizációs technikán alapuló kimutatás. A fehérjék kimutatását vagy az ellenük termel antitesttel lehetséges vagy szelektált aptamerekkel. Az antitestek lehetnek:

- poliklonáris antitestek,
- monoklonáris antitestek,
- és másodlagos antitestek.

Fehérje interakciók

A molekuláris biológia egyik kutatási területe a fehérjék működése, illetve az, hogy a fehérjék milyen más molekulákkal létesítenek kapcsolatot. Ez azért fontos, mert maguk a fehérjék kódolják az élőlények legtöbb tulajdonságát. A fehérjék képesek specifikusan kötődni bizonyos anyagokhoz, amit a térszerkezetük révén érnek el. In vitro kapcsolatok kimutatása történhet:

- fúziós fehérjékkel,
- immunprecipitációval,
- ko-immunprecipitációval,

- gél-shifttel,
- fág-display technikával,
- és kromatin immunprecipitációval.

In vivo kapcsolatok kimutatása történhet:

- élesztő két hibrid rendszerekkel, melyek létrejöhetnek:
 - szolubilis fehérjék kapcsolódásával
 - és membránfehérjék kapcsolódásával
- élesztő egyhibrid rendszerekkel, ami lehet:
 - ismeretlen fehérje DNS kötődés,
 - és transzkripció faktorok promóter/enhancer-preferencia
- és élesztő három hibrid rendszerrel (Wunderlich, 2014).

3.5 A nemi hovatartozás meghatározása

A kriminalisztikai egyik feladata a személyazonosság a megállapítása, de más természettudományos területek is foglalkoznak ezzel. A személyazonosítás történhet még élő személy esetében is de általában ismeretlen holttesteknél vagy előkerült hullarészeknél, ásatások során felbukkanó csontmaradványoknál, tömegszerencsétlenségek áldozatainál fontos megállapítani a személyazonosságot.

A nem meghatározása alapkérdés a személyazonosság megállapítása során a kriminalisztikában. A nem meghatározása ép holttesteknél, csontvázaknál nem jelent nagy problémát viszont töredékes csontvázaknál, gyerekeknél nagy szakértelem szükséges. A nemi hovatartozás megállapításához több különböző módszer is rendelkezésünkre áll pl. a csontváz morfológiai vizsgálata, mikroszkópos vizsgálatok vagy genetikai és immunológiai vizsgálat során is kideríthető.

A csontvázak vizsgálatából megállapított nemi jellegzetességek lehetnek kvantitatív morfológiai jelek, ezek anatómiai leírás során rögzített értékek vagy lehetnek metrikus adatok melyeket abszolút méretekkel vagy jelzőkkel lehet meghatározni. A nemi jellegzetességek a csontvázon a másodlagos nemi érés

során alakulnak ki. Olyan felnőttkori csontmaradványoknál ahol a csontváz egészben megmaradt a nem 95-97%-os pontossággal megállapítható, de ha a másodlagos nemi jellegek még nem alakultak ki a morfológiai vizsgálat során történő nemi hovatartozás megállapítása kétséges lehet. A medence és a koponya csontok vizsgálata a legalkalmasabb a nem megállapítására, de igen jellegzetes a combcsont, felkarcsont, szegycsont és a lapockacsont is (Sótonyi, 2005).

A nem az emberi szövetek sejtmagjaiból (nyálkahártya, bőr, simaizomszövet, szívizom stb.) általánosan kimutatható mikroszkópos vizsgálat során. Az X-kromoszóma elkülönül az interfázisában és bazofílan festődik így 30-70%-ban kimutatható. Férfiaknál csak 10-15%-ban kimutatható a sejtmagban a kromoszóma. Átmérője 0,8-1,2 μm , bikonvex lencse alakú. Csak addig lehet kimutatni a kromatint (**1. ábra**) amíg a magfestés el nem tűnik az autolitikus folyamatok során. A polimorf magvú leukocitákban a kromatin dobverő alakú, itt is bazofílan festődik és 1,5 μm átmérőjű. Ha a fehérvérsejtek 1-2%-ban megtalálható a női nemre utal. Ez a módszer a halált követő 6 órán belül értékelhető biztonsággal. A hám eredetű sejtekben az Y-kromoszóma fluoreszcens festéssel jellegzetesen festődik, így könnyen megállapítható egy korábban ismeretlen holttestrészt férfi eredetű-e.

Az X- és Y-kromoszómát molekuláris biológiai, genetikai módszerrel is ki lehet mutatni. Olyan specifikus szakaszokat is tartalmaznak a kromoszómák melyek az önbomlás utána is kimutathatóak. DNS kivonás különböző szövetekből vagy akár néhány sejtből is lehetséges, majd a nemre jellemző szekvenciák felsokszorozásával kimutathatóvá válik a nem.

Az ember sejteinek majdnem mindegyike tartalmaz DNS-t a sejtmagban vagy a mitochondriumban, így az öröklött tulajdonságok segítségével elvégezhető a személyazonosítás. A lágyszövetek pl. csont, fogazat fehérjéi fajspecifikusak, és hosszú idő után is kivonható belőlük a DNS amiből megállapítható a nem vagy a személyazonosság (Sótonyi, 2005).



1. ábra Barr-testek: normál férfi, normál női, Klinefelter szindrómás
 (<http://cdn.yourarticlelibrary.com>)

3.6 PCR módszer

A polimeráz-lánreakció (**2. ábra**) egy olyan molekuláris biológiai eljárás mely során a DNS szál egy adott szakaszát (élő szervezet nélkül) fel tudjuk sokszorozni. A felsokszorozás után lehetőség nyílik annak az adott DNS szakasznak az elemzésére. A reakció során egyetlen gént vagy kisebb nagyobb szakaszok amplifikálására kerül sor (ncbi). A PRC reakcióhoz több anyaghoz szükségünk van a megfelelő működés érdekében. Ezek az anyagok általában a következők:

- DNS templát: tartalmazza a felsokszorozni kívánt gént vagy szakaszt.
- Két féle primer: az egyik 5' → 3' irányba, másik 3' → 5' irányba határozza meg a DNS szálak irányát, melyek a templát DNS komplementerei.
- DNS-polimeráz: lemásolja a felsokszorozni kívánt régiót.
- Nukleotidok: az új DNS szál felépítő anyag.
- Puffer: a DNS számára biztosítja a megfelelő kémiai környezetet.

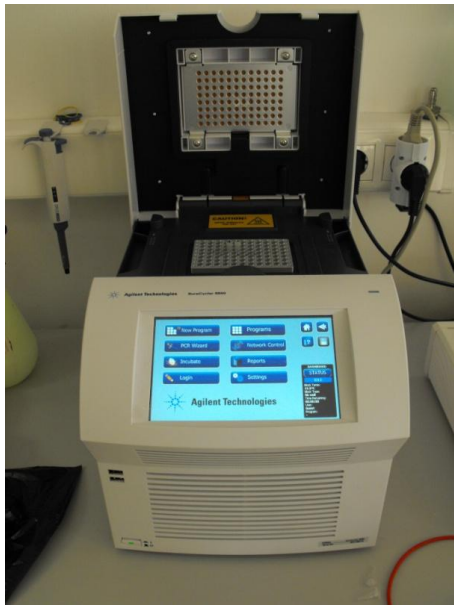
A PCR programoknak (**3. ábra**) 3 fő lépése van

- a denaturáció: 94-96°C-on a DNS kettős szála szétválik a hidrogén-kötések felbomlása miatt.
- a bekötődés/annealing: a gyártó által előírt hőmérsékletet kell beállítani a primerek optimális működéséhez, ugyanis csak azon a hőmérsékleti ponton kötődnek be megfelelően a szimpla szálú DNS-hez.

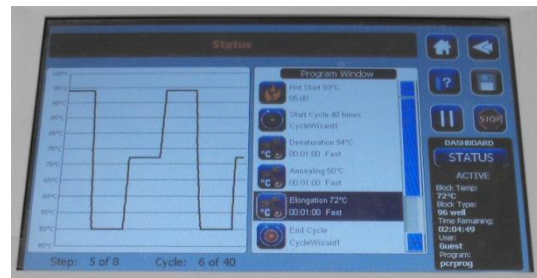
- és a meghosszabbítás/szintetizálás: a kapcsolódott primereknél a DNS-polimeráz elkezd felépíteni a hiányzó DNS szálát. A szülő DNS szál szolgál templátként a leány szál szintetizálásához.

Általában ezeket a lépéseket 30-40-szer ismételtetjük meg. A kezdeti denaturáció előtt kb. 1-5 percig magas hőmérsékleten szokták tartani a mintát, hogy a templát DNS szálak teljesen szétváljanak egymástól. Ez az idő függ a PCR-be helyezett minta mennyiségétől.

A PCR-t a legkülönbözőbb területeken és feladatoknál (pl. genetikus betegségek kimutatására, ujjnyomat azonosítására, gének klónozására stb.) lehet alkalmazni (ncbi).



2. ábra Az általunk használt PCR készülék (saját fotó)

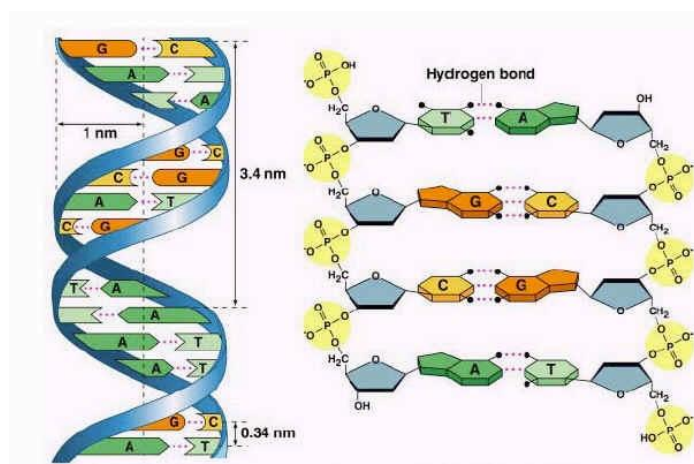


3. ábra Az általunk futtatott egyik program (saját fotó)

3.6.1 A DNS szerkezete

Nukleotid egységekből álló polimerek építik fel a nukleinsavakat. A DNS (**4. ábra**) adenin, guanin, timin és citozin polimer bázisokból épül fel. Az egymáshoz foszfodiészter kötéssel kapcsolódó dezoxi-ribóz részek építik fel a polimer vázát, oly módon, hogy az egyik cukorkomponens 3'OH csoportja és következő

cukorkomponens 5'OH csoportja között található a foszfodiészter kötés. Az információt a bázissorrend határozza meg, ami a nukleotid bázisok különböző egymást követő sorrendjétől függ. A DNS lánc nem egyenes lefutású, hanem két ellentétes irányú (antiparallel) kettős hélixből áll. A spirál külső oldalát a váz alkotja a foszfodiészter kötésekkel együtt, belsejében pedig a bázisok találhatóak. Megkülönböztetjük a purin bázisokat: adenin és guanin, és a pirimidin bázisokat: timin és citozin. A két szál az egymást kiegészítő bázispárok (adenin – timin, guanin – citozin) alkotta hidrogénhidak kötik össze. Kettős hidrogénhid köti össze az adenint és timint, hármas hidrogénhid pedig a citozint és guanint (Ádám, 2002).



4. ábra A DNS szerkezete (<http://www.biologyjunction.com/>)

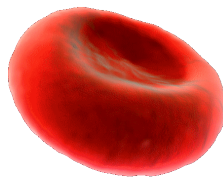
3.7 A vér anatómiája

A vér (*sanguis*) piros színű, sűrű folyékony kötőszövet. Egy átlagos felnőtt emberi szervezetben 5 liter található. Felépítését tekintve elkülöníthetjük a vérplazmát, ami kb. 56% illetve a sejtés elemeket, ami 44%-ban alkotja a vért. A vérplazma 90%-ban vízből és 10% kis- és nagy molekulatömegű anyagokból tevődik össze. Ebbe a 10%-ba tartoznak a plazmafehérjék, ionok, szerves anyagok, és vérgázok. A sejtés elemek közé tartoznak a vörösvértestek (*erythrocyták*), a fehérvérsejtek (*leukocyták*) és a vérlemezkék (*thrombocyták*). A sejtés elemek a magzati élet vége felé már kizárólag a vörös csontvelőben keletkeznek (korai embrionális korban még a testen kívül, majd magzati korban a máj és a lép is termel sejtés

elemeket). Ez alól kivételt képeznek a *lymphocyták*, melyek a nyirokszervekben jönnek létre (Szentágothai, 2002).

3.7.1 Vörösvértestek

A vörösvértestek (**5. ábra**) találhatóak meg a legnagyobb számban az emberi vérben, 4,5 – 5,4 db/ μ l közötti értékkel. Sejtmaggal nem rendelkeznek, korong alakúak, a közepük besüppedve elvékonyodik.



5. ábra Vörösvértest (<http://stevegallik.org>)

A vörösvértestek sejthártyája lipidekből és glükolipidekből, illetve fehérjéből és glükoproteinekből áll. Az egyik legfontosabb glükolipidek az AB0 antigének, melyek a vércsoportokat határozzák meg. A vörösvértestek élettartam körülbelül 100-120 nap. Fő feladatuk a haemoglobin segítségével az oxigén (O_2) és a széndioxid (CO_2) szállítása. A haemoglobin vas atomjához a szénmonoxid (CO) is képes kötődni, és ezáltal megakadályozza az oxigén kötődését és szállítását, ha ez az állapot tartósan fenn áll az a személy szén-monoxid mérgezéséhez vezet (Szentágothai, 2002).

Ennek egyik jellegzetes motívuma az élénk cseresznyevörös színű, nagy terjedelmű süllyedésszerű hullafolt (Gábor, 1983).

3.7.2 Fehérvérsejtek

A fehérvérsejtek a vörösvérsejtekkel ellentétben sejtmaggal rendelkeznek és szabályos gömb alakúak. A vérben 5 – 8000 db/ μ l található. Három fajtájukat különböztetjük meg: a *granulocytákat*, a *lymphocytákat* és a *monocytákat*.

3.7.2.1 Granulocyták

A granulocyták (**6. ábra**) sejtmagja lebonyozott és sejtplazmában jellegzetes granulomok lehetnek. Ezek a specifikus granulomok által három különböző fajtájú granulocytát különböztetünk meg festődésük szerint: *neutrophil*, *eosinophil* és *basophil*.

Neutrophil granulocyták

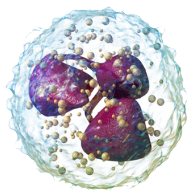
A fehérvérsejteknek a 60-70%-át a neutrofil granulocyták alkotják. Sejtmagjuk 2-5 lebenyből álló, vékony hidakkal összekötött erősen festődő durva kromatinból áll. A plazmában lévő granulomok kicsik, ibolyarózsaszínűen festődnek tehát sem a bázikus sem a savas festékek keverékéből egyiket sem kötik meg. Nőben megfigyelhető az egyik karéjon egy jellegzetes dobverő alakú heterochromatin-tömörülés [Barr-test (**1. ábra**)], ez az inaktív X kromoszómával egyeztethető. A neutrophil granulocyták fő feladata a szervezetet megvédeni a baktériumoktól és más kisebb idegen anyagoktól. Mozgékonyak, a szövetekből a vérerekbe képesek diffundálni majd a véráram segítségével a fertőzés vagy sérülés helyére jutnak, ahol amöboid mozgással körülveszik a fertőzött gócot vagy az idegen testet, phagocitálják és a granulomokban lebontják őket. A folyamat során sok sejt elpusztul és összegyűlik, így képződik a genny.

Eosinophil granulocyták

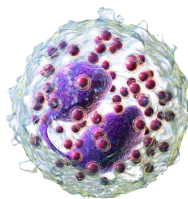
Egy egészséges emberben a fehérvérsejteknek mindössze csak 2-4%-át teszik ki az eosinophil granulocyták. A sejtplazmában helyet foglaló granulomok eosinophilan (lúgosan) festődnek. Ezért a jelenségért a centrális kristály felelős, amely bázikus protein tartalmú. A sejtmag általában 2 lebenyből áll, amiket vékony hidak kötnek össze. Gyengébben festődnek, mint a neutrophil granulocyták, kromatin szerkezetük finomabb. Fő feladatuk az immunrendszer erősítése, allergiás reakcióknál és egyes parazitás megbetegedéseknél a számuk megnő a keringő vérben, de ez még nem teljesen tisztázott.

Basophil granulocyták

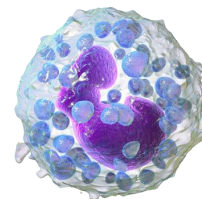
A basophil granulocytákból még kevesebb található a fehérvérsejtek között, csupán csak 0,5 – 1%-át alkotják. Granulomai basophilan (savasan) festődnek és a magot elfedik, ezért a sejtmag alakját nehéz meghatározni. A kötőszöveti hízósejtekkel megegyező működésűek, tulajdonképpen az előfutárának tekinthetőek. Ha allergiás reakció lép fel a szemcsékben lévő tartalom kiürül (Szentágothai, 2002).



Neutrophil granulocyta



Eosinophil granulocyta



Basophil granulocyta

6. ábra Granulocyták (<https://upload.wikimedia.org>)

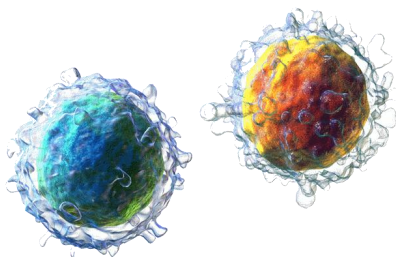
3.7.2.2 Lymphocyták

A lymphocyták (**7. ábra**) fehérvérsejteknek a 20-30%-át alkotják. Keletkezésüknek a helye túlnyomó részt a nyirokszervek. A keringő vérben egészen a kis mérettől 6-8 μm (melyek a lymphocyták 92%-át alkotják), a nagy 12-18 μm -es (ez alkotja a maradék 8%-ot), tartományig megtalálhatóak. A kisméretűek 5 μm -es magátmérővel rendelkeznek, a nagyobbak pedig 7 μm -es sejtmaggal. Fő feladatuk az immunrendszerrel kapcsolatos. Keletkezésük helye szerint megkülönböztetjük a T-lymphocytákat és a B-lymphocytákat.

A T-lymphocyták olyan őssejtekből keletkeznek, amelyek a csecsemőmirigybe (thymus) vándoroltak majd utána a nyirokszervekbe. Ezek alkotják a lymphocyták 80%-át. Három altípusát különböztetjük meg, vannak a T_h sejtek a támogatók (helper), a T_c sejtek a pusztítók (cytotoxicus), és a T_s sejtek a visszafogók (supresszáló).

A B-lymphocyták a csontvelőben alakulnak ki és onnan jutnak át a nyirokszervekbe. Nevüket a madarak busra Fabricii nevű szervéről kapták,

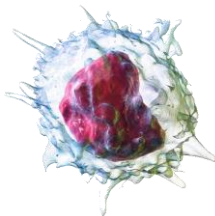
ugyanis az ott keletkező immunsejtekkel analóg működésűek a humán B-lymphocyták. Antigenstimulus hatására immunoglobulinokat termelnek és plazma sejtekké differenciálódnak, található köztük természetes ölósejtek (natural killer, NK sejtek) és memóriasejtek is. A vérben keringő lymphocyták készenléti sejtek, ha valamilyen idegen anyag kerül a szervezetbe, osztódnak és olyan sejtekké differenciálódnak melyek az immunvédekezésben közvetlenül részt vesznek (Szentágothai, 2002).



7. ábra Lymphocyták B és T-sejt (<http://upload.wikimedia.org>)

3.7.2.3 Monocyták

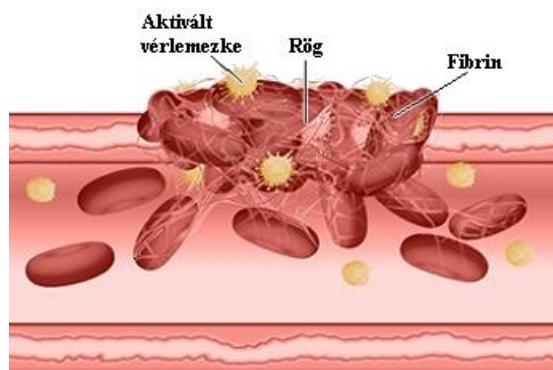
A monocyták (**8. ábra**) a fehérvérsejtek mindössze csak 3-8%-át alkotják. Méretüket tekintve (kb. az eosinophil granulocytákkal és a nagyobb méretű leukocytákkal egyenlő) 12-15 μm -es nagyságúak. A sejtmag lehet bab vagy patkó alakú, a kromatin még a lymphocytáknál is gyengébben festődik mivel az állománya finomabb. A csontvelőben keletkeznek speciális előalakból, a monoblastból (Szentágothai, 2002).



8. ábra Monocyta (<https://upload.wikimedia.org>)

3.7.3 Vérlemezkék

A vérlemezkék száma a keringő vérben kb. 300.000 db/ μ l, alakjukat tekintve oválisak vagy kerek, laposak, 2-4 μ m-esek. Élettartamuk kb. 5-10 nap. A csontvelőben lévő megakaryocytákból származnak. Fő feladatuk a véralvadásban van. Ha az ereknek megsérülnek (**9. ábra**) az endothel sejtjei a vérlemezkék összetapadva egy ún. thrombocytá dugaszt hoznak létre, mellyel teljesen megakadályozzák egy idő után a vér szivárgását az érből. A folyamat során a vérlemezkék nem csak összetapadnak, hanem szét is esnek, ezáltal szerotonin szabadul fel belőlük, ami érszűkítő és így tovább fokozódik a vérzés csillapítása (Szentágothai, 2002).



9. ábra Érsérülés (<http://www.med-health.net>)

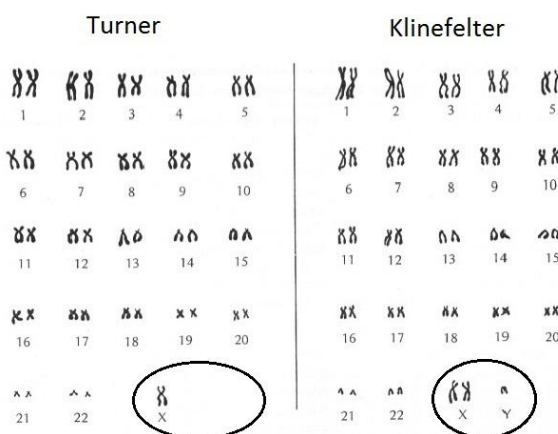
3.8 Kromoszómák és rendellenességek

A legjobban az XX-XY nem meghatározás az ismert (ezen kívül még két nem meghatározást létezik az XX-X0 és a ZZ-ZW). Az emlősök tehát az ember is egyöntetűen ebbe a nem meghatározási fajtába tartoznak. Az XX kromoszómával a nőstények az XY kromoszómával a hímek rendelkeznek, tehát az utód nemét az határozza meg, hogy a hím spermiuma a megtermékenyítés után X vagy Y kromoszómát tartalmaz-e. Citológiai vizsgálattal az Y kromoszóma jól elkülöníthető az X kromoszómától, mert az annál sokkal kisebb.

Vannak olyan esetek, amikor a nemi kromoszómáknak a száma eltérhet a normálistól. Az X kromoszóma olyan géneket hordoz, amelyek nélkülözhetetlenek mind a két nem számára. Ha hiányzik vagy több van belőle

genetikai rendellenesség áll fel. Amikor XX helyett csak egy darab X kromoszómája van az érintett egyének, túléli a kromoszóma veszteséget. Ez a betegség a Turner szindróma (**10. ábra**), jelölése X0. Az újszülöttek között 1/3000 gyakorisággal fordul elő. A betegség csak nőket érint, akik alacsony termetűek, zömökek, a válluknál és a nyakuknál bőrrödő található, épelméjűek és sterilek.

A Klinefelter szindrómának (**10. ábra**) 1/1000 az előfordulási esélye az újszülötteknél. A kromoszóma készletüket az jellemzi, hogy kettő vagy annál több nemi kromoszómával rendelkeznek. Általában az XXY fordul elő, de lehet XXXY, XXXXY vagy XXYY is. Ebben a szindrómában szenvedő férfiakra jellemző, hogy magasak, ritka az arcszörzetük, csípőjük kerek, mellük nagyobb az átlagosnál és az intelligenciájuk átlagos (Maróy, 2009).



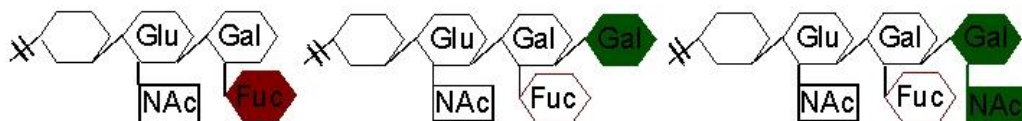
10. ábra A Turner- és Klinefelter szindróma kariogramja
(<http://image.slidesharecdn.com>)

3.9 Vércsoportok

A vércsoportrendszer az emberi vérben található vörösvértestek membránján található makromolekulák alapján kategorizálhatók. A makromolekulák más és más antigéndeterminánsokat tartalmaznak és antigénként működnek. Ma 29 vércsoport rendszert ismerünk az emberi szervezetben, melyek egymástól különállóak és öröklődésük sem függ a másiktól. Az AB0(H)- és Rh-vércsoport

rendszerek a legjelentősebbek. De meg kell említeni az MNS (MNS), a Lutheran (LU), a Kell (KEL), a Lewis (LE) és Duffy (FY) vércsoportokat is, ugyanis néha pl. szervátültetésnél, orvosi problémákat okozhatnak. Az egymástól független öröklődésű vércsoport és vércsoport rendszer antigének, annyira jellemzőek egy személyre, hogy majdnem olyan egyediek mint az ujjnyomat.

Az AB0(H)- vércsoport Karl Landsteiner fedezte fel, ez volt a világon az első vércsoportrendszer rendszer amit megállapítottak, nevét a vörösvérsejteken található A-, B- és H(0) antigénekről kapta melyeknek A-, B-, 0, és H-génjei felelősek azért, hogy kialakuljanak. Az antigén különbségéért a lánc végi monoszacharidok felelősek. Fenotípus szerint az emberek négy vércsoportba tartozhatnak: A, B, AB és 0 (**11. ábra**). A 0-s vércsoportú emberek vörösvértestein csak H-antigén található, ha a H-antigénhez még kötődik N-acetilgalaktózamin kialakulnak az A-antigén, ha pedig a H-antigénhez egy második galaktóz kötődik, akkor B-antigén alakul ki. Ugyanazon a vörösvértesten megjelenő A- és B-gén AB-s vércsoportot eredményez. Az A- és B-gének kodominánsan míg a 0-gén recesszíven öröklődik. Az igazságügyi orvostanban gyakorlati szerepe van a vércsoportok meghatározásának, az öröklési viszonyok ismeretében ugyanis kizárható vele a vélelmezett szülő, de az nem bizonyítható ezzel a módszerrel, hogy ki a szülő.



11. ábra Vércsoport típusok: 0, B, A (<https://upload.wikimedia.org>)

Az Rh-antigéneket 3 allél gén pár c/C, d/D, és e/E alakíthatja ki és örökíti őket. A d-gén abszolút semmilyen génterméket nem hoz létre, a c-, C-, e- és E-gének gyengén immunogének. Rh-pozitívoknak nevezzük azokat a személyeket akiknek a vörösvérsejtjein megtalálható a D-gén, ez a legerősebb immunitással bíró gén, mely antigénképződés vált ki a szervezetben. Azokat az egyedeket akinél nem található meg a D-gén de más Rh-antigén található a vörösvértetek felszínén Rh-negatívoknak nevezzük. Orvosi szempontból erős immunogén hatása miatt csak a

D-génnek van jelentősége. A D-antigénnel szembeni immunválasz két féle képpen jöhet létre:

- Vérátömlesztéssel, ilyenkor Rh-negatív személy Rh-pozitív vért kap, vagy
- terhesség során, amikor Rh-negatív anya Rh-pozitív gyermeket vár, 4-6 hét után az anya vérében kialakulnak anti-D-antitestek, amik több éven keresztül is jelen lehetnek.

Ezek az anti-D-antitestek többsége az IgG családba tartozik. Ha az Rh-negatív anya ismét terhes lesz, Rh-pozitív magzattal, ezek az antigének megtámadják a magzatot, a placentán keresztül áthatolva bejutnak a magzat vérkeringésébe, ahol annak vörösvértestjeivel reakcióba lépve akár hemolysist is okozhatnak (Fonyó, 2008).

3.10 A fog anatómiája

Az emberi fogat (*dens, dentis*) (**12. ábra**) 3 fő részre lehet osztani, a koronára (*corona dentis*), a gyökérre (*radix dentis*) illetve a két résznek a határán található fognyakra (*cervix dentis*).

A korona a szájüregben szabadon elhelyezkedő, az alveolusból kiálló rész melyet zománc fed. Két féle korona létezik, az egyik a zománc-cement határig (fognyakig) terjed ez az anatómiai korona, normál esetben itt tapad meg az íny. Az íny széllel nem fedett részt klinikai koronának nevezünk, nem minden esetben egyeznek meg.

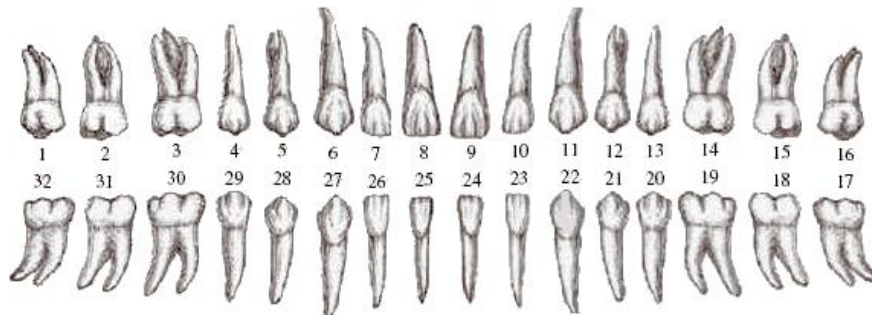
A fognyak a korona és gyökér közötti átmenet, a zománc-cement határa és annak környéki része. Nem egy egyenes rész hanem hullámvonalszerű lefutású mintázat.

A foggyökér az állcsontokba beágyazódott rész, mely cementtel fedett (Fazekas, 2006).

Egy teljesen kifejlett maradandó emberi fogazat 32 db fogból áll. A maradó fogazat képlete embernél: 2123. Az emberi fogazatot 4 típusú fog alkotja:

- metszőfog: összesen 8 db található egy teljesen kifejlett maradandó emberi fogsorban, funkciójukat tekintve harapásra szolgálnak. Egy gyökérrel rögzülnek az állcsontokban.
- szemfog: összesen 4 db található belőlük, és a tépést biztosítják. Egy gyökérrel rendelkeznek.
- kisórló: összesen 8 db van, feladatuk a szétnyomás és darabolás. A felső első két kisórló 2 gyökérrel a második kettő illetve az alsók egy gyökerűek.
- nagyórló: összesen 12 darab van a teljesen kifejlett fogsor esetében, ezen típusú fogak végzik a legnagyobb rágómunkát. A felső nagy órlóknak három gyökere van, az alsó nagyórlóknak két gyökerűek.

A fogakat zománc-, dentin-, és cementállomány építi fel. A fog belsejében a fogbél (*pulpa*) található (**13. ábra**) (Donáth, 2005).



12. ábra A teljes emberi fogsor (<http://wellnessadvocate.com/>)

Zománc (*substantia adamantina*)

A zománcréteg fedí kívülről a fogkoronát, a szervezetben található legkeményebb szövet. Ez a keménység a 96-99% anorganikus anyagú felépítésének és kristályszerkezetének köszönhető. A réteg keménysége nem egyenlő mindenhol, sem egyedeknél sem foganként és egy fagon belül is eltérhet.

Dentin (*substantia eburnea*)

A dentin alkotja a fogak legnagyobb állományát, keménysége jóval a zománc alatt van, az alacsonyabb anorganikus anyagú felépítése miatt, de ezáltal sokkal

rugalmasabb szövet, kevésbé törekeny mint a zománc. A fogbélkamrát veszi körbe. A dentin a csontokhoz hasonló élő szövet (de az átépülés nem jellemző rá), találhatóak benne dentin csatornák (tubulusok), melyekben az odontoblastok nyúlványai (Tomes-féle rostok) foglalnak helyet, ez a szerkezet a fog fejlődése során alakul ki és nem változik.

A dentin típusai:

- Mantle-dentin: első, homogén dentin réteg, olyan odontoblastok melyeknek még nincs Tomes-nyúlványa, ezek az odontoblastok hozzák létre ezt a nem túl ásványosodott réteget.
- Predentin: az odontoblastok által termelt, még nem ásványosodott réteg
- Primer dentin: a fogak kialakulásakor képződik
- Secunder dentin: szerkezete ugyanolyan mint a primer dentinnek, a fogak kialakulása után, az egyed élete során folyamatosan termelődő dentin.
- Tercier (reparatív) dentin: védekezési reakció során képződő dentin, melyeket külső ingerek (pl. fogszuvasodás) váltanak ki. Szerkezete nem egyezik meg a primer dentinével, a dentin csatornák is hiányozhatnak belőle.

Cement (*substantia ossea dentis*)

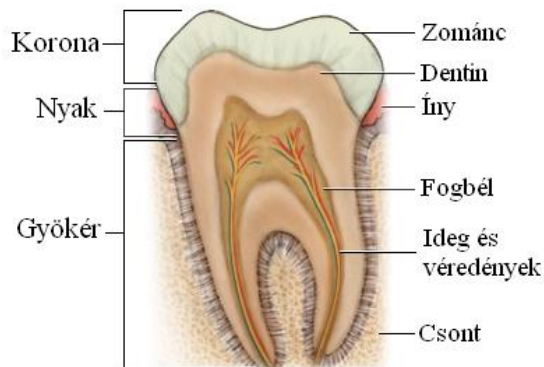
A cement a foggyökeret fedő réteg. A cement periodontium szövet melynek a fontossága a fogak megtámasztásában és tartásában van. Nagyon fontos szerepet töltenek be a periodontium szövetbe tartozó részek, hiszen ha nem megfelelően tud rögzülni a fog, akkor akár z a fog elvesztésével is járhat.

A periodontium két fő összetevője:

- Gingivalis: részei a szabad ínszél, a feszes íny, a laza alveoláris nyálkahártya.
- Rögzítő apparátus: részei a gyökérhártya, a cement és az alveoláris csont.

Fogbél (*pulpa*)

Ahogy a fognál, a pulpánál is megkülönböztetünk korona- és gyökérpulpár. Alakja miatt a koronapulpát 2 részre osztjuk, pulpaszarvra és pulpakamrára. A fogbélnek 3 funkciója van: irányítja a dentin- és zománcképződés, védekező és érzékelő funkciót tölt be (Fazekas, 2006).



13. ábra A fog (<http://img.webmd.com>)

4 Anyag és Módszerek

4.1 Csontleletek

A fogmintákat Dr. Tóth Gábortól a Nyugat-magyarországi Egyetem Biológia Intézet Állattani Tanszék oktatójától kaptuk. A minták Balatonudvariból származtak, előzetes archeológiai módszerekkel a szakértők megállapították, hogy a leletek avar koriak így kb. 1200-1400 évesek.

4.2 DNS kivonás vérből

A vérből való DNS kivonáshoz először egy vörösvérsejt (RBC) lízis buffert (**14. ábra**) 10x használtunk mely a következőket tartalmazta:

- 8,26 g ammónium klorid (NH_4Cl),
- 1,19 g nátrium-hidrogénkarbonát (NaHCO_3),
- 200 μl 0,5M EDTA,

majd 100 ml-re egészítettük ki az oldatot desztillált vízzel és a pH-ját 7,3-ra állítottuk be.

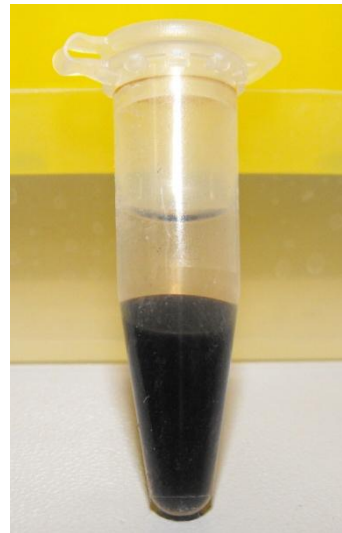
Továbbá szükségünk volt még egy fehérvérsejt (WBC) lízis bufferre (**15. ábra**) is, amit a következő anyagokból állítottunk össze:

- 79 mg Tris-hidrogénklorid (Tris-HCl)
- 148 mg nátrium-klorid (NaCl)
- 1 ml 0,5M EDTA
- 5 g SDS

majd 50 ml-re egészítettük ki a buffert.



14. ábra A vérminta RBC lízis buffer használata után (saját fotó)



15. ábra A vérminta WBC lízis buffer használata után (saját fotó)

A kivonás során 300 μ l vérhez adtunk 900 μ l RBC lízis buffert (az eredeti vér mennyiségéhez képest mindig háromszor annyi mennyiségű RBC lízis bufferre van szükség), majd vortexeltük pár másodpercig és 2000 rpm sebességen 10 percig centrifugáltuk. A centrifugálás utána a felülúszót eldobtuk és 1 ml-t átraktunk egy új eppendorf csöbe és az imént leírt folyamatot háromszor megismételtük, hogy már egy közel tiszta felülúszót kaptunk. A pellethez 500 μ l WBC lízis buffert adtunk majd pár másodpercnyi vortexelés utána 400 μ l-t

átraktunk egy új eppendorf csőbe, és 10 µl 10mg/ml proteináz K-t adtunk. 2 órán keresztül 56 °C-on inkubáltuk.

Az inkubálás után 300 µl-t áttettünk egy új eppendorf csőbe és 300 µl fenol-kloroform-izoamil alkoholt (25:24:1) (mindig ugyanannyi mennyiségűt) adtunk hozzá, kicsit megvortexeltük és 10.000 rpm sebességen 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót kell megtartani, amit egy új eppendorf csőbe átpipettáztuk majd 2x megismételtük az imént leírtakat. Az ismétlések befejezés után a felülúszóhoz 10 ml 10 mg/ml RNase-Exitus Plus-t (Applichem) adtunk és 37 °C-on 30 percig inkubáltuk.

Egy új eppendorf csőbe 200 µl-t átraktunk és hozzáadtunk 200 µl fenol-kloroform-izoamil alkoholt (25:24:1) és 10 percig 10.000 rpm sebességen centrifugáltuk. Utána a felülúszóból 200 µl-t áttettük egy új eppendorf csőbe és 200 µl 100%-os etanolt adtunk hozzá (ugyanannyi mennyiségű etanol kell). 10 percig -20 °C-on tartottuk a csövet és utána 10.000 rpm sebességen 20 percig centrifugáltuk. A pelletet megtartottuk és 250 µl 70%-os etanolban feloldottuk, majd 10.000 rpm sebességen 10 percig centrifugáljuk. A pelletet megszáritjuk és 50 µl nukleázmentes vizet adunk hozzá (Ghatak, 2013).

4.3 PCR módszer alkalmazása a vérmintáknál

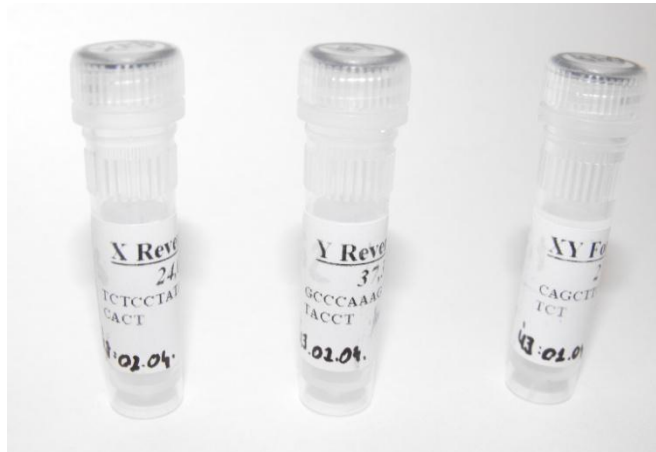
A PCR termék összeállításához

- 25 µl Master mixet,
- 1 µl Taq polimerázt,
- 5 µl forward primert,
- 5 µl reverse primert,
- 5 µl templát DNS-t,
- 9 µl steril vizet

mértünk össze, így összesen 50 µl végtérfogatú PCR terméket készítettünk.

A primerek (**16. ábra**) kiválasztása Faeman (1995) alapján történt:

- Forward (XY): CAGCTTCCCAGTTTAAGCTCT
- Reverse X: TCTCCTATACCACTTAGTCACT
- Reverse Y: GCCCAAAGTTAGTAATTTTACCT



16. ábra A PRC reakcióhoz használt primerek (saját fotó)

A PCR program a következő volt:

- 93 °C 5 perc
 - 94 °C 1 perc
 - 50 °C 1 perc
 - 72 °C 1 perc
 - 72 °C 5 perc
- } 40x ismételjük

a PCR végén a csöveket 25 °C-on tartottuk.

4.4 Agaróz gél elektroforézis a vérmintáknál

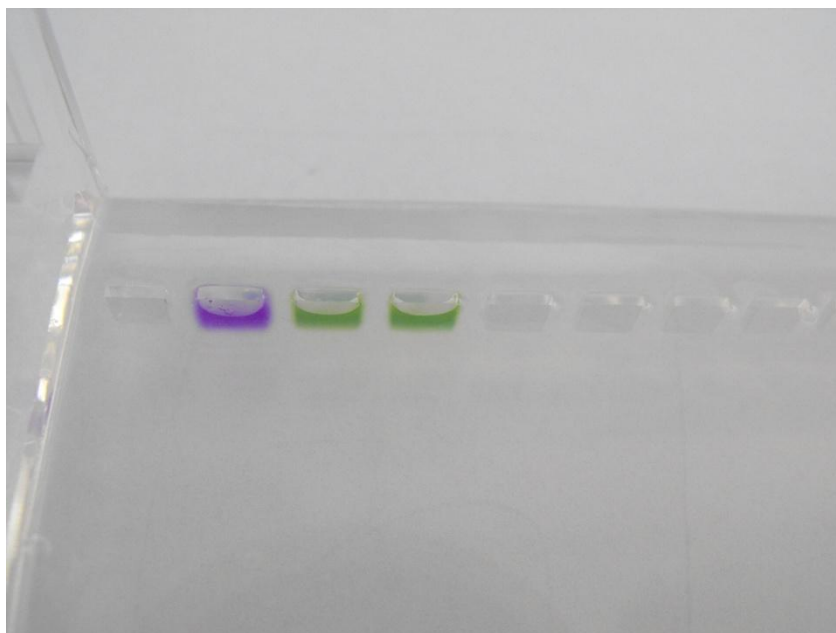
A PCR által felszaporozott minta megjelenítéséhez 1%-os agaróz gél-t (**17. ábra**) készítettünk ami a következőket tartalmazta:

- 0,7 g agaróz,
- 2 ml TAE buffer,
- 68 ml desztillált víz,

ezeket mikrohullámú sütőben addig melegítettük, míg az agaróz fel nem oldódott teljesen, azután kihűtöttük és

- 30 µl ethidium-bromidot adtunk hozzá.

A gél által megjelenített eredmények fotó formájában dokumentáltuk.



17. ábra Gélelektroforézis. A gél zsebeiben látható: a DNS létra, a kivont DNS X-primer készlettel és a DNS Y primerkészlettel (saját fotó)

4.5 A fogminták előkészítése és a DNS kivonása

A fogakból való DNS kivonást vízszintes és függőleges áramlású lamináris fülkében végeztük, amit előzőleg 70%-os etanollal fertőtlenítettünk. A fűrőfejeket előzetesen autoklávban 120 °C-on sterilizáltuk majd RNase-Exitus Plus (Applichem) és 70%-os etalonnal is fertőtlenítettük őket 5-5 percen keresztül.

A fogakból való DNS kivonásnál a beszennyeződés minimalizálása érdekében a fogakat lemostuk desztillált vízzel és a legkülső felszínüket lecsiszoltuk. A foggyökér felőli részéből is eltávolítottuk annyit, hogy a foggyökér szabad szemmel láthatóvá vált. Egy gömb alakú fűrőfej segítségével egy kisebb vajat készítettünk, ezen a mélyedésen keresztül egy hegyes fűrőfejjel (**18. ábra**) a foggyökércsatonáján keresztül egészen a fogbélig vagy pulpáig fűrtünk (**19. ábra**)

ahonnan a mintavétel történt. A fogport egy 1,5 ml-es eppendorf csőbe fogtuk fel. A kivonáshoz szükséges fogpor mennyisége kb. 10 mg. A DNS kivonáshoz Phusion Human Specimen Direct PCR kitet (ThermoScientific) (**20. ábra**) használtunk a következő képpen a 10 mg fogporhoz:

- 50 µl Dilution buffert,
- 1,5 µl DNA release additive-t

adtunk hozzá, majd egy rövid vortexelés után 2-3 percig hagytuk szobahőmérsékleten állni. Ezután 98 °C-os vízfürdőbe helyeztük 2 percig és utána 10.000 rpm sebességen 2 percig centrifugáltuk, és a DNS a felülúszóban volt jelen.



18. ábra A fog tisztításához és fúrásához használt fúrófejek (saját fotó)



19. ábra A kutatás során felhasznált egyik fogminta (saját fotó)

4.6 PCR alkalmazása a fogaknál

A PCR reakcióhoz Phire Green Hot Start II DNA Polymeraset (ThermoScientific) (**21. ábra**) használtunk és a következő képpen állítottuk össze:

- 10 µl 5x Phire Green Reaction Buffer
- 1 µl 10mM dNTPs
- 5 µl forward primer
- 5 µl reverse primer
- 10 µl templát DNS

- 1 µl Phire Hot Star II. DNA Polymerase
- 18 µl steril víz

így az össz. térfogat 50 µl volt.



20. ábra Fog DNS kivonáshoz használt kit (saját fotó) **21. ábra Fog PCR reakciójához használt polymerase kit (saját fotó)**

A PCR program a következő volt:

- 98 °C 30 mp
 - 98 °C 10 mp
 - 50 °C 10 mp
 - 72 °C 10 mp
 - 72 °C 1 perc
- } 40x ismételjük

a primerek (**16. ábra**) itt is, mint a vérnél ugyanazok voltak:

- Forward (XY): CAGCTTCCCAGTTTAAGCTCT
- Reverse X: TCTCCTATACCACTTAGTCACT
- Reverse Y: GCCCAAAGTTAGTAATTTTACCT

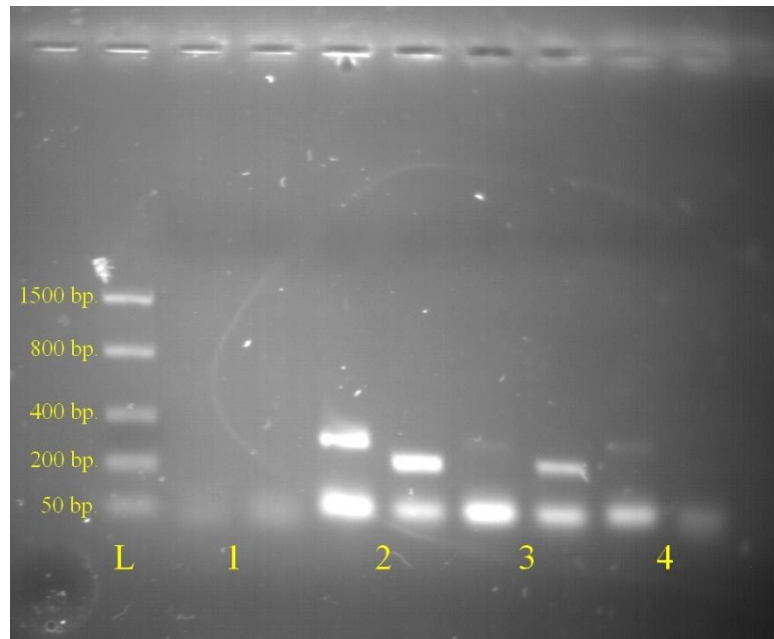
4.7 Agaróz gélelektroforézis a fogaknál

A PCR által felsokszorozott mintát 1%-os agaróz gélen jelenítettük meg (**22. ábra**), ami tartalmazott:

- 0,7 g agaróz,
- 2 ml TAE buffer,
- 68 ml desztillált víz,

ezeket mikrohullámú sütőben addig melegítettük míg az agaróz fel nem oldódott teljesen, azután kihűtöttük és

- 40 µl ethidium-bromidot adtunk hozzá.

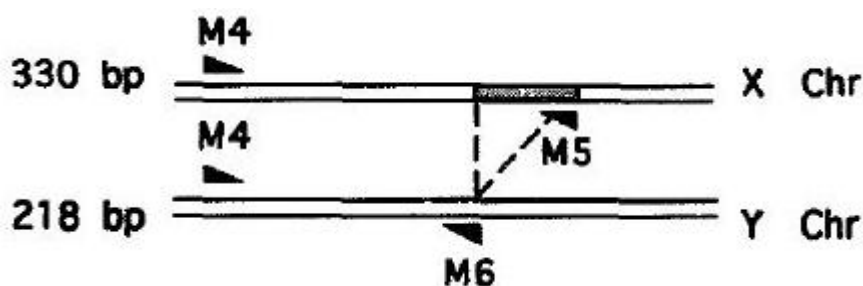


22. ábra A fogakból kivont DNS megjelenítése gélelektroforézissel, L-létra, 1-ismeretlen, 2-férfi, 3-férfi , 4-női (saját fotó)

A gélen megjelenő szekvenciákat lefotóztuk és az eredményeket Microsoft Office Excelben elemeztük.

5 Eredmények

A vérminták vizsgálatánál Ghatak (2013) cikke alapján kezdtünk el az előkészületeket és a munkát. A vér elemzésére azért volt szükség, hogy egy olyan biztos molekuláris biológiai módszert tudjunk kidolgozni amellyel a primerek pontos és specifikus működését meg tudjuk állapítani. A vérmintáknál ismert volt a mintát adó személynek a neme. A vér mintavételezése steril vérvételi lándzsa segítségével történt a kísérlet elvégzése előtt közvetlenül. Ezzel tudtunk meggyőződni arról, hogy a PCR reakció során a primerek működőképesek, illetve jó helyre kötődnek be, amit később gélelektroforézissel mutattunk ki. Az eredmények pozitívak voltak tehát a primerek megbízhatóak, megállapítottuk, hogy X- és Y kromoszóma (23. ábra) specifikusak.

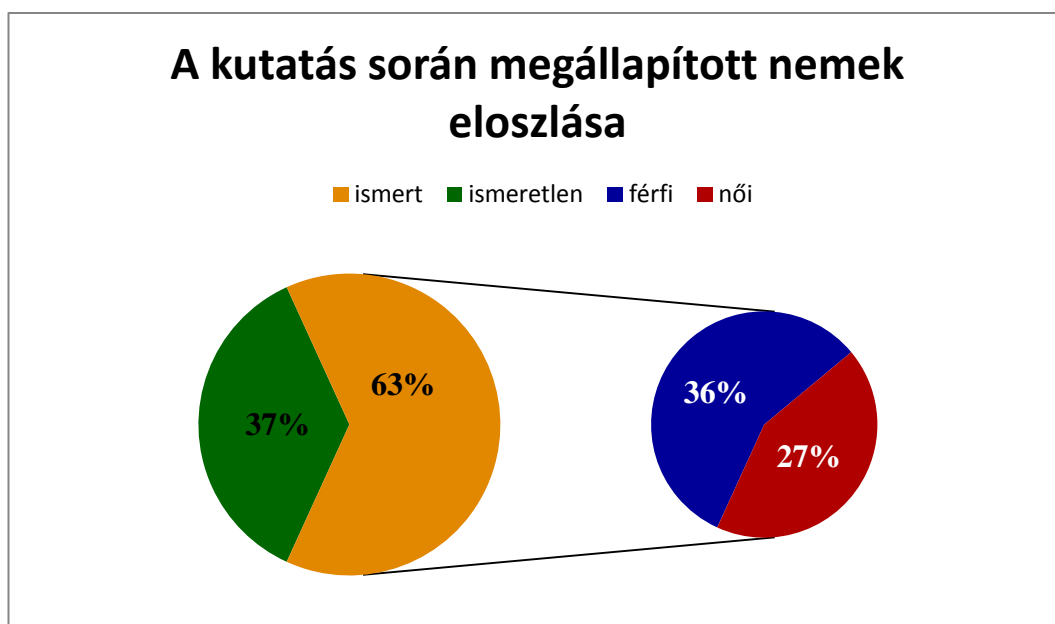


23. ábra Az X- és Y-kromoszóma közötti különbség (Faerman, 1995)

Az archaikus fogmintáknál használt kiteket modern kori fogmintákon is kipróbáltuk, mind kettőnél ugyanazt a protokolt alkalmaztuk ami az "Anyag és Módszerek" részben le van írva. Kipróbálásra került a DNS kivonáshoz szükséges Phusion Human Specimen Direct PCR kit, a vérmintánál is tesztelt primerek és a PCR reakcióhoz használt PhireGreen Hot Start II DNA Polymerase. A kitek annyira specifikusak, hogy modern kori fogmintákon nem lehetett alkalmazni, nem kaptunk értékelhető pozitív mintákat.

Összesen 11 darab archaikus fogmintát vizsgáltunk meg, melyek az avarkorból származtak tehát kb. 1.000 - 1.200 évesek voltak. Az összes fogat ugyanúgy kezeltük és végeztünk el rajtuk minden vizsgálatot. A 11 darab fogból megállapítottuk, hogy 4 darab férfié és 3 darab nőé volt, 4 darabnál pedig nem tudtuk meghatározni a nemet. Azoknál a fogaknál ahol a nemet nem tudtuk

megállapítani 2 darabnál újvizsgáltuk a fogakat az eredeti módszerrel illetve kipróbáltunk két másik PCR terméket.



Az új PCR termékek a Phusion U Hot Start DNA Polymerase (Thermo Science) és a 2x Phusion U Hot Start PCR Master Mix (Thermo Science) (**24. ábra**) voltak. A két új anyaggal sem jártunk sikerrel, ezért valószínűsíthető, hogy a fogakban már nem volt elegendő DNS a nem azonosítására.



24. ábra Az ismeretlen fog újvizsgálásához használt PCR termékek (saját fotó)

Az munkafolyamat végén az összes gélt lefotóztuk és az eredményeket Microsoft Excel programban tároltuk.

6 Megvitatás

A kutatás során nem meghatározást végeztünk PCR segítségével melyhez a DNS-t különböző humán eredetű szövetekből vontuk ki. A DNS kivonásához különböző buffer anyagokat valamint speciális kiteket alkalmaztunk. Az adott DNS szakasz felszorzásához X- és Y-kromoszóma specifikus primereket valamint genomiális DNS-t használtunk. A 11 megvizsgált fogból 7-nél sikeresen megállapítottuk a nemet (4 férfi, 3 női).

A negatív mintáknál az "Anyag és Módszerek" résznél ismertetett protokoll alapján végeztük el a fogak újrvizsgálását illetve két új anyagot is kipróbáltunk a vizsgálat során a Phusion U Hot Start DNA Polymerase-t (Thermo Science) és 2x Phusion U Hot Start PCR Master Mixet (Thermo Science) a gyártó által előírt használati útmutató alapján. Az eredeti protokoll alapján történt újra vizsgálatok során és az új anyagokkal sem jártunk sikerrel, ezért valószínűsíthető, hogy azok az archaikus fogak már nem tartalmaztak annyi DNS-t amiből kimutatható lett volna a nem.

A vizsgálat során megállapítottuk, hogy az általunk használt primerek megbízhatóak, csak az X- és Y-kromoszóma allélokra érzékenyek. A DNS kivonás sikerességét nem befolyásolta, hogy a fogak honnan származtak és mikoriak voltak. Sikerült 11 db fogból 7-nél megállapítani nemet, melyek előtte ismeretlen neműek voltak. Ez a módszer a későbbiek során is alkalmazható a nemi kromoszóma meghatározására.

7 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani a Nyugat-magyarországi Egyetem Savaria Egyetemi Központ Természettudományi és Műszaki Kar Biológia Intézetének és konzulensemnek Dr. Molnár Péternek, hogy segítették a tudományos fejlődésemet és munkásságomat.

Továbbá szeretném megköszönni Schmidthoffer Ildikónak, hogy segítségemre volt a laboratóriumi munkák során illetve Dr. Tóth Gábornak a kutatási foganyagokért.

Nem utolsó sorban szeretném megköszönni Szüleimnek, hogy lehetőséget adtak arra, hogy tanulhassak, illetve Barátaimnak is, hogy végig mellettem álltak és támogattak.

8 Felhasznált irodalom

Ádám Veronika (2002): Orvosi biokémia; Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest

Bócz Endre (2014): Kriminálisztika 1.; BM Kiadó

Donáth Tibor (2005): Anatómia - Élettan; Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest

Faerman M., Filon D., Kahila G., Greenblatt C. L., Smith P., Oppenheim A. (1995): Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles; Gene 167 327-332

Fazekas Árpád (2006): Megtartó fogászat és endodoncia; Semmelweis Kiadó, Budapest

Fonyó Attila, Ligeti Erzsébet (2008) - Az orvosi élettan tankönyve; Medicina kiadó, Budapest

- Gábor István (1983): Igazságügyi orvostan kriminalisták számára; BM Könyvkiadó
- Ghatak S., Muthukumaran R. B., Nachimuthu S. K. (2013): A Simple Method of Genetic DNA Extraction from Human Samples for PCR-RFLP Analysis; Journal of Biomolecular Tehniques vol. 24, issue 4
- Maróy Péter, Török Tibor (2009): Genetika BS; JATEPress
- Mays S. (1998): The archaeology of human bones; Taylor & Francis
- Morikawa T., Yamamoto Y., Miyaishi S. (2011): A New Method for Sex Determination Based on Detection of SRY, STS and Amelogenin Gene Regions with Simultaneous Amplification of Their Homologous Sequences by a Multiplex PCR; Acta Med. Okayama, 2011 Vol. 65, No. 2, pp. 113-122
- Ncbi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
- Renfrew C., Bahn P. (1999): Régészet - elmélet, módszerek, gyakorlat; Osiris Kiadó, Budapest
- Sótonyi Péter (2005) - Igazságügyi orvostan; Semmelweis Kiadó, Budapest
- Stone A. C., Milner G. R., Paabo S., Stonekint M., (1996): Sex determination of ancient human skeletons using DNA; American Journal of Physical Antropology 99:231-238
- Szentágothai János, Réthely Miklós (2002): Funkcionális anatómia 1.; Medicina Könyvkiadó Rt.
- Tremmel Flórián, Fenyvesi Csaba, Herke Csongor (2005):Kriminalisztika Tankönyv és Atlasz; Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs
- Vodanović M, Demo Ž., Njemirovskij V., Keros J., Brkić H. (2007): Odontometrics: a useful method for sex determination in an archaeological skeletal population?; Journal of Archaeological Science 34 (2007) 905-913
- Woller János (1995): DNS a kriminalisztikában; ORFK Oktatási és Kiképző központ
- Wunderlich Lívius (2014) - Molekuláris biológiai technikák; Typotex Kiadó