



**SZENT ISTVÁN EGYETEM**  
**ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI KAR**  
**ÁLLATTENYÉSZTÉSI, TAKARMÁNYOZÁSTANI**  
**ÉS LABORÁLLAT-TUDOMÁNYI INTÉZET**



# **HSP-70 promóter-polimorfizmus vizsgálata egy hazai Holstein állományban**

**Konc Gábor**

szigorló állatorvostan-hallgató

Témavezető:

Maróti-Agóts Ákos, intézeti állatorvos

2011

## Tartalomjegyzék

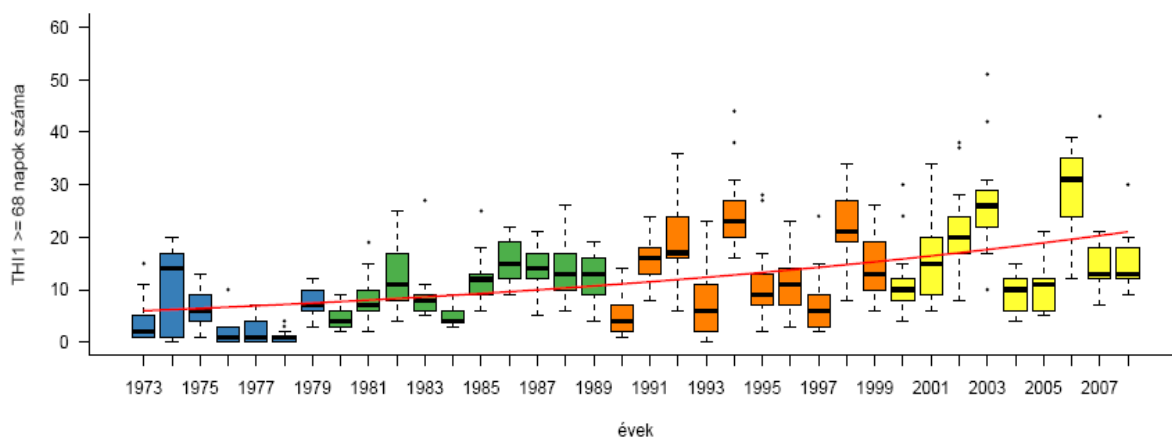
1. Bevezetés .....	3
2. Irodalmi áttekintés .....	5
2.1. Hősokk fehérjék, HSP .....	5
2.2. A HSP-70 fehérjecsalád: .....	5
2.3. A HSP-70 gén promóter régiójának polimorfizmusa .....	6
2.4. A HSP-70 gén promóter polimorfizmusának lehetséges hatásai húshasznú szarvasmarhában.....	6
3. Anyag és módszer .....	8
3.1. A telep bemutatása .....	8
3.1.1 A Holstein fajta .....	9
3.1.2 A fajták összehasonlításához felhasznált további állományok .....	10
3.2. DNS tisztítás.....	10
3.2.1 QIAamp DNA Mini Kit .....	10
3.3. Agaróz gélelektroforézis .....	11
3.4. Polimeráz-lánreakció, reakció termékek tisztítása .....	12
3.5. DNS szekvenálás, reakciótermékek tisztítása, szekvenálási termékek analízise .....	13
3.6. Restriktív endonukleáz hosszúság polimorfizmus .....	13
3.7. SDS poliakrilamid gél elektroforézis (PAGE) .....	15
3.8. Statisztikai feldolgozás .....	16
4. Eredmények .....	17
4.1. Molekuláris genetikai eredmények .....	17
4.2. Az PCR-RFLP módszer eredményei.....	19
4.3. Statisztikai analízis .....	21
4. Következtetések .....	24
5. Összefoglaló.....	25
6. Summary.....	26
7. Köszönetnyilvánítás .....	27
8. Felhasznált irodalom.....	28

# 1. Bevezetés

A globális felmelegedés soha nem volt még ennyire égető probléma, mint manapság. Napjainkban az állattenyésztés előtt álló egyik legnagyobb kihívás a klímaváltozás várható következményeihez való alkalmazkodás. A már napjainkban is tapasztalható szélsőséges időjárási jelenségek gyakoribbá válásával közvetlenül is érzékelhető klimatikus változásokhoz való alkalmazkodás elengedhetetlen és sürgős feladat. Egyik ilyen megoldandó kérdés a Holstein-fríz szarvasmarha csökkenő tejtermelése és szaporodásbiológiai problémái, melyet a szélsőséges hőmérséklet-változások okozhatnak. Ezért lesz egyre fontosabb olyan egyedek felkutatása, genetikai módszerek segítségével, amelyek ellenállóbbak a hőmérséklet extrém kilengéseivel szemben.

A tartástechnológiai alkalmazkodás feltételei bár igen költségesek, de rendelkezésre állnak.

Az állatállomány adaptálása a megváltozott körülményekhez ezzel szemben nem elhanyagolható költségei mellett idő és munkaiigényes.



1. ábra: Hőstressz napok száma évenkénti bontásban ez elmúlt évtizedekben (SOLYMOSI 2008)

Mikor az emlősöket hőstressz éri, elsődlegesen párologtatással - izzadással, lihegéssel, magasabb légzésszámmal, hormonális változásokkal próbálnak alkalmazkodni a megváltozott körülményekhez. Az alkalmazkodás sejt szinten is elindul, megnő a hő stressz fehérjék (HSP) termelése, ez a folyamat az adaptáció egyik fontos lépése. A HSP szerepe sejt szinten már nagyjából tisztázott, ugyanakkor a szervezetben betöltött szerepét illetően még további kutatásokra van szükség. Elméletek vannak arra, hogy szarvasmarhában egy a HSP fehérjék közül, ez a HSP-70, ellenállóbbá teszi az állatot a magas hőmérséklet által okozott hőstresszel

szemben. Néhány egyed nagyobb mennyiségben termeli ezt a fehérjét, mint a többi szarvasmarha. Néhány kutatás kimutatta a HSP-70 promóter szakaszának polimorfizmusát. Az a vélekedés, hogy ez a promóter szakasz okoz különbségeket a fehérje termelésének mennyiségében különböző egyedekben.

Szakedolgozatom célja az volt, hogy egy nagy-létszámú Holstein tehenészetben a HSP-70 promóter genotípusait meghatározzam, és a már rendelkezésre álló korábbi kutatási adatokkal azokat összehasonlítva a lehetséges közvetett szelekció nyomait keressem.

## **2. Irodalmi áttekintés**

### **2.1. Hősokk fehérjék, HSP**

A hatvanas években Ritosa professzor (RITOSA, 1962) olaszországi laboratóriumában valaki véletlenül magasabb hőmérsékletre állította az inkubátort, amiben drosophila tenyészetek voltak elhelyezve. Másnap a muslincák nyálmirigyeinek vizsgálatakor a kromoszómák szerkezetéből megváltozott génexpresszióra lehetett következtetni. Így kezdődött a hősokk fehérjék csoportjának vizsgálata.

A hő sokk proteinek (HSP) a fehérjék egy olyan csoportja, melyek termelése akkor növekszik meg, ha a sejtet magasabb hőmérséklet vagy más stresszhatás éri (YOSHIMUNE 2002). Ezen fehérjék jelen vannak minden sejtben és minden élő szervezetben, még optimális feltételek között is. A HSP-ket kódoló gének konzervált, jellemzően nem mutálódó génszakaszokon találhatóak és fejeződnek ki fiziológiás és változatos stressz tényezők hatására. A hőstressz fehérjék, mint gondos "dajkák" felügyelik a sejtek egyéb fehérjéit, hogy azok megfelelő állapotban, a megfelelő helyen és időben működjenek (YOSHIMUNE 2002). HSP-k funkciói közé tartozik az is, hogy segít az újonnan szintetizált, vagy az eltorzult fehérjék funkcióját visszaadni, megjavítani. A sejtekben, mint szállító egységek hordozzák a fehérjemolekulákat. Az elhasznált, tönkrement fehérjéket elszállítják a sejt fehérje lebontó folyamatainak helyszínére.

A sejt stresszre való válaszkor a HSP-ket kódoló génszakasz erőteljes, ideiglenes és gyorsuló expressziója figyelhető meg. A sejtek életben maradásához és zavartalan működéséhez a HSP-k termelésének tökéletes szabályozása nélkülözhetetlen (RITOSA 1996).

A HSP-k a molekulatömegük alapján lettek elnevezve. Tehát a HSP-70 fehérjecsaldnak 70 kDa a molekulatömege (WEGELE 2004, YOSHIMUNE 2002).

### **2.2. A HSP-70 fehérjecsald:**

A 70 kDa hő stressz proteinek (Hsp70) családj a szervezetben mindenhol expresszaldódik (WEGELE, 2004). Hasonló szerkezeti felépítésű fehérjék gyakorlatilag minden élő organizmusban megtalaldható.

Az eukarióta szervezetekben több hasonló szerkezetű Hsp70 fehérje található. Ezen fehérjék ugyan azon alapszerkezettel rendelkeznek, de mindegyiknek van egyedi specifikus csoportja, vagy meghatározott helye a sejten belül.

A Hsp70 fehérjék aktívan részt vesznek a sejtek védelmében mikor hő vagy oxidatív stressz éri azokat. E stresszhatás a sejt fehérjéit károsíthatja úgy, hogy részleges szerkezeti változásokat és aggregációt okozhat. Stressz hatására a fehérjék ideiglenesen hidrofób szerves anyagokhoz kötődhetnek. A Hsp70 megakadályozza, hogy a részlegesen denaturálódott fehérjék kicsapódjanak, illetve segíti a fehérjék visszaalakításában (MORANO, 2004).

### **2.3. A HSP-70 gén promóter régiójának polimorfizmusa**

Manfred Schwerin (2001) és munkatársai a sertés és szarvasmarha hsp70.2 gén promóter régiójában egy olyan polimorfizmust mutattak ki, amelynek eltérő változatai az átíródás folyamatát alapvetően befolyásolni voltak képesek. A polimorfizmus pontos helye a GCbox a sertésben és ennek megfelelője az AP2-box szarvasmarhában.

Szarvasmarhában az eltérő változatok közötti különbséget a GC-**C**-AGGGGG szakaszon vastaggal jelzett C megléte vagy hiánya jelenti.

Az eltérő allélok hatására az átíródott mRNS mennyisége szignifikánsan eltér, így következményesen a termelődő fehérje mennyisége, így a funkció hatékonysága sem azonos.

### **2.4. A HSP-70 gén promóter polimorfizmusának lehetséges hatásai húshasznú szarvasmarhában**

M. Lamb és társai (2007) nyolc eltérő egybázisos nukleotidpolimorfizmust (SNP) találtak a HSP70 gén promóterszakaszát érintő kutatásukban melyet 157 Angus, Brahman és Angus-Brahman keresztezés vizsgálatával folytattak. Két SNP-t kapcsolatba lehetett hozni a tej összetevőinek arányával. Az AP2-box (GC alél) heterozigóta tehenek kevesebb ( $P < 0.05$ ) szomatikus sejt számú tejet termelnek, mint a homozigóta GC egyedek (111 vs 305 x 1000 / mL). Azok a tehenek, amelyek homozigóta allélokot hordoztak a 1902-es pozícióban ( $P < 0.05$ ) több tejfehérjét és tejszírt termeltek, mint az eltérő genotípusúak.

A. Banks és társai (2007) kilenc SNP-t írtak le vizsgálatukban melyet az előzőekben említett Lamb mintáinak felhasználásával végeztek. A vemhesülési arány szignifikánsan ( $P < 0.01$ ) magasabb volt a homozigóta A (1125 pozíció) egyedek esetében. Továbbá ugyan azoknál a teheneknél is magasabb ( $P < 0.01$ ) vemhesülési arányt mutattak ki, amelyeknél nem volt jelen a már korábban leírt deléció az AP2 boxban.

Mindkét szerző aláhúzza a témában folytatott további kutatások fontosságát.

### 3. Anyag és módszer

#### 3.1. A telep bemutatása

A telep Békés-megyében, Magyarország délkeleti részén az alföld „legmagasabb” területén helyezkedik el.

A vállalat termelési ágazatai: szántóföldi növénytermesztés, vetőmagtermesztés és feldolgozás, takarmány előállítás, állattenyésztés, tejtermelés, erdő- és vadgazdálkodás.

A vállalat nagyrészt önellátó, az állatok takarmányozásához szükséges növényeket megtermelik maguknak. Saját vetőmag feldolgozó üzemmel rendelkezik. Takarmánykeverő üzemet is működtet mellyel baromfi-, és sertéstakarmányt állítanak elő. Másik fő ágazata az állattenyésztés; szarvasmarha-tenyésztés és tejtermelés.

A szarvasmarha ágazat jelenleg igen koncentrált képet mutat. A hajdani öt telepből most csak kettő, működik. A többi eladásra illetve felszámolásra került. A két működő telep a 11-es, ahol a tejtermelés folyik, illetve a 81-es telep, ahol az üszöket tartják.

Magyarországon az elsők közt volt a telep, ahol elkezdték a holstein-fríz tenyésztést. Eleinte Magyar tarkát kereszteztek red- Holsteinnel. A fajtaváltást azzal indokolták, hogy a magyar tarka kevésbé alkalmas a gépesített ipari tejtermelésre, kedvezőtlen tőgyforma miatt, és kevesebb tejet is ad, mint a holstein-fríz.

1975-ben a gazdaság 500 vemhes illetve szűz holstein-fríz üszőt vásárolt az USA-ból. Ez az állomány képezte tejelő tehén törzskönyvezett törzsállományát. A termelés fokozása és korszerűsítése érdekében számos fejlesztést és korszerűsítést végeztek el a gazdaságban. A 70-es években nagy beruházásokat kezdődtek. Jó minőségű import tenyészanyag beszerzés kezdődött, ami az állomány feljavulásához vezetett. Megkezdődött egy 1248 férőhelyes szakosított tehenészeti telepnek a felépítése, mely 1980-ban került átadásra. A mezőtelep rendszerű telepre jellemző a 7×2×96 férőhelyes, kötetlen, pihenő bokszos termelő istálló. Az akkor még korszerűnek épült telep ma már elavultnak számít. 1998 szeptemberében megkezdődött egy 2×22 Bou Matic Express Parallel fejőház és egy 200 férőhelyes új istálló építése. 1999-ben új ellető istálló és takarmánytároló épült meg. A fejlesztések továbbra is folynak, az európai Uniós támogatások igénybevételel nagy beruházás vette kezdetét. Hatalmas trágyatárolókat kezdtek építeni, melyekből a trágyát a gazdaság a saját földjeire



fogja kivinni, ezzel is növelve a növénytermesztés hatékonyságát. Hamarosan épületfejlesztési és korszerűsítési munkák is megkezdődnek.

1. táblázat: 2011. július 7 –i tehénlétszámok

<b>Összes tehén</b>	<b>1034</b>
Befejt tehének	908
Betegistállóban lévő tehének	24
Szárazon álló tehének	102
Kikerült tehének	26

### 3.1.1 A Holstein fajta

A **Holstein-fríz** fajta kitenyésztésének alapját az észak-európai, síkvidéki legelőkön kialakult lapály fajtacsoport adja, amely fajtakör túlnyomórészt feketetarka, kisebb arányában vöröstarka. Őse az ún. "feketetarka marha" - rendszertanilag a *Bos taurus primigenius hollandicus* típusba tartozik - már a XIV. században feltűnt viszonylag magas tejtermelésével. Az egyes változatokat már a XV. századtól exportálták Európa, majd világ-szerte. A ma ismert tipikus fekete-fehér színváltozat csak a XIX. sz. elején jelent meg.

A fajta első hivatalos törzskönyvét 1872-ben, Amerikában adták ki. A XIX. század második felében több amerikai tenyésztő is importált holland fríz marhát és mindegyik szerepelt az 1885-ben megjelent holstein-fríz törzskönyvben. A századfordulón lett híres az USA-Kanadai Holstein-fríz, amely azután világszerte elterjedt. Sok más kontinens mellett a fajta visszatért Európába is.

Színe fekete-, vagy vöröstarka de a fekete szín domináns a vörössel szemben. Az állatok lehetnek szinte teljesen fedettek, ugyanakkor pigment nélküliek is. Közép-nagy testű, középkorán érő fajta. A tehének marmagassága 140 cm, súlyuk 600-700 kg, a bikák marmagassága 152cm, súlyuk 1000-1200 kg. A testalakulás tekintetében az ivari dimorfizmus jól megfigyelhető. A bikák előlről hátrafelé keskenyedő alakja az izomszegény fartájéknak köszönhető. Ugyanakkor a tehének testalakulása hátrafelé szélesedő, ún. körte formát mutat, köszönhetően a jól fejlett tőgynek. Ez a forma a specializált tejelő fajták jellemző sajátja, s a tejelő jelleg megítélésekor akár szemből, akár pedig oldalról nézve fontos bírálati szempont. A finom, nemes tejelő jelleg, általában hosszú és mély, viszonylag lapos

mellkassal, terjedelmes hassal, szikár, vékony csontozattal, illetve terjedelmes ideális teknő alakú tőggyel párosul. A fajta élénk vérmérsékletű, anyagcsere-típusát tekintve a *respiratórikus* típusba tartozik. Mindez azt jelenti, hogy a tejtermelés szintjének fenntartása érdekében - átmenetileg - saját tartalékait is mozgósíthatja.

Iparszerű tartásra alkalmas, fejhetősége kiváló, technológiai tűrőképessége nagyon jó. Tejtermelésben első a világon, a nagy tejmennyiség közepes hasznosanyag-tartalommal párosul. Az ilyen tejet fogyasztói tejnek is hívják. A - számos rész tulajdonságból álló - hústermelő képessége viszont csak közepes. Az ellések lefolyása a tehenek esetében általában probléma mentes, de az üszőknél előfordulhat a nehéz ellés is. A legtöbb gond a tehenek újravemhesülésével van. Napjainkban a tenyésztők a reprodukciós és konstitúciós (*fitness*) tulajdonságok javításán fáradoznak.

Mintavételünk egy a mentességi igazolásokhoz kapcsolódó vérvételhez kapcsolódva történt EDTA-s Vacutainer típusú vákumos vérvételi csőbe 2010 tavaszán. Összesen 870 tehéntől gyűjtöttünk mintát

### **3.1.2 A fajták összehasonlításához felhasznált további állományok**

Dolgozatomban a tanszék azonos projektjében korábban született adatokat is felhasználunk a saját eredmények más fajtákról nyert eredményekkel történő összevetésekor. Ezek Maróti-Agóts 2009-ben született munkájából és Magyar szürke fajtára (n=150) vonatkozó adatokat tartalmaznak.

## **3.2. DNS tisztítás**

A DNS tisztítás célja az, hogy a teljes vérben található genomi DNS-t tartalmazó fehérvérsejtekből található megfelelő mennyiségű és tisztaságú DNS-t nyerjünk ki további vizsgálatok végzéséhez.

A nukleinsav tisztítása egy szilika oszlopos DNS-izoláló kit alkalmazásával (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) történt.

### **3.2.1 QIAamp DNA Mini Kit**

A DNS tisztítását a gyártó által mellékelt protokoll szerint végeztük el.

A mintahordozókat mintavevő pálcákról steril szikepenge segítségével 2 ml-es mikrocentrifuga csőbe vágtuk. Ezután a csőben 400µl mennyiségű PBS-t, 20 µl QIAGEN

Protease-t és 400µl AL puffert mértünk, majd 15 másodperces vortexeléssel összekevertük. A következő lépésben a sejtalkotó fehérjék lebontása céljából a csöveket 30 percig 56°C-on inkubáltuk. Az így kapott homogenizátumhoz 400µl etanolt (96-100 %-os) mértünk hozzá, ezt újabb homogenizálás követte. Az így nyert homogenizátumot szilika oszlopra (QIAamp Mini spin column) mértük át, majd a DNS felkötése céljából 1 percig 8.000rpm-en centrifugáltuk. A DNS-mentes folyadék a cső aljára került, ahonnan eltávolítottuk. A DNS mosására az oszlopra 500µl mennyiségű AW1 puffert mértünk (1 perc, 8.000rpm). A gyűjtőcsőben összegyűlt folyadékot eldobtuk, majd 500µl AW2 mosó puffert mértünk az oszlopra. Ezt követte kétszeri centrifugálás (3 perc, 13.000rpm) eltávolítva a közben összegyűlt mosópuffert. A szilika oszlopot, mely a DNS-t kötötte tiszta mikrocentrifuga csőbe helyeztük át és 150µl extrakciós (AE) puffert pipettáztunk rá. A csöveket ezután 1 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd centrifugáltuk (1 perc, 8.000rpm), így a tisztított DNS-oldat (30 µl) a cső alján gyűlt össze.

### **3.3. Agaróz gélelektroforézis**

A DNS tisztítás eredményének ellenőrzését agaróz gélen végeztük. Ezzel a módszerrel igazolható a DNS jelenléte, valamint mennyiségének szemikvantatív meghatározása is elvégezhető. Áteső UV-megvilágításnál a gélbe kevert interkaláló festék fényintenzitása a felvitt DNS-minta koncentrációjától függ.

A DNS mintákat 1%-os agarózgélen detektáltuk, melynek összetétele: 0,5 g agaróz (Sigma), 50 ml 1x TEB puffer (Tris-EDTA pH=8,3: 10,78 g/l Tris, 5,5 g/l bórsav, 0,74 g/l EDTA), 7,5 µl GelRed (GelRed Nucleid Acid Stain, 10.000×, Biotium). A gél zsebekbe 6 µl tisztított DNS minta és 2 µl brómfenolkék oldat keverékét mértük. Az elektroforézishez a Pharmacia Biotech GNA 100-as készülékét használtuk

Az agaróz gélelektroforézis paraméterei:

1/1 program: 80 V feszültség, 150 mA áramerősség, 100 W teljesítmény, 5 perc futtatási idő.

1/2 program: 100 V feszültség, 150 mA áramerősség, 100 W teljesítmény, 30 perc futtatási idő.

Az elektroforézis befejeztével a DNS molekulákat áteső UV-fénnyel tettük láthatóvá. Az eredményeket digitális fényképezőgéppel rögzítettük.

### 3.4. Polimeráz-lánreakció, reakció termékek tisztítása

Polimeráz-lánreakciót (Polymerase Chain Reaction, PCR) alkalmazva a Strakey (2007) korábban már publikált primer-párját alkalmaztuk.

3F-HSP70      5'- GCCAGGAAACCAGAGACAGA -3'  
3R-HSP70      5'- CCTACGCAGGAGTAGGTGGT -3'

A PCR összeállítása során előre összemértük az összes, a reakcióhoz szükséges reagenst, ún. mester mixet készítettünk.

2. táblázat: A PCR reakció összetevői

Reagens	térfogat (μl)
10 x PCR buffer	2,5
dNTPs Mix (10 mM)	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1
Forward primer	1
Reverse primer	1
Bovine Serum Albumin	1
Taq DNA polymerase	0.2
Ultra tiszta víz(UP)	15,3
Template	0,5
Össztérfogat	25

Ezt követően a mixből 15 μl-t pipettáztunk 200 μl-es vékony falú PCR csövekbe, majd az 1 ng/μl-re hígított DNS mintákat (10 μl, össztérfogat 25 μl) mértük hozzá. A PCR reakció elvégzésére GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) készüléket alkalmaztuk a következő programmal: 95°C 10 p., 36 x(94°C 30 mp., 60°C 45 mp., 72°C 60 mp.), 72°C 10 p., 10°C ∞.

A polimeráz lánreakció sikerességének ellenőrzését és a keletkezett termékek mennyiségi szemikvalitatív meghatározását agaróz gélelektroforézissel végeztük.

A PCR termékeket a további felhasználás érdekében tisztítani szükséges. A tisztítás során eltávolítjuk a PCR folyamán fel nem használt komponenseket (primerek, nukleotidok, stb.), ezáltal „tiszta” templátszalakat biztosítva a szekvenálási reakcióhoz. A PCR tisztításhoz QIAquick PCR Purification Kitet (Qiagen) használtunk követve a gyártó útmutatásait.

A tisztításhoz 1,5 ml-es mikrocentrifuga csöveket használtunk, melyek anyaga szilikagél oszlop. Ezen az oszlopon adszorbeálódik a hozzáadott az egy- és kétszálú DNS molekula 150µl PBI pufferre jellemző pH és só koncentráció következtében. Az oszlopra mért 700µl PE pufferrel végzett mosással (1 perc, 15.000rpm) eltávolítottuk a PCR reakció komponenseket. Az oszlopot 1,5 ml-es tiszta mikrocentrifuga csőbe helyeztük és 30 µl elúciós (EB) pufferrel (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) eluáltuk a DNS-t (1 perc, 15.000rpm). A tisztított PCR termékek mennyiségének meghatározásához agaróz gélelektroforézist alkalmaztunk.

### **3.5. DNS szekvenálás, reakciótermékek tisztítása, szekvenálási termékek analízise**

A tisztított minták szekvenálásához a BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit-et alkalmaztunk standard protokoll szerint (Applied Biosystems).

A szekvenálási reakcióhoz szükséges reagenseket előre összemértük, mester mixet készítettünk, amely összetétele: 5,6 µl HPLC minőségű víz, 2 µl Ready Reaction Premix, 1 µl BigDye 5× Sequencing Buffer, 1 µl primer (1,6 pM/µl), 0,4 µl DNS templát (100-300 ng).

A szekvenálási reakcióhoz használt program: 96°C 1 p, 25×(96°C 10 mp., 50°C 5 mp., 60°C 4 p.), 10°C ∞. A reakcióhoz a GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) készüléket használtuk. A szekvenált termékek tisztítása a BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) alkalmazásával történt.

A képződött DNS szálak stabilizálása érdekében a mintákhoz 45 µl SAM™ Solution-t mértünk, majd 10 µl BigDye XTerminator Solution-t adtuk hozzá a szekvenálás során feleslegben maradt nukleotidok megkötésére. Ezt követően 30 percig inkubáltuk és centrifugáltuk (2 perc, 1000 rpm) a mintákat tartalmazó csöveket. A tisztított, szekvenált DNS-t, amely a felülúszó folyadékban (kb. 30 µl) található ABI Prism 310 genetikai analizátor készülékbe (Applied Biosystems) mértük át. Ezután a szekvenálási termékeket elektroforetizáltuk és fluoreszcens festéssel detektáltuk. A nyers adatok kiértékelésére, a szekvenciák szerkesztésére és illesztésére a Sequencing Analysis Software 3.4.1. és a Seqscape 2.1. szekvencia analizáló programokat használtuk.

### **3.6. Restriktációs endonukleáz hosszúság polimorfizmus**

Az RFLP-technika a bakteriális restriktációs endonukleázok szekvencia-specifikus hasítási tulajdonságait használja ki. A specifikus hasítási hely megléte esetén elhasítják a DNS

3. táblázat: A CviKI-1 endonukleáz hasítási pontjai az AP2 mutáns HSP70 PCR termék esetén

MS	hasítási pozíció	hasítási hely és környékének szekvenciája	fragmentum hossz
1	38	27 ggaccttccc AG CC cctctcccc	38
2	195	184 ccgacctggc AG CC cactgagct	157
3	205	194 agccccactg AG CT cggtcattgg	10
4	217	206 ctcggtcatt GG CT gacgagggaa	18
5	238	227 gaaaaggcgg GG CT tgatgaagaa	21
6	264	253 ataaacacag AG CC gcctgaggag	26
7	285	274 gaaaacagc AG CC tggagagagc	20
8	296	285 gcctggagag AG CT gataaaactt	11
9	312	301 taaaacttac GG CT tagtccgtga	16
10	330	319 ccgtgagagc AG CT tccgcagacc	18
11	402	391 ggttccgaaa AG CC cgagcttctc	72
12	408	397 gaaaagcccg AG CT tctcgtcgca	6
13	449	438 tcaggtttga AG CT tatttcggag	41
14	461	450 cttatttcgg AG CC ggaaaagcag	12
15	498	487 cgaaaaacac AG CT atcgcatcg	37
			41

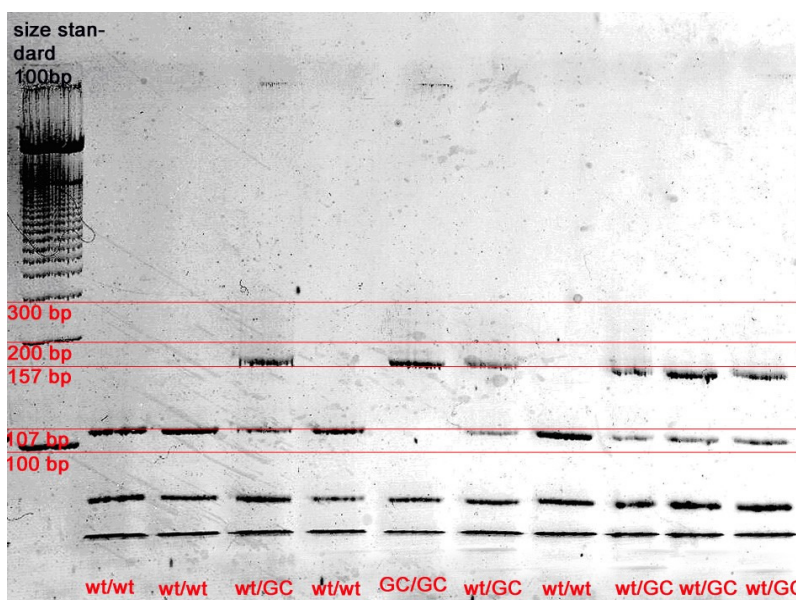
4. táblázat: A CviKI-1 endonukleáz hasítási pontjai a vad típusú HSP70 PCR termék esetén

MS	hasítási pozíció	hasítási hely és környékének szekvenciája	fragmentum hossz
1	38	27 ggaccttccc AG CC cctctcccc	38
2	145	134 ggttccagaa AG CC agggggcagg	107
3	196	185 ccgacctggc AG CC cactgagct	51
4	206	195 agccccactg AG CT cggtcattgg	10
5	218	207 ctcggtcatt GG CT gacgagggaa	18
6	239	228 gaaaaggcgg GG CT tgatgaagaa	21
7	265	254 ataaacacag AG CC gcctgaggag	26
8	286	275 gaaaacagc AG CC tggagagagc	20
9	297	286 gcctggagag AG CT gataaaactt	11
10	313	302 taaaacttac GG CT tagtccgtga	16
11	331	320 ccgtgagagc AG CT tccgcagacc	18
12	403	392 ggttccgaaa AG CC cgagcttctc	72
13	409	398 gaaaagcccg AG CT tctcgtcgca	6
14	450	439 tcaggtttga AG CT tatttcggag	41
15	462	451 cttatttcgg AG CC ggaaaagcag	12
16	499	488 cgaaaaacac AG CT atcgcatcg	37
			41

szálat amennyiben a felismerési hely szekvenciája nem található meg például deléción, inszerción, vagy más mutációs jelenségek miatt nem hasít. Ezt utána elektroforetikus futtatással detektálhatjuk, a fragmentumok vagy az eredeti termék jelenlétének vizsgálatával. Esetünkben olyan restriktív enzimet használtunk, amely specifikus volt az említett AP2 mutációra.

A PCR termék CVIKI 1 endonukleázzal történő emésztését követően, ahol a 145. pozícióban van a CVIKI1 specifikus wt/AP2 mutáció, mert ha a citozin jelen van, akkor a CVIKI hasít (4. táblázat) ha nincs a deléción miatt, akkor nem történik hasítás (3. táblázat).

A genotipizálást ezek szerint a második fragmentum hossza alapján végezhetjük el: ha 107 bázispár hosszú, akkor vad típus, ha 157 bázispár hosszú, akkor AP2 mutáns van jelen. Természetesen mindkettőt észlelhetjük, amennyiben heterozigóta egyedről van szó (5. ábra).



2. ábra: Eltérő genotípusú minták SDS poliakrilamid gél elektroforézis képe, restriktív emésztést követően

### 3.7. SDS poliakrilamid gél elektroforézis (PAGE)

Az SDS-PAGE, (sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), módszert használtuk a DNS fragmensek szétválasztásához, mert az alternatívát jelentő agar gél elektroforézisánál jóval pontosabb méret-meghatározást tesz lehetővé és a futás után a gélek archiválhatóak.

Az SDS-PAGE futtatáshoz NOVEX futtató berendezést használtunk. Az elektroforézist folyamatos feszültség mellett (120 V) a festékfront kifutásáig végeztük.

Az ezüstofftés 15 perc fixáló folyadékban történő áztatás után ezüst-nitrát oldatban történő perfúzióval hajtottuk végre, és előhívást követően szárítottuk.

A gélek folpackkal burkolva, amely a kiszáradástól védte őket hosszan tárolhatók.

### **3.8. Statisztikai feldolgozás**

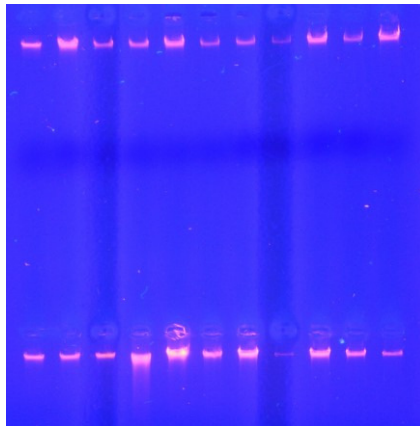
A statisztikai analízist a szabad felhasználású R statisztikai (R Development Core Team, 2008) programcsomaggal végeztük. A Hardy-Weinberg egyensúly tesztelése és ábrázolása Hardy-Weinberg csomag (GRAFFELMAN, 2008) felhasználásával történt, a szignifikancia vizsgálatokat Fisher exact tesztel, a Pearson reziduálisokat a VCD csomaggal ábrázoltuk (MEYER, 2006).



## 4. Eredmények

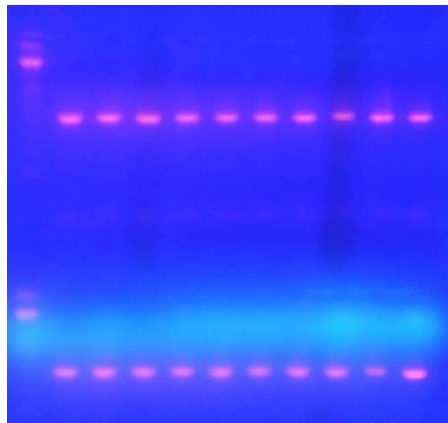
### 4.1. Molekuláris genetikai eredmények

Sikeresen vontunk ki sejtmagi a DNS-t gyűjtött 250 mintából



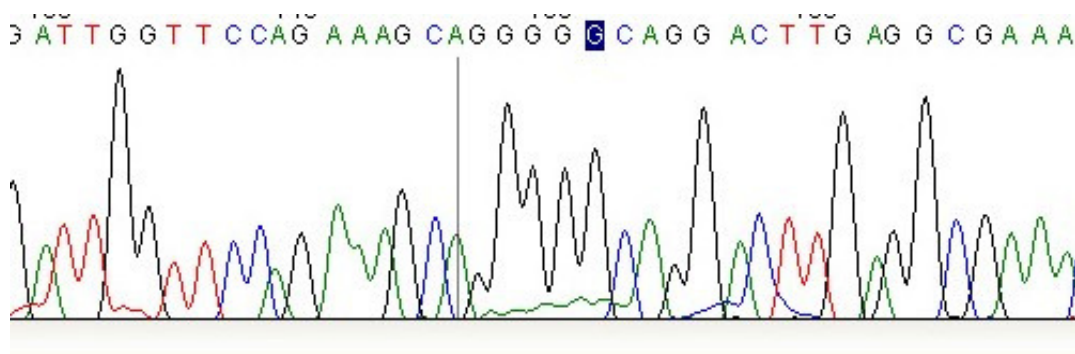
3. ábra: Agar gél elektroforetikus futtatás fényképe a 1-10 és a 11-20 templát esetében az első oszlop mindkét sorozat esetében kontroll minta volt.

250 sikeres PCR reakcióban sikerült felszorzoznunk a kérdéses promóter szakaszt.

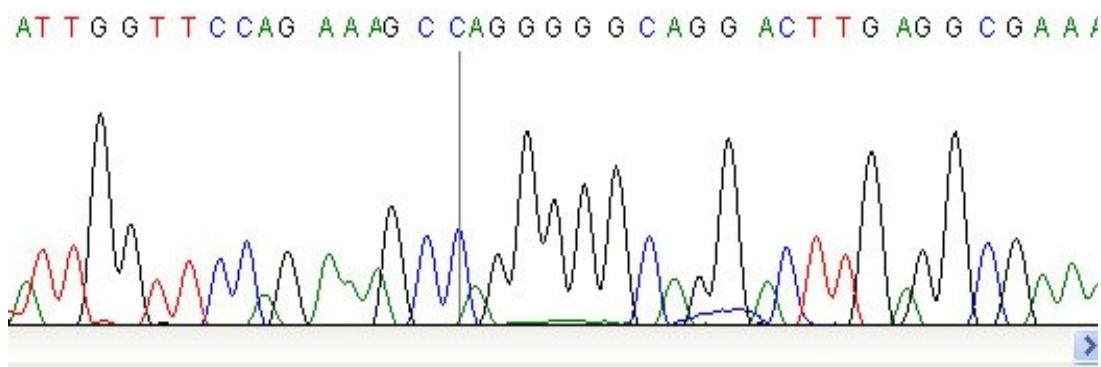


4. ábra: 539bp PCR termék az agargél –elektroforézis után, első oszlopban a méretstandard

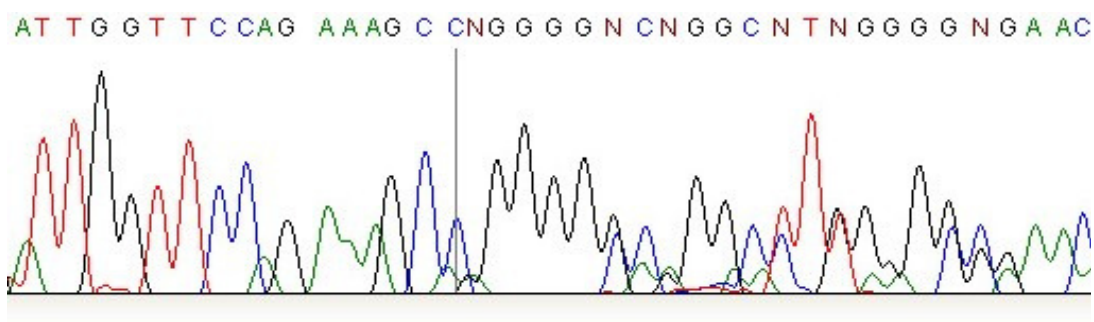
Sikeresen határoztuk meg a kiválasztott magyar szürke és norvég vörös, valamint három Holstein minta szekvenciáját és genotípusát a fentebb leírt didezoxi szekvenálás módszerével (5. 6. 7. ábrák).



5. ábra: Homozigóta norvég vörös kontroll AP2 mutáns AP2/AP2 (deléció a jelzett szakaszon) elektroferogram



6. ábra: Homozigóta magyar szürke kontroll vad típus wt/wt (cc a jelzett helyen) elektroferogram



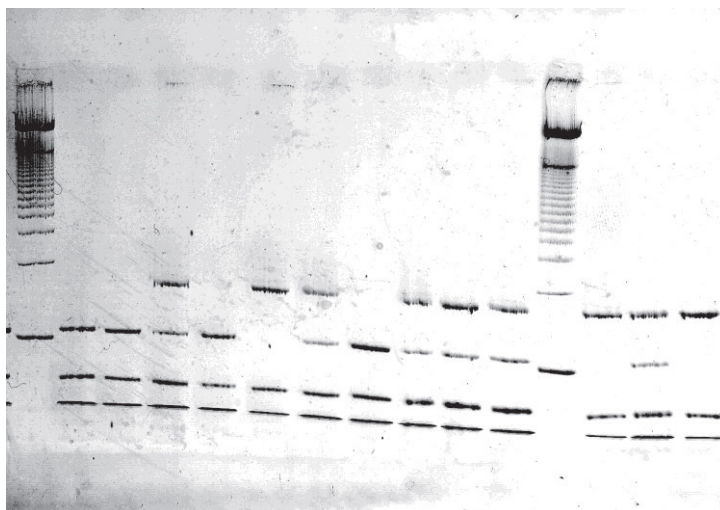
7. ábra: Heterozigóta AP2/wt Holstein minta (duplacsúcs a jelzett helyen) elektroferogram forward primerrel

#### 4.2. Az PCR-RFLP módszer eredményei

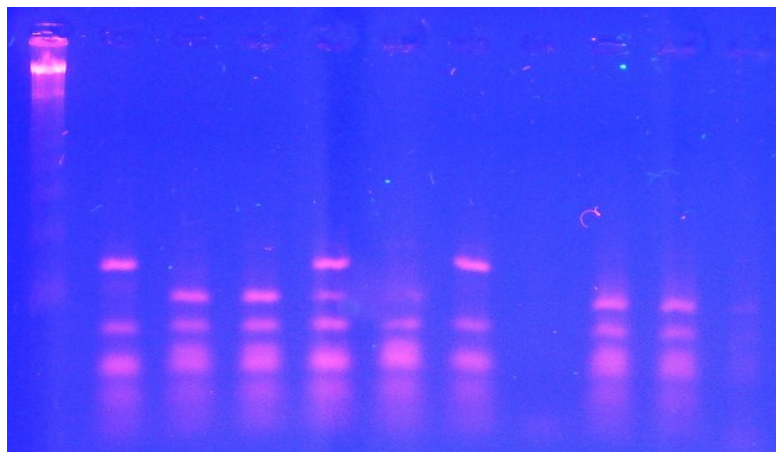
A PCR-RFLP vizsgálatok során melyeket a közös projekt keretében korábban Marita Skogseth munkája alapján végeztünk nem várt hibával szembesültünk. A korábban azonos reagensekkel egyértelmű eredményt biztosító reakció során elbírálási nehézségekbe ütköztünk.

Az SDS-PAGE során kapott eredmények zavarosak, zajosak, elbírálhatatlanok voltak több esetben. Az esetleges kontamináció miatt az összes reagens lecserélése sem vezetett eredményre. A DNS tisztítás megismétlése sem oldotta meg a problémát.

Végül az ismétlésekkel együtt csak 173 egyed genotípusának meghatározása sikerült egyértelműen. A hibát utólag a használt restrikciós endonukleáz esetleges kontaminációjára vezettük vissza, ennek ellenőrzése a dolgozat befejezéséig nem történt még meg.



8. ábra: RFLP mintázat 10 vizsgált egyed esetében SDS-PAGE



9. ábra: RFLP mintázat 10 vizsgált egyed esetében agargél elektroforézis

5. táblázat: A PCR-RFLP genotipizálás eredményei

Sorszám	Krotália száma	Genotípus
3.	6587	wt/wt
4.	6850	wt/wt
8.	1914	wt/wt
9.	4407	wt/wt
12.	6436	wt/wt
13.	6797	wt/wt
16.	8240	wt/wt
17.	7246	wt/wt
18.	5845	wt/wt
20.	3362	wt/wt
21.	6930	wt/wt
24.	8776	wt/wt
25.	8058	wt/wt
29.	8270	wt/wt
30.	8395	wt/wt
33.	8201	wt/wt
34.	8195	wt/wt
35.	8038	wt/wt
37.	7870	wt/wt
39.	8082	wt/wt
40.	8307	wt/wt
43.	8145	wt/wt
45.	8153	wt/wt
46.	8184	wt/wt
47.	7991	wt/wt
53.	8105	wt/wt
60.	6478	wt/wt
61.	6097	wt/wt
63.	6566	wt/wt
64.	5866	wt/wt
65.	4370	wt/wt
66.	516	wt/wt
71.	5858	wt/wt
75.	4914	wt/wt
76.	6870	wt/wt
77.	6943	wt/wt
84.	1368	wt/wt
89.	5431	wt/wt
105.	6697	wt/wt
109.	5517	wt/wt
110.	3459	wt/wt
115.	2587	wt/wt
125.	485	wt/wt
126.	5618	wt/wt
127.	6686	wt/wt
130.	3807	wt/wt
133.	9909	wt/wt
135.	4258	wt/wt
140.	6750	wt/wt
144.	6448	wt/wt
149.	314	wt/wt
150.	6504	wt/wt
159.	6938	wt/wt
168.	3781	wt/wt
170.	7859	wt/wt
172.	7797	wt/wt
303.	3934	wt/wt
305.	6449	wt/wt

Sorszám	Krotália száma	Genotípus
315.	6131	wt/wt
1.	6879	wt/AP2
5.	5544	wt/AP2
10.	6915	wt/AP2
14.	1077	wt/AP2
19.	4096	wt/AP2
22.	1692	wt/AP2
26.	7517	wt/AP2
27.	8128	wt/AP2
28.	8268	wt/AP2
32.	7982	wt/AP2
38.	8126	wt/AP2
42.	8089	wt/AP2
44.	8196	wt/AP2
52.	8312	wt/AP2
54.	8355	wt/AP2
55.	5422	wt/AP2
59.	6100	wt/AP2
67.	6860	wt/AP2
72.	81	wt/AP2
78.	6069	wt/AP2
81.	4861	wt/AP2
82.	5507	wt/AP2
83.	1761	wt/AP2
85.	3157	wt/AP2
86.	5330	wt/AP2
87.	3080	wt/AP2
90.	6603	wt/AP2
92.	6914	wt/AP2
102.	1334	wt/AP2
103.	6496	wt/AP2
104.	6372	wt/AP2
108.	6951	wt/AP2
111.	7616	wt/AP2
114.	7449	wt/AP2
119.	2343	wt/AP2
120.	6527	wt/AP2
121.	8812	wt/AP2
122.	4439	wt/AP2
128.	6621	wt/AP2
129.	9387	wt/AP2
132.	6308	wt/AP2
139.	1346	wt/AP2
141.	6834	wt/AP2
143.	6105	wt/AP2
145.	5709	wt/AP2
146.	6678	wt/AP2
147.	5808	wt/AP2
148.	9270	wt/AP2
157.	2471	wt/AP2
158.	4817	wt/AP2
160.	3249	wt/AP2
161.	6440	wt/AP2
162.	6249	wt/AP2
163.	1785	wt/AP2
164.	6858	wt/AP2
166.	4806	wt/AP2
167.	6161	wt/AP2
169.	6362	wt/AP2

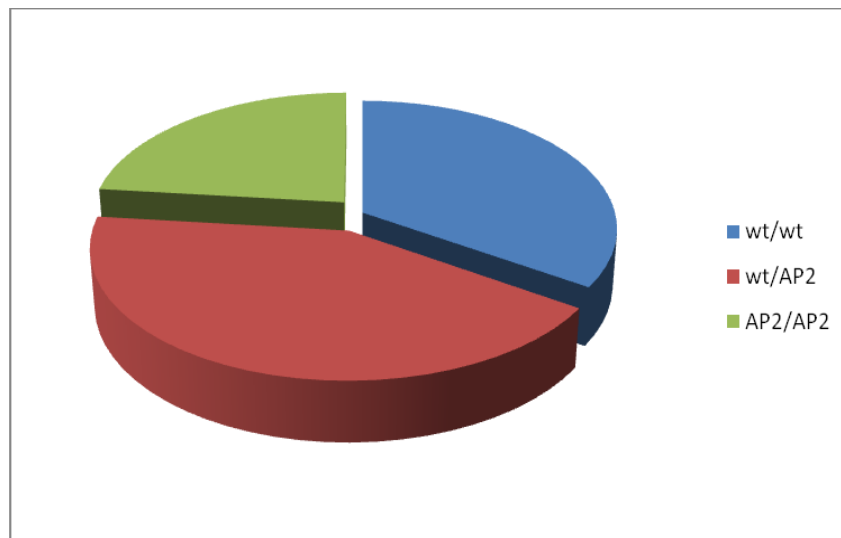
Sorszám	Krotália száma	Genotípus
171.	6385	wt/AP2
173.	2004	wt/AP2
175.	6965	wt/AP2
176.	4478	wt/AP2
177.	6893	wt/AP2
301.	7844	wt/AP2
302.	5171	wt/AP2
310.	6206	wt/AP2
311.	4263	wt/AP2
312.	4244	wt/AP2
313.	4350	wt/AP2
314.	877	wt/AP2
316.	2599	wt/AP2
319.	7091	wt/AP2
321.	6280	wt/AP2
2.	7008	AP2/AP2
6.	6832	AP2/AP2
15.	5605	AP2/AP2
23.	8850	AP2/AP2
31.	8176	AP2/AP2
36.	8266	AP2/AP2
41.	8143	AP2/AP2
48.	8171	AP2/AP2
50.	8222	AP2/AP2
56.	4792	AP2/AP2
57.	2109	AP2/AP2
58.	2290	AP2/AP2
68.	5423	AP2/AP2
69.	2600	AP2/AP2
70.	716	AP2/AP2
73.	4997	AP2/AP2
80.	6066	AP2/AP2
91.	5955	AP2/AP2
93.	4846	AP2/AP2
106.	7539	AP2/AP2
107.	5595	AP2/AP2
112.	9228	AP2/AP2
116.	9078	AP2/AP2
117.	4623	AP2/AP2
118.	6393	AP2/AP2
134.	6048	AP2/AP2
137.	6924	AP2/AP2
138.	612	AP2/AP2
142.	6550	AP2/AP2
151.	5862	AP2/AP2
154.	6282	AP2/AP2
304.	7114	AP2/AP2
306.	3919	AP2/AP2
307.	5299	AP2/AP2
308.	6328	AP2/AP2
309.	3173	AP2/AP2
317.	6695	AP2/AP2
322.	5986	AP2/AP2
324.	7197	AP2/AP2
325.	4988	AP2/AP2

### 4.3. Statisztikai analízis

A Holstein fajtára vonatkozó adataink elemzésével a következőkre jutottunk:

6. táblázat: Genotípus megoszlás, összesített eredmények

Genotípus	wt/wt	wt/AP2	AP2/AP2
n	59	73	40
százalékban kifejezve	34,10%	42,20%	23,12%

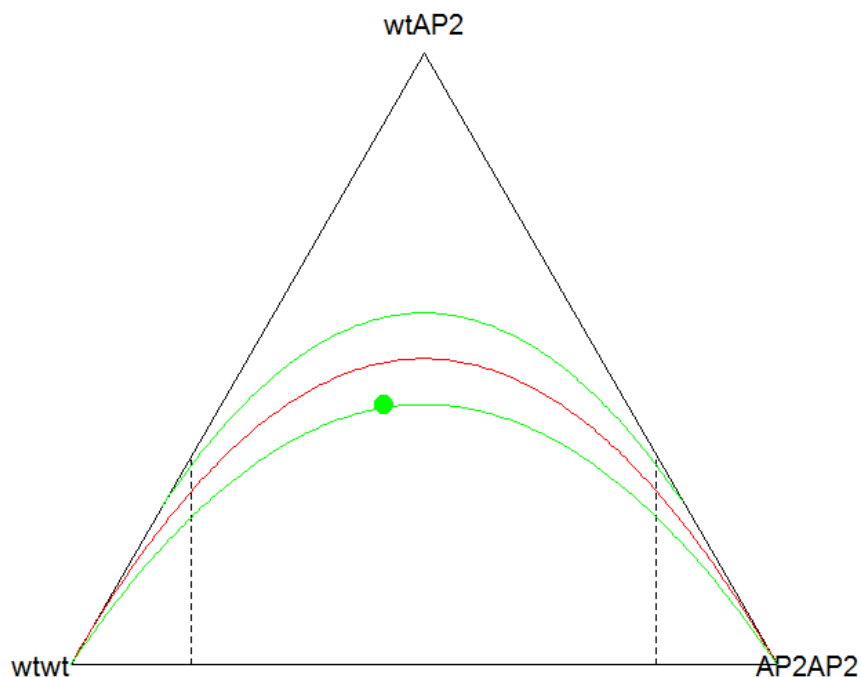


10. Ábra: Genotípusok megoszlásának ábrázolása

7. táblázat: A HWE teszt eredménye a Holstein állományban

	Chi <sup>2</sup>	p-érték	D*
Holstein-fríz	2.9899	0.08378534	-5.975291

\* Félészorás érték a HWE-től a wt/AP2 genotípusnál

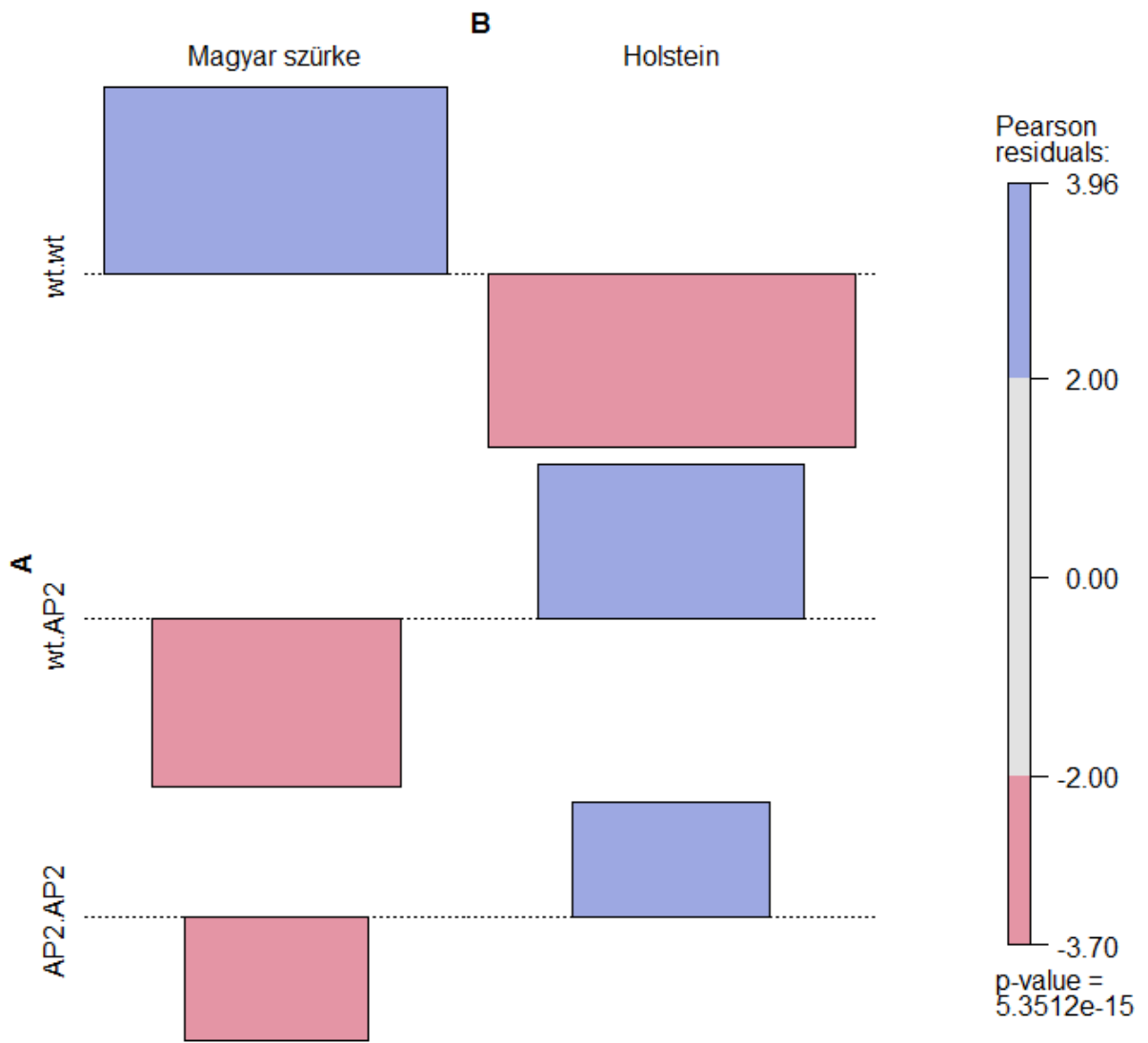


11. ábra: Hardy-Weinberg háromszög-ábra a  $\chi^2$  teszt eredményével, ahol a vizsgált mintát a zöld pont jelzi, a vörös vonal a HWE egyensúly pontos pozícióját, a zöld vonal pedig a Hardy-Weinberg egyensúly fennállásának konfidencia intervallumát

Eredményeink alapján az egyensúly fennáll, bár a heterozigóták arányának nagy mértékű többletét jelzi a D érték.

A Holstein és a Magyar Szürke fajta összehasonlításához a Fischer Exact tesztet használtuk, a Pearson residuálisok megjelenítése az R programcsomag VCR csomagjával történt.

A p érték a Fischer teszt eredményeként  $5.3512 \cdot 10^{-15}$  ami az eltérés véletlenszerűségét kizárja, azaz a két minta jelentősen eltér a genotípusos megoszlásban. (12. ábra). Az oszlopok magassága a várt és megfigyelt gyakoriság különbségével arányos. A kék szín többletet, a vörös hiányt jelez a várt gyakorisághoz viszonyítva.



12. ábra: Pearson reziduálisok a genotípusonként a fajta függvényében

## 4. Következtetések

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a Hardy-Weinberg egyensúlyban lévő mintánkban a nagyon magas a heterozigóták aránya. Ez a többlet amely szinte felborítja az egyensúlyt valamilyen adaptációs folyamat eredményeképpen állhatott elő. A telep fekvése és klimatikus jellemzői alapján a szóba jöhető, a genetikai változást előidéző folyamatok közül a hősokkhoz való alkalmazkodás valószínűsíthetően jelentős hatást gyakorolhat a populációra.

A hősokkra erőteljesebb expresszióváltozással reagáló egyedek pozitív szelekciója helyett a gyengébben adaptálódó egyedek negatív szelekciós értéke állhat a háttérben ( $D = -5.975291$ ).

A magyar szürke szarvasmarha fajtával történő összehasonlításban szembeűnő, hogy a Holstein minta jelentős többletet mutat heterozigóta és homozigóta AP2 mutáns egyedekből. Ez valószínűsíthetően a modern tejelőfajta adaptációs hátrányának tekinthető a régen honosult őshonos fajtához viszonyítva.

További vizsgálatokban a minta kiterjesztésén túl, saját genetikai anyaggal dolgozó telepeket lenne szükséges vizsgálni az esetleges nagyobb mértékű adaptáció jeleinek feltárására.



## 5. Összefoglaló

Szaktervezésem célja az volt, hogy egy nagy-létszámú Holstein tehenészetben a HSP-70 promóter genotípusait meghatározzam, és a már rendelkezésre álló korábbi kutatási adatokkal azokat összehasonlítva a lehetséges közvetett szelekció nyomait keressem.

Dél-magyarországi Holstein telepen történő mintavétel után sikeresen meghatároztuk 172 tehen genotípusát, egy kapcsolódó korábbi kutatásban kifejlesztett PCR-RFLP módszerrel.

A kapott eredmények arra a megállapításra jutottunk, hogy a Hardy-Weinberg egyensúlyban lévő mintánkban a nagyon magas a heterozigóták aránya ( $D=-5.975291$ ). Ez a többlet amely szinte felborítja az egyensúlyt, valamilyen adaptációs folyamat eredményeképpen állhatott elő. A telep fekvését és klimatikus jellemzőit figyelembe véve feltételezhető, hogy a genetikai változást előidéző folyamatok közül a hőssokhoz való alkalmazkodás jelentős hatást gyakorolhat a populációra.

A hőssokra erőteljesebb expresszióváltozással reagáló egyedek pozitív szelekciója helyett a gyengébben adaptálódó egyedek negatív szelekciós értéke állhat a kapott értékek háttérében ( $D=-5.975291$ ).

A magyar szürke szarvasmarha fajtával összehasonlítva szembevetendő, hogy a Holstein-fríz állományból származó minta jelentős többletet mutat heterozigóta és homozigóta AP2 mutáns egyedekből. Ez az eltérés valószínűsíthetően a modern tejelőfajta adaptációs hátrányának tekinthető a régen honosult őshonos fajtához viszonyítva.

További vizsgálatokban a minta kiterjesztésén túl, saját genetikai anyaggal dolgozó telepeket lenne szükséges vizsgálni az esetleges nagyobb mértékű adaptáció jeleinek feltárására.

## 6. Summary

The aim of my study was the genotyping the promoter region of HSP70 Heat Shock Protein gene promoter polymorphism in a large scale Holstein Farm in South-Hungary to find out the possible sign of heat-shock adaptation.

The genotyping of 172 Holstein cow was successfully made by a earlier developed PCR-RFLP method.

Concerning to the results the sample was in Hardy-Weinberg equilibrium but the percentage of heterozygote was higher than the expected ( $D=-5.975291$ ). This surplus was presumably resulted by the negative selection pressure on AP2/AP2 mutants and not the positive pressure on wild type homozygous.

The comparison between Holstein and Hungarian Grey sample was enlightened a massive surplus of heterozygous and AP2 mutant homozygous in Holstein breed. Presumably this surplus was resulted by the long adaptation mechanism of autochthonous Hungarian grey breed.

Furter investigations are needed with extended sample size, and with a genetically nearly isolated “Hungarian” Holstein stock.

## **7. Köszönetnyilvánítás**

Köszönetet szeretnék mondani a Szent István Egyetem Állatorvos - Tudományi Kar Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet Állattenyésztési és Genetika Osztályának, hogy biztosították a szakdolgozat elkészítéséhez szükséges feltételeket.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Zöldág László osztályvezető úrnak hasznos tanácsaiért.

Továbbá köszönettel tartozom témavezetőmnek: Dr. Maróti – Agóts Ákosnak útmutatásaiért, végtelen türelméért.

Külön köszönetet szeretnék mondani Keindl Ágnes laborasszisztensnek is.

## 8. Felhasznált irodalom

Banks A., Looper M., Reiter S., Starkey L., Flores R., Hallford D., and Rosenkrans, Jr.C. (2007): "Identification of single nucleotide polymorphisms within the promoter region of the bovine heat shock protein 70 gene and associations with pregnancy", " Conference Abstrakt American Society of Animal Science Southern Section Meeting 2007

Bartosiewicz L. (2000): "Hungarian Grey history" in: The origins of the Hungarian Grey Cattle Bugacpuszta, pp. 6-13

Béri B. (2002): "Preservation of genes and profitability in breeding of Hungarian Grey cattle" in: Preservation and Results of Research of traditional domestic animal breeds, pp.39-48

Bodó I. (2000): "The Hungarian Grey cattle" in: Living heritage.ed. Bodó I. Budapest-Agroinform, pp.40-43.

FAO (2007): "The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture"  
Graffelman J. (2008). HardyWeinberg: Graphical tests for Hardy-Weinberg equilibrium. R package version 1.2. <http://www.r-project.org>, <http://www-eio.upc.edu/~jan>

Lamb M., Okimoto R., Brown M., Brown H., Johnson Z., and Rosenkrans Jr.C., (2007): "Relationship between single nucleotide polymorphisms in the bovine heat shock protein 70 gene and milk characteristics of beef cows", Conference Abstrakt American Society of Animal Science Southern Section Meeting 2007.

Meyer David, Achim Zeileis, and Kurt Hornik (2006). The Strucplot Framework: Visualizing Multi-Way Contingency Tables with vcd. Journal of Statistical Software, 17(3), 1-48. URL <http://www.jstatsoft.org/v17/i03/>

Morano KA (October 2007). "New tricks for an old dog: the evolving world of Hsp70". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1113**: 1–14.

Morimoto R.I., Milarski K.L., Tissieres A, Georgopoulos C. (1990): "Stress Proteins in Biology and Medicine" in: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 323–359.

Mülhardt C., Beese E.W. (2007), "Molecular Biology and Genomics", pp.11-36

Nicholas F.W, (1996), "Introduction to Veterinary Genetics", pp. 52-55

Ritossa F. (1962): "A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila" in Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)

Ritossa F. (1996): "[Discovery of the heat shock response](#)" in: Cell Stress Chaperones 1 (2), pp. 97–98.

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Schwerin M., Maak S., Kalbe C., Fauerbass R. (2001), BBA 1522, pp. 108-111 TITLE!!!

Scwerin M., Maak S., Hagendorf A., Lengerken G.V., Seyfert H.M. (2002), BBA 1578, pp. 90-94

Shapiro A.L., Viñuela E., Maizel Jr. J.V. (1967): "Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels." In: Biochem Biophys Res Commun. 28 (5), pp. 815-820.

Solymosi N., Kern Anikó, Maróti-Agóts Á., Horváth L, and Erdélyi K.: Tety: an easy to use tool for extracting climatic parameters from tyndall data sets. Environmental Modelling & Software 23 (2008) 948-949

Starkey L., Looper M., Banks A., Reiter S, Rosenkrans C, 1University of Arkansas, Fayetteville, 2USDA/ARS, Booneville, AR. Identification of polymorphisms in the promoter region of the bovine heat shock protein gene and associations with bull calf

weaning weight. Conference Abstrakt American Society of Animal Science Southern Section Meeting 2007.

Wegele H., Müller L., Buchner J. (2004): "Hsp70 and Hsp90, a relay team for protein folding" in: *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 151: 1–44.

Weber K., Osborn M. (1969): "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." In: *J Biol Chem.* 244 (16), pp. 4406-4412.

Yoshimune K., Yoshimura T., Nakayama T., Nishino T., Esaki N. (2002): "Hsc62, Hsc56, and GrpE, the third Hsp70 chaperone system of *Escherichia coli*" in: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (5), pp.1389–95.