

A hsp70 hőstressz gén polimorfizmus vizsgálata különböző juh genotípusokban

Nagy Krisztina¹ – Kovács András¹ – Gyimóthy Gergely¹ – Oláh János¹ – Egerszegi István² – Lucky T. Nedambale³ – Shirchingiy Demberel⁴ – Giorgio Antonio Presicce⁵ – Dinnyés András⁶ – Jávor András¹ – Kusza Szilvia¹

¹Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar
Diószegi Sámuel Agrárinnovációs Intézet, Debrecen

²Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet, Herceghalom

³Agricultural Research Council, Animal Production Institute, Germplasm and Reproduction Biotechnologies, Republic of South Africa

⁴Mongolian State University of Agriculture, Ulaanbataar, Mongolia

⁵ARSIAL –Assessorato Agricoltura Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione dell'Agricoltura del Lazio Rome, Roma, Italy

⁶Szent István Egyetem, Molekuláris Állatbiotechnológiai Laboratórium, Gödöllő

knagy@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Napjainkban a klímaváltozás egyre nagyobb hatással van az élőlényekre. A melegedő éghajlat számos problémát vet föl az állattenyésztés területén, melyekkel érdemes foglalkozni. Az élőlények kezdetektől fogva tartalmaznak védekező mechanizmusokat a hőstressz ellen. Vizsgálatunk során olyan különböző juhajtást – Magyarországról és más országokból gyűjtött – mintáit használjuk fel, melyek eltérő éghajlaton élnek. Alapvető feltételezésünk, hogy a más éghajlaton élő egyedek másképpen alkalmazkodnak a környezet változásaihoz, amelyek genetikai szinten is megnyilvánulnak. Ezeket a rögzült mutációkat keressük a Hsp70 hőstressz génben, azonban eddig nem találtuk polimorfizmust. Vizsgálatainkat folytatjuk további fajták és nagyobb egyedszám bevonásával.

Kulcsszavak: mutáció, Hsp70, juh

SUMMARY

Nowadays the climate change has an increasing effect on the animals. The warming climate brings up several problems on the area of the animal husbandry, which ones are really important. From the first time the living beings have defensive mechanisms against the heat shock. In current examination we use – from Hungary and from other countries collected – samples of sheep breeds, which are living on different climate. Our fundamental assumption was, that the animals living on other climate adapted to the changes of the environment and there are differences in their genetic background. These fixed mutations we are looking for in the HSP70 heat shock gene, but we haven't found any polymorphism yet. We are going to involve further breeds and more individuals in the investigations.

Keywords: mutation, Hsp70, sheep

BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A klímaváltozás és az éghajlat szélsőségesse válása számtalan problémát vetnek fel napjainkban az állattartás, és az állattenyésztés területén. A megoldások sürgetőek és bonyolultak, mert a lecsökkent állatállomány, a hatékonysági mutatók kedvezőtlen alakulása az elmúlt évtizedekben olyan negatív tendenciákat indítottak el, melyek kutatása elsődrendű feladattá vált. Az utóbbi évek hőségnapjai és csapadékhiányai megviselték az állatokat. Különösen gondot jelent ez olyan gazdasági haszonállatok – a legelőn, illetve nyitott istállóban tartott juh és szarvasmarha - esetében, melyek életük során közvetlen és napi kapcsolatban állnak a környezeti hatásokkal. A juhok mind bárány, vagy kifejlettkori tartásuk és szállításuk során számos stresszhelyzetnek vannak kitéve.

Az egyik legősibb stressz, amely az élőlényeket érte a hősök volt. A sejtet érő káros hatások után, a sejt azonnal reagál: míg jórészt minden fehérje termelődése leáll, addig a stresszfehérjék szintézise fokozódni fog. A stresszfehérjék számos képviselőjét hősokkfehérjéknek hívják, melynek angol elnevezése „Heat shock protein”, röviden *Hsp* (Ritossa, 1962). Védőfunkcióiknak köszönhetően hősokkfehérjék vagy stresszfehérjék alapvető szerepet töltenek be a sejt túlélésében, nélkülözhetetlenek abban, hogy a hibás szerkezetű fehérjék megtalálják a rájuk jellemző, megfelelő szerkezetet (Kocsis et al., 2003). Ugyanakkor a természetes immunitás elemeként részt vesznek a programozott sejtihal szabályozásában (Morimoto et al., 1994).

A legegyszerűbb hőstresszfehérje az *Escherichia coli*-ban megtalálható DnaK fehérje. A hőstressz fehérjék nagymértékben konzervatív szerkezetűek, ezt bizonyítja, hogy az aminosav szekvenciát tekintve a humán *Hsp70* fehérje 73%-ban megegyezik a *Drosophila Hsp70* fehérje szekvenciájával, valamint 43%-ban azonos az *Escherichia coli* DnaK fehérje szekvenciájával (Hunt és Morimoto, 1985).

A stresszfehérjék legnépesebb és leginkább kutatott családja a 70 KDa molekulatömegű fehérjék, tagjai rendkívül változatos csoportot alkotnak. A *Hsp70* fehérjét kódoló gént választottuk kutatásunk kiindulási alapjául, de a *Hsp70* géncsalád mellett más *Hsp* gént is vizsgálni szeretnénk. A *Hsp70* géncsalád tagjai evolúciósan konzerváltak. A citoplazmában és a sejtmagban kimutatható egy állandóan jelenlévő (*Heat shock*

constitutive) *Hsc70* és egy hőindukált *Hsp70*, ezenkívül ismert a mitokondriumban és az endoplazmás retikulumban előforduló *Hsp70* (Csermely, 2000). A *Hsp70* gének alapállapotban nem expresszálódnak, hőstressz esetén azonban indukálódnak.

A fent említett *Hsc70* gének különböző számú intront tartalmaznak, míg a *Hsp70* gén kevés kivételtől eltekintve nem tartalmaz intront. Ennek köszönhető, a *Hsp70* mRNS gyors szintézise és felhalmozódása a sejtekben (Yost és Lindquist, 1988). Egyedülálló módon találtak intront a *Blastocladella emersonii* egysejtű gombák génállományában, de emlősben és gerincesben kevés esetben találtak intront (Stefani és Gomes, 1995).

Humán vonalon találtak olyan *Hsp70* gént amely intront tartalmaz, de a legtöbb gén intronmentes (Broccieri et al., 2008, Kudla et al., 2004). Emberben a 6-os kromoszómán található *Hsp70* gén lókusza nagyon közel helyezkedik el a Major Histocompatibility Complex-hez (MHC), ezzel is bizonyítva a természetes immunitásban betöltött szerepét. Hasonló *Hsp70* lókuszt találtak patkányban (Wurst et al., 1989) és kecskében is (Cameron et al., 1990).

Haszonállatok közül a sertés és a szarvasmarha *Hsp70* génállománya részletesebben (Camargo et al., 2007; Dezeure et al., 1993; Dworniczak és Mirault, 1987), míg a juh és a kecske *Hsp70* génszakaszai kevésbé vizsgált területek (Gade et al., 2010). Sertés esetében a *Hsp70* gén 90%-ban megegyezik a humán *Hsp70* génnel (Hunt és Morimoto, 1985), és 89%-ban hasonló az egér *Hsp70* génszekvenciájához (Hunt és Calderwood, 1990). A szarvasmarha génállományában több *Hsp70* kódoló szakasz ismert, ezek mind intronmentesek és különböző kromoszómákon helyezkednek el (Adamowicz et al., 2005). Nukleotid szinten a kecske *Hsp70*-1 fehérje kódoló szakasz 96–99%-ban megegyezik a juh *Hsp70* részleges szakaszával, és 95–100%-ban hasonló *Hsp70*-1 fehérje aminosav szekvenciája a szarvasmarha *Hsp70* fehérje szekvenciájával. Vizsgálatainkban a *Hsp70* kódoló szakaszainak rokon fajok közötti nagyarányú hasonlóságát használjuk fel.

Jelenleg nem ismert a különböző juhajták *Hsp70* teljes génállománya, néhány kódoló szakasz struktúráját azonban már igen (Etschmann, Serrano unpublished).

A különböző környezeti feltételekhez való alkalmazkodás során mutációk jöhetnek létre ugyanazon faj egyedeinek adott génszakaszain belül, mely mutáció bekövetkezhet spontán, vagy akár környezeti hatásra, és mi ezeket a mutációkat keressük. A kutatás kiindulási alapja, hogy különböző éghajlati övekről származó juhek mintáit dolgozzuk fel: déli, melegebb (trópusi, szubtrópusi) területek fajtáit hasonlítjuk északi, hűvösebb területekről származó fajtákkal. Vizsgálataink során, az egy bázist érintő nukleotid polimorfizmusokat (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) keressük, a különböző éghajlatról származó juhállományokban, amelyek fajtához, és elterjedéshez köthetően jelennek meg az állatokban.

Munkánk során kiemelt helyet kap a dorper (fekete fejű és fehér) fajta, mely származása miatt jó hőstressz tűrő képességgel rendelkezik. A dorset horn kosok és ott tévesen fekete fejű perzsa anyajuhok keresztezésével állították elő a dorper fajtát Dél-Afrikában. A dorper fajtára jellemző, hogy a hátvonalon nőtt gyapjút levedlik, a testet lesimuló szőr fedi, a bőr minősége kiváló (Jávör et al., 2006).

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatban szereplő állatoktól vér, vagy szőrmintát (szőrhagymával rendelkező tépett szőrmintát) gyűjtöttünk, melyekből izoláltuk a genomiális DNS-t. Vérből való izolálás során Zsolnai és Orbán (1999) módszerét, míg a szőrhagymából való izolálás során a FAO/IAEA (2004) módszerét használtuk.

Minták

Vizsgálataink során a következő fajták álltak a rendelkezésünkre:

Magyarországon gyűjtött mintáink fajtatiszta, vagy keresztezett állományokból származnak. Fajtatiszta állatokból gyűjtött mintáink: szomáli, suffolk, dorper, szapora merinó, barbados blackbelly, fehér és fekete racka, kameruni, cigája, awassi, brit tejelő juh. Keresztezett állományokból gyűjtött mintáink: (cigája x suffolk), (cigája x szapora merinó), (barbados blackbelly x dorper).

Külföldről származó mintáink a következők: assaf Spanyolországból, mongol háziju, namaqua, pedi, zulu, damara és van Roy Dél-Afrikából, sopravissana, gentile di puglia, sarda, comisana és massese Olaszországból, bardhoke és cigája minták több országból (Bulgária, Szerbia, Szlovákia, Albánia).

Primer

Juh és rokon fajok *Hsp70* génszakaszai alapján specifikus primerpárt terveztünk a *Hsp70* gén különböző szakaszainak vizsgálatához a Primer3 programmal. A tervezett primerek (primer4-nek neveztük) szekvenciája a következő:

Forward Primer Szekvencia 5'-3':AGCTGCTGCAGGACTTCTTC-3'

Reverse primer szekvencia 5'-3'5'-CGTTGGTGATGGTGAATCTTG-3'

Az amplifikált DNS fragment hossza: 474 bp.

Ezen primerpárral felszaporított PCR terméket használtuk a szekvenálathoz és az SSCP metodikához is.

PCR

A PCR reakció összetétele 10 µl-es reakcióközegben: 100 µM dNTP, 5Xpuffer, 1,25 µM MgCl₂, 1 pmol/1 pmol primerF/primerR, 0,5 U Go Taq Flexi, és 100 ng genomiális DNS-t adtunk hozzá.

A PCR-kondíciók: 94 °C 4 perc, (94 °C 0:35 perc, 60 °C 0:35 perc, 72 °C 2 perc) 35x ismételve, majd, 72 °C 10 perc, 10 °C ∞.

Az amplifikáció sikerességének ellenőrzését 2%-os agaróz gélen végeztük.

Szekvenáltatás

Az amplifikált szakaszok szekvencia sorrendjének meghatározását az Eurofin (Németország) cég végezte el. A különböző genotípusok szekvenciáit a ClustalW programmal hasonlítottuk össze és kerestük a mutációkat.

PCR-SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)

A 13%-os poliakrilamid gél összetétele Acrylamide/Bis solution, 37,5:1, 10X TBE puffer, dH₂O. Hozzáadva: 10%-os ammónium perszulfát oldat (iniciátor), valamint TEMED-tetrametil-etiléndiamin (katalizátor). A PCR minták előkészítése SSCP-hez: 1 µl PCR termék valamint 10 µl Formamid Dye. A Formamid Dye összetétele: 8% (V/V) festék (bromophenol kék, xylene cyanol) és 92% (V/V) formamid.

Az előkészített mintákat 95 °C-on denaturáljuk 5 percig, majd ezt követően jégen hűtjük, a formamid a komplementer szálak összekapcsolódását akadályozza meg.

Futtatási paraméterek: szobahőmérsékleten (20–21 °C), feszültség: 400 V, futtatás időtartama: 20 h.

EREDMÉNYEK

A genomiális DNS PCR-e

Vizsgálatunk megkezdése során sikeresen végeztük el a genomiális DNS kivonását vérből és szőrhagymából, a hazánkból és a fent említett országokból gyűjtött mintákból.

Az általunk tervezett specifikus Hsp70 primer, a primer4 sikeresen működött, és a PCR után jól értékelhető képet adott (1. ábra).

Eredményeinket 5 mintán keresztül mutatom be: (1) kameruni, (2) pedi, (3) fekete racka, (4) dorper és (5) barbados blackbelly. Mindegyik minta Magyarországról származik, kivéve a pedi, amely dél-afrikai juhajtaja.

1. ábra: DNS 5 különböző juhajtából agaróz gélen

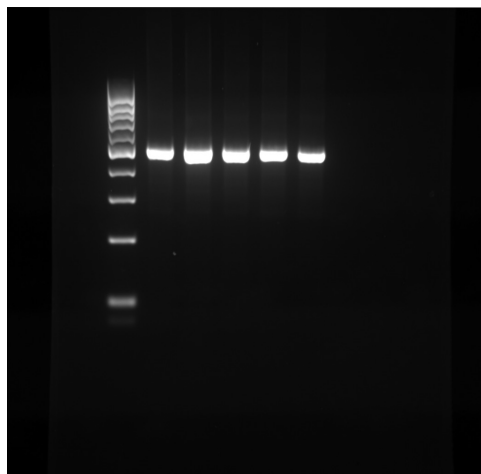


Figure 1: DNA from 5 different sheep breeds in agarose gel

Szekvenáltatás eredménye

A specifikus primerpár (primer4) használatával szekvenáltattunk 138 egyedat, a következő genotípusokból:

Magyarországról gyűjtött mintáinkból: szomáli, suffolk, dorper, szapora merinó, barbados blackbelly, fehér és fekete racka, kameruni, cigája, awassi, brit tejelő juh, (cigája x suffolk), (cigája x szapora merinó), (barbados blackbelly x dorper).

Külföldről származó mintáinkból: assaf, mongol házijuh, namaqua, pedi, zulu, damara és van rooi, sopravissana, gentile di puglia, sarda, comisana és massese, pramenka, bardhoke illetve cigája minták több országból.

Bár a primer4 jól működött, és a szekvenáltatás során *Hsp70* fehérje kódoló génszakaszt kaptunk, azonban mutációt eddig nem találtunk, de vizsgálatainkat tovább folytatjuk a további primerek és újabb juh genotípusok bevonásával.

A képen (2. ábra): (1) kameruni, (2) pedi, (3) fekete racka, (4) dorper és (5) barbados blackbelly fajták DNS szekvencia részlete látható, melyek egymással teljesen megegyeznek.

2. ábra: DNS szekvencia részlet 5 különböző juhajtából

kameruni_PRIMER4	CCTTCGACATCGACGCCAATGGCATCCTGAACGTCA CGGCCACGGACAAGAGCACGGGCA	359
dorper_PRIMER4	CCTTCGACATCGACGCCAATGGCATCCTGAACGTCA CGGCCACGGACAAGAGCACGGGCA	360
BBB_PRIMER4	CCTTCGACATCGACGCCAATGGCATCCTGAACGTCA CGGCCACGGACAAGAGCACGGGCA	358
pedi_PRIMER4	CCTTCGACATCGACGCCAATGGCATCCTGAACGTCA CGGCCACGGACAAGAGCACGGGCA	359
racka_PRIMER4	CCTTCGACATCGACGCCAATGGCATCCTGAACGTCA CGGCCACGGACAAGAGCACGGGCA	247

Figure 2: DNA sequence details from 5 different sheep breeds

A PCR-SSCP eredménye

A PCR-SSCP módszer tesztelési szakaszban jár, de jól értékelhető mintázatot kaptunk. A 3. ábra mutatja be az 5 minta (1) kameruni, (2) pedi, (3) fekete racka, (4) dorper és a (5) barbados blackbelly mintázatát.

3. ábra: Az 5 juhajta poliakrilamid gélképe

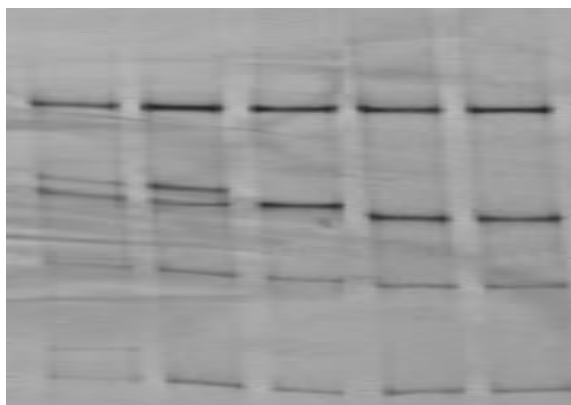


Figure 3: 5 samples from different sheep breeds in polyacrylamide gel

KÖVETKEZTETÉSEK

A klímaváltozás és a globális felmelegedés miatt aktuális a téma a gazdasági haszonállatok körében is. Fontos ismerni az állatok hőtűrő képességét mind a tenyésztés, mind a kereskedelem szempontjából.

Eddigi vizsgálatunk során a sikeresen működő fajspecifikus primer párt használva mutációt eddig nem sikerült azonosítanunk, de vizsgálatainkat tovább folytatjuk. Célunk, hogy új mutációt azonosítsunk a különböző juhgenotípusok *Hsp70* hőstressz génjében, mely összefüggésben van a hőtűrő képességükkel.

Az állatokat ért hőstressz az állattenyésztés minden területét kedvezőtlenül befolyásolhatja: csökkenti az egyedek termelési mutatóit, nagyfokú állatelhullást von maga után, rontja a szántóföldi takarmányok és gyepek hozamait. Az éghajlatváltozás miatt szükségessé válik az épületek, tartástechnológiák, valamint a takarmányozás nagyarányú modernizálása a ráfordítás-hozam arányok javítása érdekében. A felmerülő problémák megoldására a tartási és takarmányozási körülmények változtatásának lehetőségein túl a molekuláris genetikai kutatások nyújtanak segítséget, a gazdaságosabb állattartás megvalósítása érdekében.

IRODALOM

- Adamowicz, T.–Pers, E.–Lechniak, D. (2005): A new SNP in the 3'-UTR of the shp70-1 gene in *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Biochemical Genetics*. 43: 11–12.
- Brocchieri, L.–de Macario, E. C.–Macario, J. L. (2008): *Hsp70* genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evolutionary Biology*. 8: 19.

- Camargo, L. S. A.–Viana, J. H. M.–Ramos, A. A.–Serapiao R. V.–de Sa, W. F.–Ferreira, A. M.–Guimaraes-do Vale Filho, V. R. (2007): Developmental competence and expression of the Hsp70,1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. *Theriogenology*. 68. 49: 626–632.
- Cameron, P. U.–Tabarias, H. A.–Pulendran, B.–Robinson, W.–Dawkins, R.L. (1990): Conservation of the central MHC genome: PFGE mapping and RFLP analysis of complement, HSP70, and TNF genes in the goat. *Immunogenetics*. 31: 253–264.
- Csermely P. (2000): *Stresszfehérjék*. Vince Kiadó. Budapest.
- Dezeure, F.–Vaiman, M.–Chardon, P. (1993): Characterization of a polymorphic heat shock protein 70 gene in swine outside the SLA major histocompatibility complex. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1174. 1: 17–26.
- Dworniczak, B.–Mirault, M. E. (1987): Structure and expression of a human gene coding for a 71 kd heat shock 'cognate' protein. *Nucleic Acids Res.* 15: 5181–5197.
- Etschmann: Differential expression of transport proteins during rumen epithelium adaption. Unpublished.
- FAO/IAEA (2004): Agriculture Biotechnology Laboratory. Handbook of Laboratory Exercises. IAEA Laboratories. Seibersdorf. Austria.
- Gade, N.–Mahapatra, R. K.–Sonawane, A.–Singh, V. K.–Doreswamy, R.–Saini, M. (2010): Molecular Characterization of Heat Shock Protein 70-1 Gene of Goat (*Capra hircus*) SAGE-Hindawi Access to Research Molecular Biology A. ID. 108429. 7.
- Hunt, C.–Morimoto, R. I. (1985): Conserved features of eucaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 6455–6459.
- Hunt, C.–Calderwood, S. (1990): Characterization and sequence of a mouse hsp70 gene and its expression in mouse cell lines. *Gene*. 87: 199–204.
- Jávor A.–Kukovics S.–Molnár Gy. (2006): *Juhtenyésztés A-tól Z-ig*. Mezőgazda Kiadó. Budapest.
- Kocsis J.–Füst Gy.–Prohászka Z. (2003): A 70 kDa-os hőszokkfehérje molekuláris biológiája és egyes immunológiai folyamatokban játszott szerepe. *Magy. Immunol./Hun. Immunol.* 2. 2: 5–15.
- Kudla, G.–Helwak, A.–Lipinski, L. (2004): Gene concersion and GC-content evolution in mammalian Hsp70. *Molecular Biology and Evolution*. 21. 7: 1438–1444.
- Morimoto, R. I.–Tissieres, A.–Georgopoulos, C. (1994): *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ritossa F. (1962): A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*. 18: 571–573.
- Serrano: Analisis of apoptosis-related genes in central nervous system of scrapie-infected sheep. Unpublished.
- Stefani R. M.–Gomes S. L. (1995): A unique intron-containing hsp70 gene induced by heat shock and during sporulation in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Gene*. 152. 1: 19–26.
- Wurst, W.–Benesch, C.–Drabent, B.–Rothermel, E.–Benecke, B.J.–Günther, P. (1989): Localization of heat shock protein 70 genes inside the rat major histocompatibility complex close to class III genes. *Immunogenetics*. 30: 46–49.
- Yost, H. J.–Lindquist, S. (1988): Translation of unspliced transcripts after heat shock. *Science*. 242. 4885: 1544–1548.
- Zsolnai, A.–Orbán, L. (1999): Accelerated separation of random complex DNA patterns in gels: comparing the performance of discontinuous and continuous buffers. *Electrophoresis*. 20: 1462–1468.