

Holstein-fríz tehenek hosszú hasznos élet-tartamának vizsgálata proteomikai módszerekkel

Gulyás Gabriella¹ – Béri Béla¹ – Jávor András¹ – Márk László² - Csósz Éva³ – Pohóczky Krisztina¹ – Soltész Beáta¹ – Kuti Dániel¹ – Czeglédi Levente¹

¹Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Debrecen

²Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

³Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen
gulyas@agr.unideb.hu

Using MALDI TOF/TOF and nanoLC-IonTrap MS, we have found eleven protein sequences those were expressed only in the samples of good longevity group.

Keywords: longevity, Holstein-Friesian, proteomics, 2D-PAGE

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során proteomikai módszerek segítségével olyan marker fehérjéket kerestünk, melyek összefüggésbe hozhatóak a tehenek hosszú hasznos élettartamával. A vizsgálatokba bevont holstein-fríz egyedeket teljesítményük alapján 3 csoportba soroltuk, az egyikbe a hosszú hasznos élettartamú tehenek kerültek, a másik két csoportba a kontroll állatok, melyeket a szaporodásbiológiai okok miatt, illetve alacsony termelési színvonal miatt selejtezésre ítélt egyedekből választottunk. Egy vizsgálati csoport 12 tehénből állt, melyektől vérést tejmintákat gyűjtöttünk. A vérplazma mintákat kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis módszerrel (2D PAGE) vizsgáltuk, míg a MALDI TOF/TOF és nanoLC-MS/MS metodikákkal a vérplazma és a tej mintákat egyaránt. A 2D PAGE eljárás során a hosszú hasznos élettartamú teheneknél átlagosan 143 egyedi fehérjepontot tudunk elkülöníteni. A nehezen vemhesülő kontroll csoportnál 139, az alacsony termelési színvonalú kontroll csoportnál 136 fehérjepontot különítettünk el. Találtunk olyan fehérjéket, melyek expressziójának mértéke eltér a három vizsgálati csoportban, illetve olyanokat is, melyek csak a hosszú hasznos élettartamú állatoknál jelentek meg, azonban ezek a különbségek nem bizonyultak szignifikánsnak. A MALDI TOF/TOF és nanoLC-MS/MS vizsgálatok során 11 olyan szekvenciát detektáltunk, melyek expressziója a hosszú hasznos élettartamú egyedekben szignifikánsan emelkedett.

Kulcsszavak: hosszú hasznos élettartam, holstein-fríz, proteomika, 2D-PAGE

SUMMARY

The aim of the present study was to determine marker proteins those are associated with functional longevity of dairy cattle. Holstein-Friesian cows were grouped based on their performance as follows: group 1) individuals with good longevity traits; group 2) short production life because of poor reproduction traits; group 3) short production life with low milk yield. Twelve individuals were sampled in each group, blood and milk samples were collected from cows. Blood samples were analysed with two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D PAGE), MALDI TOF/TOF and nanoLC-MS/MS. The milk samples were analysed with MALDI TOF/TOF and nanoLC-MS/MS. Using the optimized gel based proteomic approach, we have successfully separated 143 proteins in the group1, 139 proteins in the group2 and 136 proteins in the group3, but we could not find significant differences between groups in the expression pattern.

BEVEZETÉS

A tejtermelő állományokban a két ellés között eltelt idő manapság már meghaladja a 440 napot, a hasznos élettartam pedig a kényszerű szelekció miatt nem éri el a három évet (jelenleg 2, 3 laktáció) (Berta, 2010). Ez nagyon kis teljesítmény, ha figyelembe vesszük, hogy a szarvasmarha biológiailag lehetséges élettartama 30–35 év. A rövid termelésben maradás következményeként a tejelő szarvasmarha tenyésztésben megnövekedett a funkcionális tulajdonságok, mint a fitnesz tulajdonságok és az élettartam szerepe (Vacek et al., 2006). Különösen fontosak ezek az iparszerű termelési viszonyok között, amikor a természetszerűtlen tartás miatt a kedvezőtlen külső hatásokkal fokozottan kell számolni, így a hasznos élettartamot nagymértékben meghatározza a technológiai tűrőképesség is. Erre a képességre a küllemből, azon belül is a lábszerkezetből következtethetünk (Grünhaupt, 1994). Az ellenálló képességre, a konstitúcióra előre lehet következtetni a szervezeti szilárdságból (Püski et al., 2010). A kiváló konstitúciót bizonyítja a hosszú hasznos élettartam, illetve a nagy élettartamú egyedek (Béri és Szőnyi, 1999). A hosszú hasznos élettartam lényegesen csökkenti a laktációnkénti állománypótlás költségét és lehetővé teszi, hogy a tehén a termelésben a maximumot nyújtsa, amikor elérte a kifejlett korát. Ezen kívül a megfelelő egészségi állapot és fertilitás mellett a hosszú ideig való tenyésztésben maradás csökkenti a kezelési költségeket és a kényszerű selejtezést (Berta és Béri, 2006). A gazdaságos tejtermelés megkövetelné az egyed minél hosszabb termelésben tartását, ezáltal a minél nagyobb élettartamot (Dohy, 1983).

A hosszú hasznos élettartam molekuláris biológiai vizsgálatára eddig leginkább genetikai módszereket alkalmaztak. Számos SNP-t (pontmutációt) detektáltak már, és ezek hatását is vizsgálták (Komisarek, 2010; Samoré et al., 2010; Komisarek és Dorynek, 2009; Szyda et al., 2011), míg más szerzők QTL analíziseket végeztek (Moreno et al., 2005; Diao et al., 2004; Johannes, 2007). Új megközelítést jelenthet a proteomikai módszerek bevonása, melyek segítségével olyan marker fehérjéket kereshetünk, melyek expressziós változásai összefüggésbe hozhatók a tehenek hosszú hasznos élettartamával.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Állatok és kezelés

A vizsgálatokba bevont holstein-fríz teheneket teljesítményük alapján 3 csoportba soroltuk, az egyikbe a hosszú hasznos élettartamú tehenek kerültek (legalább 5 lezárt laktációval rendelkező, életteljesítmény $\geq 80\,000$ l tej), a másik két csoportba a kontroll állatok, melyeket a szaporodásbiológiai okok miatt selejtezésre ítélt (első laktációs), illetve, kis laktációs tejhozam miatt selejtezésre ítélt (második laktációs) egyedekből választottunk. Egy vizsgálati csoport 12 egyedet jelentett. Az állatok 2 különböző telepről származtak, ennek nagy jelentősége van abban az esetben, ha mindkét telephelyről származó állatcsoportnál találunk szignifikáns expresszióbeli különbséget a kísérleti és a kontroll csoportok között, akkor a telep befolyásoló hatását kizárhatjuk.

Mintagyűjtés

A vérmintákat a nyaki vénából vettük EDTA véralvadást gátló tartalmú vércsőbe. Közvetlenül a levétel után, centrifugálással szeparáltuk a plazmát, majd azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük. A proteázok aktivitását az EDTA mellett proteoblock proteáz inhibitor mix (Fermentas) hozzáadásával gátoltuk. A vérplazma mintákat 2D PAGE, MALDI TOF/TOF és nanoLC-MS/MS módszerekkel vizsgáltuk.

A tejmintákat steril csövekbe gyűjtöttük, azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük, a további tárolás $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on történt. A tejmintákat MALDI TOF/TOF és nanoLC-MS/MS módszerekkel elemeztük.

Mintatisztítás

A plazma fehérjéinek 95%-át két nagygyakoriságú fehérje teszi ki: 60% albumin, 35% globulinok. Ezek a nagy arányban előforduló fehérjék a géleképeken elfedhetik a számunkra nagyobb jelentőséggel bíró kisebb gyakoriságú proteineket, ezért a vérplazma mintáknál mindig nagy kihívást jelent, hogy csökkentjük ezeknek a fehérjéknek a gyakoriságát. ProteoMiner Kit-et (BioRad) használtuk a plazma minták komplexitásának csökkentésére. A kit alapja egy nagy diverzitású kombinatorikus peptid ligand könyvtár, mely gyöngyökhöz van kikötve és az elválasztás a fehérjék specifikus peptid ligand kötődésén alapszik. Ezt követően a mintáinkat 2-D Cleanup Kittel (BioRad) tisztítottuk, mivel a vérplazmában lévő sók, ionok, lipidek zavarják az izoelektromos fókuszálást. A Cleanup Kit-ből nyert precipitátumot mintapufferben vettük fel, melynek összetétele: 8M urea, 2% CHAPS, 50mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte.

A tejszír MFG (milk fat globule) frakciójának vizsgálata bizonyos esetekben helyettesítheti az invazív tögybiopsziát, ami – az állatvédelmi szempontok mellett – kiemelten előnyös nagy egyedi értékű állatoknál. A tejszír a tögy epithel sejtjeiből szekretálódik cseppek formájában, melyek elsősorban trigliceridekből állnak. Ezeket a cseppeket az epithel sejtek apikális membránja veszi körül. A membrán lipid kettősrétege segíti a zsírcseppek stabilizálását a vizes közegben. A fehérjék a tejszírcseppet körülvevő membránburok fehérjéit

és a zsírcseppben lévő citoplazma fehérjét jelentik, vagyis a tejszír kiválasztó sejt plazma és membrán proteomját.

Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D PAGE)

Az előzetes tesztelesek során az izoelektromos fókuszálást a pH 3–10-es tartományban végeztük, megállapítottuk, hogy a tisztított vérplazma minták fehérjéinek hatékony elválasztásához a pH 5–8-as régió kedvezőbb, ezért a későbbiekben ilyen pH tartományú strippekkel dolgoztunk. A vérplazma mintákból 100 μg -ot vittünk fel a 17 cm-es pH 5–8-as IPG stripekre. A paszszív rehidratálás a mintákkal együtt történt 16 órán keresztül, szobahőmérsékleten. A rehidratáló puffer összetétele: 8M urea, 2% CHAPS, 50mM DTT, 0,2%, 0,002% Bromphenol Blue, ampholyte 4/6 (40%) és 6/8-as (40%) 1:2 arányban.

Az első dimenzióánál többlépéses fókuszálást használtunk: 1. lépés: 250 V 20 perc Linear Ramp, 2. lépés: 10 000 V 2,5 óra Linear Ramp, 3. lépés: 10 000 V 40 000 Vh Rapid Ramp, $20\text{ }^\circ\text{C}$ -on $50\mu\text{A}$ /strip, összesen 50 000 Vh. A fókuszált stripeket az SDS-PAGE előtt equilibráltuk. 10 percig inkubáltuk az equilibráló I. oldatban (6M urea, 2% SDS, 0,05M Tris/HCl pH 8,8, 20% glicerol, 2% DTT), majd 10 percig az equilibráló II. oldatban (6M urea, 2% SDS, 0,05M Tris/HCl pH 8,8, 20% glicerol, 2,5% jodoacetamid).

Második dimenzióban a gélek futtatása BioRad Protean Plus Dodeca cell rendszerben történt, így egyszerre 12 gélt tudunk kezelni, ezzel próbáltuk elkerülni a nem egy időben történő futtatásokból eredő eltéréseket a gélen. A poliakrilamid gélek 12%-os koncentrációjúak voltak. Futtató pufferként 1X Tris-Glicin-SDS oldatot használtunk.

A poliakrilamid géleken lévő fehérje foltok láthatóvá tételére ezüstfestést (Shevchenko et al., 1996) és fluoreszcens festést (Sypro Ruby Protein Stain, Lonza) használtunk. Mindkét festék esetében a fehérje detektálás alsó határa 1 ng. Az ezüstfestés lépései: 1. fixálás: 50% metanol, 5% ecetsav; 2. mosás: 50% metanol; 3. érzékenyítés: 1,27 mM nátrium tiosulfát pentahidrát; 5. festés: 0,15% ezüst nitrát; 7. előhívás: 0,04% formaldehid, 2% nátrium karbonát; 8. leállítás: 5% ecetsav. Sypro Ruby festés lépései: a géleket először egy prefixáló oldatba helyeztük, melynek összetétele: 50% metanol, 10% ecetsav, dH_2O , 12 órán keresztül fixálódtak a gélek, folyamatos rázás mellett. Ezt követte maga a festő oldat: Sypro Ruby Protein Gel Stain (Lonza), melyben 24 órán keresztül festődtek a gélek. Végül 30 percre a postfixáló oldatba kerültek: 10% metanol, 7% ecetsav, dH_2O .

A gélek elemzését a Delta2D software segítségével végeztük. A futtatásokat az optimalizálás után háromszoros technikai ismétlésben végeztük.

MALDI TOF/TOF és nanoLC-IonTrap tömegspektrometria

MALDI TOF/TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization tandem time of flight mass spectrometry)

A minták 1–1 μL -ét Bruker rozsdamentes acél mintatartó tálcára (MTP 384 ground steel plate) csep-

pentették. A vizsgálatok során mátrixként 10 mg/mL-es koncentrációjú CHCA acetonitril – 0,1% TFA (50:50, v/v) oldatát alkalmaztunk. A minták beszárítása után az elemzéseket Bruker Autoflex II típusú mátrix segítette lézersedzorpációs ionizációs technikát alkalmazó tandem repülési idő analizátoros (MALDI TOF/TOF) tömegspektrométerrel, reflektor, illetve nagyobb tömegeknél linear detektálási módban. Az ionizáláshoz 337 nm-es nitrogén lézert alkalmaztunk, a vizsgálatok során 500 lézerimpulzus tömegspektrumát összesítettük, a lézer frekvenciája 50 Hz volt. A tömegspektrumokat pozitív ionizációs módban m/z 500 és 4000, illetve 5000–30 000 tartományban regisztráltuk a gyorsító feszültség 20 kV, a késleltetési idő 120 ns volt.

nanoLC-MS/MS (nano Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry)

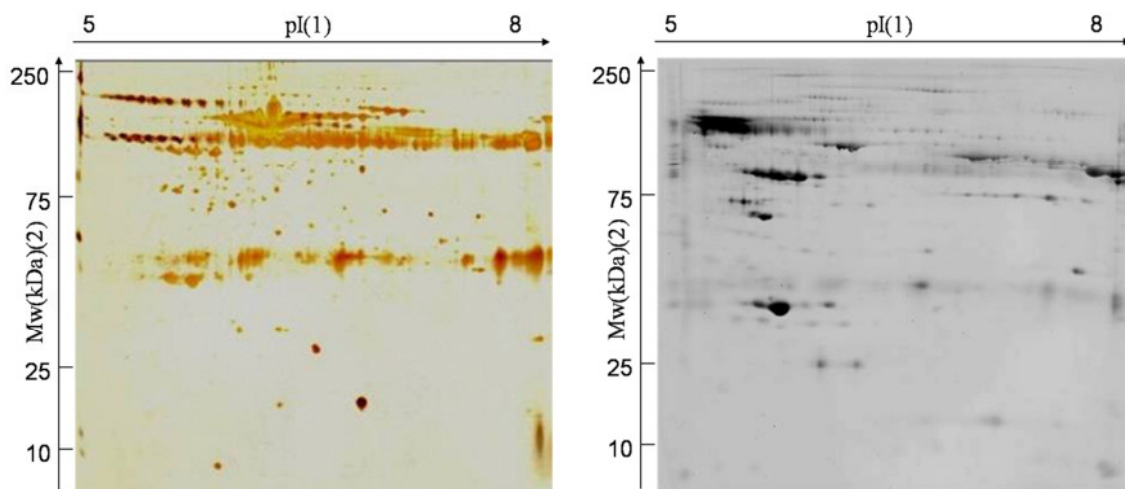
Az LC-MS vizsgálatokat egy Waters nanoAcquity, illetve Agilent 1100 folyadékkromatográfval kapcsolt Bruker Esquire ionscspadás tömegspektrométerrel végeztük. A kromatográfiás rendszer áramlási sebessége 600 nL/min volt, az alkalmazott eluens rendszer 5% acetonitril – víz (0,05% hangyasav), illetve 95% acetonitril – víz (0,05% hangyasav) tartalmazott. Az elválasztás gradiens profilja a következő volt: 20 perc alatt

40% B, 10 perc alatt 100% B, majd mosási és egyensúlyi fázisok következtek. Szállító gázforrásként nitrogént használtunk 6 L/min áramlási sebességgel. Az ionforrás hőmérséklete 200 °C, míg a kapilláris feszültség 1,8 kV volt. A spektrumok m/z 200–1200 tartományban regisztráltuk pozitív ionizációs módban.

EREDMÉNYEK

A kétdimenziós gélelektroforézist megelőző miniatúristításnál a ProteoMiner Kit segítségével sikeresen csökkentettük a vérplazma mintákban nagy gyakorisággal előforduló albumin és globulin mennyiségét (1. ábra). A géleképek elemzése során a hosszú hasznos élettartamú teheneknél átlagosan 143 egyedi fehérjepontot tudtunk elkülöníteni. Az 1-es kontroll csoportnál (szaporodásbiológiai okok miatt selejtezésre ítélt) 139-et, a 2-es kontroll csoportnál (alacsony laktációs tejhozam) 136 fehérjepontot különítettünk el. Találtunk olyan fehérjéket, melyek expressziójának mértéke eltér a három vizsgálati csoportban, illetve olyanokat is, melyek csak a hosszú hasznos élettartamú állatoknál jelentek meg, azonban a csoportokon belül (még az azonos telephelyről származó állatok esetében is) is igen nagy volt a szórás és a különbségek nem voltak szignifikánsnak.

1. ábra: Vérplazma, Cleanup Kit (bal oldali gélekép), ProteoMiner Kit (jobb oldali gélekép)



Mw: molekula tömeg, pI: izoelektromos pont

Figure 1: Blood plasma, Cleanup Kit (left side), ProteoMiner Kit (right side)
Isoelectric point(1) Molecular weight(2)

A tömegspektrometrián alapuló vizsgálatok során találtunk olyan peptidket/triptikus fragmenteket, melyek expressziója szignifikáns különbséget mutatott az adott a csoportok között. A fő eltérések a protein profil vizsgálatoknál a m/z 8000–10 000 közötti tartományban találtuk. A hosszú hasznos élettartamú egyedekben megfigyelhető egy m/z 9450-as csúcs (2. ábra), amely a legerősebb különbséget adta. Az kijelenthető, hogy a m/z 9450-nél jelentkező polipeptid egy olyan biomarker, amely a hosszú hasznos élettartamú állatokra jellemző és a többi csoportban nem volt detektálható sem MALDI sem LC-MS vizsgálatokkal.

A szaporodásbiológiai selejt csoport, vagyis a nehezen vemhesülőknél találtunk egy polipeptidet (m/z 9142), amely erre a csoportra jellemző. Számunkra ez is ugyanolyan jelentőséggel bír, mint a hosszú hasznos élettartamú teheneknél tapasztalt expressziós emelkedés, olyan értelmezésben, hogy ez a gén a célcsoportnál elcsendesült (3. ábra).

A kis tejhozamú teheneknél m/z 8755 körül van egy intenzív unikális csúcs, amit a hosszú hasznos állatoknál nem mértünk (4. ábra).

2. ábra: Hosszú hasznos élettartamú csoport tömegspektruma (m/z 8000–10 000 tartományban)

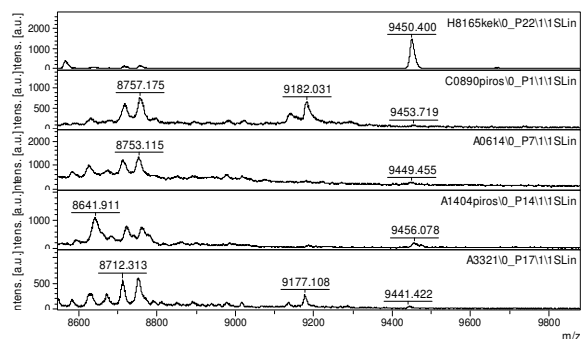


Figure 2: Mass spectra of group with good longevity traits (m/z 8000–10 000)

3. ábra: Szaporodásbiológiai selejt csoport tömegspektruma (m/z 8000–10 000 tartományban)

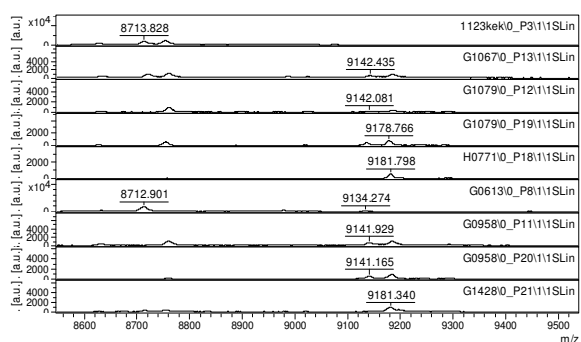


Figure 3: Mass spectra of group with poor reproduction traits (m/z 8000–10 000)

4. ábra: Kis tejhozamú csoport tömegspektruma (m/z 8000–10 000 tartományban)

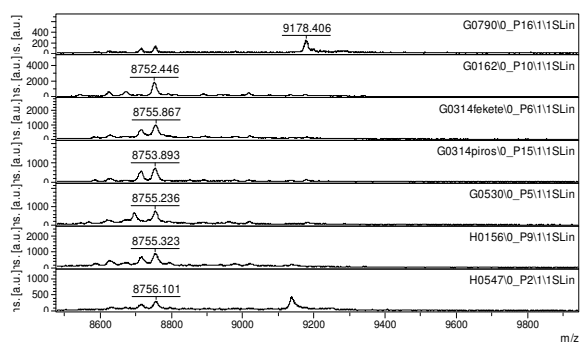


Figure 4: Mass spectra of group with low milk yield (m/z 8000–10 000)

A tömegspektrometriás méréseken alapuló vizsgálatok során 11 olyan fehérjét azonosítottunk, melyek expressziója a hosszú hasznos élettartamú egyedekben szignifikánsan megnövekedett. Ezeket a sejtekben betöltött funkciójuk szerint három csoportba sorolhatjuk: nyolc fehérje a mitokondriumokban végbemenő terminális oxidációban és a citromsav ciklusban játszik fontos szerepet, két protein transzkripció szabályozó faktor, egy pedig a T-sejtek fejlődésében és aktiválásában vesz részt.

KÖVETKEZTETÉSEK

A kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis technika segítségével a vérplazma mintákban számos egyedi fehérjét tudunk elkülöníteni, megoldva a nagy gyakoriságú fehérjék problémáját is. A nem gél alapú mérések eredményeként leszögezhetjük, hogy a további vizsgálatokat érdemes fókuszálni a 10 000 Da alatti fehérje tartományra. Elsősorban a tejminták szolgáltatnak statisztikai szempontból értékelhető eredményeket, mivel a vérminták esetében a biológiai variabilitásból adódó szórás nagyobb volt. A bizonyítottan megnövekedett expressziós szintet mutató fehérjék sejtekben betöltött szerepe összefüggésbe hozható a hosszú hasznos élettartammal. A mitokondriumok mátrixa tartalmazza a citromsavciklus fehérjéit, míg a belső membránban a légzési lánc enzimeit találjuk. Mindkét anyagcsere-út vonal a szénhidrát-lebontás és az ATP-termelés folyamatában játszik szerepet, fehérjéinek expressziós szintbeli változása hatással van a sejt energiatermelésére. A második csoportban szereplő fehérjék transzkripció aktivátorokként szolgálnak, DNS kötő domének formájában. A harmadik csoportba tartozó protein a T-sejtekben expresszálódik, melyek a sejt immunválaszért felelősek, segíti ezen sejtek érését és aktiválását. A fehérje megnövekedett expressziós szintje jelezheti a hosszú hasznos élettartamú állatok erősebb immunstátuszát.

Eredményeink alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy a kísérlet során használt proteomikai megközelítés alkalmas ilyen összetett tulajdonságok vizsgálatára.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A publikáció elkészítését a TÁMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 és a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 számú projektek támogatták. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

IRODALOM

Béri B.–Szönyi V. (1999): A küllem szerepe a tejhasznosítású állományok termelésében. Tiszántúli Mezőgazdasági Tudományos Napok. Debrecen. 137–145.
Berta A.–Béri B. (2006): Tejhasznosítású tehén küllemének szerepe a hasznos élettartamban. Agrártudományi Közlemények. Különszám. 21.

Berta A. (2010): A hasznos élettartam növelésének tenyésztési lehetőségei tejelő szarvasmarha állományokban. Debreceni Egyetem. Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola. Doktori értekezés.

Diao, G.–Lin, D.Y.–Zou, F (2004): Mapping quantitative trait loci with censored observations. Genetics. 168: 1689–1698.

- Dohy J. (1983): A szelekció hatékonyságának növelése új tejelő szarvasmarha típusok kialakításában. MTA doktori értekezés. Budapest.
- Grünhaupt J. (1994): A jó küllem növeli az élettartamot. *Holstein Magazin*. Budapest. 2. 2: 37–39.
- Johannes, F. (2007): Mapping Temporally Varying Quantitative Trait Loci in Timeto-Failure Experiments. *Genetics*. 175: 855–865.
- Komisarek, J.–Dorynek, Z. (2009): Effect of ABCG2, PPARGC1A, OLR1 and SCD1 gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. *J. Appl. Genet.* 50. 2: 125–132.
- Komisarek J. (2010): Impact of LEP and LEPR gene polymorphisms on functional traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports*. 28: 133–141.
- Moreno, C.R.–Elsen, J.M.–Le Roy, P.–Ducrocq, V. (2005): Interval mapping methods for detecting QTL affecting survival and time-to-event phenotypes. *Genetics Research*. 85: 139–149.
- Püski J.–Bozó S.–Tran Anh, T. (2000): A hosszabb élettartam a nagyobb ételteljesítmény, a tejtermelés hatékonysága és a típus összefüggései holstein-fríz teheneknél. *Holstein Magazin*. Budapest. 8. 2: 73–75.
- Samoré, A.B.–Rossoni, A.–Rizzi, R.–Bagnato, A. (2010): Genetic parameters for functional longevity, type traits, somatic cell scores, milk flow and production in the Italian Brown Swiss. *Italian Journal of Animal Science*. 9: 28.
- Shevchenko, A.–Wilm, M.–Vorm, O.–Mann, M. (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*. 68. 5: 850–858.
- Szyda, J.–Morek-Kopeć, M.–Komisarek, J.–Żarnecki, A. (2011): Evaluating markers in selected genes for association with functional longevity of dairy cattle. *BMC Genetics*. 12: 30.
- Vacek, M.–Štipkova, M.–Němcova, E.–Bouška, J. (2006): Relationships between conformation traits and longevity of Holstein cows in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*. 51. 8: 327–333.

