

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 19

Issue 1

Gödöllő
2023

SERTÉS FIBROBLASZT ALAPÚ GÉNBANK

*Urbán Martin^{1,2}, Ivan Carl Dela Rosa^{1,2}, Ecker András^{1,2}, Benedek Zsuzsanna³,
Nagy Szabolcs Tamás³, Bodó Szilárd³, Gócza Elen^{1,2}*

¹MATE, Genetika és Biotechnológia Intézet, 2100, Gödöllő, Szent-Györgyi Albert út 4.

²Agrár-biotechnológia és precíziós nemesítés az élelmiszerbiztonságért nemzeti laboratórium
2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert utca 4.

³MATE, Állattenyésztési Tudományok Intézet,
8360 Keszthely, Deák Ferenc u. 16.
Urban.Martin@uni-mate.hu

Received – Érkezett: 20.11.2022.

Accepted – Elfogadva: 03.04.2023.

Összefoglalás

Manapság egyre nagyobb kihívást jelent a genetikai diverzitás megőrzése. Az afrikai sertéspestis (ASP) súlyosan tizedeli Európa vaddisznó és házisertés állományait. A hazai őshonos és a köztenyésztésből egyre inkább kiszoruló hagyományos magyar fajták kifejezetten veszélyeztetettek egy ilyen járvánnyal szemben, alacsonyabb egyedszámuk miatt.

Választásunk ezen fajták közül a magyar nagyfehér sertésfajtán belül egy archaikusabb típust képviselő core populáció egyedeire esett. Kísérleteink során a keszthelyi magyar nagyfehér törzstenyészet 25 kocájától származó fülcsipkét dolgoztunk fel. A fülcsipkékből létrehozott mintákat Knockout DMEMw/F-12 alapú médiumban tenyésztettük, és 37,5 °C-on, 5% CO₂ tartalom mellett inkubáltuk 15 napon keresztül. A tenyésztés végén, a sejtenyészeteket mélyhűtöttük egyedi vonalkóddal ellátott fagyasztó csövekben. A lefagyasztott sejteket -150°C fokon tároljuk a mintákból származó DNS és RNS mintákkal együtt.

Mind mélyhűtés előtt, mind mélyhűtés után elvégeztük a sejtenyészetek életképesség vizsgálatát Arthur fluoreszcens sejt számoló géppel. Átlagosan 97%-os életképes sejtet kaptunk. Ezek mellett megkezdtük a minták immunfestéssel való vizsgálatát is. Sikeresen ki tudtuk mutatni a titin és actin jelenlétét a mintákban.

A kutatócsoportunk által alkalmazott protokollok lehetőséget nyújtanak a sertés fibroblaszt tenyészetek egyszerűbb izolálására és tenyésztésére. Emellett más távlati lehetőséget is megnyithatnak, mint például az iPS tenyészetek létrehozását, amik a sertés anatómiai sajátosságai miatt alapjául szolgálhatnak majd orvosi kutatásokban alkalmazható modell rendszerek létrehozására.

Kulcsszavak: génbank; sertés fibroblaszt; sejtenyésztés

Fibroblast based gene banking in pig

Abstract

Today genetic conservation programs are an essential task for preserving genetic variability. The African swine fever is decimating the European wild boar and domestic pig population, posing a growing threat to native species. These animals have lower population numbers than the species used by the meat industry, so a pandemic like this poses a more significant threat.

One of these pig species is “*Keszthelyi Large White*”. This is a unique breed to Keszthely University, and the current pandemic endangers it. We isolated adult porcine fibroblast from ear tissue samples from 25 sows. The tissue samples were cultured in an adult fibroblast medium containing Knockout F12 DMEM. The fibroblasts were cultured in a CO₂ incubator at 37.5⁰ Celsius and 5% CO₂. After 15 days of culture, the cultures were gathered in cryotubes with individual barcodes. The samples were stored at -150⁰C. We collected DNA and RNA samples from the cultures for later analyses. We also tested viability before and after freezing on cultures with Arthur Fluorescent Cell Counting Machine. Viability in cell cultures was, on average, 97%. We took samples from the cell cultures and immunostained the samples detecting titin and actin.

The protocol developed by our group may pave the way for the proper isolation and culture of porcine fibroblasts to use it for further research. iPSCs from pigs can be used in various approaches. Since the pig’s anatomical system is being studied with relation to human medicine for organ replacement and other medical purpose.

Keywords: gene banking; porcine fibroblast, cell culturing

Bevezetés

Manapság a génmegőrzés egyre jelentősebb kérdéssé válik a növekvő gazdasági igények és a járványos betegségek hatására. Az afrikai sertéspestis hatására jelentős elhullást figyelhetünk meg mind a vaddisznó, mind a házi sertés állományokban. Ez a betegség még inkább veszélyezteti az őshonos fajtákat, ami alacsony létszámuk miatt, akár a fajta teljes eltűnését is okozhatja. Génmegőrzési programunk alapjául pontosan ezért esett választásunk a keszthelyi nagy fehér fajta törzs állományára. Ez a sertés fajta egy archaikusabb típusa a magyar nagyfehér fajtának. A fajta robusztusabb testfelépítéssel és jó lábszerkezettel és szervezeti szilárdsággal rendelkezik, aminek hatására nagyobb technológiai tűréssel bír. A fajta hazai körülmények között alakult ki, így az itthoni körülményeket jól viseli a kisüzemi és háztáji tartásban is. Ami a génmegőrzési projekt sürgős megindítását indokolta, hogy a fajta koca állománya 45 tenyész kocát számlál. Kísérletünk célja a fajta fibroblaszt alapú génmegőrzése, az ehhez szükséges módszerek tökéletesítése és a sejttenyészetek karakterizálása.

Fibroblaszt

A fibroblasztok orsó alakú, ovális nukleusszal rendelkező, lapos sejtek. Mezenchimális eredetűek és a rostos kötőszöveti állomány fontos elemei (Komuro 1990). Ezeket a sejteket könnyedén izolálhatjuk, a test bármely kötőszövettel rendelkező részéből. Ezek a sejtek fontos szerepet játszanak megfelelő szervek közötti szerkezet kialakulásában és a sebgyógyulásban.

A fibroblasztokra jellemző továbbá, hogy különböző szervek mellett speciális alakzatokat vesznek fel, és ezeket a struktúrákat izolálás után is megőrzik (S. Van Linthout és mtsai 2014). Az izolálásra szánt szövet darabokat, általában valamilyen emésztési folyamatnak vetik alá, aminek

célja, a sejtek közötti kapcsolat fellazítása. Az, hogy milyen enzimeket alkalmazunk az emésztés során az befolyásolja, hogy a tenyészet alapítására szánt minták, milyen korú állatból és annak mely részéből származnak a szövetminták. Az állat kora alapján megkülönböztetjük az embrionális és az adult sejtenyészeteket. Az embrionális sejtenyészetek alapításánál, általában felhasználjuk az embrió teljes testét. Azonban ügyelnünk kell arra, hogy először az agyat és a belső szerveket, alaposan eltávolítsuk, ugyanis az ezekből visszamaradó sejtek által termelt faktorok elősegítik a fibroblaszt sejtek differenciálódását (Freshney 1994). Az adult fibroblasztok, az embrionális fejlődésen átesett állatokból származnak, azok tényleges korától függetlenül. Ezeket általában fülből, vagy a farokból izoláljuk, ugyanis ezekben található a könnyebben feltárható fibroblaszt állomány és itt a legkisebb az esély, hogy például zsírsejtek szennyezzék tenyészetünket. Felnőtt állatok esetében különös figyelmet kell fordítanunk a fertőzések megakadályozására, hiszen az itt felhasznált szövetek általában szennyeződhetnek, mind az alommal, esetlegesen fekáliával, továbbá megnő bakteriális vagy gombás fertőzések esélye. Éppen ezért a felnőtt tenyészet alapításánál ezeket a szöveteket általában anti-biotikumos és anti-mikotikus kezeléseknek is alá kell vetni (1. ábra).

1.ábra: Sertés fibroblaszt izolálás fülcsipkéből

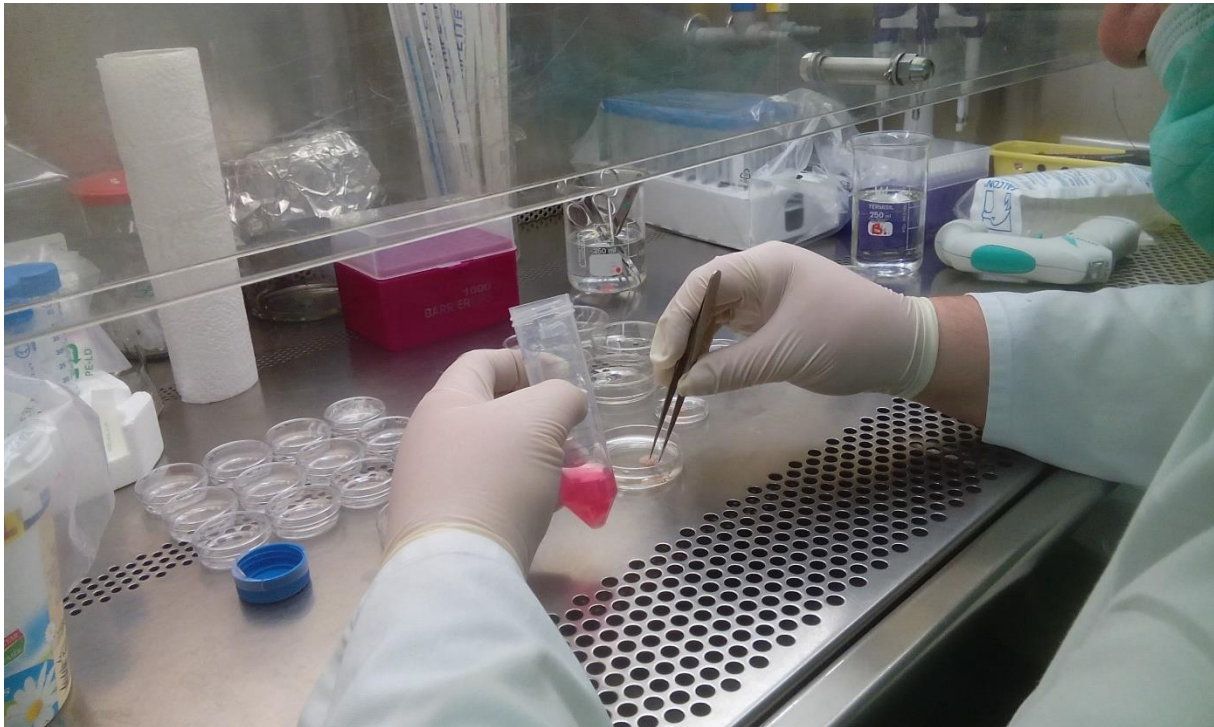


Figure 1: Porcine fibroblast isolation from ear tissue

A fibroblaszt tenyészeteket többféleképpen is felhasználhatjuk a biotechnológia keretein belül. Segítségükkel létrehozhatunk szomatikus, avagy testi sejtes klónokat (C.Kubota és mtsai, 2000). Ezzel a módszerrel kihalás szélére sodródott fajokat menthetünk meg a módszer engedélyezése esetén. Azonban a módszer hátránya, hogy a rendelkezésre álló genetikai állományt korlátozza a rendelkezésre álló sejtvonalak száma. Segítségükkel létrehozhatunk iPS sejtenyészeteket, amik gyógyászati vagy kísérleti modellek létrehozását teszik lehetővé, továbbá

hosszú generációs idejű állatoknál megkönnyítik a transzgenézis folyamatát (*W. Ruan és munkatársai 2011*).

Anyag és módszer

Fibroblaszt izolálás

Kísérletek során a kocák jelölése során keletkezett fülcsepkeket használtuk fel. A szövetmintákat Knockout DMEM w/F12 alapú (GIBCO), 2,5% anti-biotikum és anti-mikotikum (GIBCO), 20% FBS (GIBCO), 1% nukleozid (GIBCO), 1% Glutamax (GIBCO), és 1% nem esszenciális aminosav (GIBCO) összetételű szállító médiumban 4 °C-on tároltuk felhasználásig. A mintákat az izolálás előtt először 70%-os etil-alkoholban mostuk 10 másodpercen keresztül, majd háromszor 2 percig steril 2,5%-os anti-biotikum-anti-mikotikum tartalmú steril DPBS-ben (GIBCO). A következő lépésben a mintákat tovább mostuk háromszor 2 percig steril DPBS-ben (GIBCO), majd eltávolítottuk a bőr felső rétegét steril eszközök segítségével. A szöveteket ezután 1mm-es darabokra vágtuk, majd II.-es típusú kollagenáz (GIBCO) és diszpáz (GIBCO) 1:1 arányú keverékében emésztettük 45 percen keresztül 37,5 °C-on Thermomixer készülékben, 350 rpm rázási sebesség mellett. Az emésztést ezután Knockout DMEM w/F12 alapú 1% penicillin-streptomycin (GIBCO), 20% FBS (GIBCO), 1% nukleozid (GIBCO), 1% Glutamax (GIBCO), és 1% nem esszenciális aminosav (GIBCO) tartalmazó adult fibroblaszt médium 1:1 arányú hozzáadásával állítottuk le. A szövet darabokat tartalmazó szuszpenziót 70 µm-es sejtszűrőn átszűrtük, majd lecentrifugáltuk. A sejt pelletet újra szuszpendáltuk 1 ml adult fibroblaszt médiumban és kihelyeztük T25-ös tenyésztőflaskára. A tenyészeteket 5% CO₂ tartalom mellett 37,5 °C-on tartottunk fenn.

Passzálás

Az osztódó fibroblaszt tenyészeteket bizonyos időközönként, általában két naponta, átpasszáljuk, ami eljárás során áthelyezzük a sejteket egy új tenyésztőflaskába, mely friss médiumot tartalmaz.

Az eljáráshoz szükséges médiumokat 4°C-on tároljuk, használat előtt 37°C-ra kell melegíteni vízfürdőben. Az így előkészített oldatokat tartalmazó csöveket 70%-os etil-alkohollal fertőtlenítjük, mielőtt bekészítenénk a steril fülkébe. A fibroblaszt tenyészetekről, Pasteur-pipetta segítségével eltávolítjuk a médiumot, majd 2 ml steril DPBS-sel (GIBCO) átmoszuk a tenyészeteket, majd eltávolítjuk a sejtekről. A tenyésztő flaska méretétől függően, a T25-ös flaskába 1ml, a T75-ös flaskában 2 ml 0,25%-os tripszin-EDTA (GIBCO) segítségével emésztjük a sejteket 10 percen keresztül 37,5 °C-on. Az idő letelte után a tripszines emésztést 1:2 arányú adult fibroblaszt tenyésztő médium hozzáadásával leállítjuk, majd alapos szuszpendálás után, pipettor segítségével legyűjtjük a sejtsuszpenziót 15 ml-es centrifuga csőbe. A sejtsuszpenziót 7 percen keresztül, 1200 és 1400 rpm között centrifugáljuk 4°C-on. A centrifugálás befejezése után Pasteur-pipetta segítségével eltávolítjuk a felülúszó fázist a sejtekről ügyelve a pellet épségére, majd felsuszpendáljuk a sejteket 1 ml adult fibroblaszt médiumban. Ezek után a tenyésztő flaska méretétől függően, kihelyezünk 5,5ml, vagy 6,5 ml adult fibroblaszt médiumot. Az előkészített tenyésztő flaska kihelyezzük az 1 ml sejtsuszpenziót, majd visszahelyezzük tovább tenyésztésre azokat a termosztátba.

Viabilitás mérés és immunfestés

A tenyészetek életképességének vizsgálatához Arthur fluoreszcens sejtszámoló gép „Viabliq test” beállításán vizsgáltuk meg. A sejtuszpenziókat propídium-jodid (Dojindo) festék hozzáadása után 15 percig inkubáltuk. A 15 perc letelte után steril DPBS (GIBCO) hozzáadásával állítottuk le a reakciót és 20 µl sejtuszpenziót mértünk a tárgylemezekre, majd a fenn említett beállításon vizsgáltuk meg a sejteket.

Az immunfestéshez a sejteket 12 well-es platerre helyeztük ki, amiknek az aljára 0,1%-os zselatinnal (GIBCO) kezelt fedőlemezt helyeztünk. A zselatin réteg a fibroblaszt sejtek megtapadását segíti elő. A sejteket adult fibroblaszt médiumban tenyésztettük 2 napon keresztül, majd 4%-os PFA-val fixáltuk a sejteket az immunfestéshez. Az immunfestés során, sikeresen ki tudtuk mutatni az actin és a titin jelenlétét, amik jellemzően a fibroblaszt tenyészetekben megjelenő korai izomsejtek markerei.

Eredmények és értékelés

Kísérletünk során 25 kocából vettünk szövetmintát, és izoláltunk fibroblasztokat. Ebből 21 sejtvonalat sikerült létrehozni és mélyhűteni. Megkezdjük a sejtvonalak karakterizálásához szükséges munkák keretén belül a viabilitási méréseket és az immunfestési vizsgálatokat.

A vizsgált tenyészetek életképessége átlagosan 97%, ami azt bizonyítja, hogy az általunk alkalmazott médium alkalmas a tenyészetek fenntartására. Az immunfestés során a vizsgált fehérjéket sikeresen ki tudtuk mutatni a mintákban (2. ábra).

1. ábra Actin és Titin jelenléte fibroblaszt sejtekben

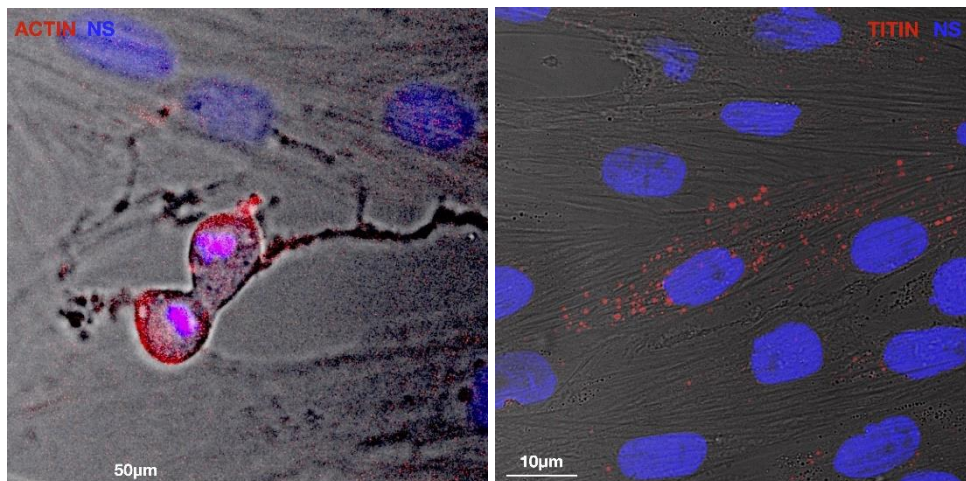


Figure2: Actin and Titin in fibroblast cells

Következtetések és javaslatok

A jövőben folytatjuk a mintavételezést a sertés állományból. Továbbá szükségesnek érezzük a tenyésztő médium optimalizálását, hogy gyorsítsuk a sejtek osztódását. Mindezek mellett tervezzük egy adatbázis létrehozását, amivel a génbakban tárolt mintákat tudnánk könnyedén nyilvántartani. Távlati terveink között szerepel iPS tenyészetek létrehozása, melyek alkalmasak lehetnek betegség és szervmodellek létrehozására.

Köszönetnyilvánítás

A kutatás az RRF-2.3.1-21-2022-00007 és a TKP2020-NKA-24 támogatásával valósulhatott meg.

Irodalomjegyzék

- Kubota, C., Yamakuchi, H., Todoroki, J., Mizoshita, K., Tabara, N., Barber, M., Xiangzhong, Y.* (2000): Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97. 990–995. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.3.990>
- Komuro, T.* (1990): Re-evaluation of fibroblasts and fibroblast-like cells. *Anat. Embryol. (Berl)*. 182. 103–112.
- Van Linthout, S., Miteva, K., Tschöpe, C.* (2014): Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovasc. Res.*, 102. 258–269.
- Ruan, W.M., Han, J.Y., Li, P., Cao, S., An, Y., Lim, B., Li, N.* (2011): A novel strategy to derive iPS cells from porcine fibroblasts. *Sci. China Life Sci.*, 54. 553–559. <https://doi.org/10.1007/s11427-011-4179-5>