



2001-2002

תקופת המחקר:

356-0340-02

קוד מחקר:

Subject: THE USE OF A UNIQUE ASSAY FOR DETECTION, CHARACTERIZATION, AND PURIFICATION OF BIOLOGICAL ACTIVE LEPTIN.

Principal investigator: EINAT MIRIAM

Cooperative investigator: YUVAL ESHDAT, PLAVNIK ISAAC, YAHAV SHLOMO, Robinstein Menachem

Institute: Agricultural Research Organization (A.R.O.)

שם המחקר: שימוש במערכת יחודית למעקב, אפיון ובידוד הורמון השובע לפטין בעופות

חוקר ראשי: מרים עינת

חוקרים שותפים: יובל אשד, יצחק פלבניק, שלמה יהב, מנחם רובינשטיין

מוסד: מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן 50250

תקציר

הצגת הבעיה: הבקרה על מאזן האנרגיה בעופות המסחריים היא בעלת חשיבות ממשקית בשלוחות רבות. בשלוחת ההטלה הכבדה שמאופיינת בירידה מתמדת בהישיג ההטלה והפוריות עם התקדמות טיפוח הפטמים, הבעיה בוערת ביותר. מציאת דרך להקטין את האכילה וההשמנה בשלוחה זו ודרכים להגביר את ההשמנה בשלוחת ההודים והאוזים יהווה פריצת דרך בעלת חשיבות ממשקית גדולה.

מהלך העבודה, שיטות העבודה ותוצאות עיקריות: בשנה הראשונה התמקדנו בלפטין עצמו, פיתחנו מערכת ביולוגית לקביעת לפטין בעופות ויצרנו את הקולטן בשתי דרכים כדי לנקות בעזרתו לפטין של עופות. בעזרת מערכות אלה עקבנו אחר אופן ביטוי הלפטין והקולטן ללפטין והגענו למסקנה שהעופות הכבדים אינם פגועים בלפטין או בקולטן ללפטין אלא בתגובה ללפטין. באותה תקופה נמצאו ראיות לכך שאחד החומרים שהפרשתם במוח עולה כתגובה לסיגנל של הלפטין, α -MSH, מפעיל חלק גדול מהמנגנונים שמופעלים על ידי הלפטין גם במקרים שבהם יורדת התגובה ללפטין כתוצאה מהשמנה. בעקבות ממצאים אלה התמקדנו בשנה השנייה של המחקר בהזרקה של אנלוג סינטטי (MT-II) של הפפטיד α -MSH ומצאנו השפעה דרמטית של הטיפול על אכילה בשני הזנים העיקריים של העופות המסחריים (הקלים והכבדים).

מסקנות והשלכות לעתיד: במהלך המחקר הצלחנו לאתר טיפול שמשפיע באופן דרמטי על אכילה בעופות. השאלה החשובה שנותרה היא האם לטיפול זה תהיה השפעה חיובית על הטלה. את זאת אנו מתכוונים לבדוק בעיקר במטילות כבדות שבהן בעיית יעילות ההטלה ומשך ההטלה היא החריפה ביותר. כדי לענות על שאלה זו יהיה צורך בטיפולים ממשוכים ובכוונתנו להשתמש לשם כך בשיטת של "שחרור איטי".

רשימת פרסומים

א. מאמרים

Friedman-Einat, M., Kaluta, V. and Rosal, M. (2002). The genetic control on obesity in poultry. *Meshek Ha'ofot* (in Hebrew, reviewed) May-Jun: 23-26.

Marikovsky, M., Rosenblum, C., Faltin, Z. and Friedman-Einat, M. (2002). Appearance of leptin in wound fluid as a response to injury. *Wound Rep. Reg.* 10: 302-307.

Friedman-Einat, M., Camoin, L., Faltin, Z., Rosenblum, C.I., Kaliouta, V., Eshdat, Y. and Strosberg, A.D. (2002). Serum leptin activity in obese and lean Patients. *Reg. Pept.* 111: 77 – 82.

דוח לתכנית מחקר מספר 356-0340-02

דוח סופי לסיכום שתי שנות מחקר

פיתוח מערכת ייחודית למעקב, אפיון ובידוד הורמון השובע לפטין בעופות

Development of a unique biological assay for monitoring and isolating chicken leptin; and its application to poultry agriculture

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות - ביוטכנולוגיה

ע"י

מרים פרידמן-עינת חקר בעלי חיים, מנהל המחקר החקלאי, רחובות

יובל אשדט מטעים, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

מנחם רובינשטיין גנטיקה מולקולרית, מכון ויצמן למדע

Miriam Friedman-Einat, Animal Science, ARO, Volcani center, P.O.B. 6 Bet-Dagan 50-250, e-mail: cinat@agri.huji.ac.il

Yuval Eshdat, Horticulture, ARO, Volcani center, P.O.B. 6 Bet-Dagan 50-250, e-mail: vayuvai@volcani.agri.gov.il

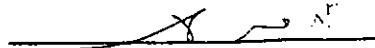
Menachem Rubinstein, Molecular genetics, the Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, e-mail: menachem.rubinstein@weizmann.ac.il

מרץ 2003

אדר תשס"ב

הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים

חתימת החוקר



תקציר

הצגת הבעיה: הבקרה על מאזן האנרגיה בעופות המסחריים היא בעלת חשיבות ממשקית בשלוחות רבות. בשלוחת ההטלה הכבדה שמאופיינת בירידה מתמדת בהישגי ההטלה והפוריות עם התקדמות טיפוח הפטמים, הבעיה בוערת ביותר. מציאת דרך להקטין את האכילה וההשמנה בשלוחה זו ודרכים להגביר את ההשמנה בשלוחת ההודים והאוזים יהווה פריצת דרך בעלת חשיבות ממשקית גדולה.

מהלך העבודה, שיטות העבודה ותוצאות עיקריות: בשנה הראשונה התמקדנו בלפטין עצמו, פיתחנו מערכת ביולוגית לקביעת לפטין בעופות ויצרנו את הקולטן בשתי דרכים כדי לנקות בעזרתו לפטין של עופות. בעזרת מערכות אלה עקבנו אחר אופן ביטוי הלפטין והקולטן ללפטין והגענו למסקנה שהעופות הכבדים אינם פגועים בלפטין או בקולטן ללפטין אלא בתגובה ללפטין. באותה תקופה נמצאו ראיות לכך שאחד החומרים שהפרשתם במוח עולה כתגובה לסיגנל של הלפטין, α -MSH, מפעיל חלק גדול מהמנגנונים שמופעלים על ידי הלפטין גם במקרים שבהם יורדת התגובה ללפטין כתוצאה מהשמנה. בעקבות ממצאים אלה התמקדנו בשנה השנייה של המחקר בהזרקה של אנלוג סינטטי (MT-II) של הפפטיד α -MSH ומצאנו השפעה דרמטית של הטיפול על אכילה בשני הזנים העיקריים של העופות המסחריים (הקלים והכבדים).

מסקנות והשלכות לעתיד: במהלך המחקר הצלחנו לאתר טיפול שמשפיע באופן דרמטי על אכילה בעופות. השאלה החשובה שנותרה היא האם לטיפול זה תהיה השפעה חיובית על הטלה. את זאת אנו מתכוונים לבדוק בעיקר במטילות כבדות שבהן בעיית יעילות ההטלה ומשך ההטלה היא החריפה ביותר. כדי לענות על שאלה זו יהיה צורך בטיפולים ממשוכים ובכוונתנו להשתמש לשם כך בשיטת של "שחרור איטי".

רשימת פרסומים

א. מאמרים

- Friedman-Einat, M., Kaluta, V. and Rosal, M. (2002). The genetic control on obesity in poultry. *Meshek Ha'ofot* (in Hebrew, reviewed) May-Jun: 23-26.
- Marikovsky, M., Rosenblum, C., Faltin, Z. and Friedman-Einat, M. (2002). Appearance of leptin in wound fluid as a response to injury. *Wound Rep. Reg.* 10: 302-307.
- Friedman-Einat, M., Camoin, L., Faltin, Z., Rosenblum, C.I., Kaliouta, V., Eshdat, Y. and Strosberg, A.D. (2002). Serum leptin activity in obese and lean Patients. *Reg. Pept.* 111: 77 – 82.

ב. כינוסים

- Friedman-Einat, M., Horev, G., Faltin, Z., Rosenblum, C.I. and Eshdat, Y. (2001). Conservation of the leptin-mediated control mechanism in avian. *Keystone Symposia: Obesity and the regulation of energy homeostasis*. Taos, New Mexico.
- Friedman-Einat, M., Camoin, L., Faltin, Z., Rosenblum, C.I., Eshdat, Y. and Strosberg, A.D. (2002). Biological activity of leptin in obese and lean patient. *Keystone Symposia: Molecular control of adipogenesis and obesity*. Keystone, Colorado.

Friedman-Einat, M. (2002). Possible involvement of leptin in poultry reproduction. The 39th Annual Convention of the World Poultry Science Association - Israel Branch. Ashkelon,

Friedman-Einat, M., Kaliouta, V., Ruzal, M. and Eitan, Y. (2002). Daily injection of MT-II to lean and obese strains of chicken. 5th International melanocortin meeting. Sunvier, Oregon.

Friedman-Einat, M., Kaliouta, V., Horev, G., Rubinshtein, M., Mrikovesky, M., and Eshdat, Y. (2002). Study of the leptin mediated control mechanism in chickens. The Annual Meeting of the Israel Endocrine Society. Tel-Aviv, Israel.

מבוא

המחקר עוסק במערכת הבקרה של מאזן האנרגיה בעופות. בין המרכיבים החשובים של מאזן האנרגיה נכללים צריכת המזון, צבירת שומן, ופוריות. פריצת דרך חשובה בהבנת מנגנון בקרה מורכב זה ביונקים הווה גלוי הלפטין בשנת 1994 (Zhang et al.). גלוי זה נוצל כמנוף חשוב להבנת התהליכים ברמה המולקולרית ולגלוי מספר רב של גנים נוספים שמעורבים בבקרה על מאזן האנרגיה. במעבדתנו היינו הראשונים שהצלחנו לשבט את הקולטן ללפטין בעופות ולהביא עדויות ראשוניות לקיום המנגנון שמופעל על ידי הלפטין גם בעופות. גנים אחרים שקשורים למערכת בקרה זו כמו אגוניסטים לקולטן למלנוקורטין (MC4-R) וניורופפטיד-Y (NPY) גם כן נמצאו בעלי דמיון בין עופות ליונקים הן במבנה הגנים והן בפעילות הביולוגית (Barbin et al., 1984; Takeuchi, et al., 1999).

במחקר הרפואי למציאת תרופה כנגד השמנה בבני אדם, אחרי האכזבה מהאפשרות שלפטין יהווה את תרופת הפלא, נמצאים בראש רשימת תרופות העתיד שני חומרים: α -MSH ו CNTF. שתי תרופות אלה נמצאות בשלבים מתקדמים ביותר של פיתוח והתוצאות מניסויים קליניים ומניסויים שנעשים במוסדות המחקר האקדמיים בחיות מודל, נראות מבטיחות. הומולוגים לשני חומרים אלה זוהו גם בעופות אך מבין שניהם רק ה α -MSH שהו פפטיד המורכב מ 13 חומצות אמינו, זהה ב 100% ברצף להומולוגים ביונקים. הגן המקודד לפפטיד זה (POMC), יחד עם פפטידים נוספים והגנים המקודדים לקולטנים להורמון זה, אותרו ואפיונו בעופות (Tachibana et al., 1998; Takeuchi et al., 1999). מעניין לציין שקולטנים אלה אותרו לפני שאותרו הפפטידים שמפעיל אותם וזאת משום שמוטציה בעכברים שבה משתחרר חומר שחוסם את אותם קולטנים גורם להשמנה מסיבית (Fong et al., 1997).

אופן הביטוי של הגן POMC של עופות ושל הגנים המקודדים לקולטנים ל α -MSH, מראה דמיון לזה שאופיין ביונקים אך לא דמיון מוחלט. הבדלים אלה יחד עם העובדה שאתר הייצור הטבעי של α -MSH הוא האונה המרכזית של ההיפופיזה המנוונת בעופות, העלו את הסברה שגם ההשפעה של α -MSH בעופות תהיה שונה מזו שנמצאה ביונקים. עדויות ראשוניות שהתקבלו מהזרקה של α -MSH וחומר סינטטי שמחקה את פעילותו (MT-II) למות של אפרוחים

בני יום הראו הבדלים בתגובה בין זני העופות הכבדים והקלים (Tachibana et al., 2001). ממצאים שלנו שנעשו באפרוחים בוגרים יותר (שבועיים וארבעה חודשים) ובצורת הזרקה שונה (הזרקה לווריד ולא למוח); הראו תגובה דרמטית לטיפול בשני הזנים ובשני הגילים. הדמיון ליונקים היה גם בטווח הריכוזים המעוררים את התגובה וגם בתגובה עצמה.

פירוט הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו

1. ייצור הקולטן המסיס ללפטין של עופות

את הקולטן המסיס יצרנו לשתי מטרות:

א. נטרול פעילות הלפטין בהזרקה לעופות לשם אפיון פעילות הלפטין בחיה השלמה.

ב. קישור של לפטין מסרום של עופות לשם ניקוי החלבון ושיבוט הגן.

בהשוואה לבידוד חלבונים מהונדסים מתאים אנימלים, ביטוי חלבונים בחיידקים יעיל יותר. ניתן להגיע בחיידקים לכמויות גדולות בכמה סדרי גודל, ובהשקעה יחסית קטנה. מאידך, בהפקת חלבונים מחיידקים קיים החשש שמודיפיקציות הנדרשות לפעילות החלבון (כמו גליקוזילציות) לא יתבצעו בחיידקים והקולטן שנקבל לא יהיה במבנה הנכון ולא יקשור את הלפטין. בספרות כל הניסויים שבהם הראו קישור בין לפטין לקולטן נעשו בתאים אנימליים אך לאחרונה הצליח פרופ' אריה גרטלר מהפקולטה לחקלאות להראות שהקולטן המסיס ללפטין ההומני שהופק בחיידקים קושר ללפטין הומני. לכן החלטנו לפעול בשני הכוונים.

1.1. בניית הקונסטקט לביטוי הקולטן המסיס ללפטין בתאים אנימלים

כדי להגביר את הסיכוי שהקולטן המסיס יהיה פעיל, הסתמכנו על הקולטן המסיס הנטיבי שנמצא ביונקים (Fei et al., 1997). קולטן זה מכיל רק את האזור החוץ תאי של המולקולה, ולא את האתר שמעגן את הקולטן לממברנת התא. בניסויים שנעשו עם קולטן מסיס ללפטין ההומני נמצא שקולטן כזה קושר ללפטין ומעקב את פעילותו (Liu et al., 1997). יצרנו תחלים שמתאימים לתחילת הרצף המקודד (ATG), וכן לקצה אקסון 16,

Forward: 5'-gctctagccATGTATCATCAAATCATTCTGACC-3'

Reveres: 5'ctgggtaccTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCACATCTTGCTGGAACGA
CACAAG-3'

בתחל שפועל מכון 3' (Reverse) הוספנו רצף שמקודד לשישה היסטידינים (His-tag), אותיות אלכסוניות) ואחריו קודון של הפסקת חסינתזה (באותיות בולטות). באותיות קטנות מצוינים הרצפים שמאפשרים את חיתוך תוצרי ה-PCR באנזימי רסטריקציה ושיבוט בוקטורים. המטרה בהוספת רצף ההיסטידינים נובעת מכך שרצף כזה בקצה החלבון קושר מתכות כמו ניקל וקובלט ומאפשר את ניקוי החלבון ע"י ספיחה לקולונות. בעזרת תחלים אלה שכפלנו את רצף ה-cDNA וקבלנו פרגמנט בגודל הצפוי (1540 בסיסים) ריצוף הפרגמנט הווה את האישור הנחוץ לזיהויו. שיבטנו פרגמנט זה בתוך וקטור שמכיל את כל הרצפים הדרושים לביטוי הגן והחדרנו אותו לתאי HEK 293 בעזרת ליפוזומים (GIBCO-BRL). לטרנספקציה השתמשנו בקונסטרוקט של הקולטן המסיס יחד עם קונסטרוקט שמקודד לגן סלקציה שמקנה עמידות לאנטיביוטיקה פורומיצין (pgkPuro). אחרי כשבועיים הופיעו קלונים של תאים עמידים לאנטיביוטיקה. תאים אלה בודדו וגודלו, אספנו מדיום גידול. במדיום זה אופיינה פעילות של עיקוב פעילות הלפטין במערכת הביולוגית. במקביל ביטאנו את הלפטין בתאי 293-T בשיטה של Transient transfection. בשיטה זו ניתן לאסוף פחות מדיום גידול אך ביטוי החלבון שמוחדר לתאים יעיל יותר.

2.1. אנליזה של נוכחות הקולטן המסיס במדיום הגידול של תאי HEK-293 מוטמרים בעזרת

המערכת הביולוגית

אחת הדרכים שבהן בדקנו את הפרשת הקולטן המסיס למדיום הגידול היה שימוש במדיום זה לעיקוב הלפטין במערכת הביולוגית. מערכת זו שתוארה בפרוט רב בהצעת המחקר, כוללת תאים בתרבית (תאי כליה של עובר אדם HEK-293) שאליהם החדרנו את הגן לקולטן ללפטין של עופות וגן מדווח שנותן אור פלורסצנטי בתגובה להפעלת הקולטן ללפטין או רצפטורים לציטוקינים אחרים. מכיוון שתאים אלה מבטאים מעט מאוד קולטנים לציטוקינים המערכת פועלת באופן ספציפי ביותר כמדד לנוכחות הלפטין כפי שהדגמנו בתוצאות המקדימות בהצעת המחקר ובמערכת מקבילה שבה החדרנו את הקולטן של לפטין של אדם לאודם תאים (ראה מאמרים שפורסמו בתקופת הדו"ח). קולטנים לאינטרפרון (IFN) שמבוטאים בתאים אלה במידה מוגבלת משמשים לנו כביקורת לביטוי הגן המדווח.

במהלך השנה בודדנו קלונים חדשים של תאי HEK-293 שאליהם החדרנו קונסטרוקט משופר של הגן לקולטן ללפטין. בכך הצלחנו לשפר את הרגישות אך עדיין אין בידנו לפטין של עופות מנוקה שיאפשר את כימות התגובה. התגובה של התאים ללפטין נמדדת על פי מידת העלייה של הסיגנל שנותן הגן המדווח בעקבות אינקובציה של 8 שעות במדיום גידול עם 10% מחסרום הנבדק. את הערך שמתקבל במכשיר שקורא אור פלואורסצנטי באורך הגל המתאים (לומינומטר), מחלקים לערך שמתקבל בתאי ביקורת שמכילים את הגנים לקולטן ללפטין ולגן המדווח אך מודגרים במדיום ללא תוספת של סרום של עופות. חלוקת הערך שמתקבל באקסטרוקט של התאים המטופלים בערך במתקבל בתאי הביקורת מהווה מדד לאינדוקציה של הגן המדווח בעקבות האינקובציה. ערך זה מוגדר כמכפלת האינדוקציה (fold-induction).

כפי שמתואר בטבלה 1 אספנו מדיום גידול (conditioned medium) של תאים שעברו טרנספקציה עם הקולטן המסיס בטרנספקציה קבועה (stable transfection) ובטרנספקציה זמנית (transient transfection). ההדגרה של 8 שעות של סרום של עופות עם תאי HEK-293 שעברו טרנספקציה נעשתה גם במדיום גידול טרי וגם בנוכחות כל אחד מה- conditioned medium. ה- conditioned medium הביא לורידה באקטיבציה של התאים על ידי סרום של עופות. כצפוי, נראה שהקולטן המסיס מופרש בכמות גדולות יותר בתאי הטרנספקציה הזמנית.

כדי לכמת טוב יותר ובמידת אמינות גבוהה יותר את החלבון המופרש עברנו לשיטה של Western-Blotting (איור 1). השתמשנו בנוגדנים ל-His-tag (Novagen) שמזהים את החלבון המופרש תודות לרצף של 6 היסטטידינים שאותו החדרנו לחלבון הרקומביננטי. באיור 1 ניתן לראות שרק בתאים שעברו טרנספקציה עם הגן לקולטן המסיס (TC) נראה סיגנל בגודל הצפוי בעקבות ההיברידיזציה עם הנוגדנים. סיגנל זה לא מופיע בתאי הביקורת (CC).

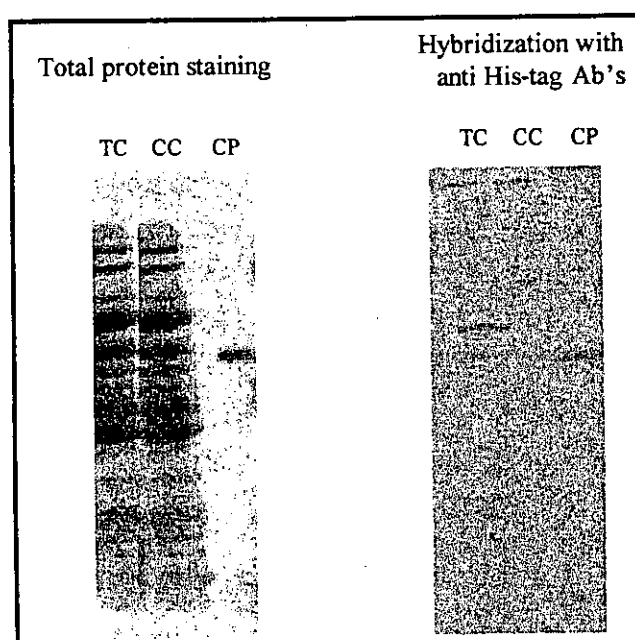
בתאים שעברו טרנספקציה (TC, איור 1) נראה בנד עיקרי בגודל הצפוי ושני בנדים קטנים וחלשים. יש להניח ששני הבנדים החלשים הם תוצרי פרוק של הקולטן, משום שאינם מופיעים בתאי הביקורת (CC). חלבון הביקורת (PC) שאותו קבלנו מהמעבדה של יורס אייל (המכון למטעים, מינהל המחקר החקלאי) הוא חלבון מנוקה שהופק בחיידקים וגם אליו הוצמד His-tag. חלבון זה זוהה על ידי הנוגדנים אך ניתן לראות בברור שרגישות הנוגדנים בתנאים שבהם עבדנו הייתה נמוכה ביותר מאחר שהסיגנל חלש מאוד לעומת הצפוי מכמות חלבון הגדולה שהוטענה על הגל (כ- 100ng). בתנאים אלה לא הצלחנו בשלב זה לאתר את הקולטן המסיס במדיום הגידול.

טבלה 1: עיקוב הפעלת הגן המדווח בתאי HEK-29 על ידי מדיום גידול מתאים שאליהם הוחדר הקולטן המסיס (conditioned medium).

Treatment	Luciferase activity - fold induction	
	Control cells with reporter gene	Cells with both CLEPR and reporter genes
Control medium	1.5 ± 0.9	1.0 ± 1.3
Conditioned medium (TT)	2.0 ± 1.0	1.0 ± 1.5
Chicken serum (10%)	1.6 ± 1.0	12.0 ± 3.0
Chicken serum plus conditioned medium (ST)	2.0 ± 1.5	6.0 ± 2.0
Chicken serum plus conditioned medium (TT)	2.2 ± 1.6	3.4 ± 1.0

ST – תאים שאליהם הוחדר הגן לקולטן המסיס בטרנספקציה קבועה
 TT – תאים שאליהם הוחדר הגן לקולטן המסיס בטרנספקציה זמנית.
 כל דוגמא נבדקה בארבע בארות של פלטת גידול תאים שמכילה 24 בארות (Nunc)

איור 1



איור 1: אנליזה של ייצור הקולטן המסיס בתאי 293-T בעקבות חחדרת הגן ב- transient transfection.

הקונסטרוקט לקולטן המסיס הוחדר לתאי 293-T בעזרת תמיסות של קלציום פוספט על פי פרוטוקול ידוע (Maniatis). אחרי 48 שעות הוחלף המדיום למדיום ללא סרום ואחרי 24 שעות נוספות פוצצו התאים בעזרת בופר ליזיס של חלבונים. הדוגמאות הופרדו על גל חלבונים שמכיל 12% אקריל אמיד והועברו לממברנה. בצד שמאל מוצגת צביעה של הממברנה בפונסו (צביעה של כלל החלבונים) בצד ימין תוצאות ההיברידזציה עם נוגדנים כנגד His-tag (Novogen).
 TC – תאים שעברו טרנספקציה
 CC – תאים שלא עברו טרנספקציה (תאי ביקורת)
 PC – חלבון ביקורת שמכיל His-tag

מסקנתנו היא שהצלחנו לבטא את הקולטן המסיס בתאים אנימלים. אך כדי לקבל כמויות גדולות שדרושות לספיחה של לפטין או להזרקה למוח של עופות יש לאסוף כמויות גדולות של מדיום גידול ולרכז את החלבונים המופרשים. בתהליך זה התחלנו תוך שימוש בפילטרים מחברת Amicon.

2. ביטוי הקולטן המסיס בחיידקים

ביטוי חלבונים בחיידקים יעיל יותר ככל שהחלבון קטן. לכן בחרנו רצף מינימלי שנמצא מספיק לקישור לפטין באדם. תכננו תחלים שמתאימים לרצפים ההומולוגיים לתחלים שעבדו בגן ההומני.

Forward: 5'-CATGGCCATGGATTGATGTGAATATCAATATC-3'

Reverse: 5'-CCCAAGCTTTCAATCTTTTACAGCTGCATA-3'

האתרים לחיתוך תוצר ה-PCR באנזימי רסטריקציה מסומן באדום. הקודון למטיונין שדרוש לתחילת הסינתזה של הקולטן בחיידקים מסומן בסגול.

גם את המקטע הזה יצרנו בשיטה של TR-PCR מאותו cDNA שהוזכר בפרק א. התקבל מקטע בגודל הצפוי שאותו שלחנו לבדיקת הרצף במכון ויצמן. השיבוט והפקת החלבון נעשו במעבדתו של פרופסור אריה גרטלר.

3. ספיחת הלפטין על קולונות זיקה

את הקולטן המסיס שהופק בחיידקים קשרנו לקולונות Affi-gel 10 מחברת ביוורד והעברנו דרכו נוזל מיוחד שמופק במעבדתנו שמכיל חלבונים מופרשים מרקמת השומן של עופות.



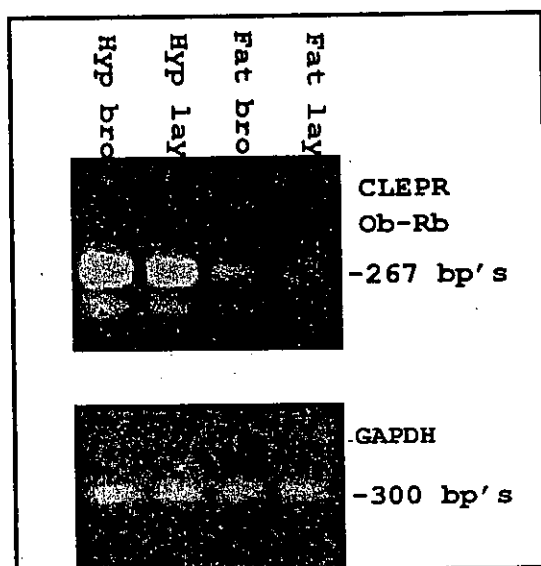
איור 2 : ניקוי לפטין שהופק מרקמת השומן של עופות על קולונות זיקה.

קולטן מסיס לפטין נקשר לקולונות Affi gel 2 מחברת ביו-רד. נוזל שמכיל חלבונים מופרשים מרקמת השומן של עופות נוקה על הקולונה והחלבונים שנספחו שחררו מהקולונה בהרתחה בבופר טרייס. אותם חלבונים הופרדו על גל אקאיל אמיד (12%) יחד עם חלבונים נקיים כביקורת. ה"לפטין המסחרי" הוא לפטין של אדם. נראה שאחד החלבונים ששחררו מהקולונה דומה בגודלו לפטין של אדם. M = מרקר של משקלים מולקולאריים.

חתיכה מהגל שמכילה את החלבון שדומה בגודלו לחלבון המסחרי של לפטין של אדם, נשלחה לאנליזה בשיטה של Mass-Spectrometry בטכניון בחיפה. זיהוי החלבון יאפשר לאתר את הגן ולאפיין באופן מעמיק יותר את מנגנון הבקרה על מאזן האנרגיה בעופות ואת ההבדלים בין הזנים השונים.

4. אפיון המטילות הכבדות כעמידות ללפטין

1.4. השוואת הקולטן ללפטין בהפוטלמוס ובשומן של מטילות קלות וכבדות. הפקנו RNA מקרמת ההיפותרמוס והשומן של מטילות בגיל שנה (15 מטילות קלות מזן לומן ו 15 כבדות מזן קוב וביצענו סלקציה ל mRNA בעזרת קיט של חברת Gibco-BRL). דוגמאות אלה שימשו לאנליזה של ביטוי הקולטן ללפטין בשיטה של RT-PCR. כדי להגביר את אמינות הכמותית של ראקציאת ה-PCR ביצענו אותו בתנאים שמוגדרים כ"חציא כמותיים". בשיטה זו מכילים את הדוגמאות עם גן ביקורת (House-keeping gene; GAPDH) ומביאים את הדוגמאות לריכוזים שיתנו את אותו סיגנל עם גן הביקורת. ריכוז זה נקבע בתנאים שבהם ראקציאות ה-PCR לא הגיעו לשלב הרוויה (plateau-level). רק אחרי כיוול הדוגמאות בדקנו אותן ב-PCR עם תחלים ספציפיים לאתר התוך תאי של הגן לקולטן ללפטין. תחלים אלה מזהים רק את המופע הארוך של הקולטן שפעיל בהיפותרמוס. כפי שניתן לראות באיור 2, בשני הזנים התקבל סיגנל חלש בריקמת השומן וסיגנל חזק בהיפותרמוס. ההבדל בין הביטוי ברקמת השומן ובהיפותרמוס צפוי על פי הממצאים ביונקים ועל פי ממצאים קודמים שלנו שנעשו



איור 3 : אנליזה ב-PCR של רקמות שומן והיפותרמוס של מטילות כבדות וקלות בתנאים חצי כמותיים (Semi quantitative PCR).

דוגמאות של Poly A+ RNA, שהופקו מרקמות השומן (Fat) וההיפותרמוס (Hyp) של מטילות כבדות (lay) וקלות (bro) בנות שנה שימשו לראקציות ה-RT-PCR בתנאים חצי כמותיים (1 microgram של mRNA ממכל רקמה). אחרי כיוול הדוגמאות עם תחלים של GAPDH, בוצע PCR באותם דוגמאות עם תחליפם של הקולטן הארוך ללפטין שמתאימים לאקסון 20 של הגן (CLEPR). תוצרי הריאקציה הוטענו על 2% אגרוז גל ונצבעו באתידיום ברומיד.

במטילות קלות (Horev *et al.*, 2000). הן בריקמת השומן והן בריקמת ההיפותלמוס לא ניתן היה להבחין בהבדלים בין הזנים השונים. הדמיון בעוצמת הסיגנל בהיפותלמוס בשני הזנים אובחנה גם כאשר ירדנו במספר ה"סיבובים" (cycles) של ראקציה ה-PCR (תוצאות לא מוצגות).

2.4. השוואת פעילות הלפטין בדוגמאות סרום של מטילות קלות וכבדות

בטבלה מספר 2 ניתן אנליזה שנעשתה בעזרת המערכת הביולוגית לדוגמאות סרום של עופות בני 7 שבועות. השוואה בין עופות דלי שומן ובעלי שומן מראה את היחס הצפוי בין כמות שומן הבטן לפעילות הלפטין בסרום. ניסוי זה נעשה בעופות מזן קוב (זן של עופות כבדים). כל דוגמא נבדלה בארבע בארות של פלטת גידול תאים שמכילה 24 בארות.

טבלה 2: מתאם בין %שומן לפעילות לפטין בדוגמאות סרום של עופות מזן קוב בגיל 6 שבועות.

B.W	Fat	%Fat	Bio-activity (fold induction)
1601	11	0.69	1.5± 1.0
1713	15.3	0.89	1.0± 0.9
2408	23.4	0.97	1.5± 0.8
2250	75.3	3.35	4.3± 1.5
2406	83.5	3.47	3.5± 2.0
2049	75	3.67	6.1± 2.3

בהשוואה בין מטילות קלות וכבדות בגיל שבו מסתיים הגידול המסחרי של המטילות הכבדות (כ- שנה ו 13 שבועות) בדקנו 4 מטילות כבדות ממשקי קבוצת יבנה (דר' יואב איתן) שגודלו בתנאים של הגבלת מזון ו 4 מטילות קלות בגיל דומה שגודלו בבית דגן בתנאים של הזנה חופשית. התוצאות שמוצגת בטבלה 3 מראות שההבדלים בפעילות הביולוגית של הלפטין בסרום העופות נמצאים בהתאמה לכמות השומן ולא לזן או לתנאי הגידול. למרות שהשוואה זו מוגבלת במספר העופות, הרי שניתן להניח שבשני הזנים מופרש לפטין פעיל לדם.

טבלה 3: פעילות לפטין בסרומים של מטילות כבדות וקלות

Chicken strain and feed	%Fat	Leptin activity in serum samples (fold-induction)
Broiler hens under feed restriction	1.7	5.4±2.0
	2.9	10.3±3.5
	3.2	15.0±4.2
	3.6	20.3±4.5
Layer hens on <i>ad-libitum</i> feeding	1.9	4.9±2.1
	2.1	6.7±3.1
	3.6	25.5±4.2
	3.8	23.4±4.9

מסקנתנו מניסוי זה ומאנליזה של ביטוי הקולטן ללפטין שתוארה בסעיף א' היא שההבדל בין הזנים אינו נובע ממוטציה בלפטין או בקולטן ללפטין שמבטלת את פעילותם. מסקנה זו נתמכת גם מבידוקת הרצף של הקולטן ללפטין שנעשו באופן חלקי בשני הזנים ונמצאו זהים (תוצאות לא מוצגות).

5. שימוש באגוניסט להורמון α -MSH לעיכוב אכילה

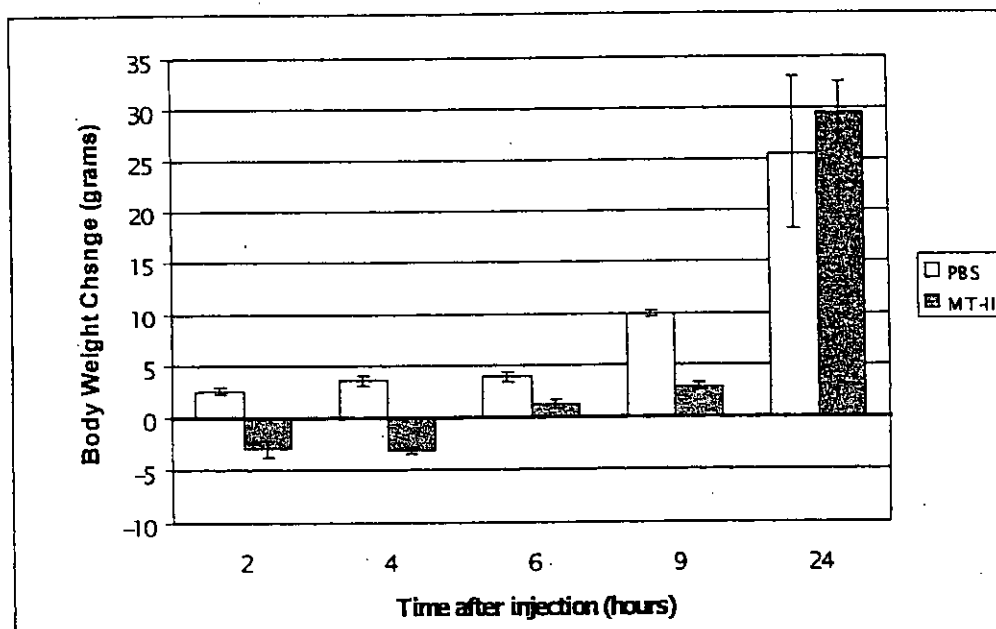
1.5. אפיון המינון המשפיע על אכילה באפרוחים

אפרוחים מזן קוב נרכשו ממדגרת בראון וגדלו במתקן הלול בבית דגן במשטר של אכילה חופשית. בגיל שבוע חולקו האפרוחים ל 6 קבוצות כשבכל קבוצה 6 אפרוחים בעלי פיזור דומה של משקלי גוף.

שלוש קבוצות ביקורת טופלו באופן הבא: 1. הזרקה תת עורית של תמיסה פיזיולוגית (PBS) (2. הזרקה תוך ורידית של PBS). 3. ללא כל טיפול. לשלוש קבוצות הטיפול הזרק MT-II מומס ב PBS באופנים הבאים: לקבוצות 1 ו 2 הזרק החומר בריכוז של 1 מג לקג בהזרקה תת עורית והזרקה לווריד כפי שנעשה בקבוצות הביקורת. לקבוצה השלישית הזרק החומר לווריד בריכוז פי עשרה נמוך יותר. מייד לאחר ההזרקה החזרו האפרוחים להזנה חופשית בקבוצות מעורבות. בנוסף למספור העופות בכנף שבעזרתו ניתן היה לזהות את הטיפולים השונים, סומנו העופות שקבלו את ככמות הגדולה של MT-II, בעזרת יוד בראשם. סימון זה אפשר לנו להבחין בכך שהעופות המסומנים אכלו הרבה פחות מהאחרים.

תופעה זו התבטאה בצורה מדויקת יותר כשבדקנו את השינוי במשקל גוף בעקבות ההזרקה (איור 4). כפי שניתן לראות באיור, שקילת האפרוחים נעשתה 2, 4, 6, 9 ו 24 שעות אחרי

ההזרקה. בעופות שקבלו את המינון הנמוך לא ניתן היה להבחין בהבדל כל שהוא לעומת קבוצת הביקורת, גם בין שלשת קבוצות הביקורת לא ניתן היה להבחין בהבדלים משמעותיים במשקל הגוף. תוצאות אלה מעידות על כך שלהזרקה עצמה ולאופן ההזרקה אין כל השפעה על האכילה ומשקל הגוף (תוצאות לא מוצגות). לעומת זאת, לרמה הגבוהה של החומר (הדומה לרמה שמשפיעה ביונקים) הייתה השפעה משמעותית ביותר לעומת קבוצת הביקורת (איור 4) אך רק במשך 9 השעות הראשונות. הירידה במשקל העופות המטופלים בשעות הראשונות נובעת מכך שעופות אלה הפסיקו לאכול לחלוטין ובשלב גידול מואץ זה הפסקת אכילה מתבטאת בירידה במשקל כבר אחרי שעותיים.



איור 4 : השפעת הזרקה של MT-II על משקל גוף באפרוחים

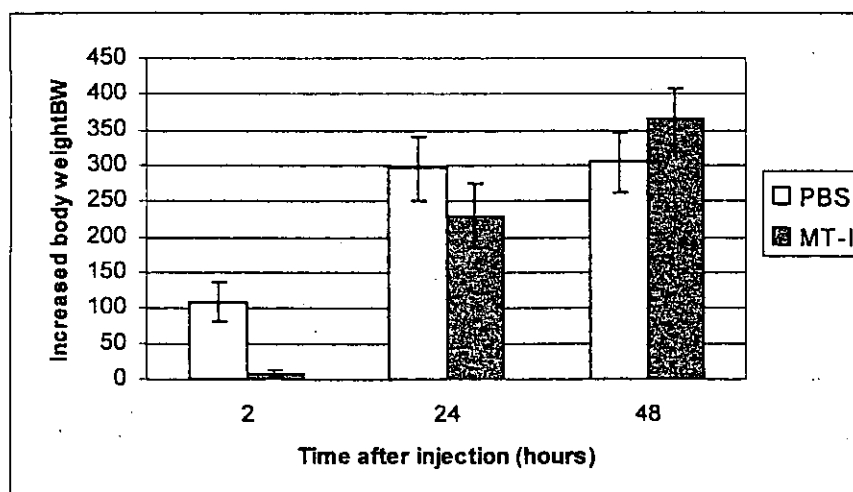
אפרוחים מזן קוב קבלו בהזרקה תוך ורידית 0.3 מיליליטר של תמיסה פיזיולוגית (PBS) עם או בלי התוספת של MT-II בריכוז של 1 מג. לקג. שקילת האפרוחים נעשתה במהלך היממה הראשונה אחרי ההזרקה בזמנים הרשומים והשנוי במשל הגוף מהמשקל שנמדד לפני ההזרקה מוצג באיור. הקווים האורכיים מציגים את ה standard error ; n=6. ההבדלים במשקל הגוף בין שתי הקבוצות בשעות הראשונות אחרי ההזרקה מהווים כ 5% ממשקל הגוף של האפרוחים.

2.5. הזרקת MT-II למטילות כבדות בגיל 4 חודשים

מטילות כבדות מזן האימהות התקבלו ממדגרת קבוצת יבנה וגדלו במתקן הלול בבית דגן במשטר של הגבלת מזון, בהתאם למה שנהוג בגידול המסחרי של עופות אלה (לזוי צמוד של דר' יואב איתן). בגיל 4 חודשים חולקו העופות לשתי קבוצות כשבכל קבוצה פיזור דומה של משקלי גוף. קבוצת הטיפול קבלה MT-II בריכוז 1 מג. לקג. בהזרקה לווריד ולקבוצת הביקורת הוזרק הממס (PBS). כ 10 דקות אחרי ההזרקה נחשפו שתי הקבוצות לאכילה חופשית בכלוב אחד. גם בניסוי זה סומנו העופות שקבלו MT-II ביד בראשם. השפעת ה MT-II בלטה לעין באופן דרמטי

משום שעופות הביקורת אכלו ברציפות במשך כמה שעות, עקב החשיפה הפתאומית למזון בלתי מוגבל, בעוד שהעופות המטופלים לא הראו כל עניין במזון. ביטוי כמותי לכך מוצג באיור 2.

שקילת העופות נעשתה לפני ההזרקה ו 2, 24, ו 48 שעות אחריה. ההבדל במשקל הגוף בכל נקודת זמן, לעומת משקל הגוף לפני ההזרקה מוצג באיור. גם בניסוי זה ההבדל במשקל הגוף שנמדד שעתיים אחרי ההזרקה מהווה כ 5% ממשקל הגוף של עופות אלה אך אחרי 24 שעות לא ניתן היה להבחין בהבדלים משמעותיים במשקל הגוף.



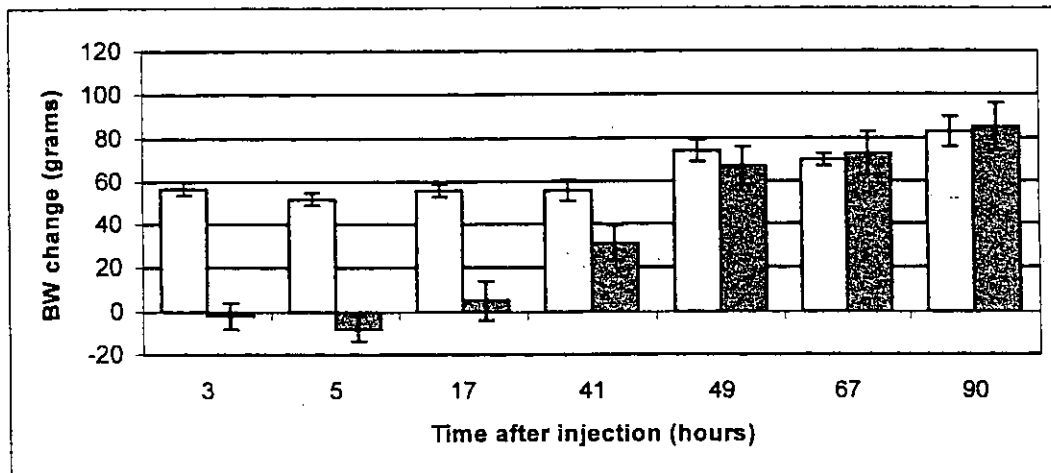
איור 5. השפעה של MT-II על משקל גוף של מטילות כבדות בנות 4 חודשים

הניסוי נערך בדומה למתואר באיור 4 אך במטילות כבדות בגיל 4 חודשים שגדלו במשטר של הגבלת מזון עד להזרקה ונחשפו לאכילה חופשית מייד לאחר ההזרקה. הקווים האורכיים מציגים standard error ; n=6. ההבדלים במשקל הגוף בין שתי הקבוצות בשעתיים הראשונות אחרי ההזרקה מהווים כ 5% ממשקל הגוף של העופות.

3.5.. הזרקת MT-II למטילות קלות בגיל 4 חודשים

ניסוי דומה לזה שתואר בסעיף 2 נעשה גם במטילות קלות מזן לומן שנרכשו ממדגרת הסוללים וגדלו באכילה חופשית. בניסוי זה נמצאו הבדלים קטנים ביותר במשקל גוף (תוצאות לא מוצגות). עקב ההבדל באופן הגידול של המטילות הקלות והכבדות, הנחנו שבתנאים של מחסור במזון חופשי, ניתן יהיה לקבוע באופן אמין יותר האם אכן קיים הבדל בין הזנים בתגובה ל MT-II. בניסוי נוסף שנעשה בעופות אחרים מאותו גידול, הופסקה האכילה כ 16 שעות לפני ההזרקה. בעקבות ההזרקה של PBS לקבוצת הביקורת ו 1 מג. לקג. MT-II לקבוצת הטיפול, נחשפו העופות לאכילה לחופשית. כפי שניתן לראות באיור 3, בתנאים אלה התגובה של המטילות הקלות להזרקה הייתה דומה לזו של המטילות הכבדות. גם בניסוי זה קבוצת הביקורת אכלה

בשעות הראשונות אחרי ההזרקה כמות אוכל שהביאה לעליה של כ 5% במשקל גופן בעוד שהעופות שקבלו את הטיפול לא הראו כל עניין באכילה. מכאן אנו מניחים שמכיוון שהשפעת ההזרקה היא קיצרת מועד, ניתן להבחין בהבדלים רק במצבים של גדילה מואצת (אפרוחים) או שחרור מהגבלת מזון. סביר להניח שבטיפול מתמשך ולא חד פעמי התגובה תבוא לידי ביטוי גם במשטרי תזונה של אכילה חופשית.



איור 6 השפעת הזרקת MT-II על משקל גוף במטילות קלות

הניסוי נעשה באופן דומה לזה שתואר באיור 5, אך במטילות קלות מון לומן אחרי 16 שעות של הרעבה. הקווים האורכיים מציגים את ה standard error ; n=6. ההבדלים במשקל הגוף בין שתי הקבוצות בחמש השעות הראשונות אחרי ההזרקה מהווים כ 5% ממשקל הגוף של העופות.

מסקנות והשלכותיהן על המשך ביצוע המחקר

במהלך המחקר הראנו שאנלוג סינטטי (MT-II) של הפפטיד α -MSH משפיע בעופות באופן דרמטי על אכילה בשני הזנים העיקריים של העופות המסחריים (הקלים והכבדים). בדומה להשפעה שציפינו לקבל מטיפול בלפטין. הקבוצה ששיבטה את הגן המקודד ל α -MSH ולקולטנים שלו (Takeuchi et al, 1999) העלו את האפשרות שתוצרי גן זה יפעלו באופן שונה בעופות משום שהאונה המרכזית של ההיפופיזה שמהווה את אתר ייצורם העיקרי, מנוונת בעופות. קבוצה אחרת שהזריקה את הפפטיד α -MSH למות של אפרוחים בני יום Tachibana et al., 2001) הראתה הבדל בתגובה של אפרוחים כבדים וקלים. אנו מניחים שההבדל בין תוצאות אלה לשלנו נובע הן מאופן ההזרקה והן מגיל העופות. לגבי אופן ההזרקה, יתכן שלא כל התגובה נעשית במוח אלא גם באתרים אחרים בגוף שבהם נמצאו קולטנים לפפטיד זה (Takeuchi S, Takahashi S, 1998). ההשפעה של גיל ההזרקה יכלה לנבוע מכך שבאפרוחים בני יום, המערכות שמוסתות את כמות האכילה לא הגיעו לבשלות מלאה.

נשאלת השאלה מה המשמעות של השפעה קצרת טווח זו של שעות בודדות בלבד? האם

ניתן לראות בכך אפשרות יישומית?

התשובה לשאלה זו היא חיובית כי בכוונתנו להשתמש בחומר זה לטיפול ממועד. חשוב לציין שגם אילו ההשפעה הייתה ארוכת טווח היה הכרח לתת את החומר במזון. כלומר מה שחשוב בניסויים אלה הוא ההוכחה שהחומר אכן משפיע באופן יעיל על אכילה. לגבי הטיפול המעשי הרי שהוא יעשה באופן שונה לחלוטין מזה של הניסוי. הטיפול יהיה במינונים נמוכים יותר ומכילים היטב לכמות האכילה הרצויה, ודרך מתן הפפטיד יהיה באופן מתמשך במזון. מכיוון שהפיתוח של החומר כתרופה לבני אדם כולל פיתוח שמאפשר את מתן התרופה בכדורים, אנו מניחים שניתן יהיה להתאים את החומר גם למתן במזון. ההיאלומות המהירה של החומר מהגוף תהווה דווקא יתרון, זאת משום שבמקרה הצורך ניתן יהיה להפסיק את הטיפול ללא הפרעה של שאריות.

ספרות מצוטטת

- Barbin *et al.*, (1984). Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor. *J. Neurochem.* **43**:1468-1478.
- Fei, *et al.*, (1997). Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptor Ob-R in mouse brain and other tissues. *PNAS, USA*, **94**:7001-7005.
- Fong TM, Mao C, MacNeil T, Kalyani R, Smith T, Weinberg D, Tota MR, Van der Ploeg LH. (1997). ART (protein product of agouti-related transcript) as an antagonist of MC-3 and MC-4 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* **237**:629-631.
- Gloaguen, *et al.*, (1997). Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**:6456-6461.
- George, *et al.*, (2000). Medical strategies in the treatment of obesity. *Nature*, **404**:672-677.
- Horev *et al.*, (2000). Molecular cloning and properties of the chicken leptin-receptor (CLEPR) gene. *Mol. Cell. Endo.* **162**: 95-106.
- Kawakami, *et al.*, (2000). Central administration of alpha-melanocyte stimulating hormone inhibits fasting- and neuropeptide-Y induced feeding in neonatal chicks. *Eur. J. Pharmacol.* **398**:361-364.
- Takeuchi, *et al.*, (1999). Molecular cloning and characterization of the chicken pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Biochim. Biophys. Acta.* **1450**:452-459.
- Tachibana T, Sugahara K, Ohgushi A, Ando R, Kawakami S, Yoshimatsu T, Furuse M. (2001). Intracerebroventricular injection of agouti-related protein attenuates the anorexigenic effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in neonatal chicks. *Neurosci Lett* **8**;305(2):131-134.

סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה

מטרת המחקר הייתה למצוא כלים שישפיעו על מאזן האנרגיה בעופות ושבוערתם ניתן יהיה להשפיע על אכילה, צבירת שומן ופוריות בעופות. בתחילת העבודה הורמון השובע לפטין נראה כחומר המבטיח ביותר למטרה זו, אך תוך כדי תקופת המחקר מצאנו שהפפטיד MT-II משפיע באופן דרמטי על אכילה ועשוי להוות תחליף לטיפול בלפטין.

עיקר הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח

יצרנו את הקולטן המסיס הן בחיידקים והן בתאים אנימלים. בשתי המערכות הצלחנו לקבל ביטוי וגם הדגמנו פעילות קשירה שלו ללפטין. בעזרת המערכת הביולוגית שפיתחנו ושיטת נוספות התקדמנו באפיון מנגנוני הבקרה על אכילה, השמנה והטלה. בנוסף הראנו שאנלוג סינטטי (MT-II) של הפפטיד α -MSH משפיע בעופות באופן דרמטי על אכילה בשני הזנים העיקריים של העופות המסחריים (הקלים והכבדים).

המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו

בעקבות מחקר זה אנו מתמקדים עתה בטיפולים ממושכים יותר בשיטה של שחרור איטי ובפיתוח האפשרות של מתן החומר לעופות במזון. בנוסף, מחקר זה פותח את האפשרות להשתמש באנטגוניסטים לאותם קולטנים ולהשפיע על הגדלת התיאבון באווזים.

הבעיות שנתקו לפתרון ו.או השינויים שחלו במהלך העבודה

התוצאות שקבלנו מעודדות אך יש לבדוק עתה את השאלה האם לטיפול זה תהיה השפעה חיובית על הטלה. את זאת אנו מתכוונים לבדוק בעיקר במטילות כבדות שבהן בעיית יעילות ההטלה ומשך ההטלה היא החריפה ביותר. בכורתינו להשתמש בשיטת של "שחרור איטי" בעזרת פולימרים שניתנים להשתלה תת עורית ומשחררים את החומר במנות קטנות באופן מתמשך.

האם הוחל בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח

א. מאמרים

- Friedman-Einat, M., Kaluta, V. and Rosal, M. (2002). The genetic control on obesity in poultry. *Meshek Ha'ofot* (in Hebrew, reviewed) May-Jun: 23-26.
- Marikovsky, M., Rosenblum, C., Faltin, Z. and Friedman-Einat, M. (2002). Appearance of leptin in wound fluid as a response to injury. *Wound Rep. Reg.* 10: 302-307.
- Friedman-Einat, M., Camoin, L., Faltin, Z., Rosenblum, C.I., Kaliouta, V., Eshdat, Y. and Strosberg, A.D. (2002). Serum leptin activity in obese and lean Patients. *Reg. Pept.* 111: 77 – 82.

ב. כינוסים

- Friedman-Einat, M., Horev, G., Faltin, Z., Rosenblum, C.I. and Eshdat, (2001). Conservation of the leptin-mediated control mechanism in avian. *Keystone Symposia: Obesity and the regulation of energy homeostasis*. Taos, New Mexico.
- Friedman-Einat, M., Camoin, L., Faltin, Z., Rosenblum, C.I., Eshdat, Y. and Strosberg, A.D. (2002). Biological activity of leptin in obese and lean patient. *Keystone Symposia: Molecular control of adipogenesis and obesity*. Keystone, Colorado.

Friedman-Einat, M. (2002). Possible involvement of leptin in poultry reproduction. The 39th Annual Convention of the World Poultry Science Association - Israel Branch. Ashkelon,

Friedman-Einat, M., Kaliouta, V., Ruzal, M. and Eitan, Y. (2002). Daily injection of MT-II to lean and obese strains of chicken. 5th International melanocortin meeting. Sunvier, Oregon.

Friedman-Einat, M., Kaliouta, V., Horev, G., Rubinshtein, M., Mrikovesky, M., and Eshdat, Y. (2002). Study of the leptin mediated control mechanism in chickens. The Annual Meeting of the Israel Endocrine Society. Tel-Aviv, Israel.