

**בקרת ההתמודדות עם עקות אקלימיות בפטמים: אפיון המנגנון
האפיגנטי המבקר שחרור הורמונאלי בהיפותלמוס.**

**Accommodation mechanism to environmental stress:
Identifying the epigenetic mechanism for hormone release
in the hypothalamus.**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

המחלקה לעופות, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

נעם מאירי

Noam Meiri, Department of Poultry Science, ARO The Volcani Center, PO Box 6 Bet Dagan.
50250, E-mail: meiri@agri.huji.ac.il

אפריל 2010

ניסן תש"ע

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הממצאים לא מהווים בשלב זה המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר:

תקציר

1. **הצגת הבעיה:** לאור התחממות כדור הארץ וההשפעות הברורות שיש לטמפרטורה קיצונית על רווחת עופות המשק, יש לפתח זני עופות עמידים לחום. ממחקרים שערכנו בשנים האחרונות זיהינו שכאשר חושפים אפרוחים בני שלושה ימים לטמפרטורה קיצונית אך מבוקרת, אפרוחים אילו עמידים יותר בבגרותם לשינויי אקלים קיצוניים מאשר אפרוחים שלא נחשפו לטמפרטורה גבוהה. במקביל זיהינו שעמידות זאת נובעת משינוי בביטוי גנים בהיפותלמוס הקדמי.
2. **מטרות המחקר:** אימות הנחת העבודה שהפעלה או השתקה ארוכת תווך של הורמוני השחרור בהיפותלמוס תלויה במודיפיקציות בחלבונים ההיסטונים ובשינויים במודיפיקציות ב DNA באזור המפעיל את הגנים הללו.
3. **שיטות העבודה:** בחינת ביטויים של ההורמונים המשחררים בהיפותלמוס בעזרת Real time PCR, ובדיקת שינויים ברמת המטילציה על הדונוקלאוטידים CpG בפרומוטרים של הגנים הללו.
4. **תוצאות עיקריות:** בשנה השלישית מצאנו שינויים בביטוי ההורמונים המבקרים שחרור הורמונאלי בהיפותלמוס. בנוסף מצאנו שינויים ברמת המטילציה על הדונוקלאוטידים CpG בפרומוטרים של הגנים הללו.
5. **מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות:** המסקנה העיקרית היא שאכן ההורמונים המשחררים בהיפותלמוס מבקרים ברמה האפי גנטית. הפרויקט ממשיך ממקורות מימון אחרים ואני תקווה שבקרוב נוכל לתת המלצות למטפחים.

מבוא

לאור התחממות כדור הארץ וההשפעות הברורות שיש לטמפרטורה קיצונית על רווחת עופות המשק, המחקר זה עוסק בהפעלה והשתקת גנים המבקרים שינויי טמפרטורה באמצעות מודיפיקציות בכרומוסין. ממחקרים שנערכו בשנים האחרונות זוהה שכאשר חושפים אפרוחים בני שלושה ימים לטמפרטורה קיצונית אך מבוקרת, אפרוחים אילו עמידים יותר בבגרותם לשינויי אקלים קיצוניים מאשר אפרוחים שלא נחשפו לטמפרטורה גבוהה. התנית זו יכולה להוות פיתרון טוב לבעיית העקות האקלימיות מהן סובל משק העופות אלא שקשה טכנית במשקים לחמם את הלולים לטמפרטורה גבוהה ביום השלישי לחייהם של האפרוחים ולכן יש צורך בנוסף לפתרון זה בפתרונות חליפיים. על מנת למצוא פתרונות חליפיים אילו יש לצורך תחילה להבין את המנגנון המבקר את בקרת הטמפרטורה.

בזמן התנית החום זוהו שני הבדלים בולטים בין אפרוחים שעברו התניה לאפרוחים שלא עברו התניה בעת הוקעתם לחום. ההבדל הראשון הוא בפרופיל השחרור של הורמוני התירואיד והורמוני האדרנל, וההבדל השני - זוהו הבדלים בולטים בין עופות שעברו התנית חום לכאלו שלא עברו בביטוי גנים בהיפותלמוס הקדמי PO/AH. הנחת העבודה אותה אנו בוחנים בהצעת מחקר זו היא ששינויים בהפעלה או השתקה ארוכת טווח של גנים תלויה במודיפיקציות בחלבונים ההיסטונים ובשינויים במודיפיקציות ב DNA באזור המפעיל את הגנים הללו (הפרומוטור של הגן).

על מנת לאפשר סלקציה לעופות עמידים לטמפרטורה קיצונית או הפעלה של מנגנוני בקרה מחקר זה התרכז בשנה השנייה בשני משפיעים המבקרים ביטוי ארוך טווח של ההורמונים המשחררים בהיפותלמוס: AVT, CRH ו TRH. בזמן התנית החום ובזיכרון ההתניה בביטוי

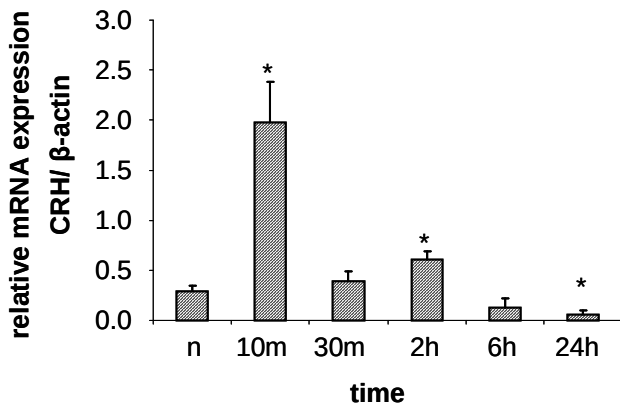
הורמונים אילו שבוע לאחר ההתניה ב. בדקנו את הקשר שבין המטילציה של הפרומוטורים המוזכרים לעיל ובין ביטוי הורמוני השחרור בהיפותלמוס

תוצאות

1. שינוי בביטוי ההורמון CRH בזמן התנית החום וביזכרון ההתניה וביטוי הורמון שבוע לאחר ההתניה

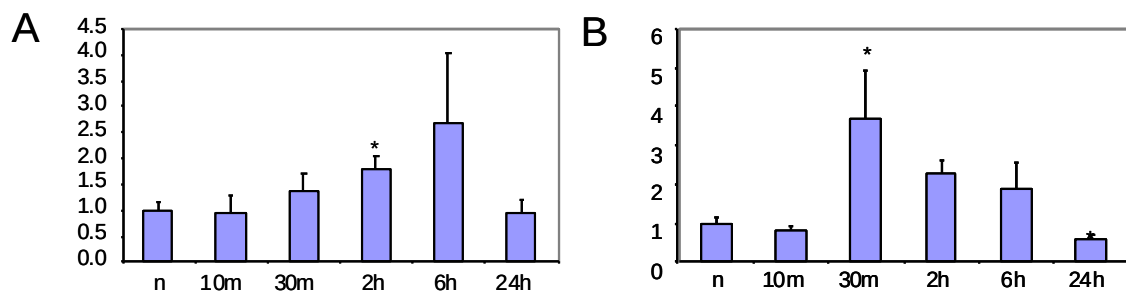
על מנת להראות כי התנית החום מפעילה תהליכי הקשורים לתהליכי עקה בהיפותלמוס הקדמי, בשלב ראשון בדקנו האם במהלך ההתניה בגיל שלושה ימים חלים שינויים ברמת הביטוי של mRNA של ההורמון CRH. ראשית, אנליזת Real time PCR הראתה כי חלה עליה בביטוי ההורמון כבר אחרי 10 דקות, כעבור 24 שעות יורדת רמת הביטוי לרמה

שנמוכה מרמת mRNA הבסיסית.



איור 1 - עליה בביטוי ההורמון CRH בהיפותלמוס הקדמי במהלך התנית חום ביום ה-3 (חשיפה של אפרוחים למשך 24 שעות ל 38 מעלות צלזיוס). על מנת למזער הבדלים הנובעים מהפקה לא אחידה כמות mRNA בכל דוגמא הושוותה לכמות 18s שכמותו בתאים לא משתנה. כל נקודת זמן מייצגת את הממוצע של 10 אפרוחים $\pm$ SEM, $p < 0.05$.

על מנת לבדוק האם ישנו זיכרון של העקה, בשלב השני בדקנו האם ההתניה משפיעה על הרמה של CRH שבוע אחרי תום ההתניה. לצורך כך השונו בין רמת ההורמון ביום 10 בחשיפה לחום בין אפרוחים שנחשפים בפעם הראשונה לחום ובין אפרוחים שנחשפו ביום שלוש ונחשפים לחום פעם שניה ביום 10 מצאנו כפי שניתן לראות באיור 2 שאכן התניה בגיל שלושה ימים גורמת לשינוי ארוך טווח ברמות הביטוי של CRH.

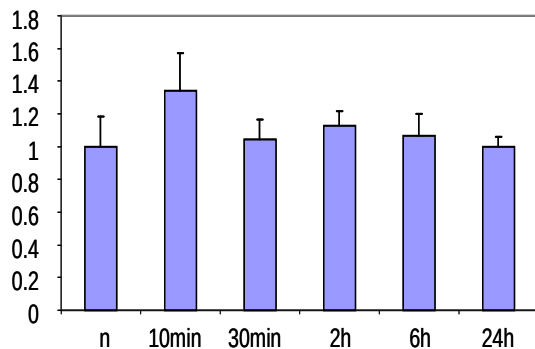


איור 2. ההבדל בביטוי ההורמון CRH בהיפותלמוס הקדמי ביום 10 בין אפרוחים שנחשפו לחום ביום בשלישי A ובין כאלו שלא נחשפו לחום B. על מנת למזער הבדלים הנובעים מהפקה לא אחידה כמות mRNA בכל דוגמא הושוותה לכמות 18s שכמותו בתאים לא משתנה. כל נקודת זמן מייצגת את הממוצע של 8 אפרוחים $\pm$ SEM, $p < 0.05$.

2. ישנה השפעה להתניית החום גם על ביטוי החלבון CRH.

מאחר והפעילות הביולוגית מתבצעת ע"י החלבון ולא על ידי mRNA בדקנו את מידת ביטוי החלבון CRH בהתניית החום ומצאנו שאכן ישנה עליה ברמת החלבון ב 10 דקות של חשיפה לחום (איור 3). מאחר וכנראה רק חלק קטן מהתאים באיזור משתתפים בשחרור CRH בדקנו בעזרת אימונוהיסטוכימיה את

ההבדל בביטוי ה CRH בין אפרוחים מותנים ונאיביים ונמצא הבדל בולט בביטוי ה CRH באיזור ההיפוטלמוס הקדמי (איור 4)



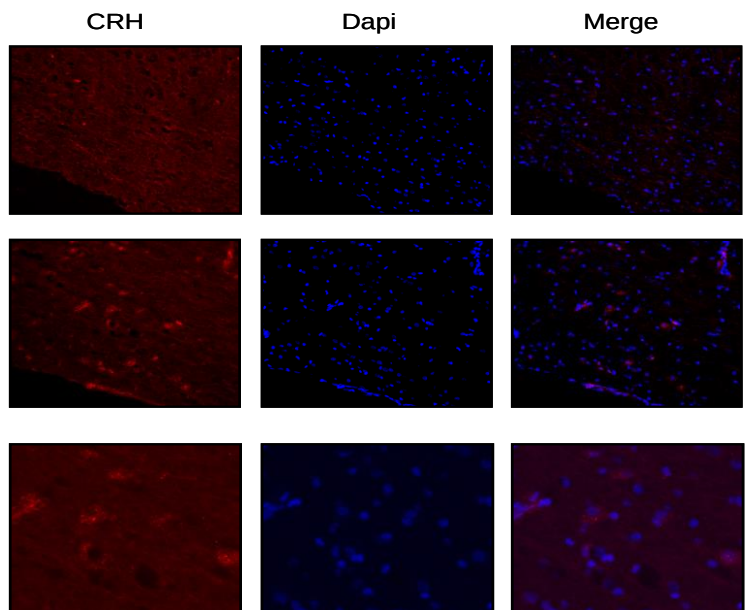
איור 3 - עליה בביטוי החלבון CRH בהיפוטלמוס הקדמי במהלך התנית חום ביום ה-3 (חשיפה של אפרוחים למשך 24 שעות ל 38 מעלות צלזיוס). מוצגת הדנסיטומטריה של 6 ג'לים. על מנת למזער הבדלים הנובעים מהפקה לא אחידה כמות החלבון בכל דוגמא הושוותה לכמות אקטין שכמותו בתאים לא משתנה. כל נקודת זמן מייצגת את הממוצע של 10 אפרוחים $\pm$ SEM,

איור 4. - אפיון אנטומי של מקום השינוי ביטוי החלבון CRH בהתנית חום
אימונוהיסטוכימיה. מוחות שלמים של אפרוחים בני שלושה ימים שעברו התנית חום של 20 דקות עברו פיקסציה. נחתכו ל 5 החתכים נחשפו לנוגדן פוליקלונאלי של CRH וצולמו במיקרוסקופ פלורסצנטי. בתמונות נראה אזור ה-PVN בו התקבל סיגנל ביטוי ל-CRH. במיקרוסקופ ההגדלה x200 ו x600

Naive
x200

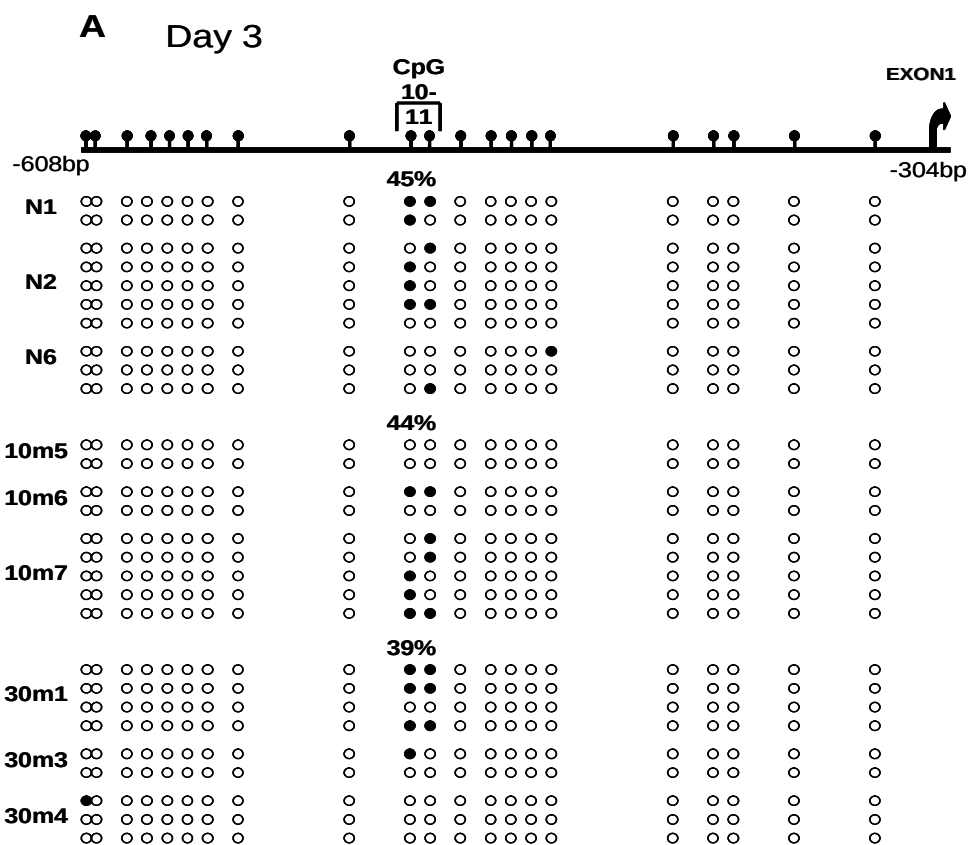
Heat-treated
x200

Heat-treated
x600



3. ישנו הבדל במטילציה על ה DNA בפרומוטור של CRH בין אפרוחים בני שלושה ימים ואפרוחים בני 10 ימים.

לאור ההבדל בין רמת הביטוי הבסיסית של ההורמונים המשחררים בין אפרוחים שעברו התנית חום ובין אפרוחים שלא נחשפו לחום בצעירותם, בדקנו בשלב הבא את רמת המטילציה ב DNA בפרומוטור של CRH נבדקו 21 אתרי מטילציה באיזור שליפני האקסון הראשון ונמצא כפי שנראה באיור 5 מטילציה ברורה באתרים 10 ו 11 ואין מטילציה באתרים פוטנציאליים אחרים. רמת המטילציה לא הישתנתה עם הזמן בזמן החשיפה של אפרוחים בני שלושה ימים לחום. לעומת זאת לא נמצאה מטילציה על אתרים אילו לא באפרוחים נאיביים בני 10 ימים ולא באפרוחים שעברו חשיפה חוזרת לעקת חום (תוצאות לא מוצגות בגלל חוסר מקום).

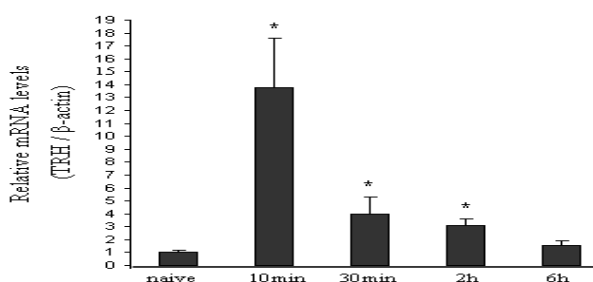


איור 5 מתילציה של הגן CRH במהלך התנית חום ביום 3. הצגה סכמאטית של אתרי ה-CpG באזור הבקרה של האקסון הראשון של הגן CRH וניתוח של מידת המתילציה באתרים אלו בקבוצת אפרוחים לפני התנית החום ביום השלישי, לאחר 10 ו 30 דקות של התנית חום ביום השלישי. לשם ניתוח המתילציה, DNA עבר מודיפיקציה ע"י סודיום ביסולפיט, הוגבר ע"י תחלים לאזור הבקרה של האקסון הראשון ולמקטעים מאזור הבקרה של האקסון השני, והוחדר לתוך פלסמיד. הפלסמיד עבר טרנספורמציה לתאים סופר קומפטנטים והתאים נזרעו בשני מיהולים על גבי צלחות סלקטיביות המכילות אמפיצילין וכן IPTG ו-X-gal. פלסמידים הופקו מהמושבות הלבנות ונשלחו לריצוף. כל נקודה באיור מייצגת את המתילציה באתר יחיד, במושבה יחידה. עיגול מלא מצביע על מתילציה באתר ועיגול ריק מצביע על אתר ללא מתילציה.

4.1 רמת ביטוי ה-mRNA של TRH עולה במהלך התנית החום ביום השלישי לחיי האפרוחים

על מנת להראות כי התנית החום במהלך החלון הזמן הקריטי להתפתחות המערכת הטרמו-רגולטיבית משפיעה על רמת הביטוי של הגן ל-TRH ב-PVN, נמדדה רמת ה-mRNA של TRH באזור זה. רמת ה-mRNA נמדדה בעזרת real-time PCR (תרשים 6). נצפתה עליה משמעותית ברמת הביטוי של הגן TRH בחשיפה לחום במהלך היום השלישי. תוצאות הניסוי מראות שינוי משמעותי ביותר ברמות ה-mRNA במהלך התנית החום כאשר כבר לאחר עשר דקות רמתו גבוהה פי 13.7 ± 7.56 מרמתו אצל אפרוחים נאיביים. לאחר נקודת זמן זו חלה ירידה ברמת ה-mRNA כאשר אחרי 30 דקות ושעתיים ממוצע רמתו עמד על פי 4 ± 2.68 ו- 3.1 ± 0.99 בהתאמה, בזמנים אלה הערכים עדיין שונים בצורה מובהקת מהממוצע באפרוחים נאיביים. בשעה השישית ירדה רמת ה-mRNA ל-

ל- 1.5 ± 0.71 הדומה לרמה התחלתית.



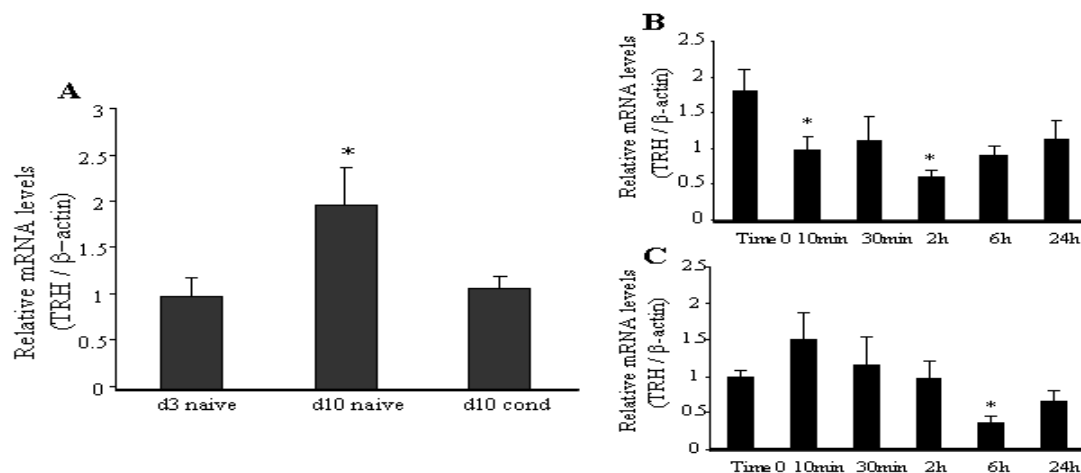
תרשים 6 - רמת ביטוי ה-mRNA של TRH במהלך התנית החום ביום השלישי לחיי האפרוחים. האפרוחים גודלו עד ליום השלישי לחייהם בטמפרטורה של 30°C וביום השלישי הועברו ל- 37.5°C ורמת ה-mRNA נמדדה לאורך החשיפה. תוצאות real-time PCR כשבכל דוגמא בוצע נרמול לביטוי הגן β -actin. כל עמודה מייצגת את ממוצע ביטוי ה-mRNA של 6-8 אפרוחים $\pm$ SEM, * $p < 0.05$.

4.2 רמת הביטוי הבסיסית ביום 10 ודפוס ביטוי ה-mRNA של TRH לאורך החשיפה לחום משתנים

כתוצאה מהתניית החום

בעקבות העובדה שאכן נצפה שינוי בדפוס הביטוי של TRH בזמן התניית החום במהלך היום השלישי לחי האפרוחים נבדק גם דפוס הביטוי במהלך היום העשירי באפרוחים שהותנו ביום השלישי (conditioned) מול אפרוחים שלא הותנו (non-conditioned). על פי מחקרים קודמים, חום גופם של אפרוחים מותנים בחשיפה חוזרת נמוך יותר מחום גופם של אפרוחים לא מותנים. ככל הנראה (5, 13), ייצור מופחת של חום מטבולי בזמן עקת חום ומאפשרת התמודדות טובה יותר והשרדות הפרט ויש להניח שנובעת משינוי בדפוס הביטוי של TRH בזמן זה.

תוצאות הניסוי מתחלקות לשלושה חלקים, ריכוז תוצאות רמת ה-mRNA הבסיסית של TRH (לפני חשיפה לחום) באפרוחים נאיבים ביום השלישי בהשוואה לרמה הבסיסית באפרוחים מותנים ולא מותנים ביום 10 (תרשים 7A), רמתו במהלך חשיפה לחום ביום העשירי באפרוחים שאינם מותנים (תרשים 7B) ורמתו במהלך חשיפה לחום ביום העשירי באפרוחים מותנים (תרשים 2C). רמת ה-mRNA הבסיסית ביום 10 באפרוחים שאינם מותנים גבוהה פי 2 ± 0.66 מהרמה הבסיסית ביום השלישי ואילו הרמה הבסיסית ביום 10 באפרוחים מותנים אינה שונה מהרמה הבסיסית ביום השלישי (1.1 ± 0.18). נמצא גם כי באפרוחים שאינם מותנים מתרחשת ירידה משמעותית ברמת הביטוי כבר לאחר עשר דקות שלאחריהן הרמה נותרת נמוכה, זאת לעומת אפרוחים מותנים שם לא התקיים הבדל סטטיסטית ברמת ביטוי TRH עד לשעה השישית שם מתקיימת ירידה. באפרוחים שאינם מותנים הירידה ברמת הביטוי מתרחשת לאחר 10 דקות של חשיפה ועומדת על פי 0.55 ± 0.18 ביחס לאפרוחים נאיבים, לאחר מכן בזמנים 30 דקות, שעתיים, 6 ו-24 שעות נותרת רמת הביטוי יחסית קבועה עם 0.61 ± 0.34 , 0.35 ± 0.08 , 0.14 ± 0.14 ו- 0.51 ± 0.34 בהתאמה ביחס לאפרוחים נאיבים.



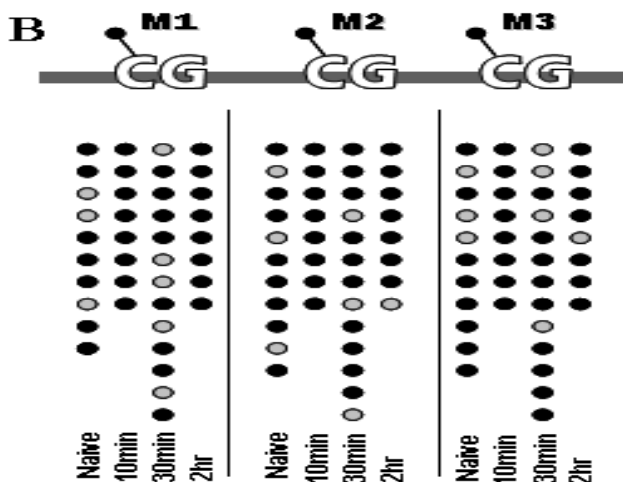
תרשים 7- רמת הביטוי של ה-mRNA של TRH ביום עשר באפרוחים מותנים ביחס ללא מותנים. A. ריכוז תוצאות רמת הביטוי של ה-mRNA של TRH לפני חשיפה לחום ביום 3 וביום 10. אפרוחים מותנים גודלו עד ליום 3 בטמפרטורה של 30°C וביום השלישי הועברו ל- 37.5°C למשך 24 שעות והוחזרו לטמפרטורה של 30°C . לאחר שבעה ימים נמדדה שוב רמת ה-mRNA. אפרוחים לא מותנים גודלו עד ליום 10 לחייהם בטמפרטורה של 30°C ואז נמדדה רמת ה-mRNA הבסיסית ב-PVN. B. רמת ה-mRNA באפרוחים שאינם מותנים לאורך חשיפה לחום ביום העשירי. C. רמת ה-mRNA באפרוחים מותנים לאורך חשיפה לחום ביום העשירי. תוצאות real-time PCR כשכלל דוגמא בוצע נרמול לביטוי הגן β -actin. כל עמודה מייצגת את ממוצע ביטוי ה-mRNA של 6-8 אפרוחים $\pm$ SEM, * $p < 0.05$.

4.3 מתרחשים שינויים דינאמיים ברמת מתילציה של עמדות M1-3 באזור הפרומוטור של TRH במהלך התניית חום של אפרוחים ביום השלישי לחייהם

היות ונמצאה אינדוקציה של ביטוי הגן TRH במהלך התנית חום, בשלב הבא חיפשנו מנגנון בקרה שיכול לאפשר את העלייה בביטוי. הגן המקודד ל-TRH מכיל רצפי בקרה הכוללים פרומוטור היושב לפני אתר תחילת השעתוק (ATG) ואינטרון יחיד היושב לאחריו (תרשים 8A). מניתוח רצפי הבקרה של הגן, נמצא כי הרצפים מכילים מספר עמדות CpG stand alone אשר יכולות לעבור מתילציה ועל כן יכולות להיות מעורבות בבקרה על שעתוק הגן. מבין העמדות שעל גבי מקטע הפרומוטור נותחו ארבע עמדות CpG (M1-4) ואילו על מקטע האינטרון נותחה עמדת CpG בודדת יחידה (M5).

למקטע הפרומוטור ארבע עמדות CpG עליהן יכולה להתבצע מתילציה, M1-4, עמדת M4 יושבת על חלק מהמקטע המשמש כאתר קישור לפקטור השעתוק HSF2 ושכזאת, וכן על פי דפוס המתילציה הייחודי שלה תזכה גם להתייחסות מיוחדת ונפרדת ביחס לשלוש העמדות האחרות.

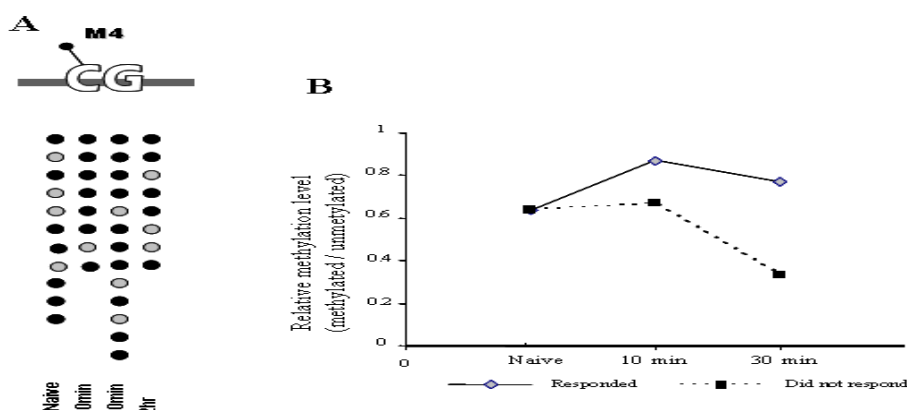
בעמדות M1, M2, M3 (תרשים 8B) נרשמה רמת המתילציה בעזרת שיבוט וריצוף מקטעים. שיטה זו מאפשרת מציאת יחס אתר ממותל/לא ממותל כאשר 100% מתילציה מתייחס למצב בו כל העמדות במקטע שרוצפו נמצאו ממותלות, כפי הנראה השינויים ברמת המתילציה אינם מתרחשים בכל התאים שנבדקו, כלומר, התגלה דגם שהינו יחסית אקראי מבחינת העמדות הממותלות ברצפים השונים אך יחד עם זאת בסיכום הנתונים מתגלה דפוס הדומה בכל העמדות. בכל שלושת עמדות אלו נצפתה עליה ברמת המתילציה ב-10 דקות הראשונות, עליה של 27%, 18% ו-9% בהתאמה. בין 10 דקות לשלושים דקות נרשמה ירידה ברמת המתילציה בחזרה לרמה הנמוכה מרמת המתילציה אצל הפרטים הנאיבים. לאחר שעתיים נרשמה עליה נוספת ברמת המתילציה בכל העמדות. העלייה המשמעותית ביותר נמדדה ב-M1 - עליה לרמה גבוהה ב-27% ביחס לאפרוחים הנאיביים. יש לציין שבגלל המדגם הקטן יחסית, הבדלים אלו יכולים להיות אקראיים.



תרשים 8 – רמת המתילציה בעמדות CpG-M1
3 באזור הפרומוטור של TRH במהלך התנית חום של אפרוחים
 במספר נקודות זמן במהלך התנית חום של אפרוחים ביום השלישי לחייהם, DNA הופק מה-PVN ועבר מודיפיקציה sodium bisulphate ע"י ערכת Imprint DNA Modification Kit. רמת המתילציה נקבעה על ידי החדרה לחיידקים קומפוננטים שיבוט וריצוף מקטעים. A. סכמה המתארת את מיקום עמדות CpG יחסית לאתר תחילת השעתוק של הגן TRH. העמדות בהן נמדדה רמת המתילציה מסומנות כ-M1-5 וצוין מיקומן המדויק. B. תיאור רמת המתילציה במקטעים כאשר עיגול שחור מייצג עמדה ממותלת ועיגול אפור עמדה לא ממותלת. כל נקודת זמן מייצגת את רמת המתילציה ב-3 אפרוחים, לכל אפרוח 2-5 מקטעים מרוצפים.

4.4 רמת מתילציה בעמדה M4 על גבי הפרומוטור של TRH עולה במהלך התניית חום של אפרוחים ביום השלישי לחייהם

M4 הינה עמדת ה-CpG שממוקמת על אזור הקישור של HSF2. על גבי עמדה זו חלה עליה ברמת המתילציה במהלך התניית החום (תרשימים 9A,B). תוצאות אלו התקבלו מניתוח מקטעים שרופו לאחר ריאקציה sodium bisulphate. על פי התוצאות בעמדה זו, עליה של 24% ברמת המתילציה ב-10 דקות הראשונות להתניית החום, לאחר 30 דקות חלה ירידה קלה ברמת המתילציה לרמה שגבוהה ב-13% מרמת המתילציה של האפרוחים הנאיבים. ולאחר שעתיים רמת המתילציה חוזרת לרמתה ההתחלתית שלפני ההתניה. על מנת להדגיש את האפקט של התניית החום על רמות המתילציה בעמדה M4 רוצפו גם מקטעים של אפרוחים בזמנים השונים של התניית החום שרמת ה-mRNA של TRH היחסית שלהם הייתה דומה לרמתו באפרוחים הנאיבים. תוצאות אלו מוצגות ביחס לרמות המתילציה של אפרוחים שרמת ה-mRNA שלהם גבוה ובזמנים שרמת המתילציה שונה מזו של האפרוחים הנאיבים (תרשים 9B). על פי התרשים ניתן לראות שלאחר עשר דקות בהתניית החום רמת המתילציה באפרוחים שלא הגיבו להתניית החום לא השתנתה, בניגוד לאפרוחים שכן הגיבו שם הייתה עליה של 24% ברמת המתילציה. לאחר 30 דקות באפרוחים שלא הגיבו, לא רק שלא נרשמה עליה במתילציה אלא נרשמה ירידה של 31% ברמת המתילציה לעומת אפרוחים נאיבים מול עליה של 13% באפרוחים שהגיבו להתניה.

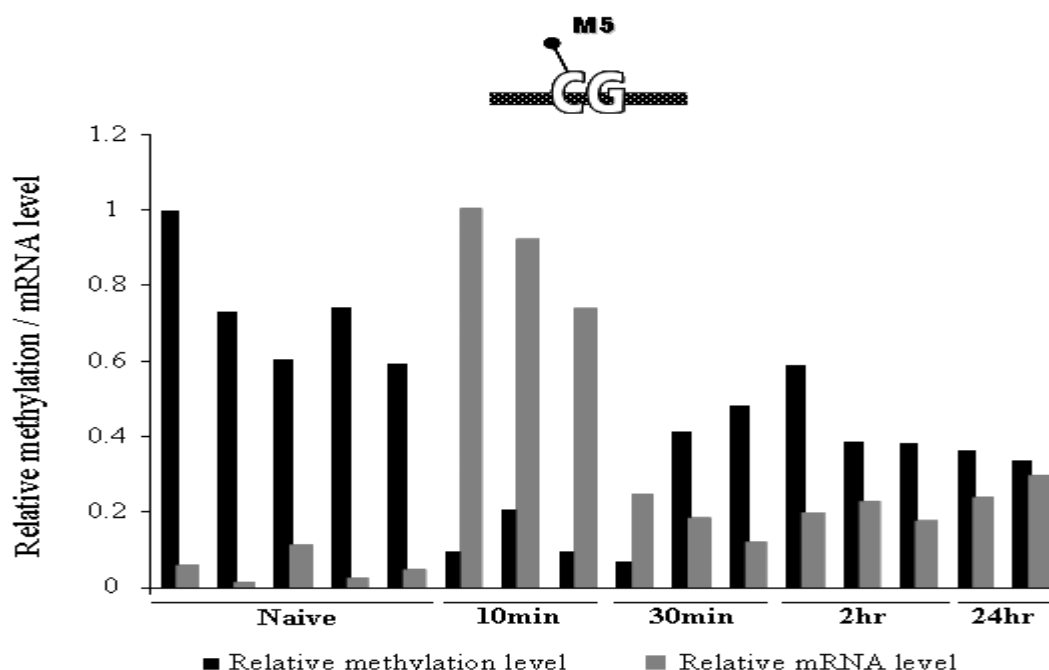


תרשים 9 - רמת המתילציה בעמדה M4 במקטע הפרומוטור של הגן TRH במהלך התניית החום. במספר נקודות זמן במהלך התניית חום של אפרוחים ביום השלישי לחייהם, DNA הופק מה-PVN ועבר מודיפיקציה sodium bisulphate ע"י ערכת Imprint DNA Modification Kit. רמת המתילציה נקבעה על ידי החדרה לחיידקים קומפוננטים שיבוט וריצוף מקטעים. A. תיאור רמת המתילציה במקטעים כאשר עיגול שחור מייצג עמדה ממותלת ועיגול אפור עמדה לא ממותלת. כל נקודת זמן מייצגת את רמת המתילציה ב-3 אפרוחים, לכל אפרוח 2-5 מקטעים מרוצפים. B. סכמה המתארת את רמות המתילציה של אפרוחים שהגיבו להתניית החום על פי רמת ה-mRNA ב-PVN (responded) מול אפרוחים שלא הגיבו (did not respond). קו מלא מתאר אפרוחים שהגיבו, קו מקווקו מתאר אפרוחים שלא הגיבו. כל נקודת זמן המתארת אפרוחים שלא הגיבו מייצגת שלושה מקטעים מרוצפים מפרט יחיד.

4.5 רמת מתילציה בעמדה M5 על גבי האינטרון של TRH יורדת במהלך התניית חום של אפרוחים ביום השלישי לחייהם ונמצאת ביחס הפוך לרמת ה-mRNA

העמדה האחרונה שאופיינה מבחינת שינויים ברמת המתילציה במהלך התניית החום היא עמדה M5, עמדה זו נמצאת על האינטרון שנמצא אחרי אתר תחילת השעתוק ולא על גבי הפרומוטור ולכן נותחה בנפרד ובאופן שונה (תרשים 10). מפני שעמדה זו היא עמדה בודדת, הניתוח התבצע בעזרת Methylation

DNA-specific PCR. נמצא כי במהלך התניית החום ביום השלישי חלה ירידה ברמת המתילציה בעמדה זו ביחס לאפרוחים הנאיבים. נמצא יחס הפוך ברור בין רמות המתילציה בעמדה M5 לרמות ה-mRNA של TRH בפרטים השונים, עובדה זו מודגשת בתרשים על ידי ציון נתוני רמת המתילציה של הפרטים שנבדקו באופן יחידני לצד נתוני ה-mRNA של TRH של אותו פרט. רמות המתילציה באפרוחים הנאיבים הן הגבוהות ביותר כאשר ממוצע רמת המתילציה היחסית בזמן זה הוא 73% וממוצע רמת ה-mRNA היחסית הוא 1.12. לאחר 10 דקות יורדת רמת המתילציה לממוצע של 13% בלבד עם ממוצע mRNA של 22.11. לאחר 30 דקות עולה רמת המתילציה ועומדת על 32% כאשר ממוצע mRNA הוא 4.4. ובזמנים של שעותיים ו-24 שעות אין שינוי ניכר ברמת המתילציה ביחס ל-30 דקות, 45% ו-35% בהתאמה עם ממוצעי mRNA 4.8 ו-6.56.

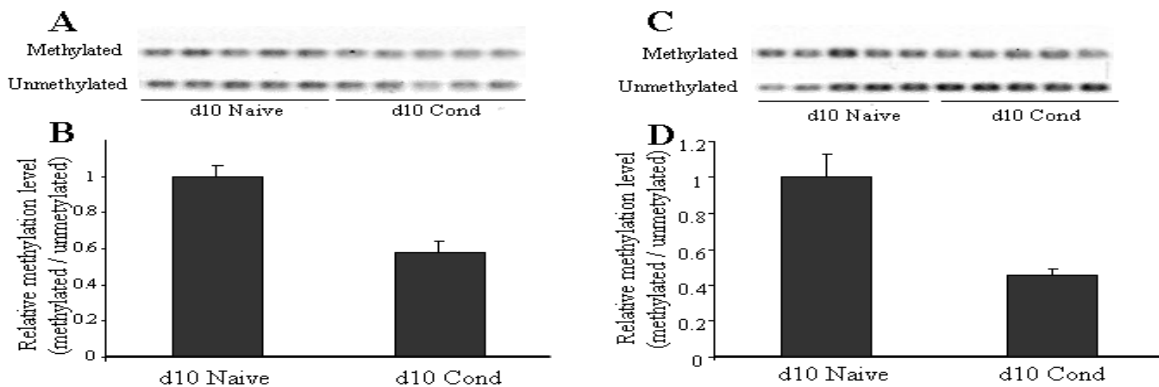


תרשים 10 - רמת המתילציה בעמדה M5 במקטע האינטרון של הגן TRH במהלך התניית החום אל מול ערכי mRNA של TRH. במספר נקודות זמן במהלך התנית חום של אפרוחים ביום השלישי לחייהם, DNA הופק מה-PVN ועבר מודיפיקציה sodium bisulphate ע"י ערכת Imprint DNA Modification Kit. רמת המתילציה נקבעה על ידי Methylase specific PCR וזאת כאשר אותן דוגמאות עברו ריאקציה PCR עם תחל ימיני השונה בנוקליאוטיד יחיד. במיקום בו בהתקיימות מתילציה, cytosine אינו יכול להפוך ל-uracil בזמן ריאקציה הביסולפט, ועל כן ההבדל בין הרצפים. תוצרי ה-PCR עברו אלקטרופורזה והתוצאות עובדו בתכנת ImageJ. היחס בין המקטעים הממותלים למקטעים הלא ממותלים הוא המוצג בתרשים. העמודות השחורות מתארות את רמת המתילציה היחסית על עמדה M5 של הפרטים המוצגים והעמודות האפורות מייצגות את הרמה היחסית של ה-mRNA של TRH של הפרטים המוצגים.

4.6 רמת המתילציה הבסיסית ביום העשירי בעמדות M4 ו-M5 באזורי הבקרה של TRH נמוכה באפרוחים מותנים לעומת לא מותנים לחום.

לאחר שנבחנה רמת ודפוס המתילציה לאורך היום השלישי באתרי ה-CpG השונים והתגלה שקיים שינוי בדפוס המתילציה כתוצאה מהתניית החום נבחנו רמות המתילציה הבסיסיות ביום העשירי בשתי עמדות שהראו שינויים משמעותיים בקורולציה עם רמות ביטוי הגן TRH: M5 – שהציגה שינויים דינאמיים ביותר בדפוס המתילציה לאורך היום השלישי ונמצא ביחס הפוך לרמת ביטוי הגן M4 – שהראתה גם

היא שינוי בדפוסי המתילציה ומוכרת כעמדה היושבת על אתר הקישור של HSF2 בפרומוטור של TRH. נמצא שעל גבי שתי העמדות התקיימה ירידה ברמת המתילציה באפרוחים שהותנו בתקופה הקריטית להתפתחות מערכת בקרת הטמפרטורה ביחס לאפרוחים שלא הותנו בתקופה זו. ביום העשירי לחיי האפרוחים הרמה הבסיסית של המתילציה על גבי עמדה M4 (תרשים 11B) באפרוחים שלא הותנו לחום ביום השלישי לחייהם גבוהה פי 1.7 ± 0.06 מהרמה הבסיסית באפרוחים שהותנו לחום (ההבדל הינו במובהקות של $p=0.06$). על גבי עמדה M5 (תרשים 11D) באפרוחים שלא הותנו לחום רמת המתילציה הבסיסית גבוהה פי 2.2 ± 0.24 מרמת המתילציה באפרוחים שהותנו, אולם הבדל זה אינו מובהק ($p=0.12$).

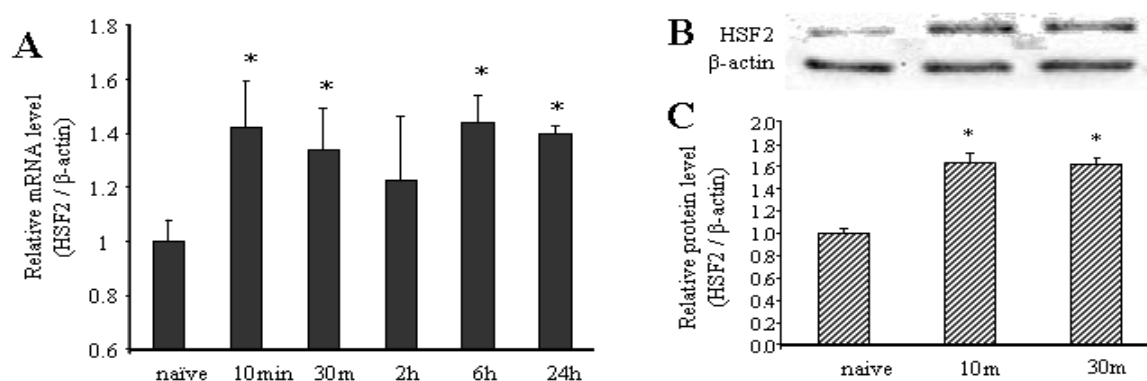


תרשים 11 - רמת המתילציה הבסיסית בעמדות M4 ו-M5 ביום עשר באפרוחים מותנים ביחס ללא מותנים. אפרוחים מותנים גודלו עד ליום 3 בטמפרטורה של 30°C וביום השלישי הועברו ל- 37.5°C למשך של 24 שעות והוחזרו לטמפרטורה של 30°C . לאחר שבעה ימים נבדקה שוב רמת מתילציה. אפרוחים לא מותנים גודלו עד ליום 10 בטמפרטורה של 30°C לחייהם ואז נמדדה רמת המתילציה על גבי הפרומוטור של TRH. רמת המתילציה נקבעה על ידי Methylation specific PCR וזאת כאשר אותן דוגמאות עברו ריאקציה PCR עם תחילי ימיני השונה בנוקליאוטידי יחיד. במיקום בו בהתקיימות מתילציה, cytosine אינו יכול להפוך ל-uracil בזמן ריאקציה הביסולפט, ועל כן ההבדל בין הרצפים. תוצרי ה-PCR עברו אלקטרופורזה והתוצאות עובדו בתכנת ImageJ. **A.** גל המייצג את רמת המתילציה בעמדה M4, כל זוג מייצג פרט בודד. שורה עליונה רצף ממותל, שורה תחתונה רצף לא ממותל. חמשת הזוגות הראשונים – אפרוחים שאינם מותנים, החמישיה השניה אפרוחים מותנים. **B.** המחשה גרפית לממוצע היחס בין המקטעים הממותלים למקטעים הלא ממותלים. **C.** גל המייצג את רמת המתילציה בעמדה M5, כל זוג מייצג פרט בודד. שורה עליונה רצף ממותל, שורה תחתונה רצף לא ממותל. חמשת הזוגות הראשונים – אפרוחים שאינם מותנים, החמישיה השניה אפרוחים מותנים. **D.** המחשה גרפית לממוצע היחס בין המקטעים הממותלים למקטעים הלא ממותלים. נבדקו 5 אפרוחים בכל טיפול $\pm$ SEM.

4.7 רמת הביטוי של HSF2 עולה במהלך התניית החום ביום השלישי לחיי האפרוחים

לאחר שנבחנו רמות המתילציה על גבי אתרי ה-CpG השונים באזורי הבקרה של הגן TRH ומאחר שנצפו שינויים משמעותיים ברמות המתילציה על גבי אתרים אלו, נבדקו ההשלכות האפשריות לשינויים אלו ברמת המתילציה ולסיבות האפשריות לקשר בין השינויים ברמת המתילציה לשינויים ברמת הביטוי של הגן TRH. רצף הבקרה נותח בעזרת תוכנה המזהה אתרי הכרה של גורמי שעתוק (Tfsitescan) ונמצא כי מתוך חמש עמדות ה-CpG הנבדקות, העמדה M4 מהווה חלק מאתר הכרה של Heat Shock Factor 2 (HSF2) שהינו גורם שעתוק רלוונטי למצבי עקת חום. על מנת לקבוע קיום השפעת פקטור השעתוק HSF2 על רמת ביטוי הגן TRH נבחנה קודם רמת הביטוי של HSF2 ב-PVN (תרשים 12). המדידות נעשו בעזרת real-time PCR ל-cDNA שהופק מ-mRNA מהרקמה ו-Western blot לרמת החלבון. התוצאות שהתקבלו מצביעות על עליה ברמת הביטוי של הגן HSF2 כאשר רמת ביטוי גבוהה נשארת לאורך כל היום השלישי. לאחר עשר דקות בהתניית החום עולה רמתו של ה-mRNA לפי 1.42 ± 0.17 מרמתו ההתחלתית.

לאחר מכן בזמנים 30 דקות, שעתיים, 6 שעות ו-24 שעות רמת ה-mRNA הינה פי 1.34 ± 0.15 , 1.22 ± 0.24 , 1.44 ± 0.1 ו- 1.4 ± 0.03 , בהתאמה, מרמתו באפרוחים הנאיבים. תוצאות רמת החלבון בתא מראות דפוס מתאים של עליה ברמת החלבון לאחר 10 ו-30 דקות לרמה של פי 1.63 ± 0.08 ו- 1.61 ± 0.07 ביחס לנאיבים.

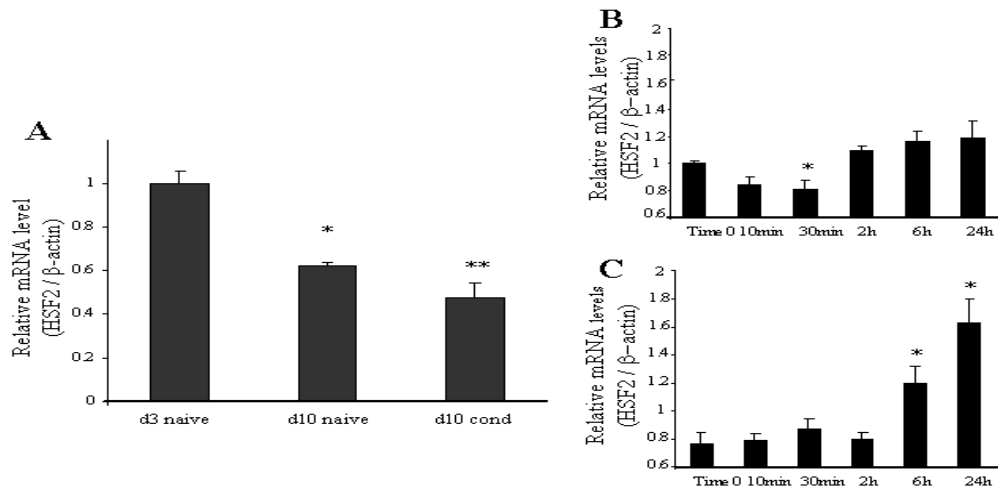


תרשים 12 - רמת הביטוי של HSF2 במהלך התניית החום ביום השלישי לחיי האפרוחים. האפרוחים גודלו עד ליום השלישי לחייהם בטמפרטורה של 30°C וביום השלישי הועברו ל- 37.5°C למשך 24 שעות. **A.** תוצאות real-time PCR כשכלל דוגמא בוצע נרמול לביטוי הגן β -actin. כל עמודה מייצגת את ממוצע ביטוי ה-mRNA של 6-8 אפרוחים $\pm$ SEM. **B.** גל Western blot מייצג. כל נקודת זמן מייצגת את רמת החלבון באפרוח אחד. **C.** דנסיטומטריה של תוצאות ה-Western blot נמדדה בעזרת התוכנה ImageJ 1.30. כל נקודת זמן מייצגת את היחס בין כמות החלבון HSF2 באותה נקודה לבין הכמות שנמדדה לפני התניית החום. על מנת למזער הבדלים הנובעים מהטענה לא אחידה כמות החלבון HSF2 בכל דוגמא הושוותה לכמות החלבון β -actin שכמותו בתאים לא משתנה. כל נקודת זמן מייצגת את הממוצע של 5-6 אפרוחים $\pm$ SEM, * $p < 0.05$.

4.8 רמת הביטוי הבסיסית של ה-mRNA של HSF2 יורדת ביום העשירי לחיי האפרוחים בתגובה להתניית חום ועולה במהלך חשיפה חוזרת

לאחר שנצפו שינויים בביטוי הגן HSF2 במהלך התקופה הקריטית להתפתחות בקרת הטמפרטורה נבדקה השלכת התניית החום על רמת הביטוי של HSF2 ביום העשירי באפרוחים מותנים ולא מותנים. נמצא שמתקיימת ירידה כללית ברמת הביטוי הבסיסית (לפני חשיפה לחום) של HSF2 בין היום השלישי ליום העשירי אך גם ברמתו באפרוחים מותנים ביחס ללא מותנים (תרשים 13A). מתקיימת ירידה של $38\% \pm 0.06$ בין רמת הביטוי באפרוחים ביום השלישי לאפרוחים לא מותנים ביום העשירי וירידה של $53\% \pm 0.02$ כמו כן, רמת הביטוי הבסיסית של HSF2 ביום העשירי באפרוחים מותנים נמוכה ב- $25\% \pm 0.07$ מרמת הביטוי הבסיסית שלו באפרוחים לא מותנים ביום זה. נמצאו גם הבדלים בין דפוסי הביטוי של פקטור השעתוק באפרוחים מותנים לאפרוחים שאינם מותנים (תרשימים 13B,C). באפרוחים מותנים רמת ה-mRNA נותרת ברמה יציבה, נמוכה עד לשעה השישית אז נצפתה עליה משמעותית מאוד. באפרוחים שאינם מותנים מתרחשת ירידה ברמת הביטוי לאחר 10 ו-30 דקות של פי 0.84 ± 0.08 ו- 0.8 ± 0.09 בהתאמה ביחס לאפרוחים נאיבים כאשר קיים הבדל מובהק ב-30 דקות, לאחר מכן אין הבדל בביטוי הגן ביחס אפרוחים הנאיבים (בזמנים שעתיים, 6 ו-24 שעות רמת הביטוי של 1.1 ± 0.06 , 1.15 ± 0.12 ו- 1.19 ± 0.17 בהתאמה). באפרוחים מותנים לעומת זאת בשעה השישית ו-24 שעות מתחילת

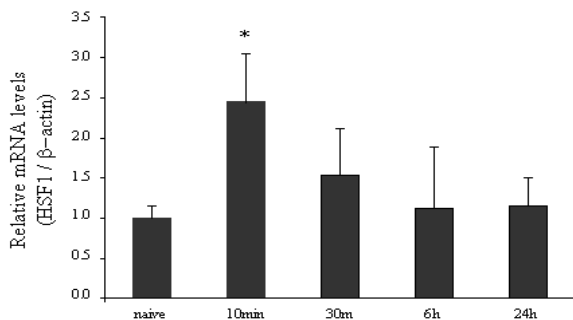
החשיפה רמות הביטוי עולות ל- 1.6 ± 0.21 ו- 2.13 ± 0.17 השונות באופן מובהק מרמת הביטוי באפרוחים הנאיבים.



תרשים 13 - רמת הביטוי של ה-mRNA של HSF2 ביום עשר באפרוחים מותנים ביחס ללא מותנים. A. רמת הביטוי של ה-mRNA של HSF2 לפני חשיפה לחום ביום 3 וביום 10. אפרוחים מותנים גודלו עד ליום 3 בטמפרטורה של 30°C וביום השלישי הועברו ל- 37.5°C למשך של 24 שעות והוחזרו לטמפרטורה של 30°C . לאחר שבעה ימים נמדדה שוב רמת ה-mRNA. אפרוחים מותנים גודלו עד ליום 10 לחייהם בטמפרטורה של 30°C ואז נמדדה רמת ה-mRNA הבסיסית ב-PVN. B. רמת ה-mRNA באפרוחים שאינם מותנים לאורך חשיפה לחום ביום העשירי. C. רמת ה-mRNA באפרוחים מותנים לאורך חשיפה לחום ביום העשירי. תוצאות real-time PCR כשכלל דוגמא בוצע נרמול לביטוי הגן β -actin. כל עמודה מייצגת את ממוצע ביטוי ה-mRNA של 6-8 אפרוחים $\pm$ SEM, * $p < 0.05$, ** רמת מובהקות באפרוחים מותנים של $p < 0.05$ ביחס לאפרוחים שאינם מותנים ונאיבים.

4.9 רמת ביטוי ה-mRNA של HSF1 עולה במהלך התניית החום ביום השלישי לחיי האפרוחים

על מנת לאתר את המנגנון המשתתף בקישור HSF2 לאתר הקישור נבדקו גם רמות הביטוי של HSF1 ב-PVN. נמצא כי חלה עליה ברמת הביטוי של HSF1 לאחר 10 דקות וירידה לאחריו (תרשים 14). רמת הביטוי של פקטור השעתוק 10 דקות מתחילת החשיפה לחום הינה פי 2.45 ± 0.61 ביחס לאפרוחים נאיבים כאשר ב-30 דקות, 6 ו-24 שעות חלה ירידה בביטוי עד לרמה הדומה לרמת הביטוי באפרוחים הנאיבים, 1.54 ± 0.39 , 1.13 ± 0.34 ו- 1.16 ± 0.33 בהתאמה.

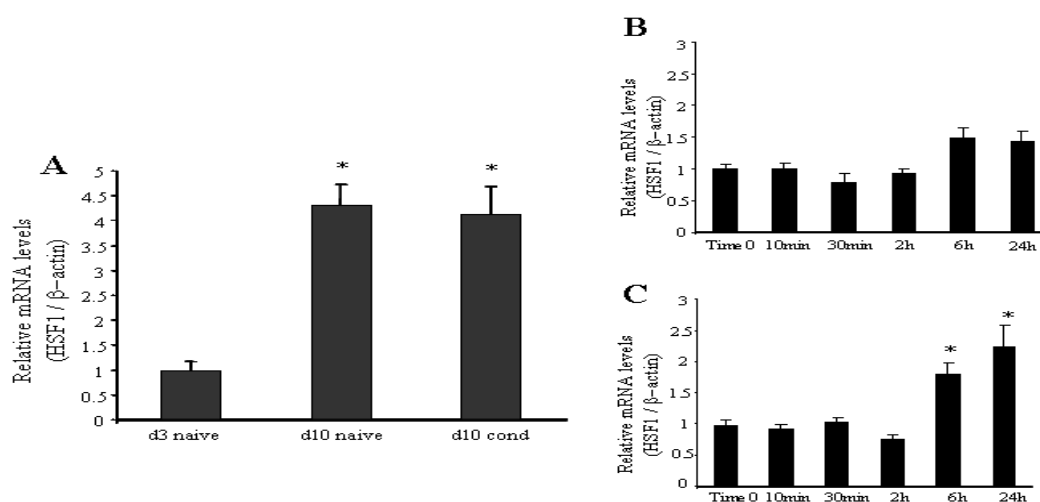


תרשים 14 - רמת ביטוי ה-mRNA של HSF1 במהלך התניית החום ביום השלישי לחיי האפרוחים. האפרוחים גודלו עד ליום השלישי לחייהם בטמפרטורה של 30°C וביום השלישי הועברו ל- 37.5°C למשך 24 שעות. תוצאות real-time PCR כשכלל דוגמא בוצע נרמול לביטוי הגן β -actin. כל עמודה מייצגת את ממוצע ביטוי ה-mRNA של 6-8 אפרוחים $\pm$ SEM, * $p < 0.05$.

4.10 רמת ביטוי ה-mRNA של HSF1 עולה בתגובה להתניית חום בחשיפה חוזרת ביום העשירי לחיי האפרוחים

בכדי לתאר את השפעת התנית החום לאורך זמן נבדקו רמות ה-mRNA הבסיסיות (לפני חשיפה לחום) ולאורך היום העשירי של (במהלך החשיפה לחום) HSF1. נמצא כי רמות הביטוי הבסיסיות של הגן עולות עם הזמן אך ללא קשר להתניה (תרשים 15A). רמת הביטוי באפרוחים שאינם מותנים לפני חשיפה לחום ביום 10 הינה פי 4.29 ± 0.43 ביחס לאפרוחים נאיבים ביום השלישי כשרמת הביטוי לפני חשיפה לחום

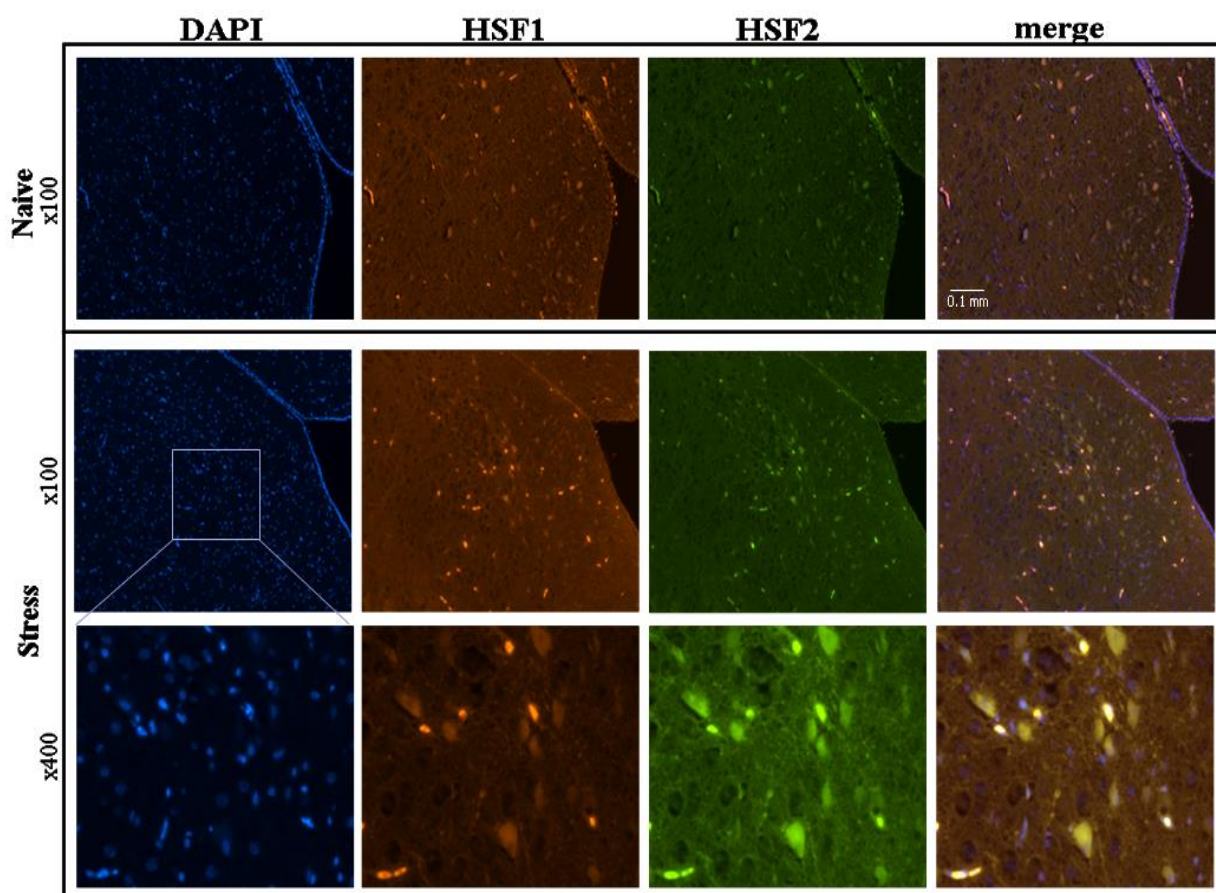
ביום 10 באפרוחים שהותנו היא פי 4.13 ± 0.57 ביחס לאפרוחים ביום השלישי. נמצא גם כי בעוד רמת הביטוי נותרת קבועה באופן יחסי לאורך היום העשירי באפרוחים שאינם מותנים, באפרוחים מותנים רמת ה-mRNA קבועה עד לשעה השישית ולאחר מכן עולה באופן משמעותי (תרשימים 15B,C). באפרוחים שאינם מותנים רמת הביטוי לאחר 10, 30 דקות ושעתיים הינה 1.01 ± 0.08 , 0.79 ± 0.14 ו- 0.93 ± 0.08 בהתאמה ביחס לאפרוחים הנאיבים, כאשר בשעות 6 ו- 24 חלה עליה קלה והרמות הן 1.49 ± 0.16 ו- 1.44 ± 0.16 בהתאמה. באפרוחים מותנים רמת הביטוי לאחר 10, 30 דקות ושעתיים הינה 0.95 ± 0.08 , 1.05 ± 0.08 ו- 0.78 ± 0.08 בהתאמה ביחס לאפרוחים הנאיבים, כאשר בשעות 6 ו- 24 חלה עליה משמעותית והרמות הן 1.86 ± 0.18 ו- 2.32 ± 0.36 בהתאמה ביחס לנאיבים.



תרשים 15 - רמת הביטוי של ה-mRNA של HSF1 ביום עשר באפרוחים מותנים ביחס ללא מותנים. A. רמת הביטוי של ה-mRNA של HSF1 לפני חשיפה לחום ביום 3 וביום 10. אפרוחים מותנים גודלו עד ליום 3 בטמפרטורה של 30°C וביום השלישי הועברו ל- 37.5°C למשך של 24 שעות והוחזרו לטמפרטורה של 30°C . לאחר שבעה ימים נמדדה שוב רמת ה-mRNA. אפרוחים לא מותנים גודלו עד ליום 10 לחייהם בטמפרטורה של 30°C ואז נמדדה רמת ה-mRNA הבסיסית ב-PVN. B. רמת ה-mRNA באפרוחים שאינם מותנים לאורך חשיפה לחום ביום העשירי. C. רמת ה-mRNA באפרוחים מותנים לאורך חשיפה לחום ביום העשירי. תוצאות real-time PCR כשכלל דוגמא בוצע נרמול לביטוי הגן β -actin. כל עמודה מייצגת את ממוצע ביטוי ה-mRNA של 6-8 אפרוחים $\pm$ SEM, * $p < 0.05$.

4.11 מתקיימת קולוקליזציה של פקטורי השעתוק HSF2 ו-HSF1 ב-PVN

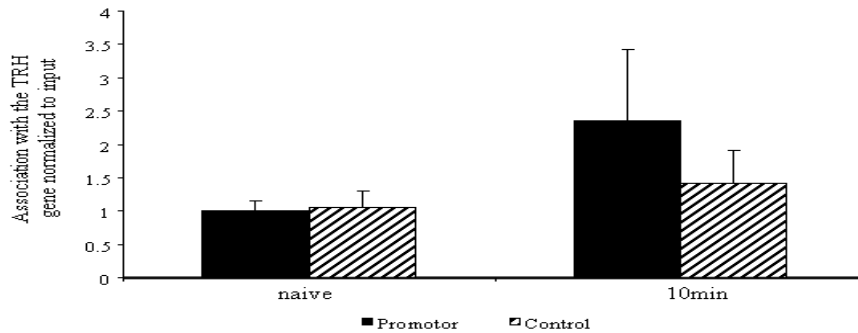
עבודה שנעשתה על אינטראקציה HSF2-HSF1 מגלה כי בזמן חשיפה לחום מתקיים קומפלקס של הפקטורים וישנה זהות מוחלטת במיקום פקטורי השעתוק בצביעה אימונופלוורוסנטית. לכן, על מנת להראות זהות במיקום של פקטורי השעתוק ב-PVN בוצעה צביעה אימונופלוורוסנטית של כל אחד מהם בנפרד בעזרת נוגדנים ספציפיים. מן התוצאות המתקבלות יש לציין מספר פרטים. ראשית, במיזוג בתמונות ניתן להבחין כי ישנה זהות כמעט מוחלטת במיקומם של שני פקטורי השעתוק. שנית, עוצמת הזריחה של התאים בהם קיימים הפקטורים גבוהה באופן משמעותי באפרוחים לאחר החשיפה לחום ביחס לתאים אלו באפרוחים נאיבים (תרשים 16), דבר המעיד על עליה בריכוז הפקטורים בתאים כתוצאה מהחשיפה. לבסוף, בספירה של תאים נמצא כי כ-34 תאים מבטאים את פקטורי השעתוק באפרוחים לאחר החשיפה לחום לעומת 18 תאים באפרוחים נאיבים, עליה של כמעט פי 2 בכמות התאים המגיבים לחום. יש לציין ששיטה זאת איננה כמותית ומידת ההגברה היא מוערכת בלבד.



תרשים 16 – קולוקליזציה של פקטורי השעתוק HSF1 ו-HSF2. צביעה אימונופלוורוסנטית של ה-PVN בחתכים סגיתיים לפני החשיפה לחום (שורה עליונה) ו-20 דקות מתחילת החשיפה (שורות תחתונות). התמונות של אפרוחים נאיבים מוצגות בהגדלה של $\times 100$ ושל אפרוחים בזמן החשיפה לחום (stress) בהגדלות של $\times 100$ ו- $\times 400$. בטור השמאלי מוצגות תמונות שנצבעו בצביעת גרעינים (DAPI), בטור השני משמאל מוצגים אותם שדות בצביעה עם נוגדן פוליקלונלי ספציפי ל-HSF1 ונוגדן anti-rabbit IgG מצומד ל-Cy3. בטור השלישי משמאל אותם שדות בצביעה עם נוגדן מונוקלונלי ספציפי ל-HSF2 ונוגדן anti-mouse IgG מצומד ל-Alexa Flour. הטור הימני מציג את מיזוג התמונות הימניות ומדגים את הקולוקליזציה של הפקטורים.

4.12 רמת הקישור של HSF2 לפרומוטור של TRH עולה 10 דקות לאחר תחילת ההתניה לחום

על גבי הפרומוטור של TRH קיים אתר קישור לפקטור השעתוק HSF2. בכדי להסביר את הקשר בין העלייה ברמות הביטוי של TRH לעליה ברמות פקטורי השעתוק HSF1 ו-HSF2 ב-PVN בוצעה השקעת כרומטין - Chromatin Immunoprecipitation (ChIP). ChIP הינו מבחן הנועד, בין השאר, לקבוע את מידת הקישור של חלבון למקטע DNA. תוצאות המבחן מעידות על קיום אסוציאציה בין HSF2 לאתר הקשירה על גבי הפרומוטור של TRH ואף על עליה ברמת הקישור לאחר 10 דקות של חשיפה לחום (תרשים 17). רמת הקישור 10 דקות מתחילת החשיפה גבוהה פי 2.34 ± 1.03 ביחס לאפרוחים לפני תחילת החשיפה לחום (אם כי הבדל זה אינו מובהק $p=0.28$). על מנת להדגיש את הקישור הספציפי נבדקה רמת הקישור כ- 3000bp במורד הזרם מאתר הקישור ונמצא כי מתקיימת עליה לא משמעותית של פי 1.32 ± 0.49 בלבד ביחס לאפרוחים נאיבים. תוצאות אילו מהוות מגמה ברורה אך יש להוסיף פרטים על מנת לוודא מובהקות סטטיסטית סיגניפיקנטית.

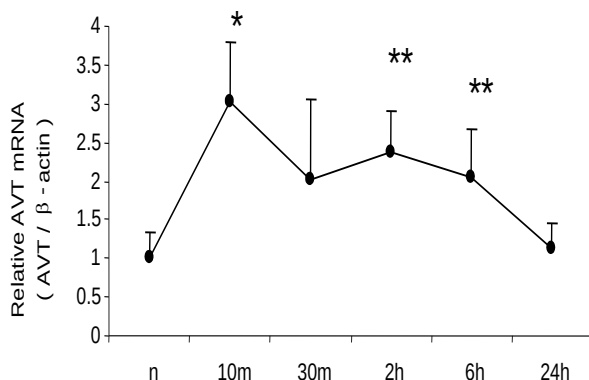


תרשים 17 - בחינת מידת הקישור של HSF2 לאזור הפרומוטור של TRH בעזרת ריאקציה ChIP. כרומטין מדוגמאות PVN שעבר קיבוע הושקע עם נוגדן כנגד HSF2 או ללא נוגדן כביקורת. לאחר ההשקעה הופק ה-DNA ונ"י real-time PCR עם תחלים לאזור הפרומוטור של TRH (-495bp - -757bp) ולאזור בקרה (2443bp - 2537bp), נמדדה מידת הקישור של החלבון ל-DNA. כל עמודה מתארת היחס בין מידת הקישור של החלבון לבין תוצאות דוגמאות input 1% שלא עברו השקעה ± SEM. כל נקודת זמן מייצגת את ממוצע הקישור של 5 אפרוחים.

ביטוי ה-mRNA של AVT עלה בעקבות התנית החום באפרוחים ביום השלישי לחייהם.

בכדי לבחון את השפעת התנית החום על רמת ביטוי ההורמון AVT בהיפותלמוס של אפרוחים הנמצאים בשלהי התקופה הקריטית של התפתחות בקרת הטמפרטורה טמפרטורת הגוף, נחשפו אפרוחים ביום השלישי לאחר הבקיעה לטמפרטורה של 37.5 °C, למשך 24 שעות. במהלך 24 שעות החשיפה האפרוחים הוקרבו בזמנים שונים המופיעים באיור 18 ורקמת ה-paraventricular nucleus הוצאה בניתוח. רמת ה-mRNA של ההורמון נבדקה באמצעות Real time PCR. נמצא כי רמת ה-mRNA של AVT אכן עולה בצורה משמעותית במהלך החשיפה לחום. כבר לאחר 10 דקות מתחילת החשיפה רמת ה-AVT עלתה פי 3.0±0.7. לאחר שעתיים רמת הביטוי גבוהה פי 2±1 ולאחר שש שעות פי 2.4±0.5. לאחר 24 שעות ישנה חזרה לרמת הבסיס כאשר רמת הביטוי הינה פי

1.1±0.3



איור 18 - ביטוי ה-mRNA של AVT באפרוחים שעברו התנית חום ביום 3.

רמת ה-mRNA של AVT ב-PVN נמדדה בעזרת real-time PCR במהלך התנית חום של אפרוחים ביום השלישי לאחר הבקיעה. מידת הביטוי הושוותה לביטוי הגן β-actin. כל נקודה מייצגת את ממוצע הביטוי של שמונה אפרוחים ± SEM, *p<0.01, **p<0.05.

4.3 ירידה ברמת המטילציה הכללית על האינטרון הראשון לאחר שעתיים של התנית חום ביום השלישי לחייהם של האפרוחים.

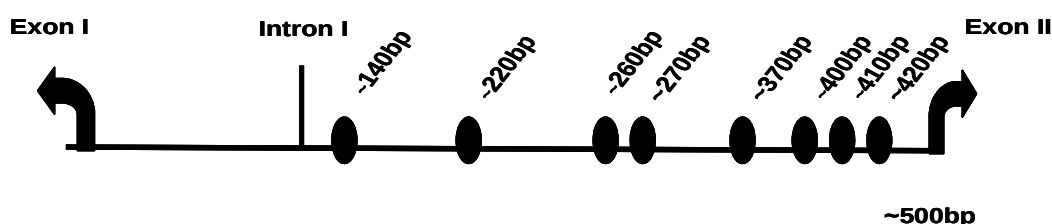
מאחר ורמת mRNA של AVT עולה בהתנית חום, בדקתי בשלב הבא, מהו המנגנון אשר מאפשר שינוי זה. לצורך כך התרכזתי בבחינת רמות המטילציה של ה-DNA באזור הבקרה של AVT.

מאחר וההנחה בספרות היא שלאיי CpG חשיבות בבקרה על ביטוי הגן, בוצעה סריקה *In silio* של רצף הגן למציאת אזורים המכילים איי CpG. סריקה זו גילתה כי איזור הבקרה שלפני האקסון השני מכיל אזור עשיר באיי CpG (איור 19A).

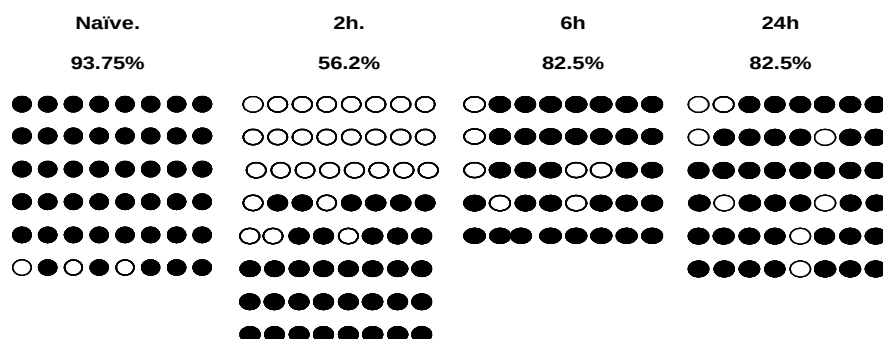
בכדי להבין את מידת ההשפעה של התנית חום על המטילציה של אינטרון זה בזמן התקופה הקריטית והשלכותיה על הסתגלות האפרוחים לחום ביצענו מדידה של רמת המטילציה על האינטרון הראשון בשמונה אתרי מטילציה (איור 19B).

בדיקה של רמת המטילציה בזמן התנית החום בתקופה הקריטית העלתה שאפרוחים שלא החלו את ההתניה התרמית אופיינו ברמת מטילציה גבוהה על האינטרון כולו של כ 93.8% (איור 3B). לאחר שעתיים ישנה ירידה ניכרת ברמת המטילציה הכוללת ל 56% (איור 3B). כשש שעות לאחר התנית החום רמת המטילציה הכללית עולה ל 82.5%. (איור 19B). לאחר כעשרים וארבעה שעות לאחר תחילת התנית החום אחוז המטילציה הכללי נשמר על 83% (איור 19B).

A



B

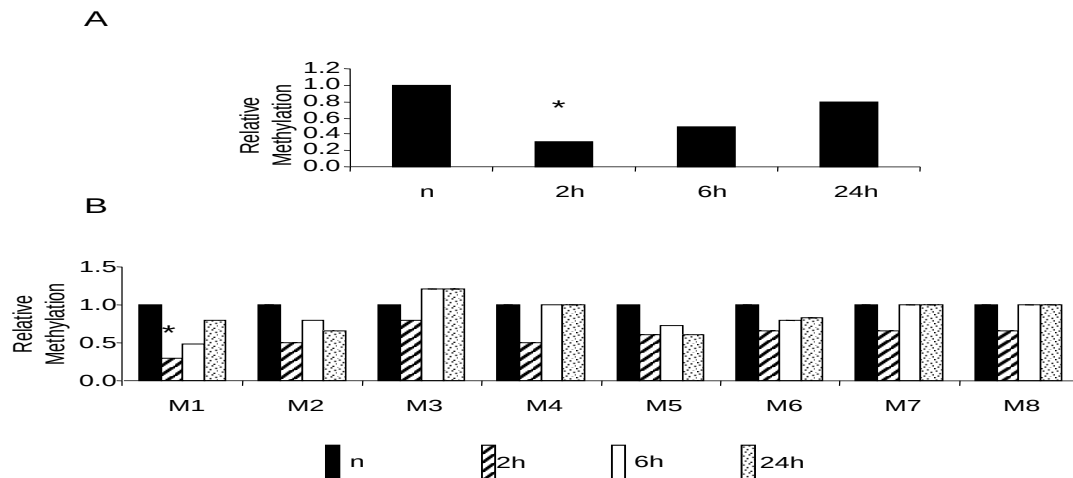


איור 19 - רמת המטילציה על שמונה אתרי מטילציה שעל האינטרון הראשון של הגן AVT.
A. הצגה סכמתית של האינטרון הראשון ועליו שמונת אתרי המטילציה. B. הצגה סכמתית של רצפי האינטרון הראשון בארבעה נקודות זמן. נקודה מושחרת הינה אתר ממוטל. נקודה ריקה הינה אתר שאינו ממוטל. הרצפים הם משלושה עד ארבעה אפרוחים. המטילציה נקבעה ע"י קביעת רצף של המקטע לאחר טיפול בביסולפיט.

4.4 רמת המטילציה בעמדה M1 יורדת בעקבות התנית חום של אפרוחים ביום השלישי לחייהם.

ניתוח כמותי של רמת המטילציה בעמדות השונות נמצא כי רמת המטילציה בעמדה M1 יורדת בצורה חדה בזמן התנית החום ביום 3. כבר אחרי שעתיים מתחילת התנית החום רמת המטילציה על עמדה זו יורדת פי 2.5 ± 0.1 , רמה זו נשמרת לאחר שש שעות (פי 2 ± 0.2 לעומת רמת הבסיס) (איור 20A). לאחר עשרים וארבע שעות של התנית חום רמת המטילציה שבה כמעט לרמת הבסיס (נמוכה פי 1.25 ± 0.2).

לעומת רמת הבסיס) (איור 20A). שאר עמדות המטילציה אינן מראות שינוי מובהק ברמות הביטוי בזמן התנית החום בתקופה הקריטית. (איור 20B).



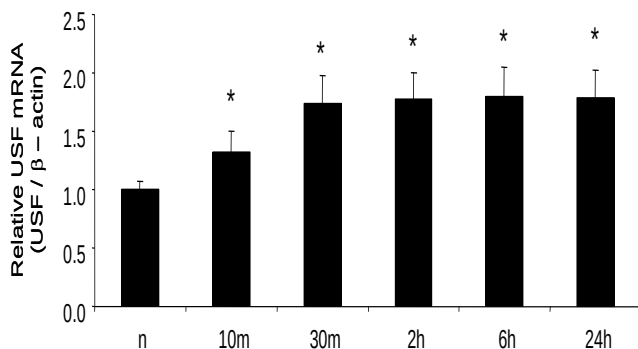
איור 20 - ניתוח של רמת המטילציה של אזור הבקרה של AVT בהתנית חום.

A. רמת המטילציה על אתר המטילציה M1 בארבע נקודות זמן. התוצאות הם יחסיות לקבוצת האפרוחים שלא עברה התנית חום (נאיביים) (* $p=0.04$) המבחן הסטטיסטי שלפיו נקבע מידת המובהקות של ההבדל בין הקבוצות נעשה על ידי הגדרת כל אחת מהמושבות הממוטלות כ-1 ואילו המושבות הלא ממוטלות הוגדרו כ-0. B. רמת המטילציה על שמונה אתרי מטילציה על האינטרון הראשון. המטילציה נקבעה ע"י קביעת רצף של המקטע לאחר טיפול בביסולפיט. רמת המטילציה מוצגת יחסית לקבוצה שלא עברה טיפול כלשהו (נאיביים).

4.5 רמת הביטוי של גורם השעתוק USF עולה בעקבות התנית חום של אפרוחים בשלהי התקופה הקריטית ביום השלישי לחייהם.

בניתוח איזור המטילציה M1 נמצא כי אתר זה מתאים לרצף הקישור הידוע של גורם השעתוק USF. במחקרים קודמים נמצא שגורם שעתוק זה מעורב בביטוי של AVT. כמו כן נמצא שיש לו חשיבות בפעילות תקינה של המוח (איור 20). לכן בדקנו את מידת הביטוי של USF1 בזמן התנית החום של אפרוחים ביום שלוש. רמת הביטוי של ה-mRNA עולה בהדרגה במהלך התנית החום, לאחר כ-10 דקות רמת הביטוי של USF הינה פי 1.3 ± 0.1 מרמת הבסיס, ומגיעה לשיא כשעתיים לאחר תחילת ההתניה, פי 1.78 ± 0.2 (איור 21), רמה זו נשארת זהה לכל אורך

התנית החום.



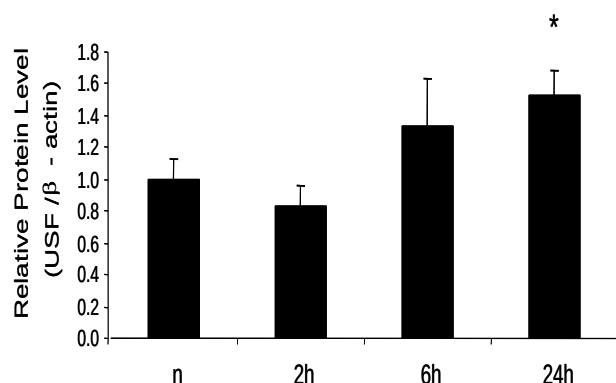
איור 21 – רמת הביטוי של גורם השעתוק USF באפרוחים שעוברים התנית חום ביום השלישי לחייהם. רמת ה-mRNA של *usf* ב-PVN נמדדה בעזרת real-time PCR במהלך התנית חום של אפרוחים ביום השלישי לאחר הבקיעה. מידת הביטוי הושוותה לביטוי הגן β -actin. כל נקודה מייצגת את ממוצע הביטוי של שמונה אפרוחים * $p < 0.01 \pm \text{SEM}$

4.6 רמת החלבון של גורם השעתוק USF עולה

בעקבות התנית חום של אפרוחים בשלהי התקופה הקריטית ביום השלישי לחייהם.

על מנת לבדוק אם השינוי ברמת ה- mRNA של USF מבטאת גם שינוי ברמת החלבון בדקתי בעזרת western blot ונוגדנים ספציפיים את ביטוי החלבון USF בהתניית חום ב- PVN. נמצא כי התניית חום גורמת לעליה בביטוי החלבון. לאחר כשש שעות ישנה עליה ברמת החלבון פי 1.3 ± 0.2 מרמת הבסיס ולאחר עשרים וארבעה שעות ישנה עליה מובהקת של פי

1.5 ± 0.2 מרמת הבסיס (איור 22).



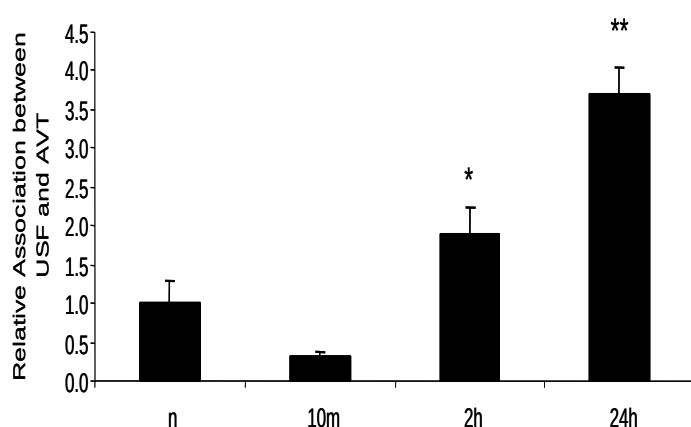
איור 22 – רמת החלבון של גורם השעתוק USF באפרוחים שעוברים התניית חום ביום השלישי לחייהם.

רמת החלבון USF נבדקה ב- PVN בעזרת western blot ונוגדן ספציפי. בכל ג'ל נבחנה רמת החלבון יחסית לחלבון אקטין. נבחנו ארבעה נקודות זמן לאורך התניית החום והושוו לרמת ביטוי החלבון בקבוצת הביקורת (קבוצת האפרוחים שלא עברו התניית חום). כל נקודה מייצגת את ממוצע הביטוי של שמונה אפרוחים $*p < 0.05 \pm SEM$

4.7 רמת הקישור של גורם השעתוק USF לעמדת הקישור M1 עולה בעקבות התניית החום של אפרוחים בשלהי התקופה הקריטית ביום השלישי לחייהם.

במהלך התניית החום בתקופה הקריטית ישנה ירידה במידת המטילציה שמלווה בעליה בגורם השעתוק USF. בשלב הבא בדקתי עם אכן USF נקשר ל- M1 בזמן התניית החום על ידי בדיקת קישור USF לאתר הקשירה M1 בעזרת Chromatin Immunoprecipitation (ChIP). לשם כך הושקעו מקטעי כרומטין שעברו שבירה ע"י סוניקציה עם נוגדן כנגד USF1. כביקורת השתמשנו בנוגדן לחלבון IgG. לאחר הפרדת ה- DNA שהושקע מהחלבונים הקשורים אליו, הוגברו התוצרים בעזרת real-time PCR עם תחלים לאתר הקישור M1 באינטרון הראשון.

תוצאות הניסוי מראות שאכן USF נקשר ל M1. לאחר שעתיים של התניית חום ישנה עליה של פי 1.9 ± 0.3 במידת הקישור של החלבון ל- DNA ולאחר עשרים וארבע שעות עליה משמעותית אף יותר של פי 3.7 ± 0.3 (איור 23).

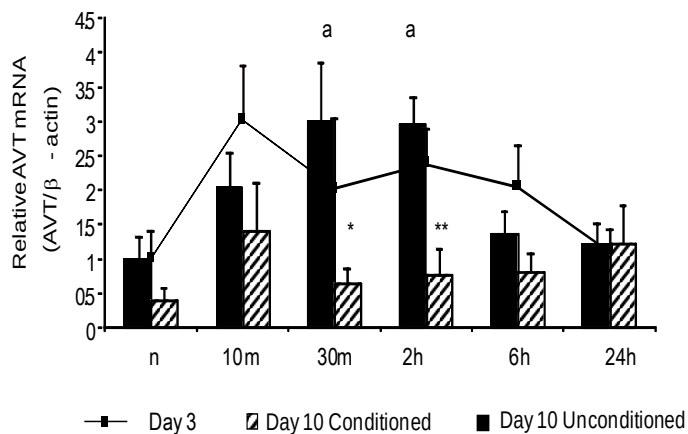


איור 23 – רמת הקישור של גורם השעתוק USF לעמדת הקישור M1 באפרוחים הנתונים להתניית חום ביום השלישי לחייהם. רמת הקשירה של USF לאתר המטילציה M1 נבדקה בעזרת ChIP. כל עמודה מייצגת את רמת קישור גורם השעתוק ל- DNA בשמונה אפרוחים, התוצאות הם יחסיות לקבוצת האפרוחים שלא עברה התניית חום. $*P = 0.05$ $**p < 0.01$

4.8 רמת השעתוק של AVT באפרוחים מותנים נמוכה באופן מובהק לעומת אפרוחים שאינם מותנים.

בכדי להבין האם התנית החום ביום השלישי בתקופה הקריטית השפיע על עמידות לעקת חום באפרוחים ביום העשירי, נמדדה רמת השעתוק של ההורמון AVT באפרוחים שעברו התנית חום ביום השלישי ורמתם הושוותה לאפרוחים שלא עברו התניה כזו שבוע אחרי התנית החום.

תוצאות Real-Time PCR הראו שרמת הביטוי של AVT ברמת השעתוק במהלך התנית החום ביום השלישי לא שונה בצורה מובהקת מרמת הביטוי של AVT באפרוחים שאינם מותנים במהלך חשיפה לחום ביום עשר (איור 24). לעומת זאת בחשיפה חוזרת לחום, האפרוחים המותנים מגיבים בצורה שונה מאפרוחים בגיל זהה שנחשפים בפעם הראשונה לחום. שלושים דקות לאחר תחילת איתגור החום ביום 10, רמת הביטוי של AVT באפרוחים שאינם מותנים גדולה פי 4.6 ± 0.2 מאפרוחים מותנים ושעתיים לאחר תחילת האתגור רמת ביטוי ההורמון גבוהה פי 3 ± 0.3 (איור 8). לאחר שש שעות ועשרים וארבעה שעות של חשיפה לחום ההבדלים בין שתי הקבוצות קטנים, כאשר לאחר שש שעות ההבדל בין אפרוחים מותנים ללא מותנים הינו פי 1.6 ± 0.2 ולאחר עשרים וארבעה שעות אין הבדל בין שתי הקבוצות (איור 8).



איור 24 - רמת ה mRNA של AVT במהלך החשיפה לחום ביום 10 באפרוחים שעברו התנית חום ביום 3 ובאפרוחים שלא עברו התנית חום ביום 3, לעומת רמתו במהלך התנית החום ביום 3.

רמת ה- *avt* mRNA ב PVN נמדדה בעזרת real-time PCR במהלך אתגור חום של אפרוחים בני 10 ימים שעברו התנית חום ביום 3 (conditioned) והשוותה לאפרוחים בגיל זהה שלא עברו התנית חום ביום 3 (unconditioned).

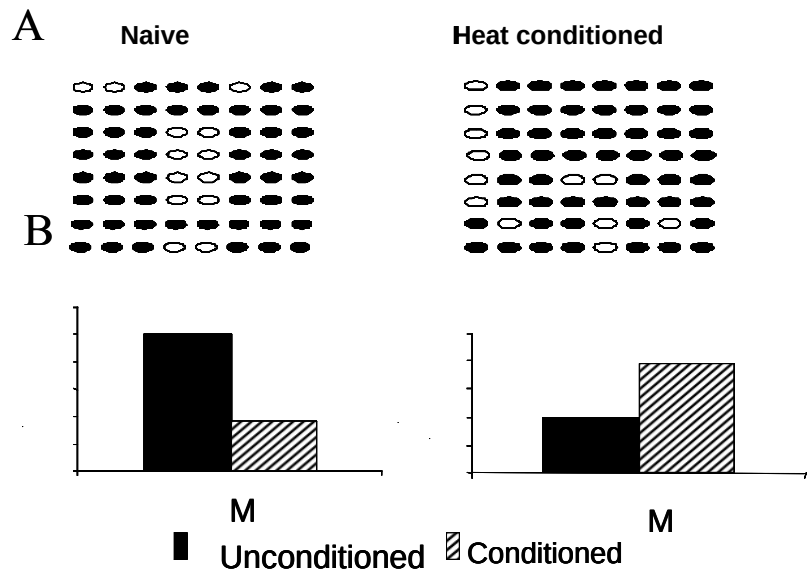
3 (unconditioned). מידת הביטוי הושוותה לביטוי הגן β -actin. כל נקודה מייצגת את ממוצע הביטוי של שמונה אפרוחים. a- מציין הבדל מובהק בין אפרוחים שאינם מותנים לקבוצת הביקורת (אפרוחים נאיביים) $p < 0.05$, * - $p < 0.05$, ** - הבדל מובהק בין אפרוחים מותנים ללא מותנים $\pm$ SEM $p < 0.05$, * $p < 0.01$.

4.9 רמת המטילציה הבסיסית על עמדות M1 ו M4 באפרוחים שלא עברו התנית חום ביום השלישי שונה בצורה מובהקת מרמת המטילציה הבסיסית באפרוחים שעברו התניה כזו.

בשלב הבא רצינו להבין האם התנית החום בתקופה הקריטית יצרה תבנית אפיגנטית חדשה. לצורך כך השוותי בין מארג המטילציה באזור הבקרה של *avt* שבוע לאחר התנית החום לבין מארג המטילציה בקבוצת אפרוחים נאיביים בני אותו גיל (גיל 10 ימים). שוני ברמת המטילציה בין שתי קבוצות אילו יכולה להעיד שתמורות אפיגנטיות ארוכות טווח אכן התרחשו. ואכן נצפה שוני כזה ברמת הבסיס במספר אתרי מטילציה. בעמדה M1 רמת המטילציה נמוכה פי 2.5 ± 0.1 באפרוחים שעברו התנית חום לעומת אפרוחים שלא עברו התנית חום (איור 25). לעומת זאת רמת המטילציה בעמדה M4 נמוכה באפרוחים שלא עברו התנית חום ביום שלוש לעומת אפרוחים שעברו התנית חום פי 1.98 ± 0.3 .

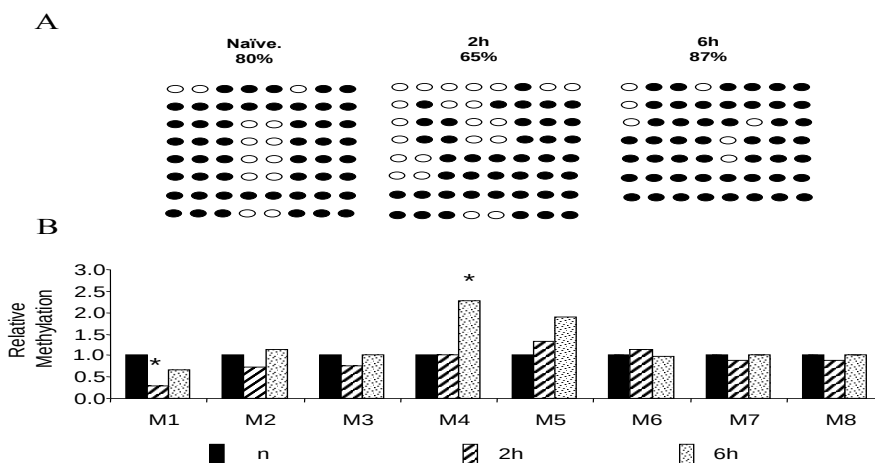
איור 25 – שוני ברמת המטילציה על עמדות M1 ו-M4 בין אפרוחים שעברו התנית חום ביום 3 לאפרוחים שלא עברו התנית חום שבוע לאחר ההתניה.

A. תיאור סכמתי של עמדות המטילציה על האינטרון הראשון. עיגול מושחר מייצג עמדה ממוטלת, עיגול ריק מייצג עמדה שאיננה ממוטלת. ה-DNA הופק ונשלח לריצוף לאחר טיפול ביסולפט. B. תיאור השוואת רמת המטילציה על עמדות M1 ו-M4 בין אפרוחים נאיביים ואפרוחים שעברו התנית חום שבוע לאחר ההתניה. כל נקודה מייצגת את ממוצע המטילציה של מספר תאים מארבעה אפרוחים שונים $p < 0.05$. המבחן הסטטיסטי שלפיו נקבע מידת המובהקות של ההבדל בין הקבוצות נעשה על ידי הגדרת כל אחת מהמושבות הממוטלות כ-1 ואילו המושבות הלא ממוטלות הוגדרו כ-0.



4.10 רמת המטילציה על M1, ו-M4 באינטרון הראשון משתנה לאחר שעתיים של חשיפה לעקת חום באפרוחים מותנים ונאיביים בני 10 ימים .

אפרוחים שלא עברו התנית חום ביום השלישי לחייהם נחשפו לחום של 36.5°C ביום העשירי למשך 24 שעות. חשיפה זו לחום של אפרוחים נאיביים גרמה לשינויים מובהקים בעמדת מטילציה M1 ו-M4 על האינטרון הראשון. בקבוצת אפרוחים זו לפני תחילת התנית החום רמת המטילציה על M1 הייתה גבוהה (איור 26A), לאחר כשעתיים של התנית חום רמת המטילציה על עמדה M1 ירדה בצורה מובהקת ביותר פי 2 ± 0.2 , ולאחר כשש שעות ירדה רמת המטילציה פי 1.6 ± 0.2 מרמת הבסיס (איור 26B) .



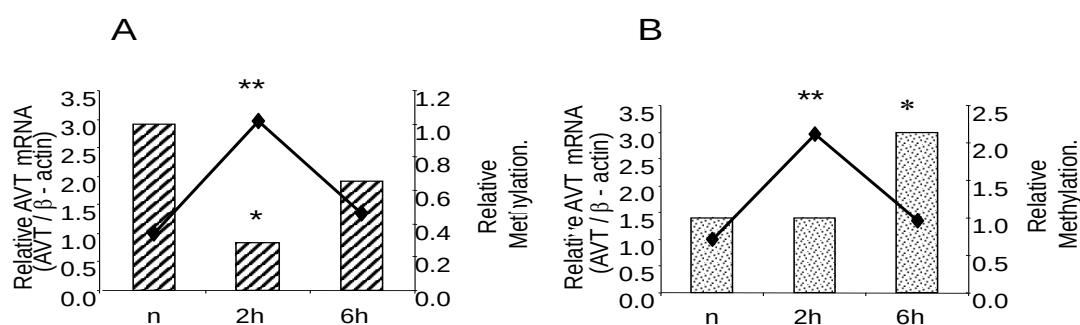
איור 26- שינויים ברמת המטילציה בזמן חשיפה לחום של אפרוחים נאיביים בני 10 ימים.

A. תיאור סכמתי של עמדות המטילציה על האינטרון הראשון. עיגול מושחר מייצג עמדה ממוטלת, עיגול ריק מייצג עמדה שאיננה ממוטלת. אפרוחים שלא עברו התנית חום ביום 3 עברו חשיפה לחום ביום 10. ה-DNA הופק ונשלח לריצוף

לאחר טיפול ביסולפט. האחוזים מציינים את רמת המטילציה הכללית על האינטרון. B. רמת המטילציה על 8 עמדות מטילציה על האינטרון הראשון בשלוש נקודות זמן, באפרוחים שלא עברו התנית חום, התוצאות הם יחסיות לרמת המטילציה בקבוצת האפרוחים שלא עברו כל טיפול (naïve). $p < 0.05$; M4 (unconditioned). המבחן הסטטיסטי שלפיו נקבע מידת המובהקות של ההבדל בין הקבוצות נעשה על ידי הגדרת כל אחת מהמושבות הממוטלות כ-1 ואילו המושבות הלא ממוטלות הוגדרו כ-0.

אתר מטילציה נוסף שחלו בו שינויים במהלך התנית החום הינו אתר המטילציה M4. בקבוצת האפרוחים הנאיביים רמת המטילציה באתר זה הייתה נמוכה, 40%-50% (איור 26B). לאחר כ- 6 שעות נצפית עליה מובהקת ברמת המטילציה בנקודות M4 פי 5 ± 0.4 מרמת המטילציה לאחר שעתיים של חשיפה לחום ופי 1.8 ± 0.4 מרמת הבסיס (איור 26B). עמדות המטילציה האחרות שנבדקו (שאינן M1, M4) על אינטרון זה לא הראו שוני מובהק באחוזי המטילציה בזמן החשיפה לחום (איור 26B).

השוני ברמת המטילציה על עמדות M1, M4 מתאימה לשוני בביטוי גן ה-AVT. לאחר שעתיים של חשיפה לחום באפרוחים נאיביים רמת המטילציה על עמדה M1 ירדה פי 2 ± 0.2 , במקביל רמת הביטוי של AVT עלתה פי 3 (איור 27A). לאחר שש שעות ישנה עליה ברמת המטילציה על M1 במקביל לירידה ברמת הביטוי של AVT (איור 27A). בעמדה M4 רמת המטילציה על עמדה זו באפרוחים נאיביים נמוכה ונשארת נמוכה לאחר שעתיים של חשיפה לחום. לאחר שש שעות ישנה עליה ברמת המטילציה על M4 במקביל לירידה ברמת הביטוי של AVT (איור 27B).



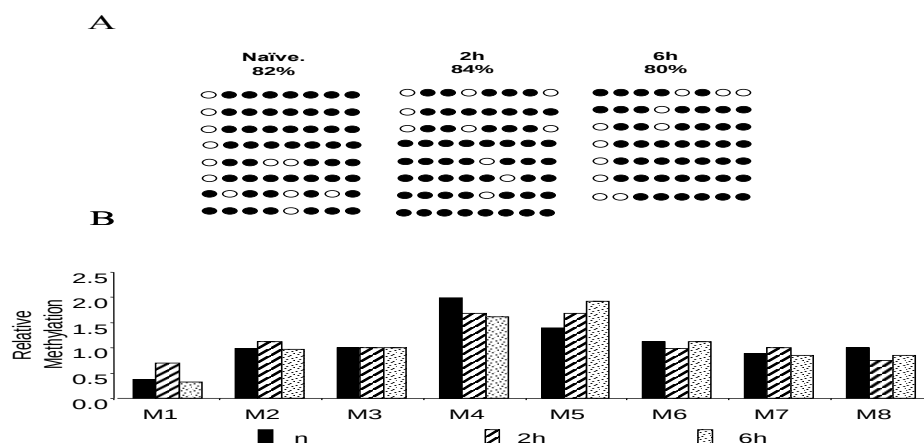
איור 27- שינויים ברמת המטילציה על עמדות M1, M4 באפרוחים שאינם מותנים.

A. רמת המטילציה על עמדה M1 בחשיפה לחום בשלושה נקודות זמן למול רמת הביטוי של ה-mRNA AVT. העמודות מייצגות את רמת המטילציה על M1 יחסית לקבוצת האפרוחים שלא עברו טיפול כלשהו (naïve unconditioned). התרשים הקווי מייצג את רמת הביטוי של AVT באפרוחים שלא עברו התנית חום ביום 3. $p=0.03$, $p<0.01$ ** B. תיאור רמת המטילציה על עמדה M4 בשלושה נקודות זמן אל מול רמת הביטוי של ה-mRNA AVT. $p=0.02$ *, $p<0.01$ **

4.11 רמת המטילציה בעמדות המטילציה M1, M4 משתנה באפרוחים מותנים במהלך אתגור החום

באופן שונה מאשר באפרוחים שאינם מותנים.

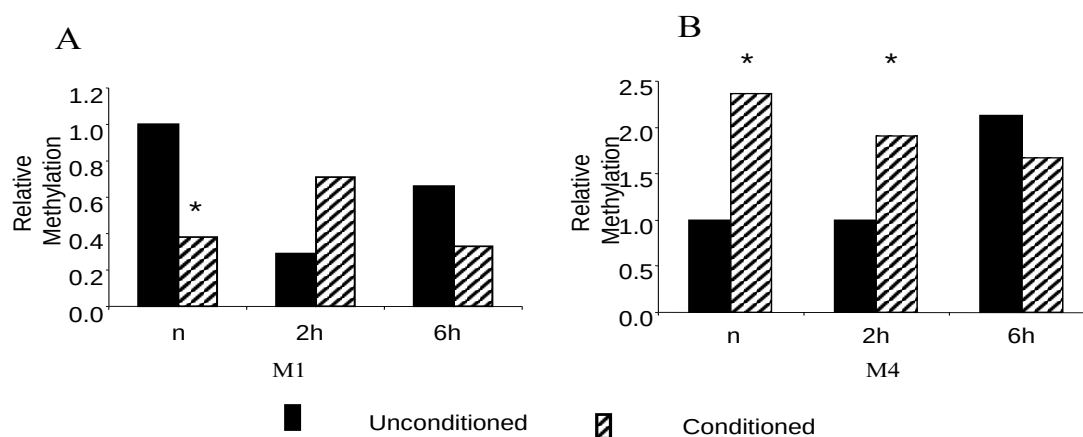
בהמשך בחנו את רמת המטילציה בזמן חשיפה חוזרת לחום. לכן חשפנו שבוע לאחר התניית החום אפרוחים שעברו התניית חום ביום 3 לאתגור חום והשוונו את מארג המטילציה של קבוצה זו לקבוצת אפרוחים בגיל זהה שנחשפים בפעם הראשונה לחום.



איור 28 - שוני ברמת המטילציה על עמדה M1 באפרוחים שעברו התנית חום ביום 3.
A. תיאור סכמטי של 8 עמדות המטילציה על האינטרון הראשון של AVT. עיגול מושחר בסכמה זו מתאר עמדה ממוטלת ועיגול ריק מתאר עמדה שאיננה ממוטלת. הרצפים נלקחו מכ 3-4 אפרוחים מכל קבוצה. ה-DNA שלהם עבר ריצוף לאחר טיפול ביסולפט. **B.** רמת המטילציה על 8 עמדות המטילציה על האינטרון הראשון בשלוש נקודות זמן. באפרוחים שעברו התנית חום ביום 3. התוצאות הם יחסיות לקבוצת האפרוחים שלא עברה טיפול כלשהו (naïve/unconditioned) כל עמודה מייצגת רצפים שנלקחו מ 3-4 אפרוחים.

באפרוחים מותנים לפני אתגור החום אחוזי המטילציה על עמדה M1 נמוכים, ורמתם היא בין 20%-40% (איור 28A) ונשארים נמוכים לאחר שש שעות של אתגור חום (איור 12A). בעמדה M4 אין שוני ברמת המטילציה במהלך החשיפה החוזרת לחום, רמת המטילציה גבוהה ונשארת גבוהה לאורך אתגור החום (איור 28B).

ישנו שוני במארג המטילציה בין אפרוחים שעברו התנית חום ביום 3 לאפרוחים נאיביים במהלך החשיפה לחום ביום 10. באפרוחים מותנים שנחשפים לחום בפעם השנייה רמת המטילציה על עמדה M1 נמוכה לעומת אפרוחים נאיביים ונשארת נמוכה לאורך אתגור החום. לעומת זאת באפרוחים נאיביים רמת המטילציה על עמדה M1 גבוהה ויורדת במהלך החשיפה לחום פי 3 (איור 29A). בעמדה M4 באפרוחים שעברו התנית חום ביום 3 ונחשפים לחום בפעם השנייה רמת המטילציה על עמדה M4 גבוהה ונשארת גבוהה לאורך החשיפה החוזרת לחום, לעומת זאת באפרוחים נאיביים רמת המטילציה על עמדה זו נמוכה ועולה באופן משמעותי לאחר חשיפה לחום של שש שעות פי 5 ± 0.2 (איור 29B).



איור 29 - שינויים ברמת המטילציה באפרוחים שעברו התנית חום ביום 3 לחייהם.

A. השוואת רמת המטילציה על עמדה M1 בין אפרוחים שעברו התנית חום ביום 3 לאפרוחים שלא עברו התנית חום ב- 3 נקודות זמן. התוצאות הם יחסיות לקבוצת האפרוחים שלא עברה טיפול כלשהו (naïve,) * $P=0.01$. B. רמת המטילציה על עמדה M4 בשלוש נקודות זמן, באפרוחים שעברו התנית חום מול אפרוחים שלא עברו התנית חום. התוצאות הם יחסיות לקבוצת האפרוחים שלא עברה טיפול (naïve unconditioned) * $p=0.04$. המבחן הסטטיסטי שלפיו נקבע מידת המובהקות של ההבדל בין הקבוצות נעשה על ידי הגדרת כל אחת מהמושבות הממוטלות כ- 1 ואילו המושבות הלא ממוטלות הוגדרו כ- 0.

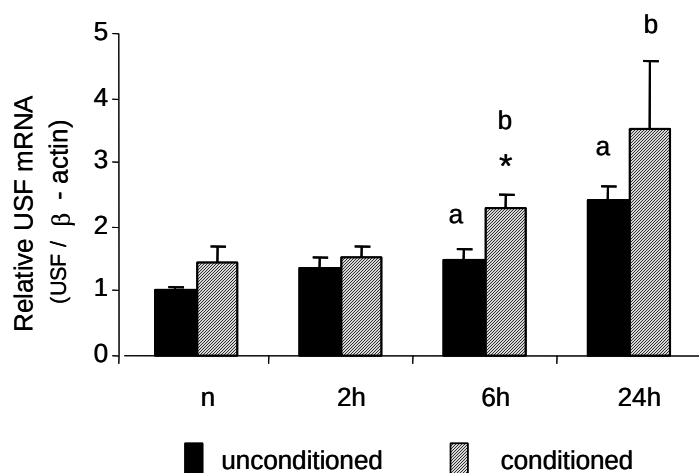
4.12 ביטוי גורם השעתוק USF ברמת השעתוק עולה במהלך התנית החום של אפרוחים שאינם מותנים ובאפרוחים מותנים ביום 10 לחייהם.

מכיוון שקיבלנו שוני בעמדת המטילציה M1 בדומה לממצאים בזמן התנית החום רצינו לבדוק את רמת הביטוי של גורם שעתוק זה באפרוחים מותנים ושאינם מותנים ביום 10. התוצאות מראות שגורם השעתוק USF עולה בזמן התנית החום באפרוחים לא מותנים ביום 10 ומגיע עד פי 2.5 ± 0.2 לאחר 24 שעות ($P < 0.01$) (איור 30).

באפרוחים שעברו התנית חום בגיל 3 ישנה עליה מובהקת ברמת השעתוק של גורם השעתוק USF מעל לפי 2 ± 0.2 לאחר 6 שעות של חשיפה לחום, ופי 3.5 ± 1 לאחר 24 שעות (איור 30).

רמת השעתוק של גורם השעתוק USF באפרוחים מותנים גבוהה יותר באופן יחסי מרמתם בקבוצות האפרוחים הלא מותנים. הבדלים מובהקים התקבלו בקבוצת האפרוחים שעברו התנית חום של שש שעות לעומת קבוצת האפרוחים שעברו אתגור חום של שש

שעות. (איור 30).



איור 30 - רמת הביטוי של גורם השעתוק USF באפרוחים שעברו התנית חום ביום 3 ובאפרוחים שלא עברו התנית חום כזו. השוואה בין רמת הביטוי של USF באפרוחים שלא עברו התנית חום לבין רמתם באפרוחים שכן עברו התניה כזו ביום ה-3 לחייהם. a - הבדל סטטיסטי מובהק בין אפרוחים שאינם מותנים לקבוצת הביקורת. b - הבדל סטטיסטי מובהק בין אפרוחים מותנים לקבוצת הביקורת. * - הבדל סטטיסטי מובהק בין אפרוחים מותנים ללא מותנים. * $p=0.01$

לסיכום

נתן לראות מהתוצאות שהבקרה על שחרור ההורמונים בהיפותלמוס מבוקרים ברמה האפי גנטית. ממצאים אילו יכוונו את המטפחים לשים דגש רב על היבט זה כאשר הם מכוונים את הזנים החדשים של פטמים.

סיכום עם שאלות מנחות

נא לענות על כל השאלות, בקצרה ולעניין, ב 3 עד 4 שורות מכסימום לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

1.1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
מטרת המחקר בשנה השלישית הייתה לבדוק את מידת הלמידה והזיכרון של התגובות לעקה באפרוחים תוך בדיקת ביטויים של הורמוני העקה בהיפותלמוס הקדמי, ולבדוק האם מנגנון זיכרון זה מבוקר על ידי שינויים אפיגנטיים - מודיפיקציות על ה DNA בפרומוטורים של הגנים
2.2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.
הניסויים העיקריים היו חשיפת פטמים לעקות חום ובחינת 1. השינוי בביטוי ההורמונים AVT, CRH ו TRH . 2. מדידת שינויים במתילציות על ה DNA באזור הפרומוטור של הורמוני ההיפותלמוס.
3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרת המחקר בתקופת הדו"ח.
המחקר התקדם היטב ולפי התוכנית. מהממצאים בשנה זו של המחקר ניתן לראות שאכן חלבוני העקה מבוקרים ברמה האפיגנטית תוצאה זו מעודדת שכן היא מעידה על כך שאכן בסיום המחקר נוכל לאפיין את הבקרה האפיגנטית על התפתחות התגובות לעקה.
4. הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרת המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר.
לא חלו שינויים במהלך העבודה והפרויקט התקדם לפי התוכנית. הפרויקט עמד במטרות כפי שהוגדרו בתוכנית המחקר אם כי לא סימנו לאפיין את כל ההיבטים האפיגנטיים של הבקרה על שחרור הורמונאלי בהיפותלמוס ונמשיך ונעבוד על נושא זה שהוא רחב מאוד.
5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - <u>יש לפרט</u> : פרסומים – כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.
הממצאים נשלחים בימים אילו לפרסום. צפויים 3 מאמרים
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
רק בספריות <
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) <
✓ חסוי – לא לפרסם - מאחר והממצאים נמצאים בשלבי פרסום אקדמי אך עדיין לא התקבלו סופית.