

איתור חלבונים הקשורים להשמנה בעופות כבדים

Identification and characterization of fat secreted proteins, related to the control of obesity and reproduction in broiler breeder hens

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות הועדה לביוטכנולוגיה חקלאית ע"י

מרים פרידמן-עינת	המכון לחקר בע"ח, מינהל המחקר החקלאי, רחובות
יובל אשדת	המכון למטעים, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
זהבה פלטין	המכון למטעים, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

Miriam Friedman-Einat, Institute of Animal Science, ARO, POB 6 Bet-Dagan

einat@agri.huji.ac.il

Yuval Eshdat, Institute of Horticulture, ARO, POB 6 Bet-Dagan

yuval@volcani.agri.gov.il

Zehava Faltin, Institute of Horticulture, ARO, POB 6 Bet-Dagan

zehava@volcani.agri.gov.il

מאי 2008

אייר תשס"ח

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כן/לא מחק את המיותר *

חתימת החוקר

רשימת פרסומים

1. מרים פרידמן-עינת, רקמת השומן – איתה ובלעדיה. "משק העופות" גיליון מאי 2007.

- Gideon Hen, Sera Yosefi, Ana Ronin, Paz Einat, Charles Rosenblum, Robert J. Denver and Miriam Friedman-Einat. (2008). Monitoring leptin activity using the chicken leptin receptor. *Journal of Endocrinology*. 197, 325–333.
- Miriam Friedman-Einat, Sera Yosefi, Ana Ronin, Faltin Zehava and Yuval Eshdat. Fat secreted proteins in broiler and layer hens. *Proceedings, The World Poultry Science Symposium, Brisbane, Australia, Jun 2008*.

(הרצאה בכינוס באוסטרליה ומאמר בספר של הכינוס).

מאמרים נוספים נמצאים בהכנה.

תקציר

הצגת הבעיה: אחת הבעיות הקשות במשק העופות היא בעיית הגידול והייצור בשלוחת הרבייה הכבדה. שלוחת עופות זו טופחה בעשורים האחרונים לגדילה מהירה במטרה ליעל את ייצור הפטמים למאכל. עם התקדמות הטיפול לגדילה מואצת, יורדת יעילות ההטלה ועולה הנטייה לאכילה עודפת המחייבת גידול של להקות הרבייה בהגבלת מזון חריפה. הבנת הקשר ברמה המולקולארית בין אכילה, צבירת שומן ומדדי הייצור תוכל לתת בידנו כלים לשיפור הייצור ולשיפור רווחת החיה.

מטרות המחקר: מטרת המחקר היא זיהוי ואפיון חלבונים המופרשים מרקמת השומן והמעורבים בבקרה על מאזן האנרגיה וייצור הביצים.

שיטות ומהלך העבודה: פיתחנו שיטה לאיסוף של חלבונים מופרשים במהלך הדגרה של פיסות רקמת שומן *in vitro* בנוכחות סימון מטבולי רדיואקטיבי. החלבונים הופרדו בגלים דו-ממדיים והחלבונים שהסתמנו בעוצמה שונה בין מטילות כבדות וקלות נבדקו במס-ספקטומטריה. החלבונים שאותרו כללו חלבונים ששיכו למנגנון הבקרה על מאזן האנרגיה גם ביונקים (כמו אדיפונקטין, CRP ועוד) וחלבונים שלא שויכו בעבר למנגנון זה ולא היו ידועים כחלבונים המופרשים מרקמת השומן (כמו *Reninoblastoma-binding-protein 4*, *osteoglycin*, *cognin* ועוד). התוצאות אומתו בשיטה נוספת של WESTERN BLOTTING ו-PCR. במקביל העמדנו מערכת למדידת פעילות לפטין בעזרת הקולטן לפטין של עופות. בדרך זו ניתן יהיה לבדוד ולאפיין את הלפטין של עופות מתערובת החלבונים המופרשים מרקמת השומן. בנוסף, מצאנו דרך מהירה זולה ויעילה להחדיר גנים לכבד של עופות בעזרת וקטורים המאפשרים את ביטויים למשך זמן ממושך. שיטה זו תאפשר לנו לאפיין את התרומה של החלבונים שאיתרנו למדדי ייצור בעופות.

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות: המחקר נתן בידנו מספר חלבונים מועמדים ואת התשתית המחקרית המאפשרים בדיקה ישירה של השפעת חלבונים אלה על מדדי ייצור בעופות. יישום התוצאות יהיה תלוי בהמשך המחקר שנעשה כעת לפיתוח של סמנים גנטיים להטלה יעילה ופיתוח כלים להקטנת התיאבון והגברת הייצור בעופות.

מבוא

גלוי הורמון השובע, לפטין (Zhang *et al.*, 1994), המופרש מרקמת השומן הביא להבנה שרקמת השומן איננה רק מחסן לעודפי אנרגיה אלא גם רקמה אנדוקרינית חשובה שדרכה נעשית עיקר הבקרה על מאזן האנרגיה. מספר רב של עבודות שנעשו מאז העידו כי הורמון השובע לפטין איננו ההורמון היחיד המופרש מרקמת השומן. חלבונים נוספים כמו אדיפונקטין ורזיסטין הספציפיים לרקמת השומן וחלבונים נוספים שאינם ספציפיים לרקמת השומן כמו IL6, IL1, TNF- β אופיינו לאחרונה כחלבונים המופרשים מרקמת השומן (Ahima, 2006). אחד הגורמים המאיצים את החיפוש אחר חלבונים אלה נובעת מההנחה כי הם כוללים גם חלבונים המשפיעים על הרגישות לפטין ולאיינוסולין ובכך יוכלו להוביל למציאת תרופה כנגד השמנה וסוכרת מטיפוס 2 (Bulcao *et al.*, 2006, Koerner *et al.*, 2005, Kralisch *et al.*, 2005, Wada, 2008) בהיבט החקלאי, העניין בחקר חלבונים המופרשים מרקמת השומן נובע מההנחה שחלבונים אלה מקשרים בין השמנה למדדי רבייה שונים כמו כניסה להתברות מינית, השפעה על המחזור המיני ופוריות (Bluher & Mantzoros, 2007, Goulis & Tarlatzis, 2008, Goumenou *et al.*, 2003, Hill *et al.*, 2008, Marikovsky *et al.*, 2006, Tena-Sempere, 2006, Wojcik-Gladysz *et al.*, 2006) יתכן כי חלבונים אלה משפיעים גם על ההחלטות הקשורות להפניית המשאבים לשריר או לשומן. לאחרונה נמצא כי חומרים המופרשים מרקמת השומן משפיעים גם על תהליכי בנייה ופרוק העצם (Lee & Karsenty, 2008). לכל מנגנוני הבקרה האלה

חשיבות חקלאית רבה והכרתם תוכל לאפשר לנו להשפיע על שיפורים משמעותיים ביעילות הייצור וברוחות החיה.

בגידול התעשייתי של שלוחת הרבייה הכבדה (הורי הפטמים המשמשים למאכל) הטיפוח לגדילה מהירה של הפטמים מלווה בירידה משמעותית ביעילות ההטלה של האמהות. הצורך בשיפור הרבייה הולך וגובר עם ההתקדמות בטיפוח. ההבדל הדרמטי ביעילות ההטלה והפוריות בין מטילות קלות שטופחו לייצור ביצי המאכל לבין המטילות הכבדות שטופחו לייצור עופות המאכל, מהווה מודל אידיאלי למחקר. במחקר הנוכחי השתמשנו במודל זה לבדיקת הקשר בין פרופיל החלבונים המופרשים מרקמת השומן למדדי הייצור. בשנה הראשונה העמדנו את השיטה להפקת החלבונים, ולהרצת הגלים הדו-ממדיים, ובדקנו מספר שיטות לניקוי החלבונים מאלבומין. בשנה השנייה איתרנו חלבונים מופרשים, והתחלנו בתהליך אימות התוצאות. בשנה השלישית התמקדנו בפיתוח מערכות לאפיון הפעילות הביולוגית של החלבונים הנבדלים.

תוצאות

איתור חלבונים מפרשים מרקמת השומן במטילות כבדות וקלות

במסגרת המחקר שיפרנו מאוד את השיטה להעשרת חלבונים מופרשים תוך כדי הדגרה *in vitro* של פיסות רקמת שומן של מטילות קלות וכבדות איור 1 מראה את הסיכום של החלבונים המופעים ברמה גבוהה יותר בכבדות וכאילו שרמת הפרשתם גבוהה יותר בקלות. חלבונים אלה נמצאו בעקבות הרצתם בגלים דו-ממדיים ואנליזה במס-ספקטרומטריה. הטבלה מסכמת מספר ניסויים שרק בחלקם נאספו החלבונים בעקבות סימון מטבולי שהגדיל את הסלקציה לחלבונים מופרשים.

רשימת החלבונים הנבדלים מוצגים באיור 1 .

לגבי ה-C- ריאקטיב פרוטאין (CRP), התוצאות שהתקבלו אומתו ב western analysis בעזרת נוגדנים כנגד CRP הומני (איור 2) מחברת (MAB1707) RnD system. הנוגדנים נתנו סיגנל בגודל הצפוי (29 kDa) בדוגמאות של סרום של עופות. בדומה לממצאים ביונקים (Iwasaki et al., 2006), רמת ה-CRP בסרום של מטילות כבדות גבוהה מזו של קלות. הממצא שהרמה יורדת בתנאים של הגבלת מזון מחזקת את האפשרות שלחלבון זה תפקיד מטבולי הקשור להשמנה. אך ראיות מוצקות יותר תתקבלנה בניסויים של ביטוי בעודף או בחוסר בעופות בשיטות שאותן פתחנו הפרויקט הנוכחי (ראה בהמשך). כאמור, במטילות כבדות הגדלות בהגבלת מזון יורד ביטוי ה-CRP אך הוא עדיין גבוה מזה שנמדד במטילות קלות. ממצא זה נמצא בהתאמה לכך שגם כשבוחנים את המדדים הפיזיולוגיים כולל הטלה וצבירת שומן, הגבלת המזון מקטינה את הפער בין המטילות הכבדות והקלות אך אינה מבטלת אותם.

אנליזה של CRP ב- real time PCR הראתה תוצאות דומות אך נראה כי הביטוי המשמעותי יותר של ה-CRP הוא בכבד. למרות זאת יתכן כי לביטוי ברקמת השומן יש השפעה פרקרנית.

לגבי חלבונים אחרים נעשה אימות בשיטת ה- real-time PCR לגבי חלק מהגנים התוצאות מוצגות באיור 3. עד כה נמצאה התאמה בין פרופיל ביטוי ה-RNA שנמדד ב-PCR כמותי לפרופיל הפרשת החלבונים המתאימים.

האדיפונקטין הספציפי לרקמת השומן ביונקים מתבטא יותר בשומן מטילות כבדות מאשר בקלות. תוצאה זו הפוכה מהצפוי מאחר שהאדיפונקטין ביונקים מתבטא ביחס הפוך למידת ההשמנה, משפר את הרגישות לאינסולין ומדדים נוספים הקשורים לסינדרום המטבולי. לכן, חשוב ביותר יהיה לבחון בעופות את התפקיד הפיזיולוגי של האדיפונקטין.

הדרך היעילה ביותר לאמוד את חשיבות החלבונים שאותרו, היא על ידי בדיקת הפעילות של חלבונים אלה במערכות בדיקה *in vivo* ו *in vitro*.

פיתוח מערכות בדיקה *in vitro* לאפיון הפעילות של החלבונים המופרשים

הקמנו שתי מערכות בדיקה *in vitro*: (1) מערכת לבדיקת פעילות לפטין. (2) מערכת בדיקה להשפעת חלבונים מופרשים על התפתחות זקיקים.

(1) בעזרת המערכת לבדיקת פעילות לפטין (איור 4) מצאנו כי הקולטן לפטין של עופות מופעל באופן ספציפי על ידי לפטינים רקומביננטיים של אדם וצפרדע (איור 4 א'). בדיקה של פעילות לפטין בדוגמאות סרום (איור 4 ב') הראתה כי סרומים של אדם ופרה מפעילים באופן ספציפי את הקולטן לפטין של עופות לעומת זאת ובניגוד לצפוי, סרומים של עופות אינם מפעילים את הקולטן לפטין של עופות. מכאן ניתן להסיק כי רמת הלפטין בסרומים של עופות, אם קיימת, נמוכה מזו שביונקים. בדיקה של הפרפרטים שלנו של חלבונים המופרשים מרקמת השומן מפעילים את המערכת התאית במידה רבה (איור 4 ג') אך הפעלה זו נמדדת גם בתאי הביקורת שאינם מבטאים את הקולטנים לפטין. מכאן ברור שהפעילות שמצאנו, לפחות בחלקה, איננה נובעת מלפטין אלא מחלבונים אחרים שאינם פועלים דרך הקולטן לפטין. כדי לבדוק את האפשרות כי בתערובת החלבונים המופרשים מצוי גם לפטין של עופות הפרדנו את תערובת החלבונים בקולונת Sephadex G-100. בשלב ראשון הוספנו לפטין של אדם לתערובת החלבונים כדי שניתן יהיה לאתר את המקטעים בהן מתנקה הלפטין. תערובת החלבונים רוכזה פי 10 ב- stir-cell, Amicon והטענה על הקולונה. המקטעים שיצאו מהקולונה נבדקו במערכת הבדיקה לפעילות לפטין (איור 5). מצאנו כי הפיק של הפעילות הלא ספציפית (המפעילה את הגן המדווח בתאי הביקורת) והפיק של הלפטין חופפים במידה מסוימת אך לא מלאה. חזרה על הניסוי הראתה לנו כי הלפטין משתחרר מהקולונה בכל הפרדה באותם מקטעים. לכן אנו מפרידים עתה תערובת חלבונים ללא הוספה של לפטין חיצוני. אנו מניחים שגם הלפטין של העופות (אם קיים בתערובת) ישתחרר מהקולונה באותם מקטעים. ההנחה שהלפטין של עופות הוא בגודל ובמבנה דומים לאלו של יונקים ולכן צפוי להופיע באותם מקטעים של הקולונה, מתבססת על הפרסום מהמעבדה של רוברט דנבר (Crespi & Denver, 2006) שבו הראו המחברים כי המבנה השלישוני של הלפטין של אדם עכבר וצפרדע הוא אותו מבנה בדיוק למרות שקיימת זהות של רק 37% ברצף החומצות באמיניות בין לפטין של צפרדע ושל יונקים. מכאן שגם אם רמת הפרשה נמוכה של לפטין בעופות לא תאפשר את איתורו באסי הביולוגי, ניתן יהיה לרכז את החלבונים מהמקטעים הרלוונטיים ולאתר את הלפטין בעזרת western blotting או mass-spectrometry.

(2) כדי לפתח מערכת למדידת השפעת חלבונים המופרשים מרקמת השומן על התפתחות זקיקים בדקנו מספר מקרים שנמצאו קשורים להתפתחות זקיקים ביונקים (איור 6). מצאנו כי במעבר בין זקיקים רדומים הקטנים מ 1 מ"מ לזקיקים שהתחילו להתפתח (1 עד 5 מ"מ) קיימת ירידה חדה בביטוי הגן GDH 9 ועליה חדה בפוליסטטין. גן אחר הקשור להתפתחות זקיקים אך מעורב בשלבים מאוחרים יותר, קיט ליגנד, אינו משתנה. הנחתנו היא כי הדגרה של הזקיקים הקטנים מ 1 מילימטר עם חלבונים המופרשים מרקמת השומן של מטילות כבדות וקלות תעיד על השפעה ישירה של חלבונים אלה על התפתחות הזקיקים בשחלה. ניתן יהיה גם להשתמש במקטעי קולונת ה ספדקס כדי להתקרב לזיהוי החלבונים המשפיעים.

מערכות בדיקה *in vivo*

הבדיקה האמינה ביותר לגבי מעורבותם של החלבונים המופרשים בתהליכי הייצור היא הבדיקה בחיה השלמה. השיטות הקיימות לייצור עופות טרנסגניים הן מסובכות ויקרות ואינן ישימות במעבדות מחקר רגילות (Ivarie, 2006). לכן פיתחנו שיטה פשוטה בהרבה שאמנם אינה מאפשרת ייצור קיום טרנסגניים המותמרים בתאי הנבט אך מאפשרים את ביטויים והפרשתם לדם של תוצרי הגנים המוחדרים. באיור 7 ניתן לראות כי הזרקה

של גן מדווח למערכת הדם ההיקפית של העובר (Chorioallantoic vessels, CAM), ביום 10 של התפתחות העובר מאפשרת הדבקה של מספר רקמות באפרוח לאחר הבקיעה. הערכתנו היא כי הווקטור הויראלי בו השתמשנו, לנטיורוס מטיפוס FIV, עובר אינטגרציה לגנום התא המארח, כפי שהודגם בעבר (Condiotti *et al.*, 2004, Shai *et al.*, 2005).

דין

במהלך שנת המחקר אותרו יותר מ-30 חלבונים דיפרנציאליים. חלק מהחלבונים היו ידועים בעבר כחלבונים המופרשים מרקמת השומן והמעורבים בבקרה על מטבוליזם ומאזן האנרגיה כמו האדיפונקטין וה-CRP. יתכן כי חשבים לא פחות הם חלבונים שלא היו עד כה ידועים כמופרשים מרקמת השומן. חלקם של חלבונים מהקבוצה השנייה הם חלבונים המופרשים מתאי דם כמו מקרופאזים. סביר להניח שממצא זה נובע מכך שבמצבים של השמנה קיים שינוי ביחס בין מספר תאי השומן למספר תאי דם כמו מקרופאזים (Weisberg *et al.*, 2003).

כדי להגיע לאיתור חלבונים מופרשים היה צורך לחזור על האנליזות שבוצעו בשנת המחקר הראשונה, בתנאים של סימון מטבולי של הרקמה. שיטה זו פתרה את הבעיות העיקריות במערכת הניסויית שדווחה לאחרונה גם על ידי מעבדות אחרות, הנובעות מספיחה של חלבונים תאיים לפיסות רקמת השומן בזמן חיתוך הרקמה. חלבונים אלה אינם יורדים בשטיפות אלא רק במהלך האינקובציה של הרקמה ולכן מוהלים את החלבונים המופרשים.

רשימת החלבונים שנמצאו בעזרת הסימון המטבולי כוללת חלבונים הנראים כבעלי פעילות רלוונטית לבקרה על מטבוליזם ומאזן האנרגיה. כמה מהחלבונים המופרשים כמו ה-Syntaxin 12 המתבטא בעיקר במוח או epididymal secretory proteins שנמצא עד כה באפידידימיס (יותרת האשך) ובשורשי השער (Peterson *et al.*, 2005). האפשרות שחלבונים אלה אכן קשורים לרקמת השומן ולבקרה על מאזן האנרגיה תוכל לשפור אור חדש על פעילותם.

לגבי חלבוני "ענק" שנמצאו כחלבונים דומיננטיים ביותר במספר פרקציות מולקולריות שונות (כפי שהובחן באנליזה של הגלים החד ממדיים), ביונקים ידועים כמה איזומרים בעלי משקלים מולקולריים קטנים בהרבה מהענק הארוך אך גם אם מדובר בפרוק של החלבון במהלך הניסוי ולא בתוצרים שונים של הגן, הרי שהממצא לפיו הענק מהווה את אחד החלבונים העיקריים ברקמת השומן היא חדשה ובעלת עניין רב. זאת משום שהענק נמצא לאחרונה כמעכב את ההפעלה של תעלות סידן ע"י β -adrenergic receptors (Haase, 2007). כידוע, קולטנים אלה הם הקולטנים המגיבים למערכת העצבים הסימפטית שדרכה פועלים סיגנלים שמקורם במוח כמו זה המופעל על ידי הלפטין. קולטנים אלה מווסטים ברקמת השומן את מידת פירוק חומצות השומן הוצאת האנרגיה ומזה זמן רב מהווים מטרה לפיתוח תרופות כנגד השמנה. החלבון AHNAK. התגלה ב-1992 כחלבון הקשור למחלת הסרטן. מקור השם שלו היא המילה ענק בעברית שהוצמד לו בגלל גודלו (5643 חומצות אמינו).

האדיפונקטין לפי הגדרתו של פרופסור Gerard Karsenty בהרצאתו במכון ויצמן (2008), הוא "קורבן הטרור המולקולארי". כלומר, ההתייחסות להורמון זה השתנתה בעקבות הקושי לאתר פנוטיפ בעכברי knock-out. למרות זאת, חשיבות האדיפונקטין בבקרה על מאזן האנרגיה הודגם בניסויים של ביטויו בעודף (Otabe *et al.*, 2007) שהראה כי אדיפונקטין מגן מפני השמנה בדיאטה עתירת שומן, מקטין את התמותה הנובעת מדיאטה זו ומאריך את תוחלת החיים גם בדיאטה רגילה שאינה עתירת שומן. התוצאה הבלתי צפויה שלנו כי

האדיפונקטין מופרש במידה רבה יותר משומן של מטילות כבדות מדגיש את הצורך לבדוק את האפשרות כי בעופות השפעתו שונה מאשר ביונקים. חלבון זה ביונקים מהווה היום את אחד היעדים לטיפול כנגד השמנה בבני אדם וחשוב מאוד יהיה להאריך את הפוטנציאל של חלבון זה בעופות.

לגבי ה-CRP, השאלה המעניינת היא האם עיכוב פעילותו בדם בעופות תגביר את הרגישות ללפטין. ניסויים בכיוון זה נעשים עתה ביונקים. כאשר יהיו בידנו מעכבים ל-CRP. נוכל לאפיין את פעילותם גם בעופות. פוטנציאל מעניין נוסף לגבי ה-CRP הוא השימוש שלו כמרקר למצב של מאזן האנרגיה בגוף ולאפשרות השימוש בו להכוונת מידת הגבלת המזון במטילות כבדות. בכוונתנו לבדוק אפשרות זו על ידי מעקב פרטני אחר רמת ה-CRP בדם במספר רב של מטילות כבדות הנבדלות ביעילות ההטלה ובמשטרי תזונה.

הפרדת החלבונים המופרשים בספדקס נעשתה בהרצות הראשונות בתוספת של לפטין של אדם כדי שניתן יהיה לאתר מראש את המקטעים שבהן יוצא הלפטין. מצאנו כי הפיק של הלפטין אינו ניתן להפרדה מלאה מהפיק של הפעילות הלא ספציפית, אך קיימת הפרדה חלקית. מכיוון שבשני ניסויי הפרדה הלפטין יצא מהקולונה בדיוק באותם מקטעים, אנו חוזרים עתה על ההפרדה בספדקס של תערובת החלבונים המופרשים ללא תוספת של לפטין רקומביננטי. גם אם לא ניתן יהיה להדגים פעילות של לפטין אנדוגני במקטעים המתאימים, ניתן יהיה לרכז מהן את החלבונים ולבצע אנליזה ב-western blotting analysis וב-mass spectrometry. במקרה של תוצאה שלילית תתחזק ההנחה לפיה לא קיים לפטין בעופות. הנחה זו מסתמנת גם מהאנליזה של סרומים של עופות באיור 3 ב' ומאי ההצלחה חרף מאמצים חוזרים ונשנים שלנו ושל אחרים לאתר את הלפטין בעופות (Friedman-Einat *et al.*, 1999).

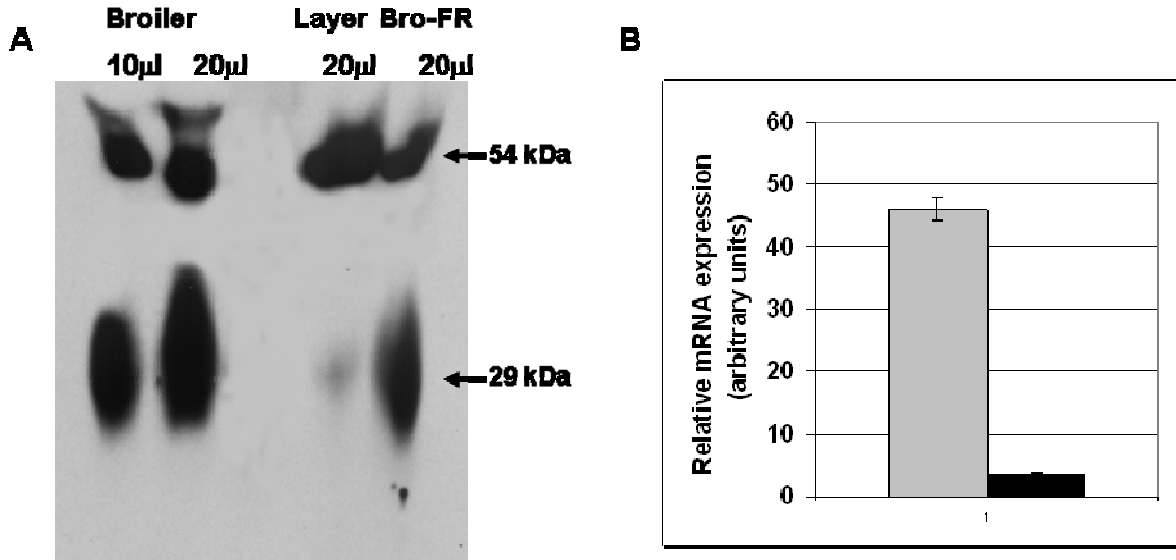
לסיכום, דווקא בגלל הקשיים באיתור הלפטין בעופות, והעדויות ההולכות ומתגבשות לפיהם לא קיימת פעילות כזאת בעופות, חשובה העבודה המוצגת בדו"ח זה המעלה מספר חלבונים אחרים המופרשים מרקמת השומן והעשויים להיות מעורבים בבקרה על מאזן האנרגיה בעופות. מסיבה זו חשובה גם השיטה שפתחנו ושבעזרתה ניתן יהי לבדוק השערה זו באופן ישיר.

איור 1: זיהוי חלבונים נבדלים בגלים דו ממדיים ומס-פוקטורומטריה, א. חלבונים המופרשים ברמה גבוהה יותר במטילות כבודת

Broilers	Accession	Amino Acids
Epididymal secretory protein E1	71894903	151
C-reactive protein	87042567	227
Retinoid binding protein 7	118101074	128
Avidin	13397826	152
Ahnak	various, see text	various
Pdlim1 protein isoform 1	118092685	327
destrin	45382979	165
Adiponectin	61229307	244
Fatty acid binding protein 4	45383556	132

איור 1 ב' חלבונים המופרשים ברמה גבוהה יותר במטילות קלות

Layers	Accession	Amino Acids
S100 calcium binding protein	45384028	101
Osteoglycin	45383706	294
Apolipoprotein A-I	118115239	204
TGF-beta receptor interacting protein 1	50759828	325
Syntaxin	1181015146	272
Cysteine proteinase inhibitor	45382597	192
Adipocyte lipid droplet binding protein (Prilipin)	118095890	516
Lysozyme C precursor	126608	147
Retinoblastoma binding protein 4	45382339	425
Vesicle amine transport protein 1	50760787	462

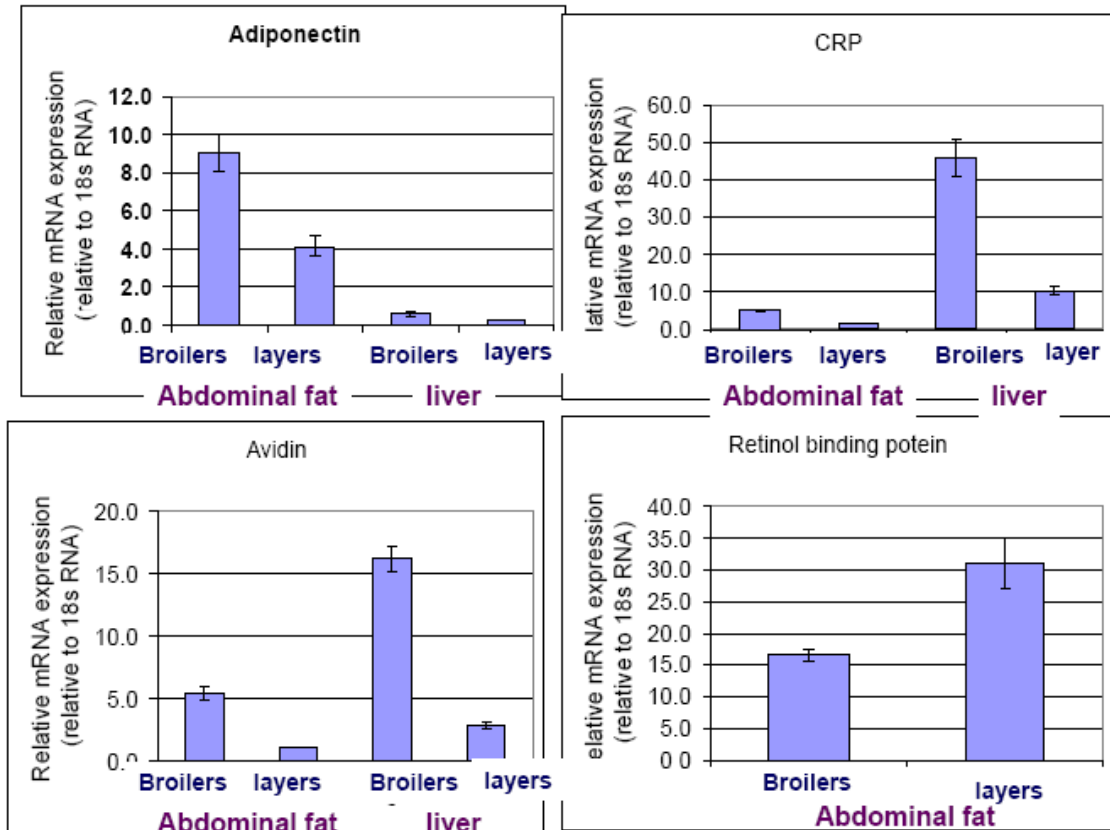


A. אנליזה של סרום של מטילות קלות (Layer) וכבדות (Broiler) ושל כבדות בהגבלת מזון (Bro-FR). סיגנל בגודל הצפוי (29 kDa) בעזרת נוגדנים מחברת RnD system (מספר קטלוגי MAB1707). הסיגנל העליון (54 kDa) נראה לא ספציפי ונמצא בהתאמה לכמות החלבון בכל באר. הכמות הגדולה של החלבונים על הגל שמפריעה במידת מה להפרדה, נובעת מהצורך להטעין כמות גדולה של חלבונים כדי להבחין ב-CRP של עוף בעזרת נוגדנים המכונים כנגד CRP של אדם.

B. אנליזה ב-quantitative, real time PCR. חישוב ההבדל בביטוי בין הכבדות (עמודה אפורה) והקלות (עמודה שחורה) נעשה בהשוואה לביטוי של 18S RNA

בדומה לממצאים ביונקים (Iwasaki et al., 2006), רמת ה-CRP בסרום של מטילות נמצא בהתאמה למידת צריכת המזון.

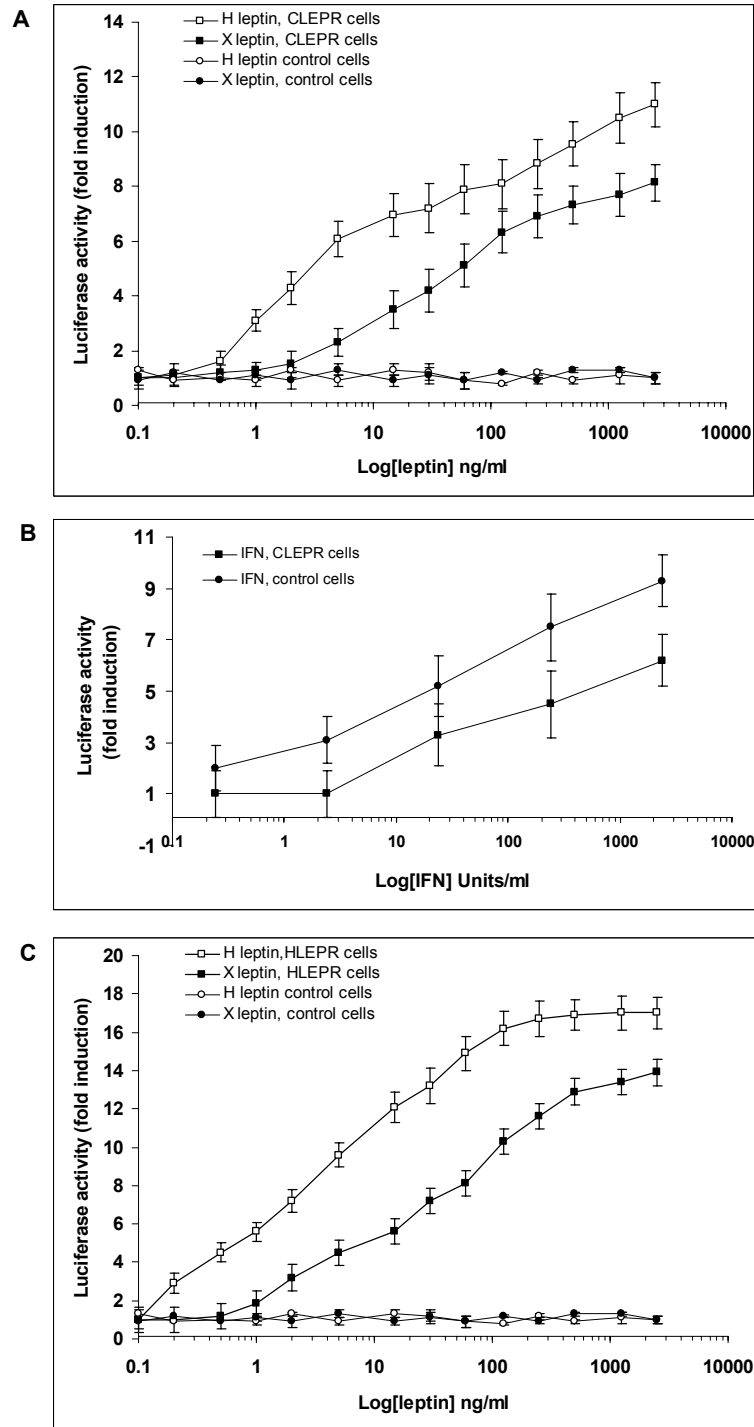
איור 3 : אנליזה של ביטוי RNA ברקמת השומן והכבד של מטילות קלות וכבדות



RNA הופק מכבד ומשומן בטני של מטילות קלות וכבדות. הכמות היחסית של ה RNA ברקמות נקבעה בשיטה של Real-time-PCR ושימוש במרקר פלואורסצנטי.

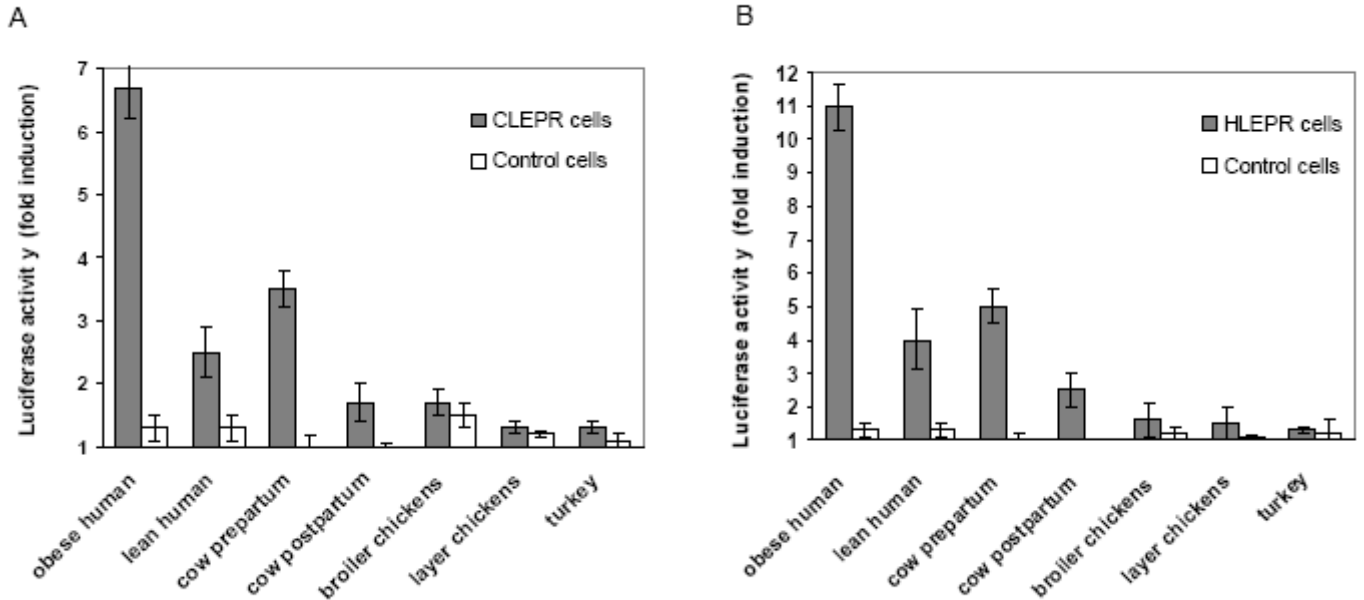
איור 4 : פיתוח מערכת תאית לבדיקת פעילות הורמון השובע לפטין של עופות

איור 4 א' : תגובת התאים לציטוקינים רקומביננטיים



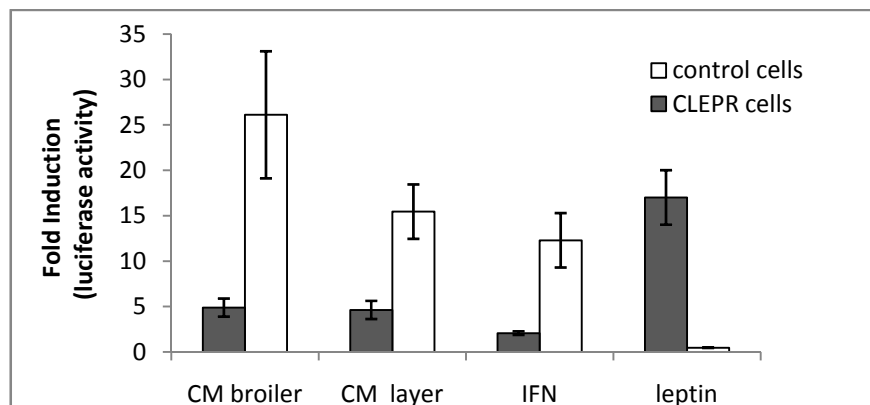
תאי HEK-293 הותמרו בגן לקולטן ללפטין של עופות (CLEPR), המפעיל את החלבון תאי STAT-3, בשילוב עם גן מדווח המגיב ל STAT-3 ביצירת לוציפראז. תאי הביקורת הותמרו בגן המדווח בלבד. הגרף העליון מראה כי הדגרה של שני סוגי התאים עם לפטינים רקומביננטיים של אדם (H-leptin) ושל צפרדע (X-leptin) הביאה להפעלה ספציפית של הקולטן ללפטין. תאי הביקורת אינם מופעלים. בגרף האמצעי ניתן לראות כי אינטרפרון (IFN), שהוא ציטוקין אחר המפעיל את STAT-3 אך לא דרך הקולטן ללפטין אלא דרך הקולטן האנדוגני לאינטרפרון מתקיימת בשני סוגי התאים וכי תאי הביקורת אף רגישים יותר מאשר התאים המבטאים את הקולטן ללפטין. בגרף התחתון ניתן לראות כי התגובה שהתקבלה דומה לזו שמתקבלת באותם תאים המותמרים בקולטן ללפטין של אדם (HLEPR cells).

איור 4 ב': בדיקת פעילות לפטין בדוגמאות סרום של יונקים ועופות



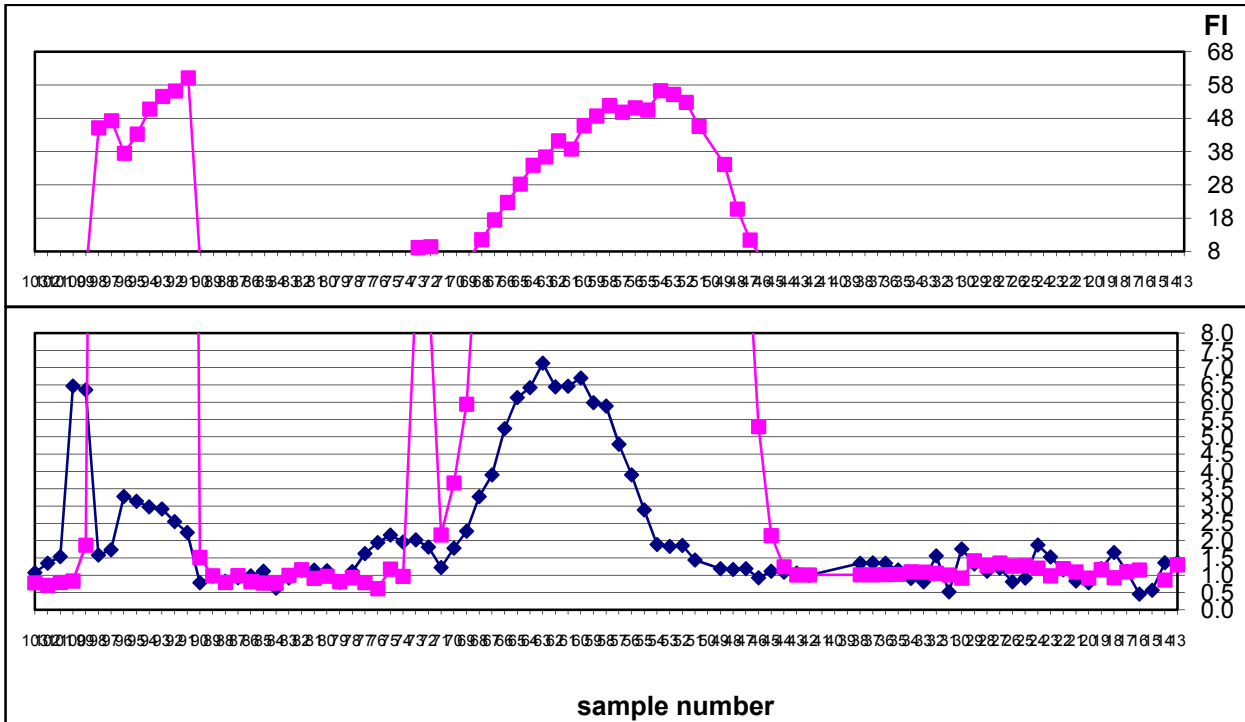
שורות תאים HEK-293 המבטאים את קולטן לפטין של עוף (A, CLEPR) ושל אדם (B, HLEPR) יחד עם גן מדווח המגיב להפעלת הקולטנים לפטין בייצור לוציפראז, הודגרו עם סרומים של אדם פרה ועופות. התגובה לסרומים של אדם ופרה על ידי התאים המכילים את הקולטנים לפטין היא ספציפית: ניתנת למדידה רק בתאים המבטאים את הקולטן לפטין ולא בתאי הביקורת. בתנאים אלה לא ניתן היה לראות סיגנל ספציפי עם הסרומים של עופות.

איור 4 ג': תגובת המערכת התאית לתערובת החלבונים המופרשים מרקמת השומן

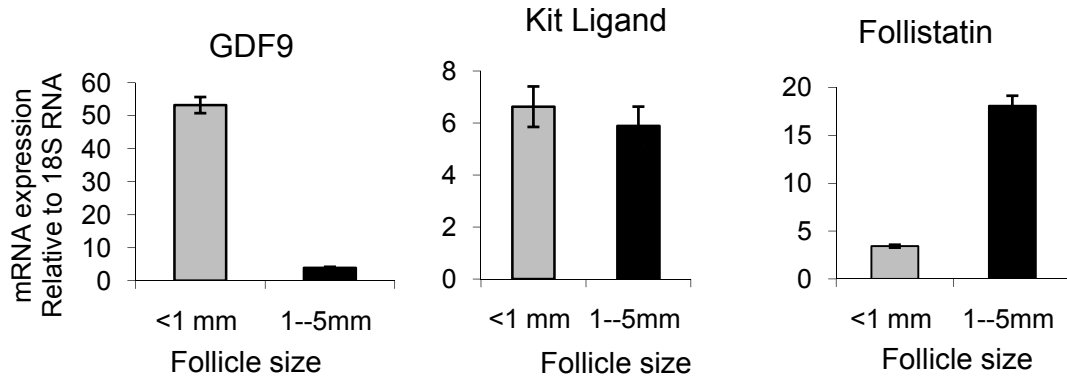


שני קווי התאים המתוארים באיור 3 הודגרו עם לפטין רקומביננטי המפעיל את התאים המבטאים את הקולטן לפטין ולא את תאי הביקורת, אינטרפרון המפעיל את שני סוגי התאים (פועל דרך קולטן אנדוגני) אך במקרה התאים ללא הקולטן לפטין רגישים יותר להפעלה על ידי קולטנים אנדוגניים. חלבונים מופרשים שנאספו בעקבות הדגרה של פיסות שומן ממטילה כבדה () וקלה הפעילו את שני סוגי התאים. הסיגנל שהתקבל היה גדול יותר בתאי הביקורת. יתכן שתערובת החלבונים מכילה חלבונים הנקשרים לקולטנים אנדוגניים שונים אך לא ניתן לשלול את האפשרות שבניהם קיים גם לפטין.

איור 5 : פעילות לפטין במקטעים של חלבונים מופרשים שהופרדו בקולונת ספקס G

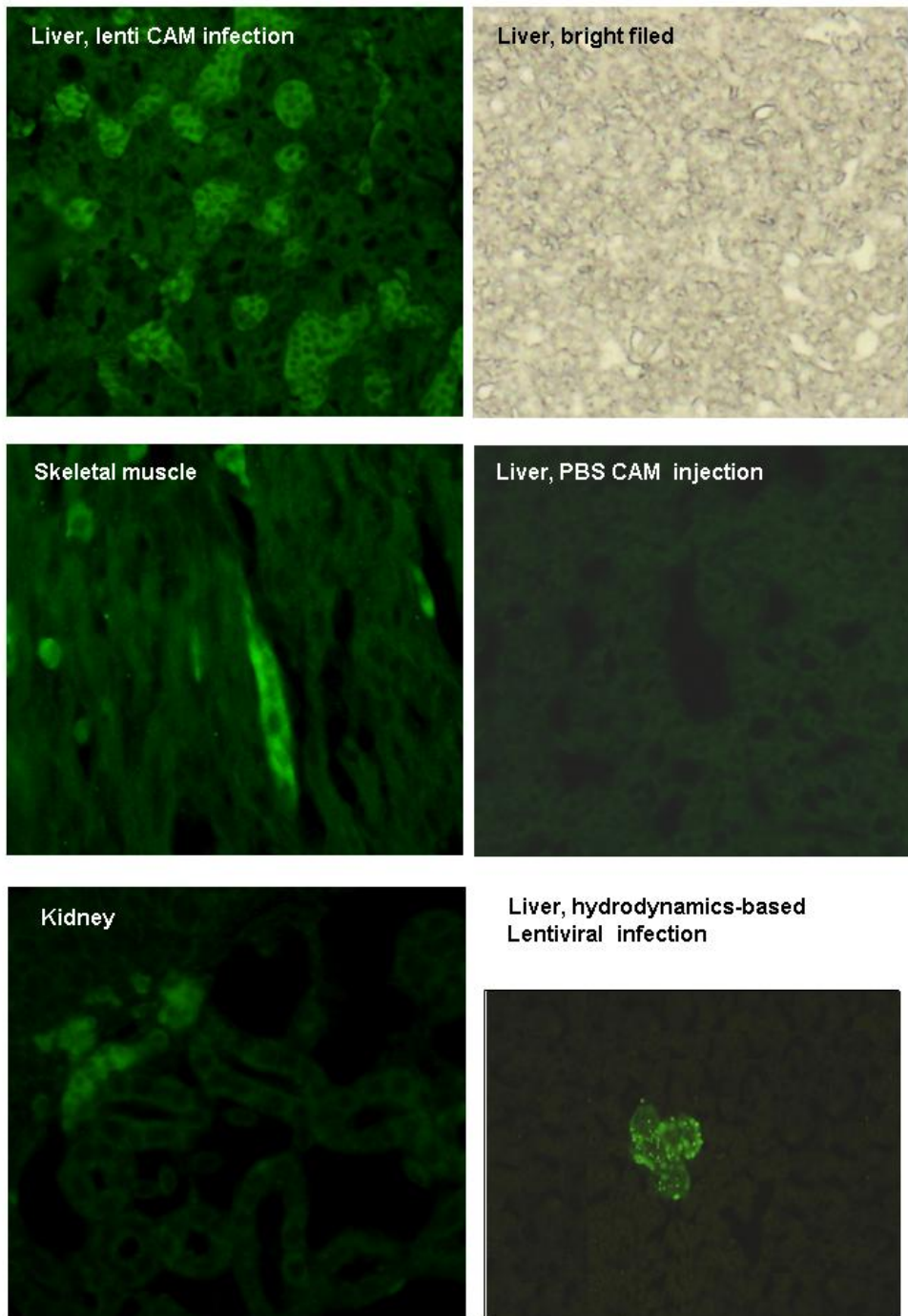


מדיום ללא סרום ששימש להדגרת פיסות שומן בטן של מטילה כבדה, רוכז פי 10 ב stir-cell (Amicon) והופרד על קולונה sephadex G-100. לפני ההפרדה הוסף לפטין רקומביננטי של אדם (500ng) המקטעים שנאספו מהקולונה הודגרו עם התאים המבטאים את הקולטן ללפטין (סימון כחול) ותאי הביקורת (סימון ורוד). נראה כי לא ניתן להפריד בדרך זו בין הפעילות הספציפית לקולטן ללפטין לבין הפעילות הנמדדת בתאי הביקורת אך הפיקים אינם חופפים ומאשרים את ההנחה כי הפעילות העיקרית הנמדדת נובעת מחלבונים שאינם לפטין. בהפרדות הבאות יאספו המקטעים שבהם אנו מצפים לפעילות לפטין, החלבונים במקטעים אלה ירוכזו וישלחו לאנליזה במס-ספקטרומטריה וב western blotting. במס-ספק נחפש חלבון לא ידוע בגודל ובמבנה דומה ללפטין, ב western נשתמש בנוגדנים שהוכנו כנגד לפטין הומני



זקיקים הקטנים מ 1 מילימטר, שהם זקיקים רדומים וזקיקים שנכנסו למסלול ההתפתחות (1-5 מילימטר) הופקו משחלות של מטילות קלות וכבדות בשבוע הראשון של ההטלה. ר.נ.א. שהופק שימש לאנליזה בשיטה של פ.ס.ר. כמותי. נבדקו תוצרי הגנים המצוינים באיור הידועים כקשורים להתפתחות זקיקים בעופות. על פי התוצאות נראה כי אם נדגיר זקיקים הקטנים מ 1 מילימטר בנוכחות חלבונים המופרשים מרקמת השומן ניתן יהיה לבדוק את השפעתם על הכניסה של זקיקים לתהליך ההתפתחות. כל עמודה מייצגת שלשה פרטים שונים של מטילות קלות. (תוצאות דומות נמצאו גם בכבדות).

איור 7: ביטוי גן מדוח ברקמות אפרוח שטופל בלנטייורוס ביום 10 של ההתפתחות העוברית



ביטוי GFP ברקמות אפרוח בגיל 14 יום בעוקבות הזרקה של לנטייורוס המכיל את הגן GFP (FIV-CMV- GFP לוריד ה CAM ביום 10 של התפתחות העובר .)

- Ahima RS 2006 Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* **14 Suppl 5** 242S-249S.
- Bluher S & Mantzoros CS 2007 Leptin in reproduction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **14** 458-464.
- Bulcao C, Ferreira SR, Giuffrida FM & Ribeiro-Filho FF 2006 The new adipose tissue and adipocytokines. *Curr Diabetes Rev* **2** 19-28.
- Condiotti R, Curran MA, Nolan GP, Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Gross E & Galun E 2004 Prolonged liver-specific transgene expression by a non-primate lentiviral vector. *Biochem Biophys Res Commun* **320** 998-1006.
- Crespi EJ & Denver RJ 2006 Leptin (ob gene) of the South African clawed frog *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** 10092-10097.
- Friedman-Einat M, Boswell T, Horev G, Girishvarma G, Dunn IC, Talbot RT & Sharp PJ 1999 The chicken leptin gene: has it been cloned? *Gen Comp Endocrinol* **115** 354-363.
- Goulis DG & Tarlatzis BC 2008 Metabolic syndrome and reproduction: I. testicular function. *Gynecol Endocrinol* **24** 33-39.
- Goumenou AG, Matalliotakis IM, Koumantakis GE & Panidis DK 2003 The role of leptin in fertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **106** 118-124.
- Haase H 2007 Ahnak, a new player in beta-adrenergic regulation of the cardiac L-type Ca²⁺ channel. *Cardiovasc Res* **73** 19-25.
- Hill JW, Elmquist JK & Elias CF 2008 Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294** E827-832.
- Ivarie R 2006 Competitive bioreactor hens on the horizon. *Trends Biotechnol* **24** 99-101.
- Iwasaki T, Nakajima A, Yoneda M & Terauchi Y 2006 Relationship between the serum concentrations of C-reactive protein and parameters of adiposity and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocr J* **53** 345-356.
- Koerner A, Kratzsch J & Kiess W 2005 Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **19** 525-546.
- Kralisch S, Klein J, Bluher M, Paschke R, Stumvoll M & Fasshauer M 2005 Therapeutic perspectives of adipocytokines. *Expert Opin Pharmacother* **6** 863-872.
- Lee NK & Karsenty G 2008 Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab*.
- Marikovsky M, Rosenblum CI, Faltin Z & Friedman-Einat M 2002 Appearance of leptin in wound fluid as a response to injury. *Wound Repair Regen* **10** 302-307.
- Otobe S, Yuan X, Fukutani T, Wada N, Hashinaga T, Nakayama H, Hirota N, Kojima M & Yamada K 2007 Overexpression of Human Adiponectin in Transgenic Mice Results in Suppression of Fat Accumulation and Prevention of Premature Death by High-Calorie Diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Peterson RL, Tkatchenko TV, Pruett ND, Potter CS, Jacobs DF & Awgulewitsch A 2005 Epididymal cysteine-rich secretory protein 1 encoding gene is expressed in murine hair follicles and downregulated in mice overexpressing Hoxc13. *J Invest Dermatol Symp Proc* **10** 238-242.
- Shai E, Palmon A, Panet A, Marmary Y, Sherman Y, Curran MA, Galun E & Condiotti R 2005 Prolonged transgene expression in murine salivary glands following non-primate lentiviral vector transduction. *Mol Ther* **12** 137-143
- Tena-Sempere M 2006 KiSS-1 and reproduction: focus on its role in the metabolic regulation of fertility. *Neuroendocrinology* **83** 275-281.

Wada J 2008 Vaspin: a novel serpin with insulin-sensitizing effects. *Expert Opin Investig Drugs* **17** 327-333.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL & Ferrante AW, Jr. 2003 Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* **112** 1796-1808.

Wojcik-Gladysz A, Nowak KW, Pierzchala-Koziec K, Wankowska M, Misztal T, Polkowska J, Nowak M, Kaczmarek P, Gorska T, Szczepankiewicz D *et al.* 2006 Aspects of central and peripheral regulation of reproduction in mammals. *Reprod Biol* **6 Suppl 1** 89-103.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L & Friedman JM 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372** 425-432.

סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
המטרה לטווח הארוך היא שיפור ההטלה בשלוחת הרבייה הכבדה (האמהות של עופות המאכל). בעיית יעילות הייצור בשלוחה זו היא מהבעייתיות ביותר בענף הלול.
המטרה הספציפית למחקר זה היא זיהוי ואפיון חלבונים מופרשים מרקמת השומן המעורבים בבקרה על מאזן האנרגיה וייצור הביצים.
עיקרי הניסויים והתוצאות.
השתמשנו במודל של זני מטילות השונות באופן קיצוני ביעילות ייצור הביצים (מטילות קלות וכבדות). השוואת פרופיל החלבונים המופרשים מרקמת השומן בין זנים אלה העלתה מספר חלבונים נבדלים שחלקם היו ידועים בעבר כקשורים למנגנון בקרה זה וחלקם לא. במקביל פיתחנו שיטות לאפיין את פעילות החלבונים האלה בחיה השלמה ולמשך כל תקופת הייצור.
מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
בעבודה זו יצרנו את התשתית לפענוח המנגנון בו משפיעה רקמת השומן על ביצועי הרבייה בעופות. בעזרת תשתית זו אנו מפתחים עתה כלים שבעזרתם ניתן יהיה להשפיע על ייצור הביצים ומאפיינים חלבונים שיוכלו להוות סמנים לטיפול גנטי.
בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר?
מטרות המחקר הושגו: אותרו מספק חלבונים הנבדלים בביטויים ברקמת השומן של מטילות קלות וכבדות ופותחו דרכים לאפיין את השפעתם של חלבונים אלה על מדדי רבייה בחייה השלמה. תוצאות המחקר קידמו מאוד את היכולת שלנו לפענח את מנגנון הבקרה החשוב הזה. תנאי קריטי להשגת המטרות היישומיות מהווה היכולת שפיתחנו לבדיקת השפעת החומרים בחייה השלמה למשך כל התקופה היצרנית.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פנטנים - יש לציין שם ומס' פנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.
Gideon Hen, Sera Yosefi, Ana Ronin, Paz Einat, Charles Rosenblum, Robert J. Denver and Miriam Friedman-Einat. (2008). Monitoring leptin activity using the chicken leptin receptor. Journal of Endocrinology, 197, 325–333.
Miriam Friedman-Einat, Sera Yosefi, Ana Ronin, Faltin Zehava and Yuval Eshdat. Fat secreted proteins in broiler and layer hens. Proceedings, The World Poultry Science Symposium, Brisbane, Australia, Jun 2008.
מרים פרידמן-עינת, רקמת השומן – איתה ובלעדיה. "משק העופות" גיליון מאי 2007.
מאמרים נוספים נמצאים בהכנה.
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
רק בספריות <
לא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) ✓ <
חסוי – לא לפרסם <
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -

*יש לענות על שאלה זו רק בדוח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדוח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים