

**SLEDOVANIE EXPRESIE EXTRACELULÁRNEHO LEPTÍNOVÉHO RECEPTORA
U VÝKRMOVÝCH KURČIAT ROSS 308
MONITORING OF THE LEPTIN EXTRACELLULAR RECEPTOR EXPRESSION
IN ROSS 308 BROILER CHICKENS**

Lubica Mrázová, Radoslav Židek, Mária Angelovičová, Lenka Maršáľková, Jana Tkáčová

ABSTRACT

Leptin gene was identified in 1994 by positional cloning. Leptin is not only important in regulating food intake and energy balance, but also acts as metabolic and neuroendocrine hormone. The effect of this protein in relation to metabolism and food behavior of farm animals has not been adequately investigated. In farm animals, control of feed intake and obesity is economically important. The aim of our study was to optimize the methodological approach. We isolated total RNA from the tissues of heart, spleen, liver and abdominal fat. In the fat abdominal tissue RNA appears as a reduced, what could be caused by an alternative cutting of the molecule (splicing). In mammals, alternative splicing of leptin receptor produces several C-terminal isoforms, which are reduced. They have an important role in transport, cellular internalisation and degradation of leptin. Chicken leptin receptor is similar to its mammalian counterparts in terms of intron/exon structure. It is not known whether the chicken leptin receptor also undergoes by alternative splicing.

Key words: leptin receptor, OB-R alternative Splicing, bird, gene expression, following

ÚVOD

Leptínový gén bol identifikovaný v roku 1994 pomocou pozičného klonovania. Jeho mutácia sa pokladá za podklad fenotypu extrémnej obezity a neplodnosti u ob/ob myší. Väčšina výskumu, ktorý nasledoval po objavení tohto hormónu, sa zamerl na úlohu leptínu v regulácii telesnej hmotnosti, s cieľom objasnenia patofyziológie obezity. Mnoho výsledkov výskumu poukazuje na to, že leptín nie je dôležitý len v regulácii príjmu potravy a energetickej rovnováhy, ale plní tiež funkciu ako metabolický a neuroendokrinný hormón. Následne po klonovaní leptínového génu u myší, potkanov a ľudí, boli vyklonované viaceré homológy u niektorých cicavčích druhov, vrátane domácich zvierat. Poznatky efektu leptínu sú hlavne známe z výskumu s hlodavcami. Efekt tohto proteínu vo vzťahu k metabolizmu a potravinového správania farmových zvierat nebol doteraz adekvátne preskúmaný. U farmových zvierat má kontrola obezity a príjmu krmiva veľký ekonomicky význam. Veľké depozície tukového tkaniva majú negatívny vplyv na metabolizmus, produkčnú účinnosť, reprodukciu a kvalitu mäsa. Od svojho objavenia u cicavcov (**Zhang et al., 1994**) bol leptín charakterizovaný ako regulátor viacerých fyziologických funkcií vďaka jeho účinkom ako hormónu podieľajúceho sa v koordinácii energetickej bilancie, metabolizme a neuroendokrinných dráhach (**Ahima et al., 2000**). Taktiež má významnú úlohu v regulácii cytokínových imunitných reakcií (**Matarese et al., 2005**). Receptor pre leptín bol čoskoro identifikovaný po expresívnom klonovaní z myšieho *plexus chorideus* (sústava ciev v ktorých sa filtruje krv a dochádza k vytváraniu mozgovomíechového moku) (**Tartaglia et al., 1995**). Toto patrí do nadčel'ade I triedy cytokínových receptorov, ktorá zahŕňa receptory pre interleukín6, leukémiu inhibičný faktor, granulocytov-faktor stimulujúci kolónie a glykoproteín 130. Leptín je uvádzaný v niekoľkých izoformách z jedného génu, ktorý obsahuje 17 spoločne kódujúcich exónov a niekoľko alternatívne spojených exónov (**Wang et al., 1996**). Všetky izoformy zdieľajú rovnaké extracelulárne ligand-väzbové domény na amino-časiach, ale líšia sa v karboxy- častiach. Z izoformiem u laboratórnych hlodavcov jeden receptor (Re) chýba v transmembránovej a intracelulárnej doméne a pohybuje sa ako rozpustný receptor, zatiaľ čo iné (Ra, Rb, Rc, Rd a Rf) zdieľajú rovnaké intracelulárne a

transmembránové domény, ale líšia sa v dĺžke intracelulárnej domény (Ohkubo et al., 2000). Iba receptor (Re) obsahuje na celej dĺžke intracelulárne domény a hydrofóbne zvyšky potrebné pre aktiváciu JAK-STAT signálnej transdukčnej cesty, ktorá je primárne zodpovedná za signalizáciu leptínových účinkov. Preto sa Rb uvádza ako "dlhá" izoforma a Ra, Rc, Rd a Rf uvádzajú ako "krátke" izoformy (Chua Jr et al., 1997). Naklonovaný kurací gén vykazuje 60% celkovej sekvenčnej identity s cicavčím receptorom pre leptín a obsahuje predpokladané exónové hranice a taktiež konzervované motívy v dlhej izoforme (Rb) cicavčieho receptora (Horev et al., 2000). Morčací leptínový gén bol taktiež nedávno charakterizovaný, že vykazuje 94% nukleotickej sekvenčnej identity so sekvenciou u kurčiat (Richards et al., 2003). Štrukturálne zachovanie vtáčieho receptora pre leptínový gén spolu s jeho mapovaním v chromozomálnom rozsahu s jeho cicavčím náprotivkom, naznačuje, že fyziologické úlohy leptínu a jeho receptorov u vtákov a cicavcov môžu byť podobné (Dunn et al., 2000). Avšak, existujú pochybnosti o identite ligandu pre vtáčí leptínový receptor, pretože sa nepotvrdili šúdie hovoriace o tom, že cDNA kóduje receptor pre leptín u kurčiat (Amills et al., 2003). Existencia splicing (zostrihávacích) variantov cicavčieho receptora pre leptín je už značne známa (Lee et al., 1996). Málo vieme o molekulárnych mechanizmoch regulácie kontroly pre splicing leptínového receptora cicavcov. Evolučná vzdialenosť medzi kurčatami a cicavcami dovoľuje zachovávať genetické prvky dôležitých potenciálnych regulátorov identifikovaných sekvenčnými porovnaniami (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004). Zachovanie sekvencie medzi vtáčimi a cicavčimi receptormi pre leptín spolu s experimentálnymi údajmi naznačujú že krátke izoformy leptínového receptora môžu existovať u vtákov, ale ešte žiadne neboli izolované a charakterizované (Richard et al., 2003).

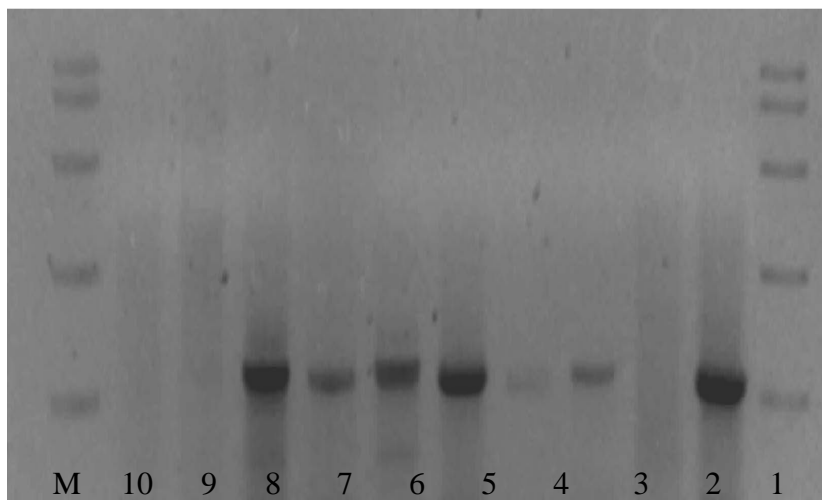
Cieľom tejto práce bolo zistiť expresiu extracelulárneho leptínového receptora na základe analýzy cDNA u výkrmového typu brojlerových kurčiat ROSS 308. Ďalším cieľom bolo študovať rozloženie tkanivovej expresie receptora pre leptín vo vybraných orgánoch u výkrmových kurčiat.

MATERIÁL A METODIKA

Analýzu sme vykonali na vzorkách získaných z finálneho výkrmového typu brojlerových kurčiat ROSS 308, ktoré boli chované v hale na hlbokoj podstielke. Všetky postupy vykonané na zvieratách boli v súlade s právnymi predpismi o ochrane brojlerových kurčiat. Pokusná skupina bola zložená zo 100 kusov brojlerových kurčiat, z ktorých bolo vybratých 5 kusov rovnakej telesnej hmotnosti. Tieto brojlerové kurčatá sme použili ako reprezentatívne vzorky, z ktorých sme použili vnútorné orgány a tuk na analýzy. RNA bola vyizolovaná z častí v tretej miske rozdrvených častí tkanív sleziny, pečene a obličiek a intra- a extra-celulárneho tuku pomocou SV Total RNA Isolation System Trial Size kit. RNA bola prepísaná reverznou transkriptázou pomocou jednokrokového - cDNA syntetizačného kitu (Amersham) s náhodnými hexamérmami ako primermi. Reakčná zmes pre PCR obsahovala cDNA, 1,80 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTPs mix. Boli použité primery, ktorými sme analyzovali identifikáciu extracelulárneho receptora 0,80 pmol.μl⁻¹ E10-F marker 5'-ATGGTCTGCAAACCCAAACGCA (Liu et al., 2006) a 0,80 pmol.μl⁻¹ E13 - 14-R marker 5'-AGGAGCTTGGATATCTTTT (Liu et al., 2006). Ďalej boli použité primery pre pozitívnu kontrolu kvality izolovanej RNA a priebehu reverznej transkripcie pre glyceraldehyd-3-fosfatát dehydrogenázu (GAPDH) GAPDH-F marker 5'-GTGTTATCATCTCAGCTCCCTCAG (Liu et al., 2006) a marker GAPDH-R 5'-AAAGGTGGAAGAATGGCTGTCACC (Liu et al., 2006). Ďalšími zložkami boli 0,80 U GoTaq HotStar Polymeráza doplnené destilovanou vodou do objemu 30 μl. Zmes obsahovala tlmivý roztok GoTaq green pufor 5x (Promega, Medison USA) a amplifikácia prebehla v termálnom cykléri (PTC-150 MiniCycler™, Research, Watertown USA).

Postup PCR reakcie bol nasledovný: PCR cyklus začínal pre-denaturáciou na teplote 94 °C po dobu 4 minút. Následne bolo zopakovaných 30 cyklov obsahujúcich denaturáciu pri 94 °C po dobu 40 sekúnd a predlžovanie pri 72 °C po dobu 1 minúty. Finálne predlžovanie fragmentov prebiehalo pri 72 °C po dobu 7 minút.

VÝSLEDKY A DISKUSIA



M-hmotnostný márker, dráha 1 a 2: pečeň, dráha 3 a 4: vnútrotelový tuk; dráha 5 a 6: slezina; dráha 7 a 8: srdce; dráha 9 a 10 negatívna kontrola; dráha 1, 3, 5, 7 a 9 fragment

Obrázok 1 Expresia extracelulárneho leptínového receptora vo vybratých tkanivách

Zámerom experimentu bolo optimalizovať metodiku na sledovanie expresie extracelulárneho leptínového receptora na aviarnom modeli. V priebehu experimentu sa podarilo úspešne vyizolovať celkovú RNA so srdca, sleziny, pečene a vnútrotelového tuku. Získaná RNA po reverznej transkripcii na cDNA predstavovala templát použitý na identifikáciu zvoleného leptínového receptora. Ako vyplýva z obrázku 1, vo všetkých analyzovaných orgánoch sa nám podarilo vyizolovať celkovú RNA, ktorá pri následnej reverznej transkripcii a PCR reakcii s použitím primérových párov GAPDH-F a GAPDH-R umožnili vznik fragmentov 1, 3, 5 a 7, ktoré slúžia ako pozitívna kontrola kvality RNA a následne cDNA vo vzorke. Ako naznačuje dráha číslo 3 najmenší obsah izolovanej RNA bol dosiahnutý vo vnútrotelovom tuku. Dráhy číslo 2, 4, 6 a 8 predstavujú markéry na identifikáciu extracelulárneho leptínového receptora. So zreteľom na obrázok 1 v tkanive pečene (dráha 2) nebolo možné identifikovať RNA, ktorá by zodpovedala za vznik leptínového receptora, napriek pomerne vysokej koncentrácii celkovej cDNA vo vzorke (dráha 1). Dráha 6 a 8 obsahujú fragment poukazujúci na prítomnosť leptínového receptora v sledovaných orgánoch. Zaujímavé výsledky ponúka dráha číslo 4, ktorá by mala poukazovať na prítomnosť leptínového receptora vo vnútro telovom tuku. V tejto dráhe sa nachádzal fragment, ktorý svojou dĺžkou nezodpovedal očakávanej dĺžke fragmentu ohraničeného navrhnutými primérmí (E10-F a E13 – 14-R - 572bp), ale bol viditeľne kratší ako kontrolný fragment GAPDH s dĺžkou 533bp. Toto naše zistenie nezodpovedá tvrdeniu ktoré je spomínané v práci (Liu et al., 2006). Z uvedeného vyplýva, že použitím primérov a postupov popísaných v metodike práce je možné pozorovať expresiu extracelulárneho leptínového receptora u hybridu ROSS 308. V tkanive srdca a sleziny, je pozorovaný leptínový receptor exprimovaný v očakávaných množstvách, ktoré korelujú s množstvami v práci (Liu et al., 2006). V tkanive pečene nie je

možné tento receptor identifikovať napriek vysokému výťažku izolovanej celkovej RNA vo vzorke. Na rozdiel od štúdie (Liu et al., 2006), v našej práci sa v tkanive vnútro telového tuku RNA javí ako skrátaná, čo mohol zapríčiniť alternatívny zostrih molekuly (splicing). Nakoľko hybrid ROSS 308 je dlhodobo šľachtený so zameraním na znižovanie obsahu vnútrotelového tuku, budeme sa tejto oblasti venovať viac.

ZÁVER

V našom experimente sa podarilo vyizolovať celkovú RNA z tkaniva orgánov ako srdce, slezina, pečeň a abdominálny tuk. V tkanive pečene napriek vysokej koncentrácii celkovej cDNA vo vzorke nebolo možné identifikovať extracelulárny leptínový receptor. Vo vnútrotelovom tuku na prítomnosť leptínového receptora poukázal fragment, ktorý svojou dĺžkou nezodpovedal očakávanej dĺžke fragmentu ohraničeného navrhnutými prímerni. Ďalej sme zistili, že použitím prímeru a popísaných postupov je možné pozorovať expresiu extracelulárneho leptínového receptora u výkrmového typu brojlerových kurčiat ROSS 308. V očakávaných množstvách sa exprimovaný receptor pre leptín našiel v tkanivách srdca a sleziny. V tkanive abdominálneho tuku sa RNA našla v skrátenej forme, čo môže byť zapríčinené alternatívnym zostrihom molekuly (splicing).

LITERATÚRA

- AHIMA, R. S., FLIER, J. S. 2000. Leptin. In *Annu. Rev. Physiol.* vol. 62, 2000, p. 413–437.
- CHUA, J. R. SC., KOUTRAS, I. K., HAN, L., LIU, S-M., KAY, J., YOUNG, S. J. 1997. Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. In *Genomics*, vol. 45, 1997, p. 264–270.
- DUNN, I. C., BOSWELL, T., FRIEDMAN-EINAT, M., ESHDAT, Y., BURT, D. W., PATON, I. R. 2000. Mapping of the leptin receptor gene (LEPR) to chicken chromosome 8. In *Anim. Genet.*, vol. 31, 2000, p. 290.
- HOREV, G., EINAT, P., AHARONI, T., ESHDAT, Y., FRIEDMAN-EINAT, M. 2000. Molecular cloning and properties of the chicken leptin-receptor (CLEPR) gene. In *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 162, 2000, p. 95–106.
- INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. 2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. In *Nature*, vol. 432, 2004, p. 695–716.
- LEE, G. H., PROENCA, R., MONTEZ, J. M., CARROLL, K. M., DARVISHZADEH, J. G., LEE, J. I. 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor. in diabetic mice. In *Nature*, vol. 379, 1996, p. 632–635.
- LIU, X., DUNN, J. C., SHARP, P. J., BOSWELL, T. 2006. Molecular cloning and tissue distribution of a short form chicken leptin receptor mRNA. In *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 32, 2007, p. 155–166.
- MATARESE, G., MOSCHOS, S., MANTZOROS, CS. 2005. Leptin in immunology. In *J. Immunol*, vol. 174, 2005, p. 3137–3142.
- OHKUBO, T., TANAKA, M., NAKASHIMA, K. 2000. Structure and tissue distribution of chicken leptin receptor (cOb-R) mRNA. In *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 1491, 2000, p. 303–308.
- RICHARDS, M. P., POCH, S. M. 2003. Molecular cloning and expression of the turkey leptin receptor gene. In *Comp. Biochem. Physiol. Biol.*, vol. 136, 2003, p. 833–847.
- TARTAGLIA, L. A., DEMBSKI, M., WONG, X., DENG, N., CULPEPPER, J., DEVOS, R. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. In *Cell.*, vol. 83, 1995, p. 1263–1271.

WANG, M. Y., ZHOU, Y. T., NEWGARD, C. B., UNGER, R. H. 1996. A novel leptin receptor isoform in rat. In *FEBS Lett.*, vol. 392, 1996, p. 87–90.

ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L., FRIEDMAN, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. In *Nature.*, vol. 372, 1994, p. 425–432.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporovaná vedeckou grantovou agentúrou prostredníctvom finančnej podpory č. VEGA 1/0509/08.

Kontaktná adresa:

Ing. Ľubica Mrázová, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KHBP, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: lubica.mrazova@uniag.sk