

**התבטאות הקולטן הקצר של הלפטין ברקמות פריפריות בשלבים
שונים במחזור החיים של הפרה המי שקית**

עבודת גמר

**מוגשת לפקולטה למדעי החקלאות המזון והסביבה
האוניברסיטה העברית בירושלים
לשם קבלת תואר "מוסמך במדעי התזונה"**

מאת

יונתן דוד פוירמן

ספטמבר 2001

רחובות

אלול תשס"א

עבודה זו נערכה בהדרכתם של :

- פרופסור זכריה מדר, המכון לביוכימיה, מדעי המזון והתזונה, הפקולטה לחקלאות האוניברסיטה העברית בירושלים.
- ד"ר אבי שמאי, המכון לחקר בעלי חיים, מנהל המחקר החקלאי-מכון וולקני, בית דגן.

תודה:

- ד"ר רות בראב-טל, המכון לחקר בעלי חיים, מנהל המחקר החקלאי-מכון וולקני, בית דגן.
- מר חיים גסיטוע, המכון לחקר בעלי חיים, מנהל המחקר החקלאי-מכון וולקני, בית דגן.
- תודה לסבא אשר וסבתא רחל.

תוכן העניינים:

1	תקציר .
	1. מבוא.
2	1.1. הקדמה.
3	1.2. זיהוי ואפיון הקולטן ללפטין.
5	1.3. הקולטן הארוך ללפטין Ob-R _L .
6	1.4. הקולטן הקצר ללפטין Ob-R _S .
7	1.5. לפטין ומערכות פריפריאליות.
7	1.6. מחזור הייחום בפרות.
8	1.7. מחזור הייחום, GnRH ולפטין.
9	1.8. שלבי התפתחות הזקיב בבקר.
	1.9. אינטראקציות בין לפטין והורמונים אחרים המשפיעים על השחלות והתפתחות הזקיב.
12	1.10. לפטין הקולטן הקצר ללפטין ובלוטת החלב.
13	1.11. בלוטת החלב.
14	1.12. השפעת ההורמונים השונים על התפתחות העטין.
14	1.13. השפעת הלפטין על התפתחות רקמת העטין.
15	1.14. מטרת המחקר.
	2. חומרים ושיטות.
16	2.1. רקמות ודוגמאות דם.
16	2.2. חומרים.
17	2.3. תמיסות, בופרים ומצעי גידול.
18	2.4. הכנת גלים.
	2.5. הפקת חומצות גרעין.
19	2.5.1. הפקת Total RNA.
19	2.5.2. הפקת DNA פלסמיד.
20	2.6. מיצוי מקטעי DNA מג'ל.
	2.7. קביעה כמותית של חומצות גרעין.
20	2.7.1. קביעה כמותית של RNA.
20	2.7.2. קביעה כמותית של DNA.
21	2.8. הכנת Northern blot באמצעות ג'ל פורמאלדהיד.

	2.9	סימון וניקוי הגלאי ל Northern blot.
	2.9.1	סימון הגלאי ל Northern blot.
	21	
21	2.9.2	בדיקת אינקורפרציה.
22	2.9.3	ניקוי הגלאי מן הנוקלאוטידים החופשיים.
22	2.10	היברידיזציה ל RNA עם גלאי מסומן ב ^{32}P .
22	2.11	RT-PCR.
	2.12	שיבוט פלסמיד המכיל מקטע cDNA הומולוגי לקולטן הקצר ללפטין.
23	2.12.1	הכנת המחדר.
24	2.12.2	הכנסת המחדר לפלסמיד.
24	2.13	טרנספורמציה לתאים קומפטנטים.
24	2.14	הכנת גלאי ל RNase protection assay-RPA.
25	2.15	קביעת הרצף.
25	2.16	RNase protection assay-RPA.
	2.17	Radio Immune Assay - RIA.
26	2.17.1	יודיניציה.
26	2.17.2	קביעת לפטין על ידי Radio Immune Assay - RIA.
27	2.17.3	קביעת רמת פרוגסטרון על ידי Radio Immune Assay - RIA.
27	2.18	מדידת פעילות יומית.
	3	תוצאות.
28	3.1	תכנון פרימרים ל PCR לצורך זיהוי התבטאות הקולטן הקצר ללפטין בבקר.
29	3.2	הכנת הפלסמיד המכיל גלאי.
32	3.3	התבטאות של הקולטן הקצר ללפטין ברקמות פריפריאליות.
33	3.4	התבטאות הקולטן הקצר של לפטין בעטין בשלבים שונים של מחזור היצרנות.
	3.5	התבטאות הקולטן הקצר לפטין בזקיקים בשלבים השונים.
35	3.5.1	התבטאות הקולטן הקצר של לפטין בזקיקים בשלבים שונים על ידי RT-PCR.
	3.5.2	התבטאות הקולטן הקצר ללפטין בזקיקים בעזרת:
36		RNase protection assay-RPA.
38	3.6	קביעת רמת הלפטין בפלסמה של עגלות ופרות בתקופה שלפני הכניסה להריון.
39	3.7	השוואה של רמות הלפטין בפלסמה מול רמות הפרוגסטרון.
43	3.8	בדיקת פעילות יומית מול רמות לפטין.

	4. דיון.
45	4.1. התבטאות הקולטן הקצר ללפטין Ob-Ra ברקמות פריפריאליות בבקר.
45	4.2. התבטאות הקולטן הקצר ללפטין Ob-Ra בעטין.
46	4.3. התבטאות הקולטן הקצר ללפטין Ob-Ra בזקיקים.
51	4.4. סיכום.
50	5. רשימת ספרות.
59	6. ABSTRACT.

תקציר.

לפטין הוא חלבון בגודל של 167 חומצות אמינו המופרש בעיקר מרקמת השומן ומשמש כגורם מרכזי ברגולציה של המאזן האנרגטי של הגוף. בנוסף נראה כי ללפטין יש קשר בויסות תהליכי התפתחות שונים כגון הבגרות המינית, התפתחות רקמת העטין ומערכת הרבייה. ללפטין שני מופעים של הקולטן (Ob-R) המופע הקצר Ob-Ra והארוך Ob-R_L. המופע הארוך מבוטא בעיקר בהיפוטלמוס והיינו בעל יכולת העברת מסר אל התא. המופע הקצר מבוטא במרבית הרקמות הפריפריאליות ורק לאחרונה נמצא כי גם הוא בעל יכולת העברת מסר אל התא.

מטרת המחקר הוגדרה כאפיון התבטאות הקולטן הקצר של הלפטין ברקמות פריפריאליות בבקר בשלבים שונים במחזור החיים של הפרה היצרנית תוך התמקדות ברקמת העטין ובשלבי התפתחות הזקיק באמצעים מולקולריים. כמו כן אפיון רמות הלפטין בסרום של עגלות ופרות.

הנחת היסוד הייתה כי רמת ההתבטאות של הקולטן הקצר ללפטין בעטין משתנה בהתאם למצבה הגופני של הפרה. בעבודה אותה ביצענו עולה כי רמת התבטאות הקולטן הקצר של הלפטין בעטין משתנה במהלך מחזור החיים של הפרה. רמת ההתבטאות של הקולטן הקצר של הלפטין בעטין הייתה נמוכה בעגלה בת 3 חודשים ובפרה הנמצאת בתחלובה. רמה גבוהה של התבטאות נמצאה בעגלה בת 12 חודשים ובעגלה בהריון.

הנחת היסוד לגבי ההתבטאות הקולטן הקצר של הלפטין בזקיקים הייתה כי רמת ההתבטאות של הקולטן משתנה בהתאם לשלב ההתפתחות בו נמצא הזקיק. הרמה הנמוכה ביותר של התבטאות הקולטן הקצר של הלפטין בזקיק נמצאה בזקיקים שנמצאו בשלב 1 של התפתחותם המוגדר כשלב האנטרלי הקטן ואילו הרמה הגבוהה ביותר נמצא בזקיק הנמצא בשלב 3 המוגדר כשלב האנטרלי הגדול.

על מנת לאפיין את התנהגות ההורמון לפטין בפרות משקיות נבחרו שתי קבוצות: עגלות לפני הריון ראשון ופרות בוגרות לאחר המלטה. מצאנו כי ההבדלים במצב הגופני של הפרות והעגלות אותן בדקנו משתקפים גם ברמת הלפטין בסרום. בפרות חולבות אשר ה BCS (Body Condition Score) הממוצע שלהן היה 2.5, רמת הלפטין נעה סביב 1ng/ml בסרום ואלו בעגלות בהם BCS הממוצע היה 3.5 רמת הלפטין שהתקבלה הייתה גבוהה יותר ונעה בין 3-5 ng/ml לפטין בסרום.

1. מבוא.

1.1 הקדמה.

לפטין הוא חלבון בגודל של 16-kDa, תוצר הגן Ob אשר מיוצר בעיקר ברקמת השומן מקור השם לפטין הוא במילה היוונית – *Leptos* שפרושה רזה. הלפטין הוא למעשה חלבון כמעט בלעדי לרקמת השומן ורמתו בדם מייצגת את מסת השומן בגוף. מכאן כי הוא למעשה משמש כאדיפוסטאט ("adipostat") כלומר סמן למערכות הגוף לגבי מצב רזרבות האנרגיה, כפי שהיא מיוצגת על פי רקמת שומן. פגיעה בסינטזת החלבון או מוטציה בקולטן ללפטין, מבוטאת לרוב בהשמנת יתר, פגיעה בפוריות ועוד (Zhang et al, 1994).

החוקר הראשון שחשד כי קיים פקטור מסוים המשקף את המאזן האנרגטי של הגוף היה Kennedy אשר הציע את התיאוריה הליפוסטטאטית (lipostatic hypothesis) על הרגולציה של משקל הגוף (Kennedy et al, 1953). על מנת לבחון את התיאוריה של Kennedy, חוקר בשם Hervey ביצע סידרה של ניסויים פראביוטים אשר אישרו את התיאוריה הליפוסטטאטית באופן הבא: החוקרים חיברו את כלי הדם של חולדות הסובלות מהשמנת יתר (שנגרמה על ידי צריבה של ה-ventromedial hypothalamus) עם מערכת כלי הדם של חולדות רזות. כתוצאה העכברים הרזים סבלו מתת תזונה שגרמה למות. Hervey הניח כי פקטור מסוים אשר יוצר בעודף אצל החולדות השמנות הוא זה שגרם לאשליה של שובע בקרב החולדות הרזות (Hervey et al, 1958). בניסויים מאוחרים יותר בהם בוצעו ניסויים פראביוטים לעכברי ob/ob (בשלבם מאוחרים יותר גילו כי הם סובלים ממוטציה בגן Ob) עם עכברים רגילים, עודף המשקל של עכברי ob/ob כמעט נעלם. Hausberger וקבוצתו הניחו כי עכברי ob/ob כנראה סובלים מחוסר של חלבון/הורמון מסוים (circulating adipocyte "factor") (Hausberger et al, 1959).

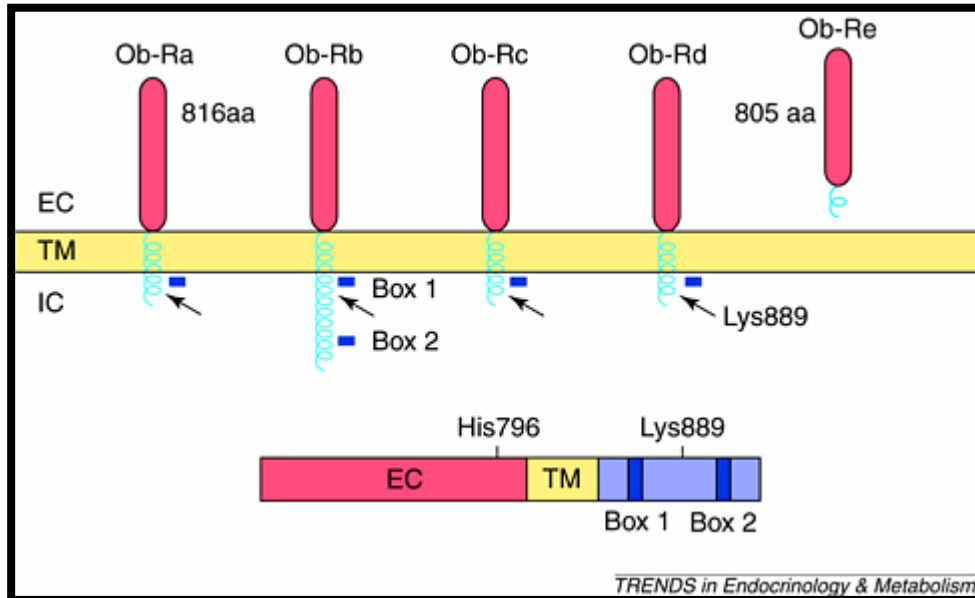
עבודות נוספות בוצעו על עכברי db/db (Coleman et al, 1969) וחולדות fa/fa (Harris, 1990), הסובלים מפגיעה בקולטן לאותו פקטור המופרש מרקמת השומן. הקבוצה הראשונה שהצליחה לשבט את ה"פקטור" המופרש מרקמת השומן, הייתה קבוצתו של Friedman. פקטור זה קרוי היום לפטין. רקמת השומן היא הרקמה הראשונה שהתגלתה כמקור להפרשת לפטין (Zhang et al, 1994), כיום ידוע על רקמות נוספות אשר יש ביכולתן ליצר לפטין, כמו הקיבה (Bado et al, 1998), שרירי השלד (Wang et al, 1998), השליה (Smith-Kirwin et al, 1999), ותאי האפיתל של העטין (Masuzaki et al, 1997). לפטין הוא בעל מבנה שלישוני הזזה לזה של הורמונים השייכים לקבוצת הציטוקינים. לפטין הוא תוצר הגן Ob אשר בנוי משלושה אקסונים. תוצר הגן בן 160 חומצות האמינו מופרש אל מערכת הדם ואתר הפעולה העיקרי שלו הוא ההיפוטלמוס

(Zang et al, 1994). לפטין מצוי בנוזלים הביולוגים הן בצורה חופשית והן כשהוא קשור לקולטן בעל המופע הקצר (Ob-Re) (Sinha et al, 1996). כיום רווחת ההנחה כי תפקידו העיקרי של הלפטין הוא לשמור על מסת השומן ברמה מסוימת על ידי ויסות צריכת המזון ואופן הוצאת האנרגיה (Pelleymounter et al, 1995). לאחרונה מתוספים יותר ממצאים המחזקים את הסברה כי לפטין מעורב בתהליכי רבייה (Caprio et al, 2001).

1.2 זיהוי ואפיון הקולטן ללפטין.

Tartaglia וצוותו היו הראשונים שהצליחו לבודד את הקולטן ללפטין (Ob-R) מ *choriod plexus* של עכבר על ידי שימוש בשיטות שיבוט (Tartaglia et al, 1999). על מנת לזהות את הקולטן ללפטין Tartaglia וצוותו השתמשו במופעים שונים של לפטין מסומן ביד או על ידי יצירה של חלבון מאוחה (fusion protein) בין לפטין לבין secreted placental alkaline phosphatase. בחומרים אלו השתמשו לזיהוי רקמות אשר להן יכולת לקשור לפטין (cell surface leptin binding activity). קשירה ספציפית זוהתה ב *choriod plexus* בעכבר. על מנת לשבט את אתר הקישור של הלפטין למברנת התא, נבנתה ספריית cDNA של murine choriod plexus. התאים שהכילו את הספרייה נסרקו על ידי leptin-alkaline phosphatase fusion protein. מתוצאות הסריקה הצליחו לבודד את המקטע בספריית ה cDNA אשר מקודד לקולטן ללפטין (Ob-R). תוצאת בדיקת הרצף של ה cDNA שבודד מהספרייה המקורית של murine choriod plexus הראו כי הקולטן הינו בעל מבנה של signal membrane-spanning domain אשר שייך לקבוצת הקולטנים class 1 cytokine receptor. לימוד מעמיק של התוצאות שהתקבלו מניתוחים שונים שנערכו על גבי ספריית ה cDNA לימדו כי ישנם מספר מופעים של הקולטן Ob-R בעכבר ובאדם הכוללים מופע ארוך של הקולטן ללפטין ומופע קצר (תמונה 1). החלק החוץ ממברנלי של הקולטן הקצר והקולטן הארוך של Ob-R זהים לחלוטין. ההבדלים בין הקולטנים נובעים מ alternative RNA splicing באזור ה C-טרמינלי של ה-coding exon. התוצאה של אותו alternative RNA splicing היא במופעים שונים של קולטן ל Ob-R כאשר ההבדלים ביניהם הם באורך וברצף של החלק התוך ממברנלי. עבודות אחרות שנעשו הראו כי קיימים סוגים נוספים של Ob-R_s. המשותף לכל אותם מופעים הוא שבכולם החלק התוך ממברנלי מסתיים לאחר point of divergence (אחרי חומצה אמינו 29 בחלק התוך ממברנלי של Ob-R). בנוסף למופעים אלו קיים מופע מסיס של ה Ob-R הנקרא Ob-Re, מופע זה הינו נטול חלק תוך ממברנלי.

בעבודות בהן השוו בין אנשים שמנים לבין אנשים בעלי רקמת שומן מינימלית ראו כי בקרב הנבדקים הרזים רוב הלפטין בדם מופיע כאשר הוא קשור ל-Ob-Re, ואילו בקרב אנשים שמנים הלפטין בדם מופיע ברובו בצורה החופשית (Sinha et al, 1996).



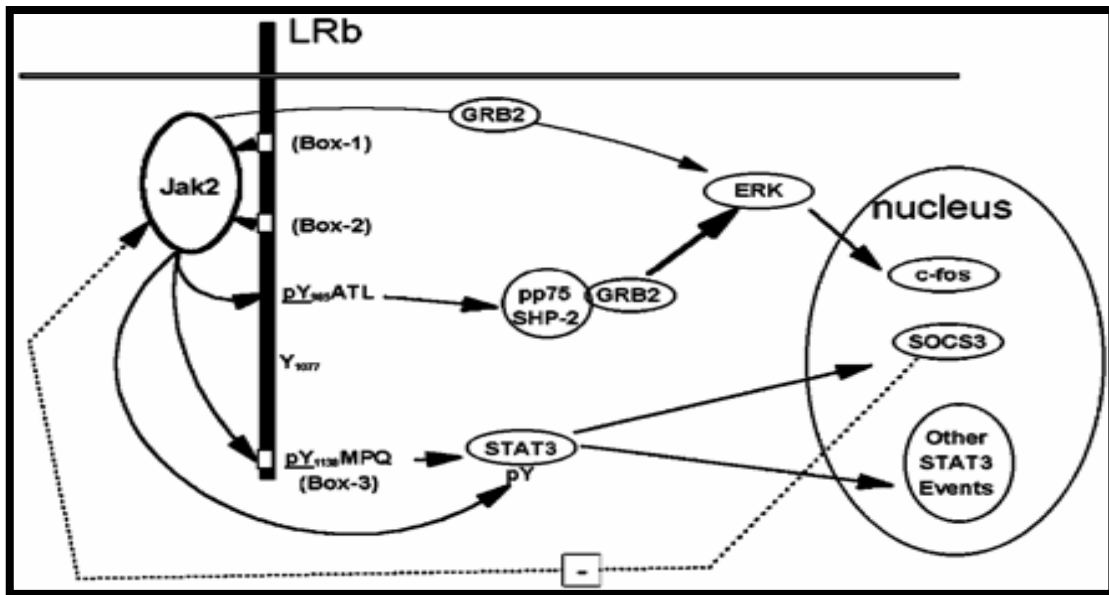
תמונה 1: תאור המופעים העיקרים של הקולטן ללפטין Ob-R. תאור חמישה מופעים של Ob-R הנובעים מ alternative RNA splicing של mRNA. בכל סוגי הקולטן, מלבד Ob-R_e מבנה הקולטן זהה עד ל חומצה אמינית Lys889 מנקודה זה מתחילים ההבדלים בין המופעים השונים. רק Ob-R_b מכיל את box 1 and box 2 אשר יכולים להפעיל את janus kinase (JAK)-signal transducers ואת (STAT) transcription pathway. המופע של Ob-R_e זהה לכול השאר עד ל His 796, ממנה רצף החלבון משתנה ונגמר לאחר 9 חומצות אמינו. מופע זה של הקולטן הוא מסיס. (aa-amino acid, EC-extracellular, IC-intracellular, TM-transmembrane). נלקח מ: Caprio, 2001.

בניסויים שנערכו על מנת לקבוע לאילו מופעים של ה-Ob-R יש יכולת העברת סיגנל אל תוך התא (signal transduction), עלה כי למופע הארוך Ob-R_b יש תפקיד חשוב בהעברת הסיגנל אל תוך התא. בניסוי שנערך ב cos cell and hematopoietic cell line אשר הכילו BaF3 DNA המקודדים למופעים Ob-R_b, Ob-R_a, תאי cos אשר הכילו את מסגרת הקידוד ל Ob-R_b הגיבו לחשיפה ללפטין בהפעלה של מרכיבים בשרשרת

העברת האות בתא (signal transduction) ו-בהפעלה של מנגנוני שיעתוק (STAT). לעומתם תאים שביטאו את Ob-Ra (Ob-Rs) לא הפעילו את מסלול ה-STAT. תאי BaF3 אשר ביטאו Ob-Rb הגיבו לחשיפה ללפטין על ידי עליה בפרוליפרציה והפעלה של מסלולי Janus kinase 2 (Jak2). בתאי BaF3 אשר ביטאו Ob-Ra לא נצפתה עליה בפרוליפרציה או בהפעלה של מסלול Jak2 (Skoda et al, 1997).

1.3 הקולטן הארוך ללפטין-OB-R_L.

עד זמן לא רב היה מקובל לחשוב כי המופע הארוך של הקולטן ללפטין Ob-Rb היה האחראי הבלעדי להעברת סיגנל אל התא בעקבות קישור בין הקולטן ללפטין. המופע Ob-Rb בעל שייר ציטופלסמטי באורך של 302 חומצות אמינו (Ob-R_L) מבוטא בעיקר בהיפוטלמוס (Bjorbaek et al, 1997). העובדה כי הקולטן Ob-R הוא בעל הומולוגיה גבוהה לקולטנים מסוג class 1 cytokine receptors עזרה להבין את מנגנון העברת האות של קשירת הלפטין אל תוך התא. ידוע כי הקולטנים מסוג class 1 cytokine משתמשים במסלול ה JAK \ STAT (Heldin et al, 1995). חלבוני ה JAK ממוקמים לרוב בחלק הקרוב לממברנה בצד התוך ממברנלי באזור הקרוי ICD – intracellular domain. אזור ה ICD עובר זרחון כאשר הליגנד (ligand) נקשר אל הקולטן. ICD מזרחן משמש כאתר קשירה לחלבוני ה STAT וחלבוני ה-STAT עוברים אקטיבציה לאחר שהם נקשרים אל ICD מזרחן. חלבוני ה STAT המאוקטבים נודדים אל הגרעין ושם הם גורמים לתחילת שיעתוק (Tartaglia et al, 1997). Ob-Rb לאחר שעבר אקטיבציה על ידי לפטין גורם לשפעול של Jak2 tyrosine kinase. בעקבות ההתקשרות של הליגנד לקולטן, חומצות האמינו Tyr⁹⁸⁵ ו Tyr¹¹³⁸ שבשייר הציטופלסמטי של הקולטן עוברות פוספורילציה. פוספורילציה של Tyr¹¹³⁸ מפעילה את STAT3 שעובר פוספורילציה על ידי Jak2, העובר לגרעין ומאתחל את השיעתוק של socs3 וגנים נוספים. socs3 גורם למשוב שלילי על ידי עיכוב של מעבר הסיגנל מ-Ob-Rb ל- Jak 2. פוספורילציה של Tyr⁹⁸⁵ מפעילה את SHP-2, שעובר פוספורילציה (על ידי Jak2). SHP-2 מזרחן נקשר ל GRB-2 ביחד הם מתווכים את פעילותו של ERK. הגורם לשעתוק של C-fos (Banks et al, 2000).



תמונה 2: מהלך העברת האות אל תוך התא לאחר קישור בין לפטין לOb-Rb. בעקבות קישור ליגנד אל Ob-Rb Tyr⁹⁸⁵ ו Tyr¹¹³⁸ עוברים פוספורילציה ומפעילים מסלולים שונים בעזרת Jak2. Tyr¹¹³⁸ גורם להפעלה של STAT3 ומוביל לשיעתוק SOCS3. SOCS3 משמש כמשוב שלילי על ידי עיכוב הסיגנל בין Ob-Rb/Jak2. ERK, הגורם לשיעתוק של c-fos, משמש כמשוב שלילי על ידי עיכוב הסיגנל בין Ob-Rb/Jak2. (Banks et al, 2000).

1.4 הקולטן הקצר ללפטין - Ob-R_S.

המופץ של הקולטן הקצר Ob-R_S מבוטא כמעט בכל רקמה שנבחנה עד היום (Houseknecht et al, 1998). במשך תקופה מסוימת לא ייחסו לקולטן הקצר חשיבות בהעברת סיגנל, היכולת להעביר סיגנל אל תוך התא הייתה שמורה למופץ של הקולטן הארוך. עד היום התגלו ארבעה מופעים קצרים של Ob-R בעכבר ואדם, לשלושה מהם יש חלק ציטופלסמטי באורך של 32-40 חומצות אמינו. החלק החיצוני למעטפת התא והחלק החוצה את מעטפת התא זהה בשלושתם עד לחומצה האמינית מספר 29 הממוקמת באזור הפרוקסימלי של מעטפת התא (membrane-proximal 29 amino acid). המופץ של הקולטן המסיס Ob-R_E זהה גם הוא עד לחומצה אמינית 29, אולם למופץ זה אין חלק החוצה את מעטפת התא. הבדל בין המופעים השונים הוא באורך השייר ציטופלסמטי (שייר באורך 3, 5, 11 חומצות אמינו). המופעים השונים של הקולטן נובעים מ – alternative RNA splicing. (Lee et al, 1996).

Leaman ו BJORBAEK הציעו כי Ob-Rs מעורב בתהליכים של העברת הלפטין דרך ה blood-brain barrier וה blood-CSF וכמו כן יכול להיות כי Ob-Rs משמש כמתווך בפינוי הלפטין ברקמות (Tartaglia et al, 1995, Leaman et al, 1996). Ob-Rs אינו יכול לשפועל את מסלול STAT מכיוון שאין לו אתר הקישור המתאים לחלבוני STAT בשייר הציטופלסמטי כמו ל- Ob-R_L (Baumann et al, 1996). BJORBAEK בעבודתו עם תאי-CHO המבטאים Ob-Rs של עכבר מצא כי mOb-Rs יכול בנוכחות לפטין לגרום לזרחון טירוזין של JAK-2 ו IRS-1, ולגרום לאקטיבציה של MAPK. בנוסף BJORBAEK וצוותו מצאו עליה בשני סדרי גודל בפוספורילציה של ERK2 בנוכחות לפטין בתאי CHO המבטאים Ob-Rs. המנגנון בו מבוצעת האקטיבציה (ligand-independent activation) של IRS-1, JAK2, MAPK על ידי Ob-R_S בתאי CHO עדין לא ברור (BJORBAEK et al, 1997). בעבודה שבוצעה של ידי Yanagihara וצוותו, בה רצו לבחון את פעילותו של הקולטן הקצר ללפטין (Ob-Ra) במדולה של האדרנל בבקר (Adrenal Medullary) מצאו כי לאחר חשיפה לרמות שונות של לפטין ישנה עליה משמעותית בשיעור סינטזת הקטכולאמין (catecholamine) במדולה של האדרנל. קטכולאמינים מעורבים במנגנונים רבים בניהם עליה של רמת הגלוקוז בדם, עליה ברמת הליפוליזיס, עיכוב הפרשת אינסולין ועליה בטרמוגנזה של הגוף (thermogenesis). ממצאים אילו מרמזים כי הקולטן Ob-Ra בבקר הוא בעל יכולת העברת סיגנל אל תוך התא (Yanagihara et al, 2000).

1.5 לפטין ומערכות פריפריאליות.

העובדה כי מופעים שונים של הקולטן ללפטין מבטאים ברקמות פריפריאליות רבות במינים שונים של בעלי חיים מרמזת על כך כי ללפטין יכול להיות תפקיד בויסות תהליכים מטבולים באותן רקמות. בנוסף על כך פעילות מטבולית ברקמות פריפריאליות מושפעת מהמצב האנרגטי של בעל החיים אשר מבטא על ידי רמת הלפטין, עובדה זו תומכת בהשערה כי ללפטין יש השפעה על תהליכים מטבוליים רבים בבעלי חיים.

1.6 מחזור הייחום בפרות.

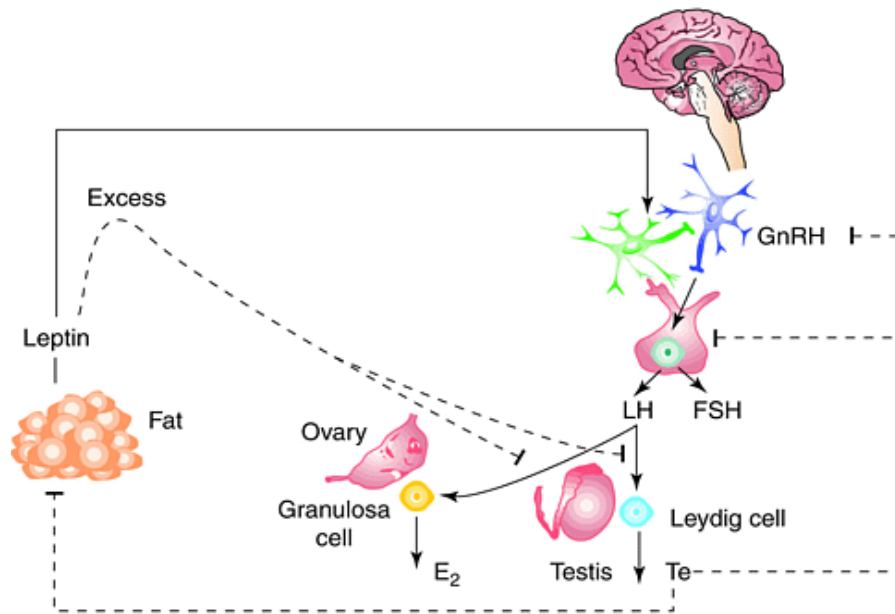
מחזור הייחום בפרות מחולק לשתי תקופות (פאזות) לפי המבנה המצוי על פני השחלה- גוף צהוב או זקיק.

- התקופה שבה שולט הגוף הצהוב – פאזה לוטאלית.
- התקופה שבה שולט הזקיק – פאזה פוליקולרית.

אורכה של הפזה הלוטאלית הוא 15-19 ימים, היא מתחילה לאחר הביץ ונמשכת עד לניוונו של הגוף הצהוב (corpus luteum). הפאזה הלוטאלית מאופיינת בנוכחות גוף צהוב, ברמות גבוהות של פרוגסטרון ורמות נמוכות של אסטרוידול ו-LH. במהלך הפאזה הלוטאלית הגלים הפוליקולרים מתחילים להתפתח. אורכה של הפאזה הפוליקולרית הוא 2-5 ימים, היא מתחילה עם נוונו של הגוף הצהוב ועד לביץ. הפאזה הפוליקולרית מאופיינת בהעדר גוף צהוב ונוכחות זקיק קדם ביוצי. רמות הפרוגסטרון נמוכות ורמות האסטרוידול וה-LH גבוהות.

1.7 מחזור הייחום, GnRH ולפטין.

GnRH המופרש מההיפותלמוס, מעודד הפרשה של LH ו-FSH מההיפופיזה. בניסויים בהם בדקו את ההשפעה של ריכוזי לפטין על הפרשת GnRH מצאו כי לפטין בריכוזים נמוכים (subnanomolar) יכול לגרום להפרשה מוגברת של GnRH. בריכוזים גבוהים (micromolar) יכולת זו נעלמה (Yu et al, 1997). עדיין לא ברור האם לפטין מעורב בהפרשה של GnRH באופן ישיר על ידי הניורונים של GnRH או באמצעות העברת סיגנל בין אזורים במוח, מכיוון שעד עתה לא נמצאו עדויות לנוכחות משותפת של הקולטנים ל-GnRH ולפטין באותם תאים על גבי ההיפוטלמוס. הסברה הרווחת היא כי לפטין משפיע על הפרשת GnRH באמצעות קשר בין הניורונים (Finn et al, 1998). בתמונה 3 מתואר מסלול משוער בו לפטין משפיע על הפרשה של LH ו-FSH דרך מעורבות בהפרשת GnRH.



TRENDS in Endocrinology & Metabolism

תמונה 3: לפטין המופרש מרקמת השומן יכול לגרום להפרשה של GnRH. בתגובה גרום להפרשה של גונדוטרופינים (gonadotropin). מצד שני רמות גבוהות של לפטין במערכת הפריפאריליות יכולת לגרום לעיכוב בהפרשה של סטרואידים על ידי השחלה. נלקח מ: Caprio et al, 2001.

1.8 שלבי התפתחות הזקיק בבקר.

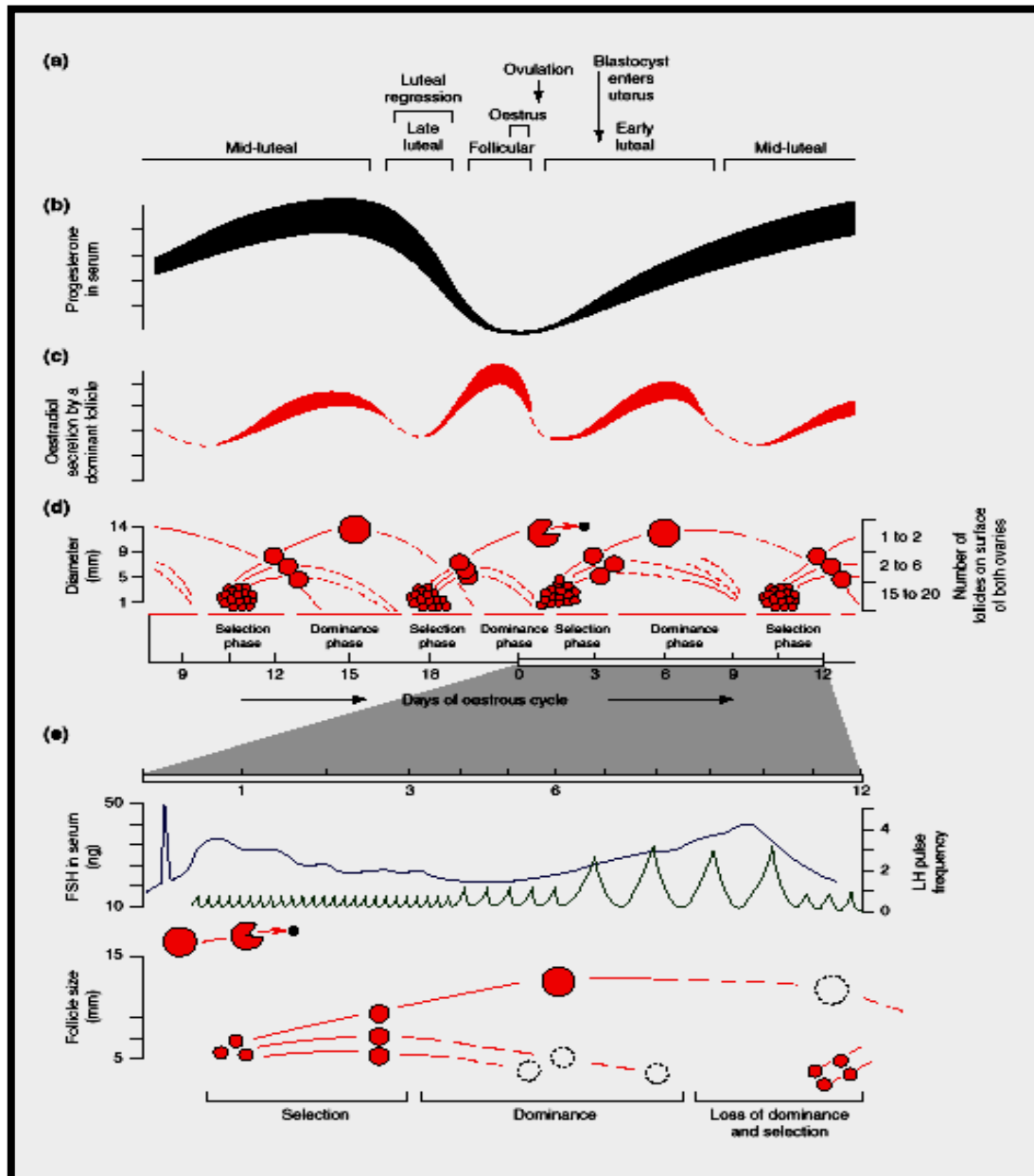
במהלך מחזור הייחום חלים שינויים בהרכב אוכלוסיית הזקיקים על פני השחלות. לאחר הייחום והביוץ נשארים על פני השחלה רק זקיקים קטנים מאוד. קבוצות של 3-6 זקיקים בגודל ממוצע של 4-5mm מתחילים להתפתח בתחילת המחזור, קבוצה כזו של זקיקים מכונה "גל זקיקים" או "גל פוליקולרי". כל גל של זקיקים מתחיל בגירוי של FSH - (follicle-stimulating hormone), לאחר שה"גל" מגיע לשיאו, יורדת רמת ה FSH במהלך מספר ימים. בשלב זה הזקיקים כולם גדלים בקצב שווה מגודל ממוצע של 4mm לגודל ממוצע של 8.5mm (שלב זה מכונה parallel growing phase). לאחר מספר ימים לרוב נוצר זקיק אחד יותר גדול מהאחרים שאר הזקיקים נספגים חזרה. הזקיק שנותר מכונה זקיק דומיננטי. לרוב יש שניים או שלושה גלי זקיקים במהלך מחזור ייחום. זקיק דומיננטי מאחד הגלים (בדרך כלל לא הגל הראשון) המגיע ל Luteal regression יהפוך להיות הזקיק שיבייץ - ovulatory follicle. לאחר שזקיק נבחר להיות הזקיק הדומיננטי מתחילים להופיע בו שינויים במטבוליזם הפנימי, המבדילים אותו משאר הזקיקים. מטרת השינויים היא להכין את הזקיק לביוץ ואת הנקבה להריון פוטנציאלי. כאשר השלב בו כל הזקיקים מתפתחים (parallel growing phase) מתחיל שלב ההפרדה בין הזקיק הדומיננטי לשאר הזקיקים, שלב זה מכונה diameter deviation - ההפרדה נובעת מהיכולת של הזקיק המפותח ביותר לשרוד לאחר הירידה בריכוזי ה FSH (Roche, 1996).

תופעת ה "גלים" של הזקיקים בבקר יוצרת מצב שבו נוצרים מספר סוגים של זקיקים דומיננטים, 1. זקיקים דומיננטים שלא יבייצו - Dominant nonovulating follicles. 2. זקיקים דומיננטים שיבייצו - Dominant ovulating follicles. ההפרדה לזקיק הדומיננטי שיבייץ מתרחשת בשני שלבים. שלב 1 - זקיק דומיננטי מהגל הראשון מפריש כמויות עולות של אסטרוידול וכמויות יורדות של אנדרוגן (androgen) לנוזל הפוליקולרי ביחס לשאר הזקיקים באותו גל. תאי תקא מהזקיק הדומיננטי מפרישים כמויות משמעותיות יותר של אנדרוגן מזקיק לא דומיננטי ולתאי הגרנולוזה יש יכולת מפותחת יותר להפוך את האנדרוגן לאסטרוידול. מכאן כי לזקיק דומיננטי הנבחר בשלב הלוטאלי יש יכולת גבוהה יותר ליצר אסטרוידול מתאי הגרנולוזה שלו. במידה ורמת הפרוגסטרוון נשארת ברמה הלוטאלית, הזקיק הדומיננטי לא ימשיך להתפתח מכיוון שרמת האסטרוידול לא תמשיך לעלות. ירידת האסטרוידול מבוקרת על ידי משוב שלילי של השחלה במטרה לאפשר לגל הזקיקים הבא

להתפתח ברמת באזלית של FSH. במידה והזקיק הדומיננטי עובר את השלב הראשון ומגיע לשלב ה dominance phase הוא נחשף להורמונים המאפשרים לו להמשיך להתפתח לזקיק מבייץ. בשלב זה הזקיק מפריש מספיק אסטרוידול על מנת להפיק גל של LH/FSH ולבייץ. הירידה ברמת הפרוגסטרוון בפלסמה בשלב הלוטאלי מלווה בעליה מסוימת בהפרשת ה LH הבזאלי, ובתדירות הפולסים של LH (Fortune et al, 1994. Ginther et al, 2001). תמונה 4. מסכמת את תהליכי התפתחות הזקיק במהלך המחזור בפרות. טבלה 1 מסכמת את תפקידי ההורמונים השונים במהלך מחזור הייחום.

ההורמון	מופרש מ...	תפקיד
GnRH	היפותלמוס	מעודד הפרשה של LH ו-FSH מההיפופיזה.
LH	היפופיזה	בפאזה לוטאלית- מעודד ייצור פרוגסטרוון ע"י הגוף הצהוב ואסטרוידול ע"י הזקיק. בפאזה פוליקולרית- מכין ביצית להפריה, גורם לביוץ וגורם לשינוי הזקיק לגוף צהוב.
FSH	היפופיזה	מעודד התפתחות זקיקים וייצור אסטרוידול ע"י הזקיק.
פרוגסטרוון	גוף צהוב (שחלה)	מדכא הפרשת LH בפאזה הלוטאלית.
אסטרוידול	זקיק (שחלה)	בפאזה לוטאלית- מדכא הפרשת LH יחד עם פרוגסטרוון. בפאזה פוליקולרית- אחראי להפרשת "שיא LH" ולהופעת ייחום התנהגותי
פרוסטגלנדין	רחם	גורם לניווט גוף צהוב בסוף מחזור הייחום.

טבלה 1: סיכום תפקידי ההורמונים השונים במהלך מחזור הייחום בבקר.



תמונה 4: תאור שלבי התפתחות הזקימים בבקר. a. השלבים השונים במחזור הייחום במהלך גלי הזקימים. b. פעילות ה corpus luteum המוערכת על ידי הפרשת הפרוגסטרון. c. הקורולציה בין יצור האסטרדיול להתפתחות הזקימ הדומיננטי בכל גל. d. התפתחות גל הזקימים במהלך המחזור. בכל גל קבוצה של זקימים מתחילה להתפתח. זקימ אחד יבחר וימשיך להתפתח עד היותו זקימ דומיננטי, שאר הזקימים בגל יספגו חזרה. זקימ דומיננטי מהגל הלוטאלי המוקדם והאמצעי יספגו לרוב גם הם. הזקימ הדומיננטי מהשלב הלוטאלי המאוחר ימשיך ויגיע לביצץ. e. השלבים השונים במהלך המחזור, גודל הזקימ בכל שלב. כל גל של זקימים מתחיל בעליה ברמת ה FSH (קו כחול), 2-5 זקימים יתפתחו לגודל בנוי ומהם אחד יתפתח לזקימ דומיננטי. תהליך ההפרדה של הזקימ הדומיננטי מלווה בעליה ברמת ה FSH ומסתיים בירידה של רמת ה FSH. תהליך הבחירה לזקימ הדומיננטי מלווה בפולסים גדלים של LH. נלקח מ: Roche, 1996.

1.9 אינטראקציות בין לפטין והורמונים אחרים המשפיעים על השחלות והתפתחות הזקי.ק.

פגם מולד ביצור הלפטין בקרב עכברי ob/ob גורם לעכברים מזן זה להשמנת יתר ועקרות. טיפול בלפטין אקסוגני גורם לירידה במסת השומן בגוף העכבר ולעליה במשקל השחלות, במספר הזקיקים ומערכת הרבייה חוזרת לתפקוד מלא (Barash et al, 1996). עקרות מופיעה גם בקרב עכברי db/db בעלי מוטציה בקולטן ללפטין בקרב עכברים אילו טיפול בלפטין אקסוגני לא גרם לשינויים במערכת הרבייה (Houseknecht et al, 1998). רוב הנשים הסובלות מתסמונת polycystic ovary disease סובלות גם מהשמנת יתר עובדה היכולה לרמז כי ללפטין יכולה להיות השפעה שלילית על מערכת הרבייה (Mantzoros et al, 2000). אפיונו של הקולטן ללפטין בשחלה מרמז כי ללפטין יכולה להיות השפעה ישירה על גורמים במערכת האנדוקרינית המוסתת את מנגנון הרבייה בבעלי חיים. העובדה כי המופעים השונים של הקולטן ללפטין מבוטאים הרקמות רבות כולל בלוטת המין, האדרנל ועוד, מרמז כי ללפטין יכולה להיות השפעה ישירה על מערכות אנדוקריניות בבלוטת המין (Wauters et al, 2000). בעבודות שבוצעו in vitro על תאי תקא ותאי גרנולוזה (thecal and granulosa cells), הראו כי ללפטין יש השפעה על המשוב השלילי של יצור סטרואידים שחלתיים.

Spicer וצוותו מצאו כי לפטין מעכב את השפעת האינסולין על יצור פרוגסטרון ואסטרדיול בתרבויות של תאי גרנולוזה של בקר (Spicer et al, 1997). עבודות שבוצעו in vitro הראו כי ללפטין יש יכולת לדכא יצור של אסטרדיול (Karlsson et al, 1997) ופרוגסטרון מהשחלות, המופרשים לאחר גירוי של LH, FSH ואינסולין. בנוסף נמצא כי לפטין מעלה את הפרוליפרציה של תאי תקע בעכברים (Spicer, 1998). מחקרים נוספים שבוצעו בחולדות, חזירים ובקר, הראו כי לפטין גורם לעיכוב של יצור סטרואידים בתאי גרנולוזה ותאי תקא בזקיקים מתפתחים. במחקר נוסף בו השרו תאי גרנולוזה של אישה פורייה בסרום של לפטין, ראו כי לפטין גורם לעיכוב משמעותי של FSH ו IGF-1-stimulated estradiol (Sanjay et al, 1999). ממצאים של Sanjay ואחרים מצבעים על אפשרות שרמות גבוהות של לפטין (כמו למשל בקרב נשים הסובלות מעודף משקל) יכולות להשפיע על יצור האסטרדיול המיוצר על ידי הזקיק המרכזי (dominant follicle). הזקיק מפריש הורמונים כמו FSH עוד בשלב הראשוני שלו (Small antral follicles) מה (Follicular Fluid) FF. כאשר זקיק נבחר להפוך לזקיק דומיננטי (המיון לזקיק דומיננטי מתחיל כאשר קוטר הזקיק מגיע לגודל של 7 מ"מ) רמת הפעילות של FSH בנוזל הפוליקולרי עולה וממשיכה לעלות עד השלב ה preovulatory. בבדיקות שנערכו על ידי Sanjay וצוותו נמצא כי רמת הלפטין בנוזל הפוליקולרי של זקיק מתפתח הייתה זהה לזו שבסרום (בהתחשב בתנודות היומיות של הלפטין בגוף) (Sanjay et al, 1999). העובדה כי רמת הלפטין בנוזל הפוליקולרי נתונה

לשינויים בהתאם לרמת הלפטין בגוף יכולה להסביר את רמת האי-פוריות הגבוהה בקרב נשים הסובלות מהשמנת יתר, כאשר נשים אילו יורדות במשקלן יש עליה מסוימת ברמת הפוריות (Kiddy et al, 1992).

1.10 לפטין, הקולטן הקצר ללפטין ובלוטת החלב.

לאחר הכניסה להריון מתחילים להופיע שינויים במטבוליזם של נקבת בעלי החיים על מנת לענות על דרישות העובר בשלב ההריון והולד לאחר ההמלטה. בתקופת ההריון השלייה היא הגורם המוסת את הצרכים המטבולים של העובר ולאחר ההמלטה רקמת העטין מחליפה את תפקיד השלייה והיא זו המספקת את הצרכים האנרגטיים של הוולד. העובדה כי לפטין מבוטא בשלייה של עכבר ואדם (Acki et al, 1999. Masuzaki et al, 1997) וברקמת העטין (Smith-Kirwin, 1998) מרמזת כי ללפטין המיוצר על ידי האם יש תפקיד בויסות הגדילה וההתפתחות של הוולד והעובר (Acki et al, 1999).

1.11 בלוטת החלב.

בלוטת החלב משמשת ביונקים כמכשיר להזנת הולד ע"י יצור חלב והפרשתו. התאמת בלוטת החלב לצרכים אלו נעשית על ידי גדילה והתמיינות לקראת המלטה והתנוונות לאחר גמילת הצאצאים או לחילופין הפסקת החליבה בבקר. את התפתחות בלוטת החלב ניתן לחלק ל 4 שלבים מחזוריים:

שלב א - גדילה: עד לבגרות המינית גדלים התאים מושלמת בזעיר אנפין המכילה את הצינוריות (duct), את ה-terminal end buds והאלבואולי בקצותיהן. פרוליפרציה של התאים האפיתליאליים מתחילה עם ההגעה לבגרות המינית ונמשכת עם ההריון.

שלב ב - התמיינות: תאי הצינוריות הסופיים והאלבואולי מתמיינים לתאים מפרישי חלב. שינויים אלו מתרחשים בסוף ההריון ונמשכים במינים מסוימים עד לאחר ההמלטה.

שלב ג - לקטציה: בשלב זה הפעילות התאית מופנית לכיוון סינטזה של חלב ואילו גדילת התאים והתרבותם מועטת או מופסקת לחלוטין. שלב זה מתחיל זמן קצר לאחר ההמלטה ונמשך לאורך תקופת ההנקה או החליבה.

שלב ד - התנוונות (involution) : שלב הרגרסיה של התאים המפרישים מסתיים באטרופיה של הבלוטה כולה. שלב זה מתחיל עם הפסקת ההנקה או הפסקת בחליבה, לאחר שלב זה המוגדר כתקופת ה"יובש" בפרות, המעגל חוזר על עצמו עם הכניסה להריון.

1.12 השפעת ההורמונים השונים על התפתחות העטין.

מקובל לחשוב כי יש שלושה הורמונים עיקריים החיוניים להתפתחות תקינה של רקמת עטין, פרולקטין, אינסולין וקורטיזול. הורמונים אילו מעורבים בשני השלבים עיקריים בהתפתחות התאים המפרישים בבלוטת החלב, שלב הפרוליפרציה ושלב הדפרנציאציה. בשלב הפרוליפרציה תאי גזע (stem calls) שבבלוטת החלב מתחלקים לתאים ראשוניים (precursors cells) ולתאים מפרישים (secretory cells). שלב הפרוליפרציה מווסת על ידי: אינסולין, epidermal growth factor (EGF) והורמון גדילה (GH). קבוצת הורמונים זו משמשת כגורם מיטוגני. פרולקטין משמש כגורם המעלה את רגישות התאים לאינסולין וכנראה משמש כגורם מיטוגני בעצמו. בשלב הדיפרנציאציה בו מתפתחים התאים המפרישים, יש תפקיד חשוב לגלוקוקורטיקואידים (קורטיזול) בשילוב עם אינסולין ופרולקטין. פרולקטין כנראה מבקר את סינטזת ה mRNA של חלבוני החלב. קורטיזול כנראה משמש כגורם מגביר לפעולתו של הפרולקטין. אסטרוגן ו progestin משמשים כגורם המגרה את התפתחות בלוטת החלב, ואת התעלות (duct) הנוצרות מגירוי של אסטרדיול. בנוסף הורמונים אילו מעכבים את הפרשת ה prolactin release inhibitory factor (PIF). מעכב נוסף של PIF הוא הפרוגסטרוגן. פרוגסטרוגן מעודד את התפתחות של התאים האלבאולים אך אינו מעורב בתהליכי יצור החלב (Norman et al, 1997).

1.13 השפעת לפטין על התפתחות רקמת העטין.

התפתחות רקמת העטין מתחילה בשלב העוברי ומסתיימת לאחר ההמלטה. במהלך כל שלבי ההתפתחות רקמת האפיתל של העטין מחוברת לסטרומה. רקמת הסטרומה מורכבת מתאי שומן ורקמת חיבור (fibrous connective) רקמה זו מכונה רקמת השומן של העטין- mammary fat pad (Neville et al, 1998). רקמה זו נחשבת לרקמה חסרת חשיבות מטבולית, לאחרונה עבודות שבוצעו על רקמת השומן של העטין הראו כי תאי השומן ברקמה זו (adipocyte-epithelial) הם בעלי יכולת לסנטז לפטין (Laud et al, 1999). בעבודות בהן בחנו את התפתחות העטין גילו כי רקמת השומן של העטין חשובה להתפתחות של תעלות העטין ולמורפוגנזה של רקמת העטין (Neville et al, 1998). Takahashi וצוותו בדקו את השפעת הלפטין על תאים עוברים של עכבר (C3H10T1/2), ומצאו כי לפטין מעודד פרוליפרציה של תאים. בנוכחות לפטין מספר התאים עלה במקביל

לצריכת הטימידין על ידי התאים (Takahashi, 1997). לפטין מבוטא ברקמת השומן של בלוטת החלב בעכבר (Acki, 1999). מכאן שיכול להיות כי ללפטין יש השפעה על מהלך ההתפתחות של רקמת העטין. הקולטן ללפטין המבוטא ברקמת העטין הוא הקולטן בעל המופע הקצר (Laud et al, 1999. Tartaglia et al, 1995). Laud וצוותו בדקו את רמת הביטוי של הקולטן הקצר ללפטין ברקמת האפיתל של העטין בכבשים ומצאו כי רמת הקולטן משתנה במהלך ההריון, ומגיעה לרמה של שיא בימים 70-106 להריון. רמתו הגבוהה יחסית של ביטוי הקולטן הקצר ללפטין ביום ה-70 תואמת את התחלת שלב הפרוליפרציה האופייני לתקופת אמצע ההריון בהתפתחות העטין (Laud et al, 1999). עבודה שנערכה בעכברים בה נבדקה רמת הלפטין בסרום. נמצא כי ביום 13-17 להריון הייתה עליה משמעותית ברמת הלפטין בסרום, שיורדה לאחר ההמלטה. כאשר בדקו את רמת הלפטין בדם במהלך ההריון, התקבלו תוצאות המראות כי לקראת אמצע תקופת ההריון רמת הלפטין עולה ללא קשר למצב הגופני של הנקבה (Hardie et al, 1997). העלייה ברמת הלפטין במהלך ההריון מיוחסת לגורמים רבים ביניהם, הפרשה של לפטין מהשחלה, הפרשה של המופע המסיס (Ob-Re) של הקולטן ללפטין ושינויים ברמות ההפרשה של הורמונים שונים היכולים להשפיע על הפרשת הלפטין כמו אינסולין אסטרוגן ועוד. Tomimatsu (Tomimatsu et al, 1997) טוען כי עליה ברמת הלפטין המופרש מרקמת השומן לקראת אמצע ההריון קשורה בתהליכים הקשורים למערכת הרבייה במהלך ההריון. Laud (Laud et al, 1999) טוען כי הממצאים המראים על עליה ברמת הלפטין לקראת אמצע ההריון והממצאים המראים כי רמת הקולטן לקראת אמצע ההריון עולה, תומכים בתיאוריה כי ללפטין יש תפקיד חשוב בתזמון וויסות השלבים האחרונים של התפתחות העטין במהלך ההריון.

1.14 מטרות המחקר.

המטרה המרכזית של המחקר הוגדרה כאפיון של התבטאות הקולטן הקצר ללפטין-Ob-Ra ברקמות פריפריות בבקר בשלבים שונים במחזור החיים של הפרה המישקית תוך התמקדות ברקמת העטין ושלבי התפתחות הזקיק.

מטרות משנה :

- בחינת ההנחה כי רמת ההתבטאות של הקולטן הקצר ללפטין בעטין משתנה בהתאם למצבה הגופני של הפרה.
- בחינת ההנחה כי רמת ההתבטאות הקולטן הקצר ללפטין משתנה בהתאם לשלב ההתפתחות שבו נמצא הזקיק.
- בחינת ההנחה כי רמת הלפטין משקפת את המצב הגופני שבו נמצאת הפרה וכי יש קשר בין הכניסה להריון לבין רמת הלפטין בגוף.

2. חומרים ושיטות.

2.1 רקמות ודוגמאות דם.

רקמות עטין, מוח ורקמות פריפריות נוספות נלקחו מפרות מזן HOLSTEIN מיד לאחר השחיטה בבית המטבחיים. לאחר הפרדת הרקמה מבעל החיים הוכנסו הרקמות לחנקן נוזלי והובאו למעבדה. הפרות לניסוי נבחרו בהתאם למצבם הגופני, גילן ושלב הזמן במחזור היצרנות שלהן.

הזיקים הופרדו משחלות שנאספו מפרות, מוינו על פי גודלם והוקפאו בחנקן נוזלי. דוגמאות דם נלקחו מפרות ועגלות במשק רביבים במהלך השנה, כל יום רביעי בין 07:00 – 08:00. הדוגמאות הונחו בקרח ומיד עם הגעתן למעבדה סורכזו, הפלסמה הופרדה ונשמרה בטמפ' של -20°C .

2.2 חומרים.

- Ethidium bromide •
 - EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) •
 - Bromophenol blue •
 - Ampicillin •
 - Guanidium thiocyanate •
 - N-lauroylsarcosine (sarcosyl) •
 - 3-[N-morpholino] propanesulfonic acid (MOPS) •
 - X-gal •
- נרכשו מחברת Sigma, St. Louis, Mo.USA

- Proteinase K •
 - DNase 1 •
 - Salmon sperm DNA •
- נרכשו מחברת Boehringer, Mannheim, Germany

- Agar •
- Bacto-yeast extract •
- Bacto-tryptone •

נרכשו מחברת Difco laboratories, Detroit, MI, USA

- BioPhenol (molecular biology grade).
 - Formaldehyde 36.5% (molecular biology grade).
 - Fromamide (molecular biology grade)
 - 2 Mercaptoethanol
- נרכשו מחברת ביו-לב, ירושלים.

- [α -³²P]-dATP (Specific activity-3000Ci/mmol)
 - Uridine-³⁵S-triphosphat
 - Sephadex G-50
 - Dextran sulfate sodium salt
- נרכשו מחברת Amersham-Pharmacia, Uppsala, Sweden.

- אנזימי רסטריקציה נרכשו מחברת Fermentas, Vilnius, Lithuania
- ניר הצילום מסוג BIOMAXTMMS מתוצרת Kodak.
- תערובת של נוקלאוטידים ל RT-PCR, נוקלאוטידים לסינטוז גלאי ל RPA נרכשו מחברת Promega, USA

2.3 תמיסות, בופרים ומצעי גידול.

התמיסות, TAE X 50, TBE X 20, MOPS X 10, הוכנו לפי Sambrook (1989). בופרים ותמיסות להפקת RNA הוכנו לפי Chomczynski (1987).

מצע LB(Luria Bertani) (pH 7.4)

Bacto-tryptone	1%(w/v)
Bacto-extract	0.5%(w/v)
NaCl	1%(w/v)

תמיסה להיברידיזציה *in situ*

formamide	50%
SSC	2x
Denhardt	1x
DTT	10Mm

Sodium pyrophosphate	10Mm
Dextrane dsulfate	10%
EDTA	5Mm
Total yeast RNA	25µg/ml

2.4 הכנת ג'לים.

ג'ל ל RNA :

Agarose	1% (w/v)
MOPS	1x(v/v)
Formaldehyde (37.5%)	0.66M

:10 x MOPS

Mops 1M pH-7	0.2M
Sodium acetate	0.05M
EDTA pH-7	0.01M

ג'ל DNA:

Agarose	0.8-1%(w/v)
TBE	1x(v/v)
Ethidium bromide	0.8µg/ml

ג'ל ל RPA:

Acrylamide (acryl: bis-acryl-19: 1)	5%(w/v)
TBE	1x
Urea	8M
10% Ammonium persulfate	120µl/15ml
TEMED	16µl/15ml

2.5 הפקת חומצות גרעין.

2.5.1 הפקת Total RNA.

הפקת RNA נעשתה לפי (Chomczynski et al, 1987). 0.5 גר' של רקמה הוכנסו לתוך 5 ml של תמיסת הפקה ונטחנה במהמגן תוך כדי קירור בקרח למשך 60 שניות. לתמיסה המהומגנת הוסף: 0.2 X Vol Phenol pH-4. 1 X Vol. 2M sodium acetate, pH 4.2. 1xVol chloroform-isoamylalcohol

המבחנות עורבבו והודגרו על קרח למשך 15 דקות. בתום ההדגרה המבחנות סורכזו למשך 15 דקות ב $10000 \times g$. בתום הסרכוז הופרדה הפזה המימית ואליה הוסף נפח 1 של isopropanol. המבחנות הודגרו למשך 60 דקות בטמפרטורה של -20°C ולאחריהן סורכזו למשך 20 דקות ב $10000 \times g$. בתום הסרכוז הורחקה הפזה המימית והפלט הורחף מחדש בתמיסת הפקה. לאחר המסת הפלט התמיסה נוקתה שנית עם פנול וה-RNA הושקע בעזרת נפח 1 של isopropanol ונשטף באתנול 75%. הפלט הורחף ב ddH₂O מטופלים ב DEPC.

2.5.2 הפקה DNA מפלסמיד.

הפקה של פלסמידים לצרכים שונים בוצעה על ידי שימוש בערכת plasmid Midi Kit של חברת QIAGEN. המושבות שנבחרו בודדו ממצע הגידול והורחפו ב 10ml של LB נוזלי שהכיל את האנטיביוטיקה המתאימה. לאחר כשעתיים הועברו 8 ml של LB לתוך ארלנמאר שהכיל 100 ml של LB + אנטיביוטיקה שטולטל למשך הלילה ב- 37°C . 2 ml שנותרו נשמרו ב-20% גליצרול ב -70°C . לאחר הלילה הועבר תרחיף החיידקים שהתקבל למבחנות 50 ml והמבחנות סורכזו למשך 15 דקות ב $6000 \times g$ בטמפ' של 4°C . בגמר הסרכוז הורחף הנוזל והפלט שהתקבל הורחף מחדש בנפח של 4 ml Resuspension Buffer. לאחר שהפלט הורחף לחלוטין הוסף לתרחיף 4 ml של Lysis Buffer, המבחנה עורבבה קלות והודגרה למשך 5 דקות בטמפרטורת החדר. לאחר ההדגרה הוסף 4 ml של Neutralization Buffer ולאחר ערבוב קל, המבחנה הודגרה על גבי קרח למשך 15 דקות. לאחר מכן סורכזו המבחנות ב $12000 \times g$ למשך 30 דקות בטמפ' של 4°C . קולונה – QIAGEN-tip 100 נשטפה ב Equilibration Buffer והנוזל שהתקבל לאחר הסירכוז האחרון הוטען עליה. לאחר שהנוזל עבר דרכה הקולונה נשטפה ב Wash Buffer פעמים בנפח של 10 ml. הפרדת הפלסמיד מהקולונה נעשתה בעזרת 5 ml של Elution Buffer.

לתוצר האלוציה הוספו 3.5 ml Isopropanol, המבחנה עורבבה קלות והודגרה ב -20°C למשך שעה, לאחר סרכוז ב $15000 \times g$ למשך 30 דקות התקבל פלט שנשטף ב 70% אתנול. הפלט יובש והומס בבופר TE.

2.6 מיצוי מקטעי DNA מג'ל.

מקטעי DNA הרצויים מוצו מהג'ל בעזרת ערכה של סיגמה (GenElute AGAROSE SPIN COLUMN). העבודה בוצע על פי הוראות היצרן. בקצרה, חתיכת ג'ל המכילה את מקטע DNA הרצוי הונח על גבי קולונה מהערכה שנשטפה בעזרת TE. הקולונה סורכזו למשך 5 דקות ב $1000 \times g$. תוצרי הסרכוז שנאגרו בתחתית המבחנה הכילו את מקטעי ה DNA הרצויים. מקטעי ה DNA עברו השקעה בעזרת אתנול. והורחפו במים או TE.

2.7 קביעה כמותית של חומצות גרעין.

2.7.1 קביעה כמותית של RNA.

פלטי ה RNA הורחפו במים ומהתמיסה נלקחה דגימה לקביעת ריכוז כלל ה-RNA. הצפיפיות האופטית (O.D.) של הדגימות המהולות נקבעה באורך גל של 260nm. ריכוז ה-RNA חושב לפי הנוסחה:

$$\text{O.D.} \times 40 \times \text{dilution} = \text{RNA} \mu\text{g/ml}$$

יחידה אחת של O.D. שקולה ל $40 \mu\text{g/ml}$ של Total RNA.

לאחר חישוב ריכוז ה RNA, נלקח מכל דוגמא נפח, כך שבכל דוגמא התקבלה כמות שווה של RNA.

2.7.2 קביעה כמותית של DNA.

פלטי ה DNA הורחפו במים ומהתמיסה נלקחה דגימה לקביעת ריכוז כלל ה-DNA. הצפיפיות האופטית (O.D.) של הדגימות המהולות נקבעה באורך גל של 260nm. ריכוז ה-DNA חושב לפי הנוסחה:

$$\text{O.D.} \times 50 \times \text{dilution} = \text{DNA} \mu\text{g/ml}$$

יחידה אחת של O.D. שקולה ל $50 \mu\text{g/ml}$.

לאחר חישוב ריכוז ה DNA, נלקח מכל דוגמא נפח, כך שבכל דוגמא התקבלה כמות שווה של DNA.

2.8 הכנת Northern blot באמצעות גל' פורמאלדהיד.

פרוטוקול העבודה הוכן לפי: Leonard et al (1986). הגלאי בו השתמשנו הופק מפלסמיד על ידי חיתוך בעזרת אנזים. $30\mu\text{g}$ של פלסמיד הודגרו למשך שעה עם 20U של EcoRI בטמפ' של 37°C . תוצרי הראקציה הושקעו בעזרת אתנול והורצו על גבי ג'ל אגרוז 1% מקטעי DNA בגודל הרצוי מוצו מג'ל (סעיף 2.6). ריכוז הגלאי נקבע על ידי ספקטרופוטומטר. $30\mu\text{g}$ total RNA הורחף ב $20\mu\text{l}$ בופר הטענה, הודגרו למשך 15 דקות בטמפ' של 65°C והועברו לקרח. הדגימות הוטענו על גבי הגל והורצו במכשיר הרצה במתח קבוע של 50V למשך 4 שעות. בתום ההרצה בוצעו שתי שטיפות ב ddH_2O למשך 15 דקות ושתי שטיפות נוספות בנוכחות $10 \times \text{SSC}$ למשך 20 דקות כל אחת. העברת ה RNA מהגל לממברנת Gene Screen Plus בוצעה בנוכחות $10 \times \text{SSC}$ למשך הלילה (ממברנת GeneScreen Plus אינה דורשת קיבוע ב UV או אפיה).

2.9 סימון וניקוי הגלאי ל Northern blot.

2.9.1 סימון גלאי ל Northern blot.

הסימון נעשה בשיטת random priming על ידי ערכת סימון של חברת Boehringer. הסימון נעשה לפי הוראות היצרן. תמיסה של 25ng DNA הושלמה לנפח של $9\mu\text{l}$ ע"י מים. לדנטורציה של ה-DNA הורתחה התמיסה במשך שתי דקות וקוררה מיד בקרח. לאחר מכן הוספו לתמיסה: $2\mu\text{l}$ בופר ראקציה המכיל אוליגונוקלאוטידים, $3\mu\text{l}$ תמיסת נוקלאוטידים אשר אינה מכילה ATP, $5\mu\text{l}$ $\alpha\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ ו- אנזים Klenow-1U. התערובת הודגרה למשך שעה בטמפ' של 37°C .

2.9.2 בדיקת אינקורפציה (יעילות הסימון).

לבדיקת רמת הסימון $1\mu\text{l}$ של ראקציה הסימון הונחה על פילטר מסוג GF/C של חברת Whatman, הפילטר נשטף בתמיסת 5% TCA על ידי ואקום. רמת הקרינה נבדקה לפני ואחרי השטיפה. אחוז האינקורפואציה נקבע על בסיס היחס בין שתי קריאות הקרינה.

2.9.3 ניקוי הגלאי מן הנוקלאוטידים החופשיים.

ניקוי הנוקלאוטידים החופשיים נעשה על ידי סרכוז הדוגמה על קולונת Microspin G-25. הנוזל הופרד מהקולונה לפני השימוש ע"י סרכוז של חמש דקות ב $2000 \times g$. לתמיסת בה סומן הגלאי הוסף $40 \mu\text{l}$ TE והיא הוטענה על גבי הקולונה וסורכזה ב $2500 \times g$ למשך 5 דקות. דגימה של $1 \mu\text{l}$ מתמיסת הגלאי המסומן נמנתה במונה ביתא כדי להעריך את עוצמת סימון הגלאי.

2.10 היברידיזציה ל RNA עם גלאי מסומן ב ^{32}P .

הממברנות הודגרו בתמיסת פרה היברידיזציה SDS 1%, NaCl 1M, 5% dextran sulfate $1 \mu\text{g/ml}$ ssDNA. למשך שעתיים בטמפ' של 58°C . לאחר שעתיים הוחלפה תמיסת הפרה היברידיזציה בתמיסת היברידיזציה ssDNA + SDS 1%, NaCl 1M, 5% dextran sulfate. למשך לילה בטמפ' של 58°C . לאחר ההיברידיזציה נשטפה הממברנה פעמים למשך 15 דקות ב 1% SDS, 2 x SSC, ופעמים למשך 15 דקות ב 1% SDS, 0.2 x SSC. טמפ' השטיפות הורדה בדרגה מהטמפ' בה נערכה ההיברידיזציה ועד לטמפ' החדר בשטיפה האחרונה. בגמר השטיפות נחשפה הממברנה לניר צילום.

2.11 RT-PCR.

cDNA הוכן מ $1 \mu\text{g}$ של RNA כללי שהופק מרקמות המטרה על ידי הדגרה עם אנזים AMV Reverse transcriptase של חברת Promega עם בופר שסופק עם האנזים (Reverse Transcription Buffer), 0.5mM dNTP's, 0.5mM oligo (dT)₁₅ primer, בנפח סופי של $20 \mu\text{l}$ למשך 60 דקות בטמפ' של 42°C . תוצר ה RT-PCR נמהלו ל $100 \mu\text{l}$. ראקציות ההגברה כללו את המרכיבים הבאים: פרימרים ספציפים בריכוז של $0.4 \mu\text{M}$, 1 יחידה של TAQ Polymerase, בופר PCR (0.1M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8, 0.5mM dNTP's, 1mM EDTA, 1mM DTT). הנפחים הושלמו ל $50-100 \mu\text{l}$ לפי הצורך. תנאי ראקציות ה PCR היו כדלהלן: 2 דקות ב 94°C , 15-35 מעגלים של אמפליפיקציה: 30 שניות ב 94°C , 30 שניות ב $56-46^{\circ}\text{C}$ תלוי ב TM של הפרימרים בהם השתמשנו 30 שניות ב 72°C . בתום המעגל האחרון הודגרו המבחנות לשלב נוסף של 7 דקות ב 72°C . תוצרי ההגברה הופרדו על ידי אלקטרופורזה על גבי גל 1% אגרז,

הפרימרים בהם השתמשנו במהלך העבודה :

Leptin receptor sense 5'-TTCCTCTTTCTCTCTGGAATC-3'

Leptin receptor anti sense 5'-TCCTCTTTCATCCAGCACTGT-3'

Leptin receptor 2 sense 5'-TGGACGTTATGAGGCAGTTG-3'

Leptin receptor 2 anti sense 5'-TTCCAGTTTCGACCTGTTTG-3'

G3PDH sense 5'-TGTTCCAGTATTGATTCCACCC-3'

G3PDH anti sense 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

2.12 שיבוט פלסמיד המכיל מקטע cDNA הומולוגי לקולטן הקצר ללפטין.

2.12.1 הכנת המחדר.

המחדר המכיל רצף הומולוגי ל mRNA של הקולטן הקצר ללפטין הוכן על ידי RT-PCR שנעשה לרקמת עטין על ידי שימוש בפרימרים ספציפים. בעזרת רצף שהוצא מבנק הגנים (Blast-NIH), ותוכנו בעזרת תוכנת 3'-prime לתכנון פרימרים. תוכנו שלושה זוגות של פרימרים:

הפרימרים בהם הוחלט להשתמש היו :

Leptin-sense: 5'-TTCCTCTTTCCTCCTGGATC-3'

Leptin-anti sense: 5'-TCCTCTTTCATCCAGCACTGT-3'

הפרימרים הוזמנו מחברת האחים איזנברג.

בעזרת הפרימרים ו-RT-PCR הכונן מקטע ספציפי ל mRNA sLR. המקטע המבוקש בגודל של 480bp בודד מהגל ונוקה על ידי ערכה של סיגמה (GenElute AGAROSE SPIN COLUMN). לפני ניקוי ה-DNA נשטפה הקולונה על ידי 100µl של TE. האגרוז החתוך הושם על הקולונה במבחנת אפנדרוף, המבחנה סורכה למשך 10 דקות ב 12000g. ה-DNA שבנוזל הושקע בעזרת אתנול. ניקיון תוצרי הניקוי נבדקו בעזרת אלקטרופורזה על גבי גל" 1% אגרוז.

2.12.2 הכנסת המחדר לפלסמיד (Ligation).

החדרת המקטע לתוך פלסמיד בוצעה על ידי ערכת pGEM[®]-T Easy Vector system של חברת Promega. הפלסמיד בו משתמשים במערכת זו הוא pGEM[®]-T Easy Vector. פלסמיד זה מכיל מקטע המכיל:

T7 / SP6 RNA Polymerase transcription initiation site, T7 / SP6 RNA Polymerase promoter, multiple cloning region, *lacZ* start codon, *lac* apron sequences, *lac* operator, β -lactamase coding region.

הליגציה נערכה במבחנת אפנדורף 1.5 ml סטרילית. שהכילה:

5 μ l 2 x Rapid Ligation Buffer, T₄ DNA Ligase, 1 μ l pGEM[®]-T Easy Vector, 3 μ l clean PCR product, 1 μ l T₄ DNA Ligase.

והודגרה למשך שעה ב טמפ' החדר. בתום השעה הועברו המבחנות לטמפ' של 70⁰ למשך 10 דקות על מנת לעצור את הראקציות.

2.13 טרנספורמציה לתאים קומפטנטים.

ל 100 μ l של חיידקים קומפטנטים אשר הופשרו על קרח הוספו 1-50 μ g של הפלסמיד המכיל את המחדר המתאים (סעיף 2.12.2). החיידקים הודגרו על גבי קרח למשך 30 דקות. הודגרו למשך שתי דקות בטמפ' של 42⁰C והוחזרו מייד להדגרה על גבי קרח. לחיידקים הוסף 1 ml של מצע LB (סעיף 2.3) והם הודגרו למשך שעה ב 37⁰C בטלטול. החיידקים הושקעו ע"י סרוז למשך 5 דקות ב 1000 x g בטמפ' של 4⁰C. המשקע הורחף ב 100 μ l של מצע LB ונזרע על גבי מצע סלקטיבי – LB המכיל 2% (w/v) Agar ו-100ug/ml Ampicilin. הצלחות הודגרו למשך לילה ב- 37⁰C.

2.14 הכנת גלאי RPA.

הגלאי בו השתמשנו לטובת ה RPA הופק מפלסמיד pGEM[®]-T Easy Vector שהכיל את המחדר הרצוי. לשם הפקת הגלאי Anti sense, הפלסמיד נחתך באנזים החיתוך Sal-1, החותך פעם אחת מחוץ למקטע המשובט. הגלאי סונז תוך שימוש באנזים T7-RNA Polymerase, בנוכחות α -[³⁵S]-dUTP. לשם הפקת גלאי ה- Sense הפלסמיד נחתך באנזים החיתוך Nco-1 והגלאי סונז תוך שימוש באנזים SP6-RNA Polymerase. בגמר הסינטז הראקציה מודגרת למשך 15 דקות בנוכחות 1 μ l של DNase 1. הראקציה הופסקה על ידי

הוספה של $1\mu\text{l}$ 0.5 M EDTA . תוצרי ראקציה הסינטוז הושקעו על ידי הוספה של 2.5 vol. EtOH . $0.1\text{ vol. } 5\text{ M NH}_4\text{OAc}$. והודגרו למשך שעה ב 20°C -, בתום ההדגרה התמיסה סורכזה למשך 15 דקות ב 12000g . הפלט הורחף ב- $20\mu\text{l}$ מים מטופלים ב DEPC. $1\mu\text{l}$ מהתערובת המסונטזת נלקח ונמדד בעזרת מונה בטא. לצורך היברדיזציה אחת דרושה דוגמה ברמת סימון של $4-8 \times 10^4\text{cpm}$.

2.15 קביעת רצף

קביעת הרצף נעשתה על בסיס שיטת sanger במעבדת השרות של מכון וויצמן. הפרימרים לקביעת הרצף היו SP6, T7. הפרימרים הספציפים סופקו על ידי מעבדת השרות.

2.16 RNase protection assay-RPA

RNase protection assay נעשתה על פי הוראות היצרן שסופקו עם ערכה שנרכשה מחברת בית העמק נציגי חברת AMBION בישראל. $15\mu\text{g}$ של total RNA $4 \times 10^4\text{ cpm}$ של גלאי מסומן ב ^{35}S הושקעו על ידי הוספה של 2.5 vol. EtOH ו $0.1\text{ vol. NH}_4\text{OAc}$ והדגרה למשך 30 דקות ב 20°C -. בתום ההדגרה סורכזו המבחנות למשך 15 דקות במהירות של $10000\times\text{rpm}$. הפלט יובש באוויר החופשי למשך 5 דקות. $10\mu\text{l}$ של בופר היברדיזציה שסופק על ידי החברה הוסף לפלט. המבחנות הודגרו למשך 4 דקות בטמפ' של $90-95^\circ\text{C}$, בתום ההדגרה הוכנסו המבחנות לתנור היבריזציה בטמפ' של 42°C למשך של לפחות 16 שעות. בגמר ההיברדיזציה הוסף לכול מבחנה תערובת של RNase A / RNase T1 יחד עם RNase Digestion buffer ביחס של 1:100 (כול החומרים סופקו על ידי היצרן). הראקציה הודגרה למשך 30 דקות ב 37°C , בתום ההדגרה הוסף למבחנות RNase Inactivation/Precipitation buffer, המבחנות עורבבו נמרצות והודגרו למשך 30 דקות בטמפ' של 20°C -. המבחנות סורכזו למשך 15 דקות ב $10000 \times \text{g}$ ב 4°C . הנוזל שנותר הורחף, הפלט שהתקבל נשטף ב $70\% \text{ EtOH}$ ויובש למשך 10 דקות באוויר החופשי. לפלטים שהתקבלו הוסף $10\mu\text{l}$ של Gel loading buffer. המבחנות הודגרו למשך 3 דקות בטמפ' של $90-95^\circ\text{C}$ בגמר החימום הועברו המבחנות לקירור על קרח. תוצרי ההיברדיזציה הוטענו על גל $5\% \text{ Acrylamide} / 8 \text{ M Urea}$ שהורץ ב $25-30 \text{ mAMPs}$ למשך 3-4 שעות. בגמר תהליך האלקטופורזה נחשף הג'ל לניר צילום למשך 72 שעות בטמפ' של 80°C -.

2.17 RIA - Radioimmunoassay

2.17.1 יודינציה.

עבודה זו נעשתה על פי Blanch D, (2000).

ראקציה זו בוצעה במבחנות פוליסטירן 75X11. בופר הראקציה היה בופר 0.05 M phosphate שהכיל:

0.154 M NaCl, 0.025 M EDTA, 0.5% bovine serum albumin (RIA grade),

0.025% sodium azide, 0.05% triton x-100.

Bovine-ovine leptin (B/o leptin) (3 μg in 10 μl of 0.3 M phosphate buffer pH7.5) סומן על ידי ערבוב של 10 μl של בופר 0.3 M phosphate pH7.5, ^{125}I Na 0.5 mCi. יחד עם 10 μl של chloramine-T (200 μg/ml in 0.3 M phosphate buffer pH 7.5). הראקציה הודגרה למשך 90 שניות. לאחר 90 שניות הוסף 200 μl של 0.3 M phosphate buffer pH 7.5. הלפטין המסומן הופרד מהיוד החופשי על ידי הרצה על גבי קולונת Sephadex G25. האלוציה נעשתה עם בופר 0.1 M phosphate pH=7.5, 1% BSA. הפרקציות בנפח של 2 מ"ל נאספו לתוך מבחנות. בגמר האלוציה נבדקו הפרקציות בעזרת מונה גמא. הפרקציות בהם הופיעה שיא של הקרינה נשמרו בטמפ' של 20°C.

2.17.2 קביעת לפטין על ידי RIA - Radio Immune Assay

לשתי חזרות של שלוש מבחנות של סטנדרט b/o-leptin ולשתי חזרות של 100 μl של הדוגמאות הנבחנות הוסף (1:5000) anti b/o-Leptin 50 μl - 50 μl של סרום נורמלי מ EMU. המבחנות הוגדרו למשך לילה בטמפ' של 4°C. לאחר ההדגרה הוסף לתערובות 50 μl של ^{125}I -b/o-Leptin (ברמת קריאה רצויה של 10000 cpm), התערובת החדשה הודגרה למשך 48 שעות בטמפ' של 4°C. השקעה של הקומפלקס נוגדן-אנטיגן בוצעה על ידי הוספה של 100 μl של סרום sheep-anti-emu immunoglobulin (מהול 1:12) למבחנות, המבחנות הודגרו בטמפ' של 4°C למשך 48 שעות. על מנת לשפר את היציבות של הפלט בסוף התהליך הוספו לכל מבחנה 1 ml של 3% polyethylene glycol 6000 ב 0.1M PBS, המבחנות סורכזו ב 2000 x g למשך 30 דקות. בגמר הסרכוז הנוזל נשפה והפלט שהתקבל יובש באוויר הפתוח למשך לילה. המבחנות נקראו במונה גמא.

2.17.3 קביעת רמת פרוגסטרון על ידי RIA - Radio Immune Assay.

רמת הפרוגסטרון בפלסמה של בקר נבחנה בעזרת ערכה שנרכשה מחברת DPC - Coat-a-Count, Progesterone Kit, TKPG2, Coated Tube (^{125}I). RIA. קביעת רמת הפרוגסטרון בוצעה על פי הוראות היצרן שצורפו לערכה.

2.18 מדידת הפעילות היומית.

הפעילות היומית היא מדד המבטא את מספר הצעדים הנצעדים ביום. מכשיר הפדומטר המולבש על אחת מרגלי הפרה/עגלה מודד את מספר הצעדים, סורק הממוקם לרוב בכניסה למחלבה קורא את הנתונים שנאגרו על גבי הפדומטר ומעביר אותם על המחשב המרכזי ברפת. מכשיר הפדומטר, הסורק ותוכנת המחשב מיוצרים על ידי חברת צח'ם אפיקים, קיבוץ אפיקים.

2.19 חלוקת הזקיקים לשלבים השונים.

הזקיקים שהופרדו מן השחלה חולקו לשלושה קבוצות לפי הגודל.
קבוצה 1 – שלב 1 – Small antral זקיקים שגודלם נע בין 3mm ל 5mm.
קבוצה 2 – שלב 2 – Medium antral זקיקים שגודלם נע בין 5mm ל 9mm.
קבוצה 3 – שלב 3 – Large antral זקיקים שגודלם נע בין 9mm ל 12mm.
קבוצה נוספת שנבדקה הייתה ה Corpus Luteum.
לאחר הפרדתם של הזקיקים מן השחלה, הזקיקים נשמרו בתחילה בחנקן נוזלי ולאחר מכן הועברו ל-70°C.

3. תוצאות.

3.1 תכנון פרימרים לPCR לצורך זיהוי התבטאות הקולטן הקצר ללפטין בבקר.

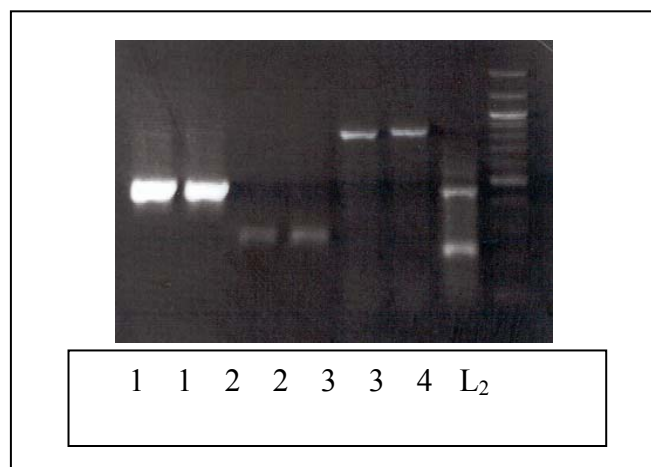
הפרימרים תוכננו על ידי תוכנת 3'-prime , התחשבות במספר גורמים. 1. ה T_m שהוגדר לתכנון הפרימרים היה $58^{\circ}C$. ה T_m של הפריימר מהווה אומדן ליציבות הקישור לגדיל המטרה.

הנוסחה לחישוב ה T_m . $T_m = 59.9 + 41(\%GC) - 674/N$ -N אורך הפריימר.

2. אורך הפרימרים הוגדר כ 21 בסיסים. אורך הפריימר הוא גורם מכריע בספציפיות שלו ומקובל שהרצף המקודד ל- 6 חומצות אמינו לפחות היינו ייחודי בגנום. פרימרים קצרים יותר עשויים להגביר את אקראיות התוצרים בראקצית PCR .

3. אורך התוצר הרצוי היה 480bp. אורך תוצר הראקציה חשוב, מכיוון שתוצר קצר מידי יהיה קשה לאבחנה על גבי ג'ל. תוצר קצר מידי אשר נרצה להשתמש בו לצורך סימון רדיואקטיבי, יסומן ברמה נמוכה אשר תקשה על זיהויו.

הפרימרים לזיהוי G3PDH הוזמנו על בסיס רצף כפי שפורסם (Mamluk, 1999)



תמונה 5: בדיקת פרימרים שונים : 1. פרימרים ל SLR (הקולטן הקצר של לפטין) בנד בגודל של 480bp. 2. פרימרים ל SLR 2, בנד בגודל של 280bp. 3. פרימרים ל G3PDH, בנד בגודל של 850bp. 4. שילוב של SLR 2 + SLRL₂. 100bp Ladder.

1. SLR sense 5'-TTCCTCTTTCTCTCTGGAATC-3'

SLR anti sense 5'-TCCTCTTTCATCCAGCACTGT-3'

2. SLR 2 sense 5'-TGGACGTTATGAGGCAGTTG-3'

SLR 2 anti sense 5'-TTCCAGTTTCGACCTGTTTG-3'

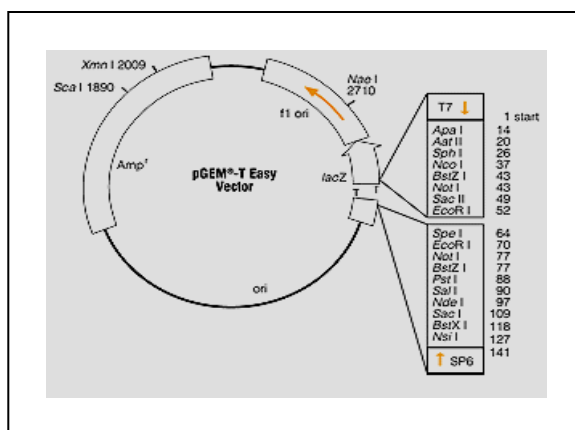
3. G3PDH sense 5'-TGTTCCAGTATTGATTCCACCC-3'

G3PDH anti sense 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

הפרימרים בהם בחרנו לעבוד היו SLR פרימרים אילו נתנו תוצר בגודל של 480bp.

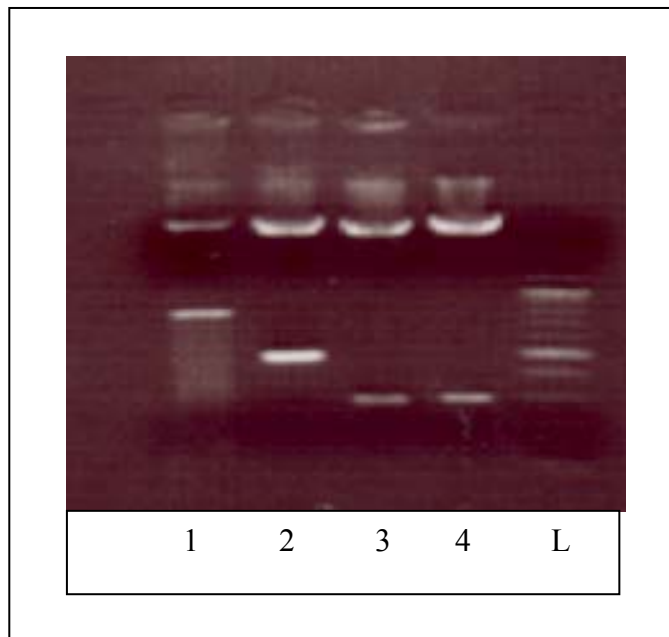
3.2 הכנת הפלסמיד המכיל גלאי.

אל פלסמיד מסוג pGEM[®]-T Easy Vector (תמונה 6). הוחדרו מקטעי ה cDNA שעברו הגברה בעזרת PCR (בעזרת הפריימרים SLR) מ-RNA מרקמת עטין, פלסמיד זה מכיל מערכת תרגום המבוססת על פרומוטורים: SP6 RNA Polymerase ו T7 RNA Polymerase. בין שני אתרי הפרומוטורים קיים אזור – Multiple cloning site-MCS שנמצא בתוך עותק של הגן lacZ- α peptide. ליגציה מוצלחת קוטעת את הגן lacZ- α peptide. כאשר גן זה שלם לפלסמיד יכולת תרגום של β -galactosidase. התאים בהם עבדנו היו חסרי יכולת לתרגם גן זה המכיל את הפלסמיד לאחר ליגציה מוצלחת מאבד את היכולת לפרק IPTG ו x-Gal. שנמצאים במצע הגידול. מושבה כזו צבעה היה לבן בניגוד למושבה בהליגציה לא הצליחה שצבעה היה כחול. הפלסמיד מכיל גם גן המקודד לעמידות ל Ampicillin. הליגציה מבוצעת לתוך ה MCS.



תמונה 6 : pGEM[®]-T Easy Vector

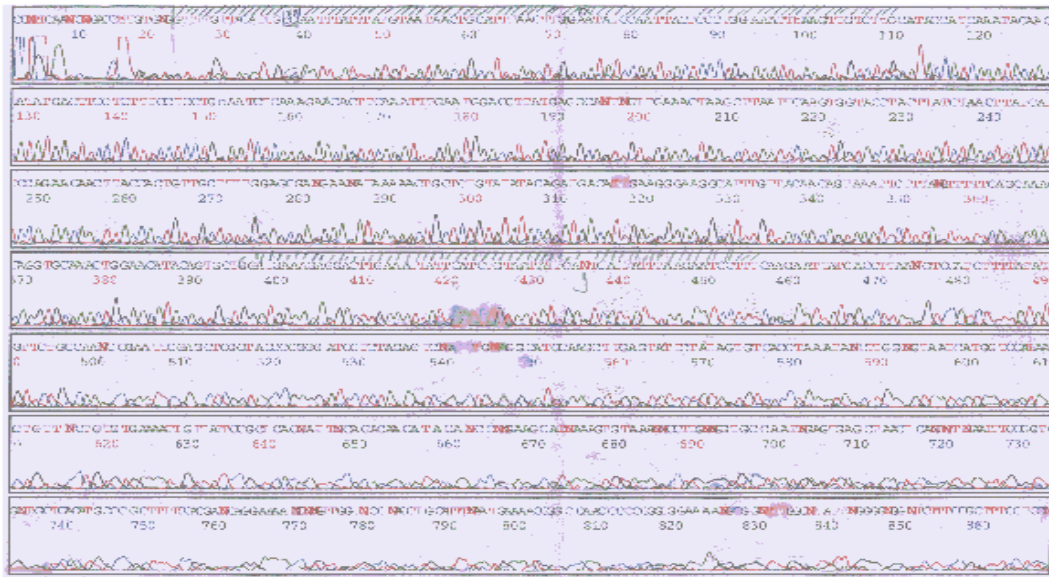
תוצרי PCR שמוצו (סעיף 2.6). הוחדרו על ידי הליגציה בין אתרי Ecor1 שב MCS של הפלסמיד (סעיף 2.12.2). הוחדרו אל תאים קומפוטנטים. שנזרעו על מצע של AMP + LB ועברו סלקציה לפי צבע. במושבות הנבחרות גודלו למשך לילה ובתום תקופת הגידול הפלסמידים נוקו, הושקעו ונבדקו על ידי חיתוך בעזרת אנזימי רסטריקציה (תמונה 7). המחדרים הצפויים היו: G3PDH בגודל של 980 bp, SLR בגודל של 480 bp ו SLR2 בגודל של 280 bp.



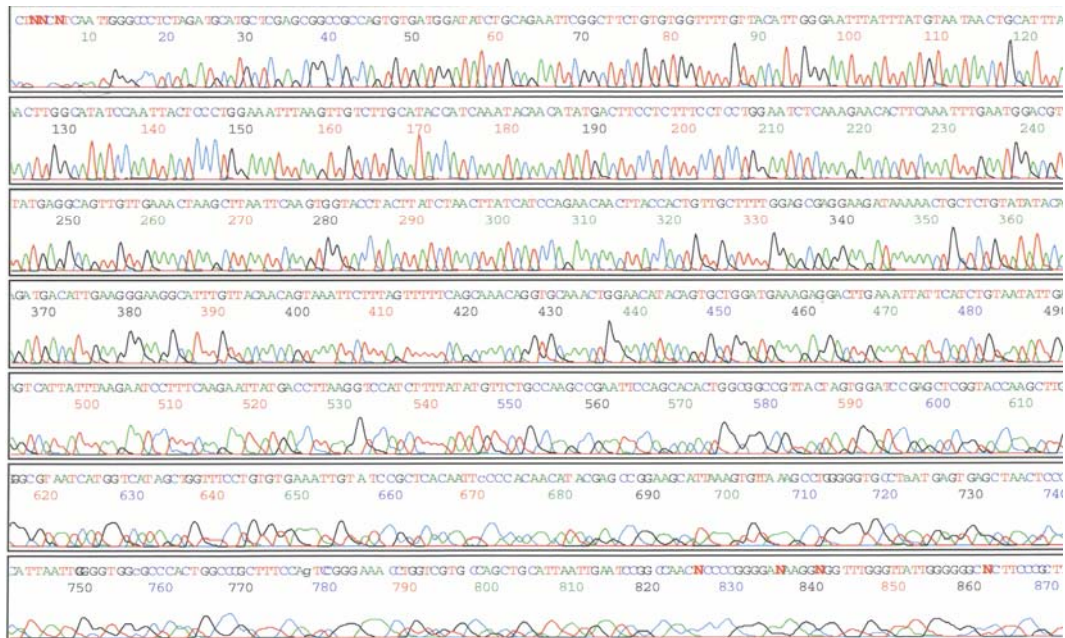
תמונה 7: חיתוך של הפלסמידים לאחר ליגציה בעזרת EcoR1: 1. פלסמיד + רצף ל G3PDH. 2. פלסמיד + רצף ל SLR 3+4. 3. פלסמיד + רצף ל SLR 2. 4. Ladder 100bp.

הפלסמידים שהכילו את המחדר (1,2) נשלחו ליחידת זיהוי הרצף של מכון ויצמן תמונה 4א, ב (סעיף 2.15).

תמונה 8 א : רצף הבסיסים בפלסמיד: SLR

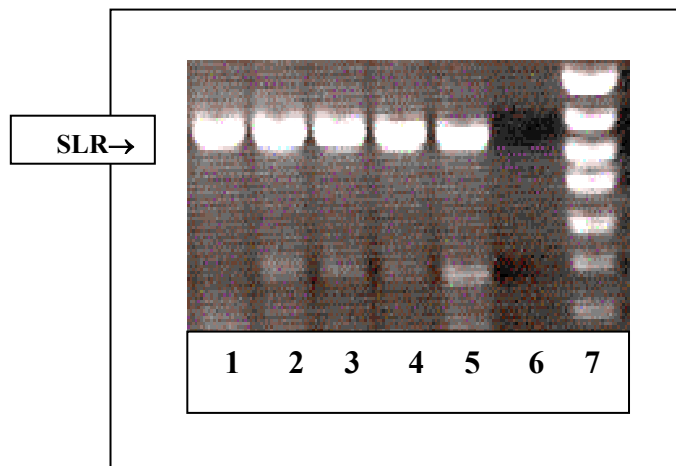


תמונה 8 ב : רצף בסיסים בפלסמיד: G3PDH

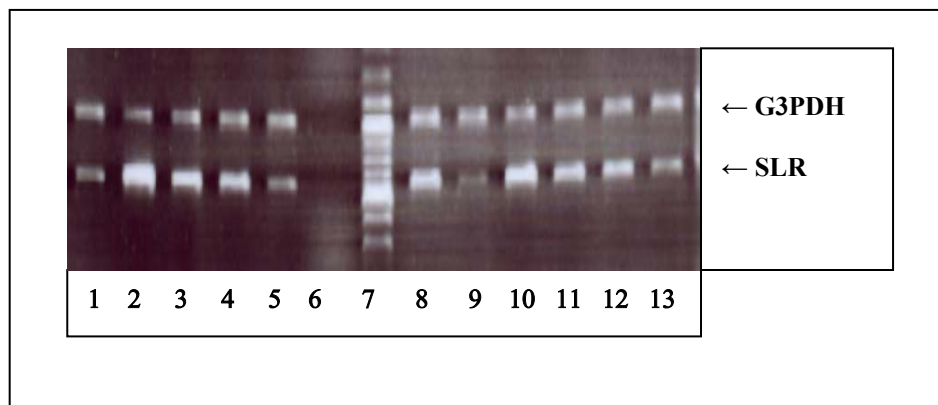


3.3 התבטאות של הקולטן הקצר ללפטין ברקמות פריפריאליות.

RNA כללי שהופק מרקמות פריפריאליות ומזיקים של פרות שימש תבנית ל RT-PCR (סעיף 2.11). בשימוש בפרימרים ספציפים לגן לקולטן הקצר ללפטין בבקר התקבל תוצר יחיד בגודל צפוי של 480 bp. פריימרים ל G3PDH (housekeeping gene) שימשו להערכת הכמות ואיכות של RNA בכל הקבוצות התקבל תוצר בגודל של 980 bp (תמונה 9,10). הקולטן הקצר ללפטין התבטא בכל הרקמות והזיקים אותם בדקנו.



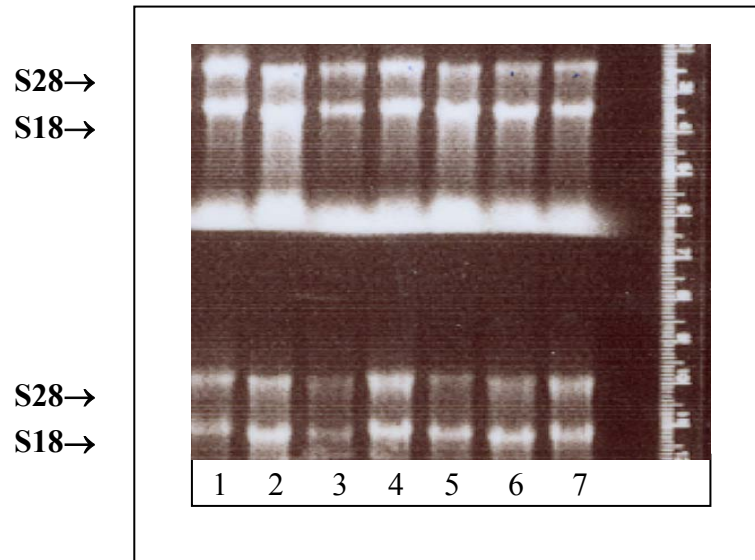
תמונה 9: התבטאות של SLR בזיקים בשלבים שונים, קורפוס לוטאום וסטרומה: 1. Stroma. 2. *Coprus luteum*. 3. זיקי שלב 1. 4. זיקי שלב 2. 5. זיקי שלב 3. 6. ביקורת. 7. 100 bp Ladder.



תמונה 10: התבטאות של SLR ו G3PDH ברקמות פריפריאליות בפרה: 1. עטין עגלה 2. עטין עגלה בת 12 חודש 3. עטין עגלה הריון חודש ראשון 4. עטין פרה 5. עטין פרה בהריון 6. ביקורת 7. 100 bp Ladder 8. שריר 9. לב 10. ראיה 11. מעי 12. שחלה 13. כבד .

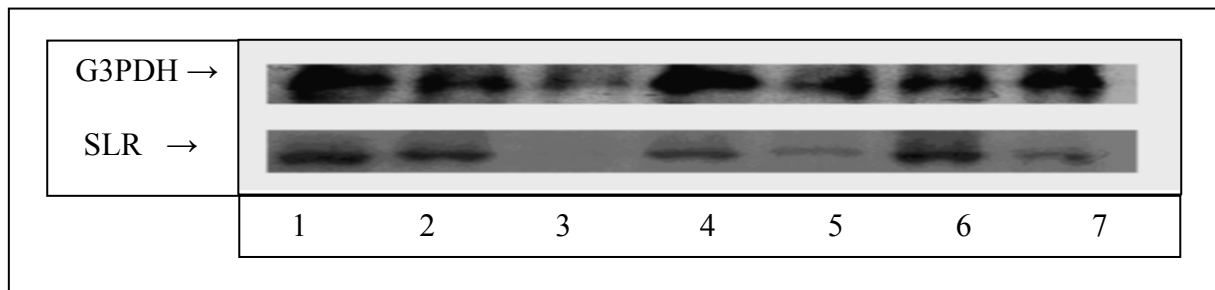
3.4 התבטאות הקולטן הקצר של לפטין בעטין בשלבים שונים של מחזור היצרנות.

RNA כללי שהופק מעטינים שנאספו מפרות בשלבים שונים של מחזור היצרנות (סעיף 2.5.1) הופרדו בעזרת אלקטרופורזה (סעיף 2.8) תמונה 11. ה RNA הועבר למברנת GeneScreen Plus. ההיברידיזציה בוצעה עם שני גלים אחד לגן לקולטן הקצר ולפטין, ואחד ל G3PDH המשמש כביקורת לאיכות וכמות ה RNA.

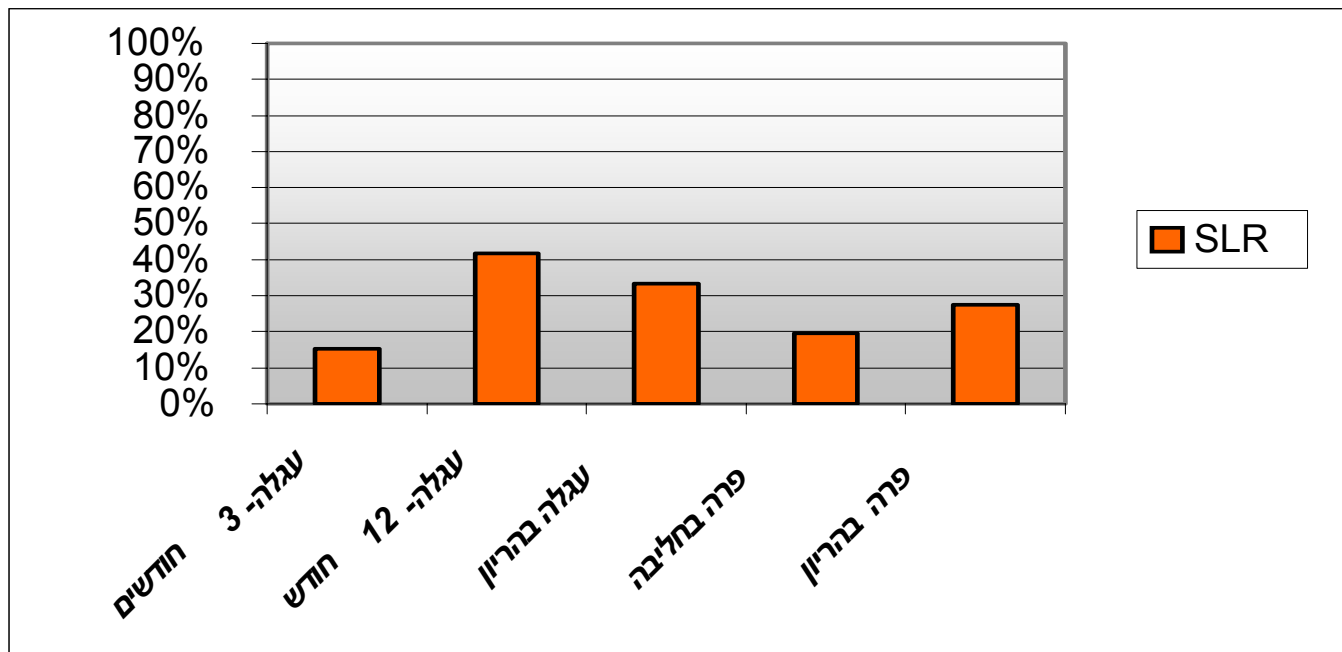


תמונה 11: אלקטרופורזה ל RNA כללי של רקמת עטין: 1. שחלה. 2. היפוטלמוס. 3. עטין מעגלה. 4. עטין מעגלה בהריון חודש ראשון. 5. עטין מפרה בהריון. 6. עטין מעגלה בת 12 חודש. 7. עטין מפרה בלקטציה.

כמויות שוות של RNA הופרדו על ידי אלקטרופורזה על גבי אותו גל אגרוז. בתום ההפרדה הועבר ה RNA למברנת ניטרוצלולוז. על גבי ממברנה זו בוצע Northern blot.



תמונה 12: Northern Blot לרקמת עטין: 1. משחלה. 2. היפוטלמוס. 3. עטין מעגלה. 4. עטין מעגלה בהריון חודש ראשון. 5. עטין מפרה בהריון. 6. עטין מעגלה בת 12 חודש. 7. עטין מפרה בלקטציה.



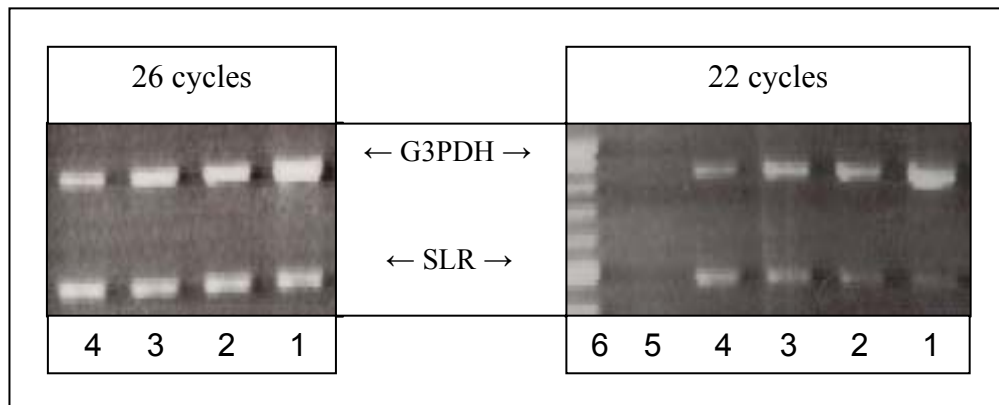
גרף 1 : כימות תוצאות ה-Northern Blot שמוצג בתמונה 12, בעזרת תוכנת NIH שנעשה לגן לקולטן הקצר של לפטין ברקמת עטין בשלבים השונים של מחזור היצרנות. רמת השיעתוק של G3PDH משמש כמדד לכמות ואיכות ה-RNA הכללי

ביטוי הגן לקולטן הקצר ללפטין בקר נבדק בשיטת ה-Northern Blot (סעיף 2.8). בגרף 1 ניתן לראות כי רמת הביטוי של הגן SLR משתנה בשלבים השונים של מחזור היצרנות של הפרה המישקית. הרמת הנמוכה ביותר נצפתה בעגלה צעירה בת 3 חודשים, ביטוי גבוה נצפה בעגלות בוגרות, עגלה בהריון שומרת על רמת ביטוי גבוהה. לאחר המלטה ולקראת אמצע תקופת החליבה רמת הגן ל-SLR יורדת. התבטאות הגן ל-SLR נבדקה בשתי רקמות נוספות, שחלה והיפוטלמוס. בשתי רקמות אילו נצפתה התבטאות של הגן-SLR.

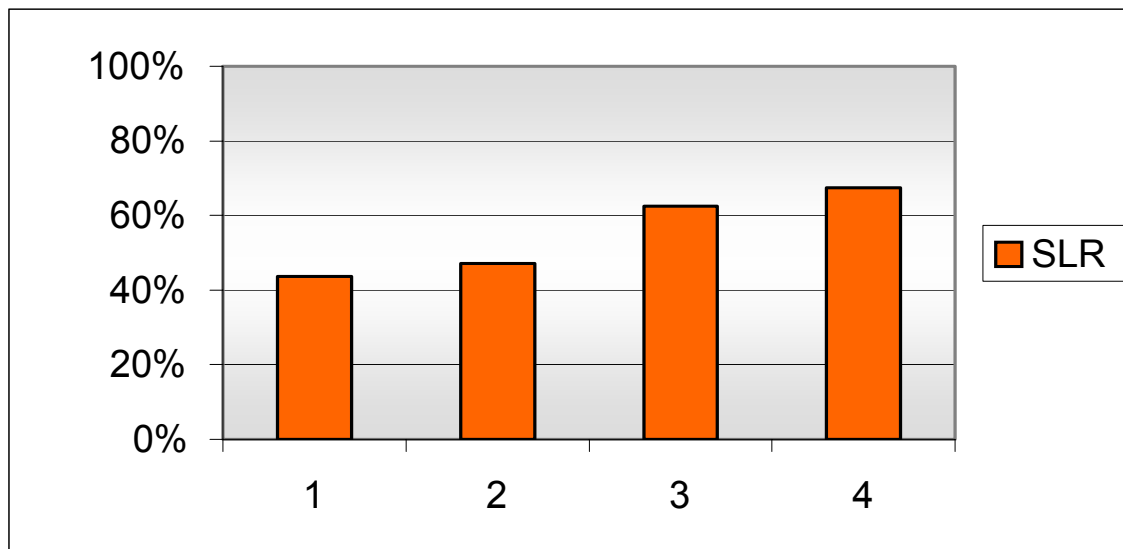
3.5 התבטאות הקולטן הקצר של לפטין בזקיקים בשלבים שונים.

3.5.1 התבטאות הקולטן הקצר של לפטין בזקיקים בשלבים שונים על ידי RT-PCR.

RNA כללי שהופק מזקיקים שנאספו משחלות של פרות (סעיף 2.5.1) שימש כתבנית לראקצית RT-PCR (סעיף 2.11). משימוש בפרימרים ספציפיים לגן לקולטן הקצר ללפטין בבקר התקבל תוצר יחיד בגודל צפוי של 480 bp. פריימרים ל G3PDH (housekeeping gene) שימש להערכת הכמות ואיכות של RNA בכל הקבוצות התקבל תוצר בגודל של 850 bp, תמונה 13.



תמונה 13: RT-PCR לגן-SLR ולגן-G3PDH בזקיקים בשלבי התפתחות שונים :
1. זקיק שלב 1. **2.** זקיק שלב 2. **3.** זקיק שלב 3. **4.** Corpus luteum. **5.** ביקורת 100 bp Ladder. **6.** 100 bp Ladder.



גרף 2: כימות תוצאות ה-RT-PCR כפי שמוצג בתמונה 13 בעזרת תוכנת NIH שנעשה לן לקולטן הקצר של לפטין בזקיקים בשלבים השונים. רמת השיעתוק של G3PDH משמשת כמדד לכמות ואיכות ה RNA הכללי. 1. זקיק שלב 1. 2. זקיק שלב 2. 3. זקיק שלב 3. 4. Corpus luteum.

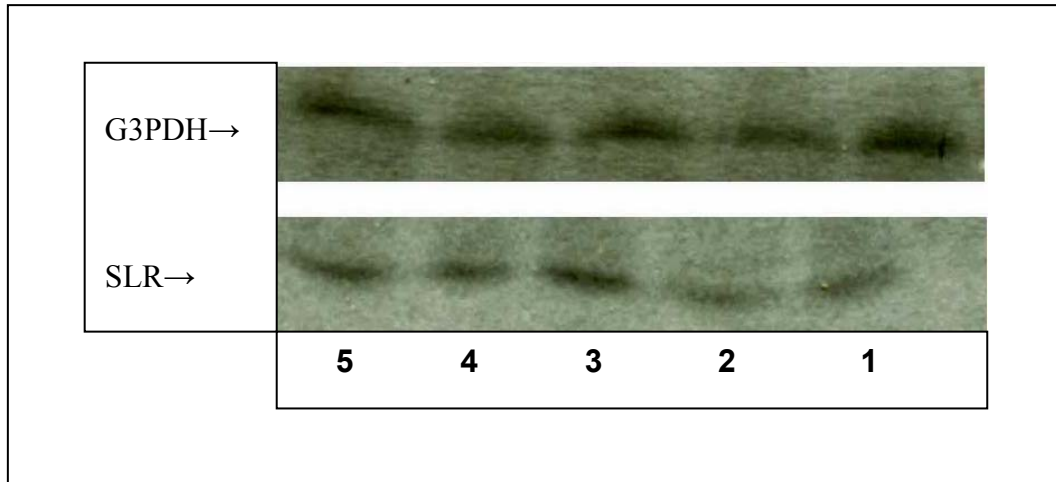
בדיקה של רמת הביטוי לקולטן הקצר ללפטין על ידי RT-PCR (סעיף 2.11) וניתוח התוצאות בעזרת תוכנת NIH. נמצא כי רמת השיעתוק של הגן SLR בזקיקים בשלב התפתחות 3 היא הגבוהה ביותר מבין שלושת מצבי ההתפתחות אותם בחנו, שלב התפתחות 2 רמת השיעתוק קרובה לזו של שלב 1 אם כי גבוהה במעט.

3.5.2 התבטאות הקולטן הקצר ללפטין בזקיקים בעזרת: RNase protection assay-RPA

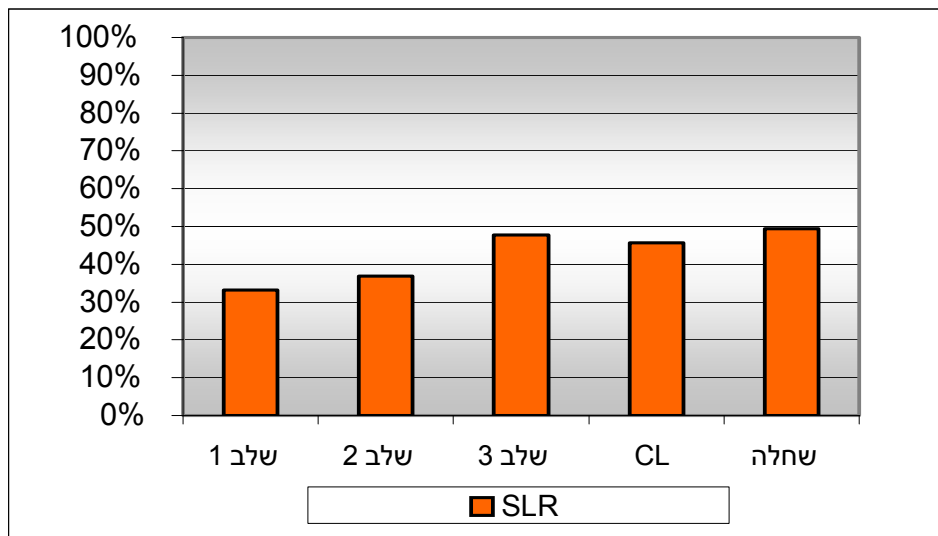
כמויות הזקיקים שנאספו מפרות הייתה מוגבלת ולכן היה צורך לפתח שיטה נוספת, מלבד PCR, בה נוכל ללמוד על התבטאות הקולטן הקצר ללפטין בזקיקים. RPA שיטה בה מבצעים היברידיזציה של RNA מול RNA היא השיטה בה בחרנו לעבוד ממספר סיבות (סעיף 2.16):

1. דרושה כמות קטנה יותר של כללי RNA על מנת לבצע היברידיזציה.
2. ההיברידיזציה מבוצעת במבחנה בנפח קטן. כך שגם mRNA המתבטא ברמה נמוכה יקשר לגדיל המשלים. ונוכל להבחין בו ברדיוגרמה.
3. מלבד השקעה בשלב הראשון של התהליך אין שלבים נוספים בהם אובד RNA (בניגוד ל Northern Blot בו יש איבוד רב יותר של RNA בשלבי הטרנספר למברנה).

4. שיטה זו היא בעלת רגישות גבוהה יותר מ Northern Blot.



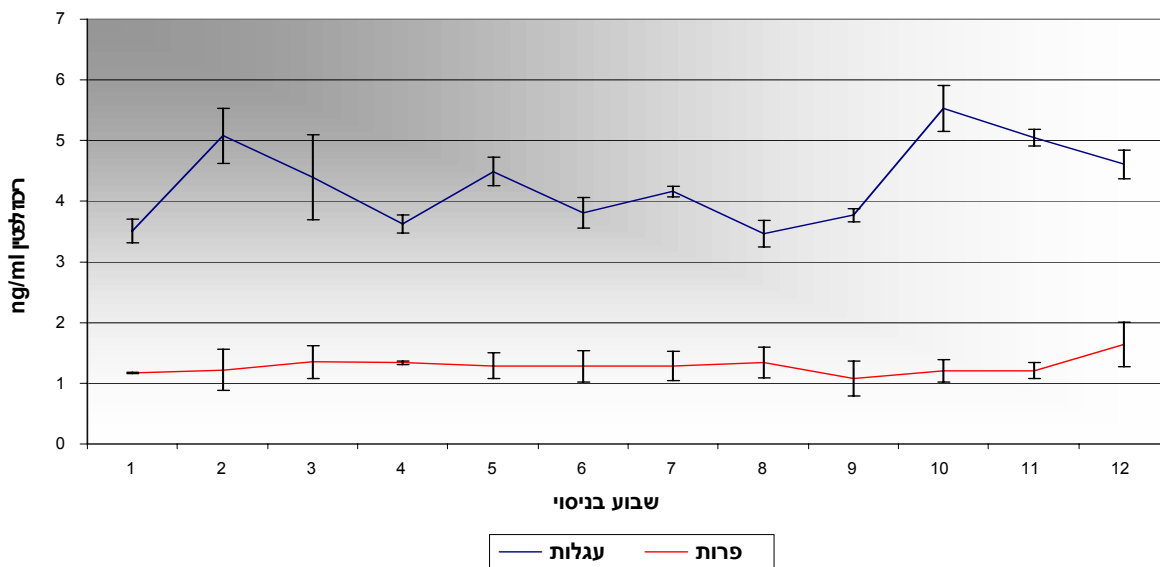
תמונה 14: RPA לזקיקים : 1. זקיק שלב 1 2. זקיק שלב 2 3. זקיק שלב 3 4. Corpus luteum. 5. שחלה.



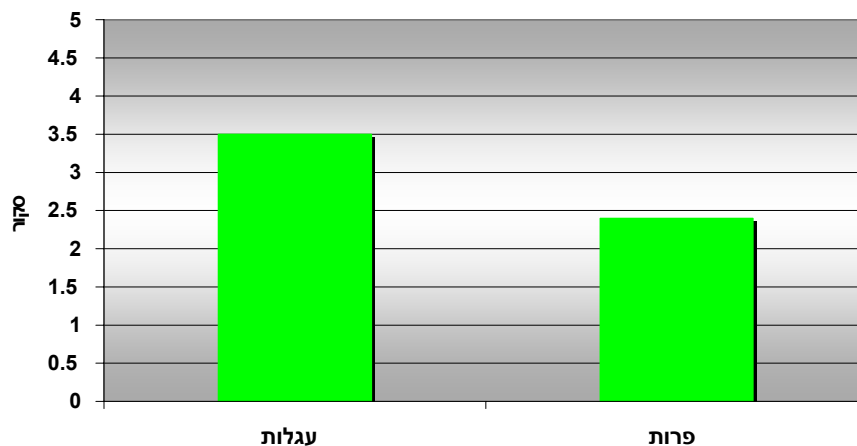
גרף 3: כימות תוצאות ה RPA המוצג בתמונה 14 בעזרת תוכנת NIH. רמת הביטוי של הקולטן הקצר ללפטין בזקיקים זהה בשלב 1 ובשלב 2 (בשלב 2 מעט גבוהה). רמת הביטוי בשלב 3 גבוהה יותר. הקולטן הקצר ללפטין מתבטא גם ב CL וגם בשחלה. כימות וניתוח התוצאות נעשה בעזרת תוכנת NIH יחסית להתבטאות G3PDH בכל רקמה.

3.6 קביעת רמת הלפטין בפלסמה של עגלות ופרות בתקופה שלפני הכניסה להריון.

דוגמאות פלסמה שנאספו מפרות בוגרות בתקופת חליבה ומעגלות לפני הכניסה להריון ושאינן נחלבות נבדקו בעזרת RIA לרמת הלפטין והפרוגסטרון. (סעיף 2.17) גרף 4. במקביל נבדק המצב הגופני (BCS) של הפרות והעגלות אחד לחודש, ה-BCS הממוצע בעגלות היה 3.5 לעומת ה-BCS הממוצע בפרות שהיה 2.5. רמות הלפטין בעגלות היו גבוהות יותר במהלך כול תקופת הניסוי מרמות הלפטין בפרות. איור 2.



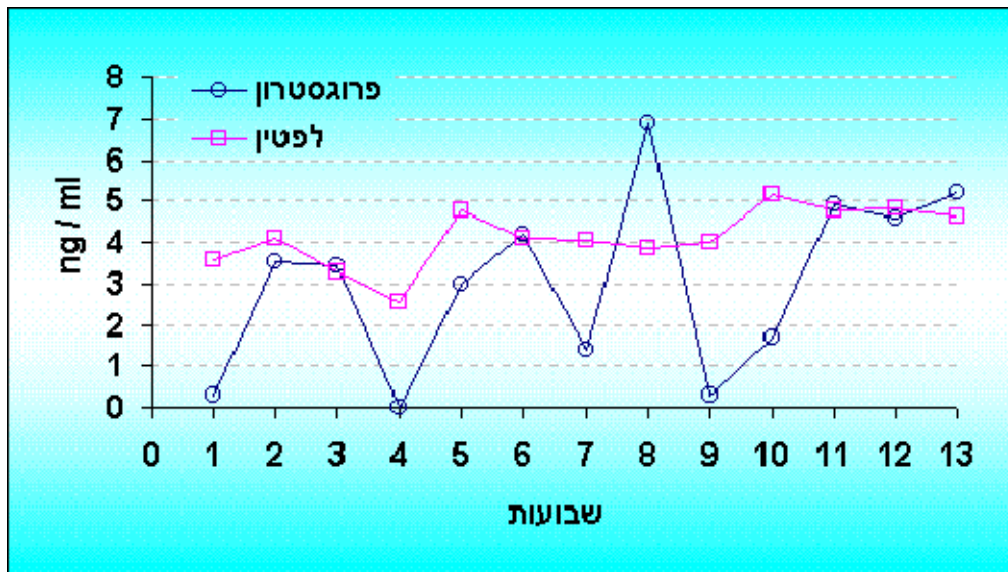
גרף 4: השוואה בין רמת הלפטין בפלסמה של פרות מול עגלות במהלך תקופת הניסוי.



איור 2: רמות המצב הגופני (BCS) הממוצעות בתקופת הניסוי בפרות ובעגלות.

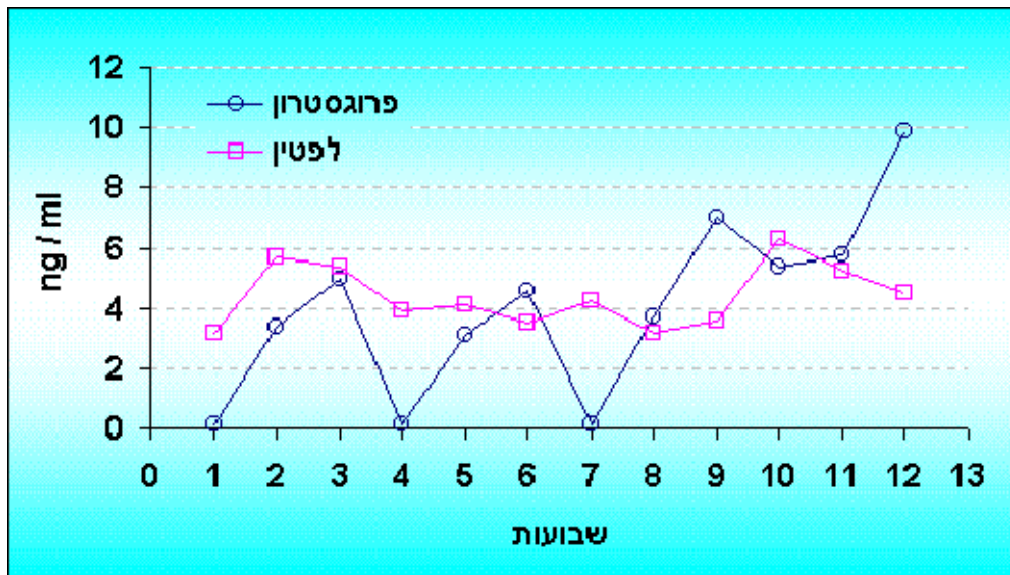
3.7 השוואה של רמות הלפטין בפלסמה מול רמות הפרוגסטרוון.

רמות הלפטין והפרוגסטרוון נבדקו בעגלות ובפרות על ידי RIA (סעיף 2.17) במהלך התקופה שלפני הכניסה להריון.



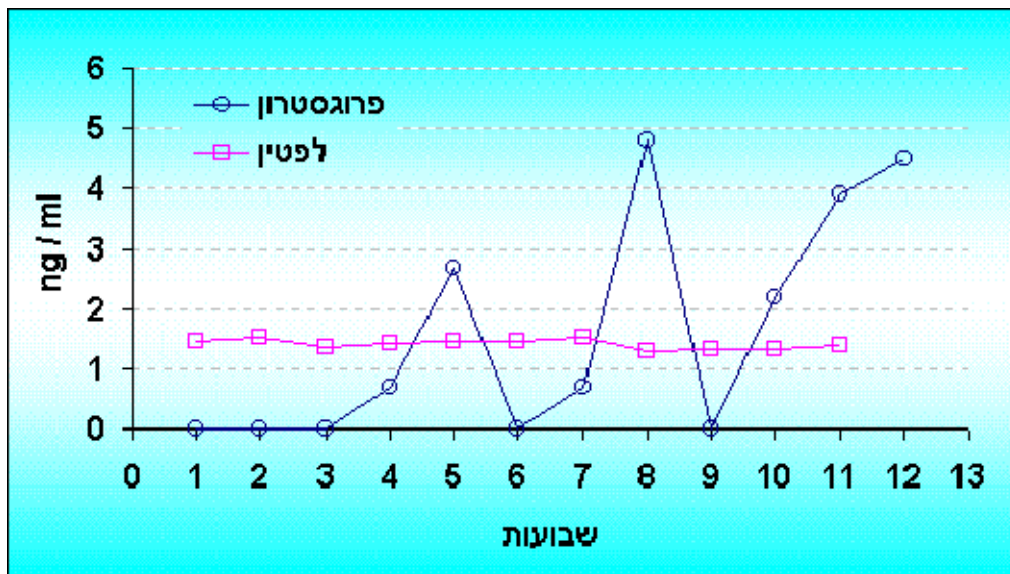
גרף 5א: רמת הלפטין והפרוגסטרוון בעגלה 443 במהלך הניסוי.

רמת הפרוגסטרוון בעגלה 443 נמדדה החל מהשבוע הראשון של הניסוי, רמת שיא נצפתה בשבוע השני 3.5 ng/ml, בשבוע השישי 4.2 ng/ml, בשבוע השמיני 6.9 ng/ml. לאחר ההזרעה שבוצעה בשבוע התשיעי רמת הפרוגסטרוון עלתה עד לרמה של 5.2 ng/ml במדידה האחרונה שבוצעה. רמת שפל של פרוגסטרוון נצפתה בשבוע הראשון 0.3 ng/ml, בשבוע הרביעי 0 ng/ml, בשבוע השביעי 1.4 ng/ml ובשבוע התשיעי 0.3 ng/ml. במקביל למדידות הפרוגסטרוון נמדדה רמת הלפטין. בשבוע הראשון רמת הלפטין היתה 3.58 ng/ml והגיעה לשיא של 4 ng/ml בשבוע השני. רמת הלפטין ירדה עד לרמה של 2.5 ng/ml בשבוע הרביעי. רמת הלפטין עלתה לרמה של 4.8 ng/ml בשבוע החמישי. בין השבוע החמישי לשבוע התשיעי רמת הלפטין נעה סביב 4 ng/ml. החל מהשבוע העשירי רמת הלפטין עלתה ועד השבוע השלוש עשר רמות הלפטין נעו בין 4.6 ng/ml ל 5.15 ng/ml.



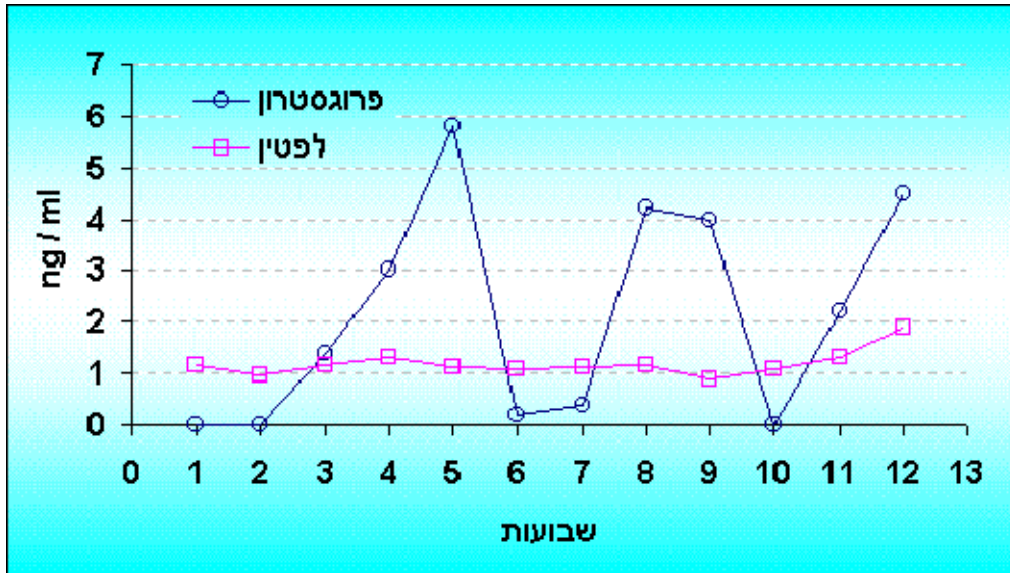
גרף 5 ב: רמת הלפטין והפרוגסטרוון בעגלה 445 במהלך הניסוי.

רמת הפרוגסטרוון בעגלה 445 נמדדה החל מהשבוע הראשון לניסוי, רמת שיא נצפתה בשבוע השלישי 5 ng/ml, בשבוע השישי 4.6 ng/ml. בשבוע השישי העגלה הוזרעה, לאחר ההזרעה רמת הפרוגסטרוון הגיעה לרמה של 9 ng/ml. רמת שפל של פרוגסטרוון נצפתה בשבוע הראשון 0.1 ng/ml, בשבוע הרביעי 0.1 ng/ml ובשבוע השביעי 0.1 ng/ml. רמת הלפטין בעגלה 445 נמדדה במקביל לרמת הפרוגסטרוון, רמות שיא של לפטין נצפו בשבוע השני 5.7 ng/ml, בשבוע החמישי 4.1 ng/ml, בשבוע השביעי 4.3 ng/ml החל מהשבוע השמיני ועד סוף הניסוי בשבוע ה 12 רמת הלפטין עלתה והגיעה בשבוע ה 12 לרמה של 5.11 ng/ml.



גרף 5 ג: רמות הלפטין והפרוגסטרוון בפרה 3292.

רמות הפרוגסטרוון שנצפו בפרה 3285 היו בשיא בשבוע 5 - 2.7 ng/ml, בשבוע 8 - 4.8 ng/ml. רמות שפל נצפו בשבוע 1+2-3, 0 ng/ml, שבוע 6 - 0 ng/ml ובשבוע 9 - 0 ng/ml. רמות הלפטין בפרה 3285 נשארות במהלך כול תקופת הניסוי סביב רמה של 1 ng/ml.

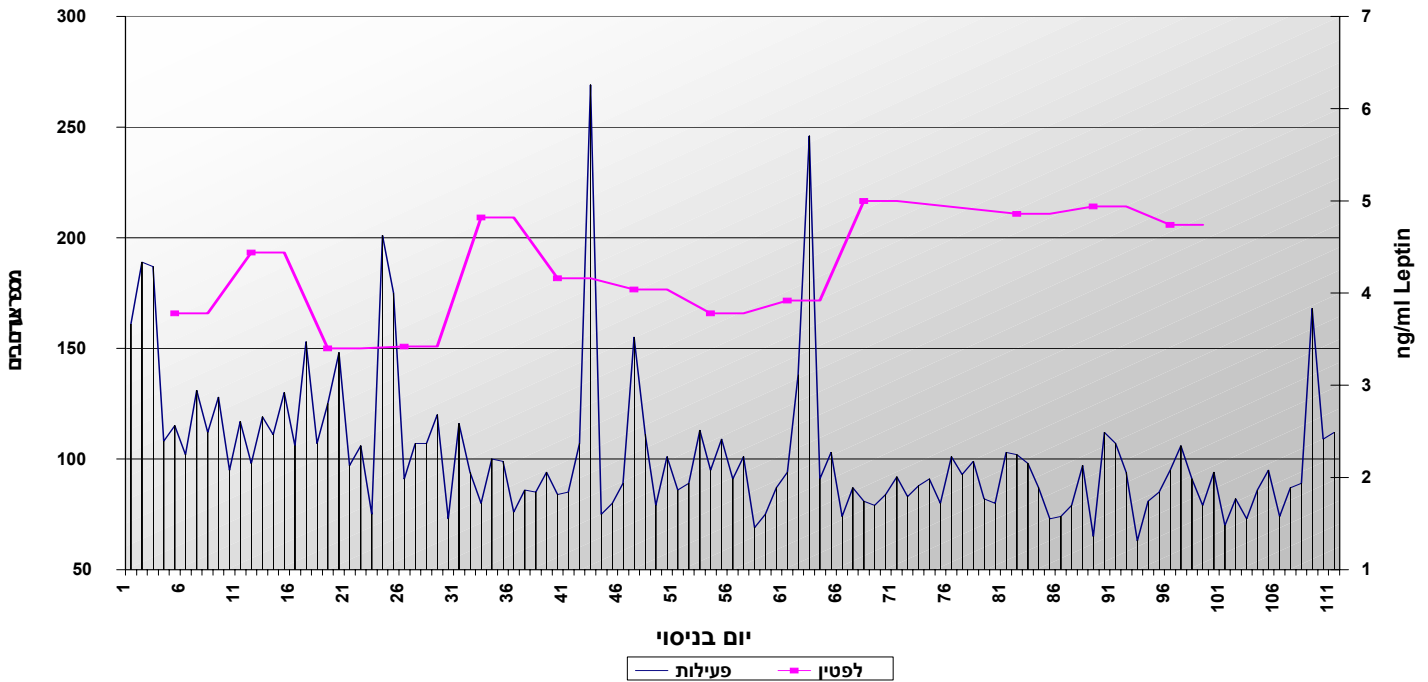


גרף 5 ד: רמות הלפטין והפרוגסטרוון בפרה 3285.

רמת הפרוגסטרוון שנצפתה בפרה 3292 הגיעה לשיא בשבוע ה-5 – 5.8 ng/ml, בשבוע ה-8 – 4.2 ng/ml. רמת שפל נצפתה בשבוע הראשון והשני – 0 ng/ml, בשבוע ה-6 – 0.2 ng/ml ובשבוע ה-10 – 0 ng/ml. רמת הלפטין בפרה 3292 נשארה במהלך תשעת השבועות הראשונים סביב רמה של 1 ng/ml לאחר ההזרעה בשבועה התשיעי רמת הלפטין עלתה עד לרמה של 2 ng/ml בשבוע ה-12.

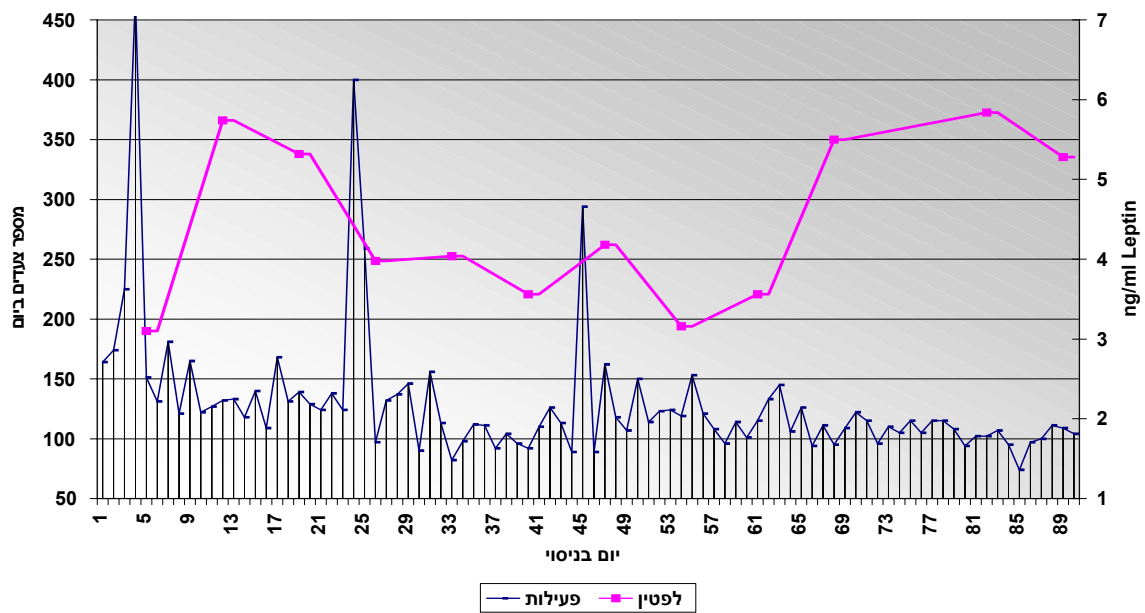
3.8 בדיקת פעילות יומית מול רמות לפטין.

הפעילות היומית נמדדה על פי מספר הצעדים שצעדה כל פרה ביום (עפ"י שיטה 2.19). מול הפעילות היומית נבדקו רמות הלפטין.



גרף 6 א: רמות לפטין והפעילות היומית של עגלה 445.

בעגלה 445, איור 6 א, הפעילות היומית השתנתה במהלך תקופת הניסוי. שיא של פעילות נצפתה בימים 2, 24, 43, 47, 63. רמות שיא של לפטין נצפו בימים הבאים: ביום 12 רמה של 4.44 ng/ml, ביום 33 רמה של 4.82 ng/ml, לאחר הזרעה שבוצעה ביום 59 רמת הלפטין הגיעה לערך של 5 ng/ml ביום 68. בארבע מדידות נוספות שבוצעו בימים 68, 82, 90, 96, רמות הלפטין לא ירדו מ 4.75 ng/ml.



גרף 6 ב : רמות הלפטין והפעילות היומית של עגלה 443.

בעגלה 443, איור 6 ב, הפעילות היומית של העגלה השתנתה במהלך תקופת הניסוי. רמות שיא של פעילות נצפו בימים 4, 24, 45. רמות שיא של לפטין נצפו ביום 12 4.75ng/ml . עגלה זו הוזרעה ביום 45.47 נצפתה רמה נוספת של 4.15 ng/ml שלושת המדידות האחרונות שבוצעו בימים 68,81,90, היו גבוהות יחסית ולא ירדו מרמה של 5.3 ng/ml .

4.1 התבטאות הקולטן הקצר ללפטין Ob-Ra ברקמות פריפריאליות בבקר.

המופע הקצר של הקולטן ללפטין Ob-Ra מבוטא כמעט בכל רקמה פריפריאלית אותה בחנו בבעלי חיים שונים. אנו בחנו את התבטאות הקולטן Ob-Ra ברקמות פריפריאליות שונות של בקר : עטין, שריר, קיבה, לב, ריאה, מעי, שחלה וזקינים. בכל הרקמות אותן בדקנו על ידי PCR נמצאה התבטאות של Ob-Ra. תוצאות אלו תואמות את הממצאים שהתקבלו ברקמות שריר, כבד, מעי, ריאה ולב בעכבר (Hoggard et al, 1997), בשחלה בבני אדם (Karlsson et al, 1997) וברקמת עטין בכבשים (Laud et al, 1999).

4.2 התבטאות הקולטן הקצר ללפטין Ob-Ra בעטין.

התבטאות Ob-Ra ברקמת העטין נבחנה על ידי Northern Blot ו RT-PCR. מהממצאים שבידינו עולה כי Ob-Ra מבוטא ברקמת העטין בשלבים שונים של מחזור החיים של הפרה. מצאנו כי הרמה הנמוכה ביותר של התבטאות התקבלה בעגלה בת 3 חודשים ובפרה הנמצאת בחליבה אנטנסיבית. הרמות הגבוהות של התבטאות Ob-Ra התקבלו בעגלה בת 12 חודשים ובעגלה בהריון (ראה 3.5 איור 1). אנו מניחים כי רמת הביטוי של Ob-Ra בעטין מבוטאת באופן יחסי ברמות גבוהות בעגלה בת 12 חודש ובעגלה בהריון ראשון מכיוון שהלפטין מעורב בתהליכי התפתחות והתמיינות העטין. עגלה בת 12 חודש נמצאת בשלב התבגרות מינית. שלב זה במהלך מחזור החיים של הפרה מלווה בהתפתחות מסיבית של רקמת העטין. במהלך ההתבגרות המינית מתחילים בעטין תהליכי פרוליפרציה של התאים האפיתליאליים. שיא ההתפתחות בעטין מתרחש במהלך ההריון. תהליך שבמהלכו מתפתחים תאי הצינורות (duct) והתאים האלבאולריים. רמה נמוכה של התבטאות נצפתה בעגלה בת 3 חודשים. בשלב זה של מחזור החיים של הפרה העטין עדין אינו מפותח ונמצא ברמה ראשונית של התפתחות. לאחר ההמלטה נפסקת ההתפתחות בעטין והפעילות התאית מופנית לכיוון של יצירת חלב.

בעבודות נוספות נמצא שהקולטן Ob-Ra מבוטא ברקמת העטין של עכברים (Aoki et al, 1999) וכבשים (Laud et al, 1999). בכבשים נמצא כי רמת התבטאות של הקולטן Ob-Ra משתנה במהלך ההריון. Laud וצוותו (Laud et al, 1999) מצאו כי רמת התבטאות הקולטן Ob-Ra נמצאה ברמה גבוהה לקראת אמצע תקופת ההריון, תקופה המאופיינת בקצב התפתחות אינטנסיבי. במהלך חציו השני של ההריון ובתקופת הלקטציה ישנה ירידה ברמת התבטאות של Ob-Ra. כיום מתבססת הסברה כי קיימת אינטראקציה בין רקמת האפיתל ורקמת השומן בעטין, המווסתת את התפתחות העטין על ידי ייצור של גורמי גדילה

מקומיים. גורמי גדילה אלו משפיעים על אופן הפעולה של סטרואידים שונים (Hovey et al, 1999). לפטין הוא אחד מהתוצרים המופרשים על ידי רקמת השומן של העטין, כפי שהוכח בעכברים (Aoki et al, 1999). בנוסף ראו כי ללפטין יש יכולת להשפיע *in-vitro* על הפרוליפרציה והדיפרנציאציה של תאים (Takahashi et al, 1997). במספר עבודות בהן נבחן הקולטן Ob-Ra המבוטא במדולה של האדרנל בבקר (Yanagihara et al, 2000) Ob-Ra i שבוטא בתאי CHO (Murakami et al, 1997), נמצא כי הם בעלי יכולת להעביר סיגנל אל תוך התא. מהממצאים שלנו ושל עבודות נוספות שבדקו את התבטאות הקולטן Ob-Ra ברקמת העטין והעובדה כי Ob-Ra הוא בעל יכולת העברת סיגנל, מרמזים כי הלפטין המייצג את המצב הגופני של הפרה משפיע על התפתחות העטין. חשוב לא להתעלם מהעובדה כי קיימת התאמה בין רמת ההתבטאות של Ob-Ra ברקמת העטין למצב הגופני (כמות רקמת השומן) בו נמצאת הפרה. כלומר עגלה בהריון ראשון נמצאת במצב גופני טוב, רקמת השומן מפותחת ואילו לאחר ההריון לקראת אמצע תקופת החליבה הפרה נמצאת במאזן אנרגטי שלילי. מכאן יתכן שרמת ההתבטאות של Ob-Ra מקבילה לרמת הלפטין בדם.

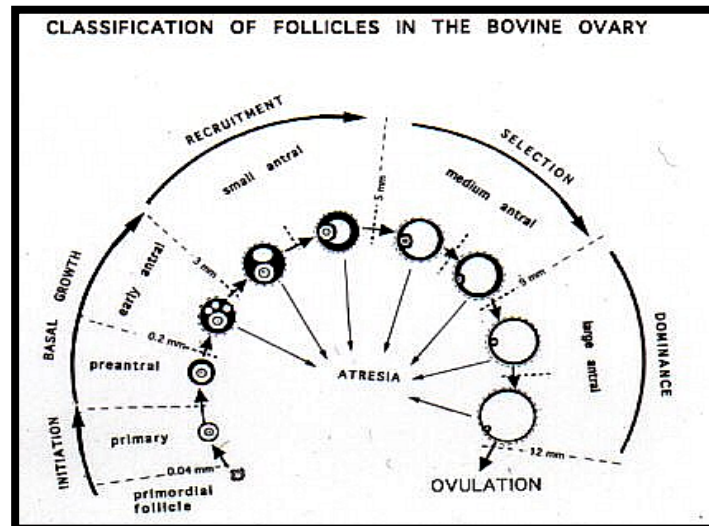
4.3 התבטאות הקולטן הקצר ללפטין Ob-Ra בזקיקים שחלתיים.

התבטאות Ob-Ra בזקיקים נבחנה על ידי RT-PCR ו RPA-RNase protection assay. מהממצאים שבידינו עולה כי Ob-Ra מבוטא בזקיקים ובשחלות של בקר. אנו משערים כי לפטין הוא בעל יכולת ויסות שלבי התפתחות הזקיקים בבקר. הקולטן המבוטא בשחלות הוא בעל המופע הארוך והמופע הקצר של Ob-R. באדם מצאו כי המופע הארוך והמופע הקצר של הקולטן ללפטין מבוטא בתאים שונים של השחלות אך המופע הקצר הוא השכיח יותר, נוכחותו של הקולטן Ob-Rb בתאים שונים בשחלות אושרה על ידי RT-PCR. בשיטות אחרות לא הצליחו למצוא ביטוי של Ob-Rb. מכאן כי ייתכן ו Ob-Rb אינו מבוטא ברמה בעלת השפעה ביולוגית. Karlsson (Karlsson et al, 1997) הניח כי לקולטן הקצר של לפטין יש יכולת העברת סיגנל מסוימת. הנחה זו בוססה על ניסוי שנערך בתאי כבד בהם הקולטן המבוטא מבין הקולטנים ללפטין הוא הקולטן בעל המופע הקצר. בניסוי זה מצאו כי לפטין יכול לעכב את השפעת האינסולין על תאי כבד (Cohen et al, 1996). כאשר בדקו את מנגנון עיכוב האינסולין על ידי הלפטין בתרביות שחלה של בקר ראו כי לפטין אינו מעכב את פעילות האינסולין על ידי תחרות על אתרי הקשירה של הרצפטור לאינסולין (Spicer et al, 1997). על סמך שילוב הממצאים המוצגים ניתן להניח כי Ob-Ra הוא בעל יכולת להעביר סיגנל אל התא. הנחה זו אושרה לאחרונה בעבודתם של Yanagihara וצוותו (Yanagihara et al, 2000) אשר הראו כי Ob-Ra מעביר סיגנל אל תוך התא בתאי המדולה של האדרנל בבקר.

במחקרים בהם בדקו האם ללפטין יש השפעה על תהליכים שונים בשחלות מצאו כי:

- לפטין משפיע על יצירת סטרואידים בתרביות תאים משחלות בקר. לפטין מעכב באופן ישיר את השפעתו של האינסולין על הפרשת סטרואידים שונים בתאי הגרנולוזה בשחלה (Spicer et al, 1997).
- בעבודות in-vivo שבוצעו בחולדות נמצא כי לפטין ברמות גבוהות גורם לירידה במספר האואוציטים שמבייצים (oocytes ovulated) (Duggal et al, 2000).
- באדם מצאו כי לפטין בריכוזים הנמצאים בנשים הסובלות מהשמנת יתר יכול לגרום לעיכוב פעולתו של IGF-I בתאי תקא ותאי גרנולוזה בשחלות (Agarwal et al, 1999).
- כאשר בחנו את השפעת הלפטין על הפוריות בנשים מצאו כי לפטין ברמות גבוהות פוגע בהשפעת האסטרדיול על התפתחות הזקיק הדומיננטי. בנשים הסובלות מ PCOS (polycystic ovarian syndrome) יש רמות גבוהות יותר של לפטין בנוזל הפוליקולרי מאשר בנשים בריאות. באותן נשים לאחר ירידה במשקל (הגעה ל BMI תקין), רמות הלפטין יורדות ורמת הפוריות עולה (Mantozoros et al, 2000).

בבקר המיון לזקיק דומיננטי נעשה כאשר הזקיקים מגיעים לסוף שלב ה- medium antral כאשר הגודל הממוצע של הזקיקים הוא כ-8.5-8mm. לאחר ההפרדה לזקיק דומיננטי שאר הזקיקים מאותו הגל נספגים בשחלות בעוד הזקיק הדומיננטי ימשיך להתפתח עד לביוץ. אנו מצאנו כי קיימים הבדלים ברמת הביטוי של הקולטן Ob-Ra בזקיקים בשלבים השונים של התפתחות הזקיק. רמת הביטוי של Ob-Ra לא השתנתה באופן משמעותי במעבר מ-small antral ל-medium antral אולם ב-large antral נמצאה רמת התבטאות גבוהה יותר של Ob-Ra.



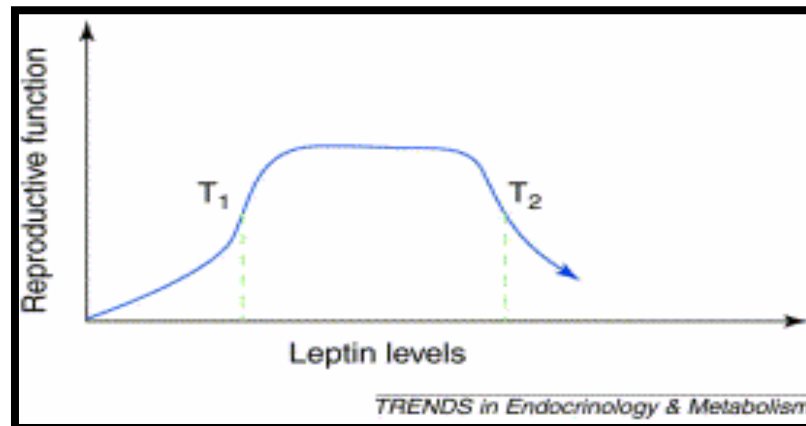
תמונה 15: שלבי התפתחות הזקיק בבקר. תמונה זו הוכנה על ידי ד"ר רות בראב-טל, מכון וולקני.

כאשר בחנו את הקשר בין המצב הגופני (BCS) לבין רמת הפוריות/אחוז ההריונות בבקר לחלב ראו כי פרות בעלות BCS גבוה דורשות יותר ניסיונות הזרעה מאשר פרות הנמצאות בטווח BCS של 2.5-3.5 (Markusfeld et al, 1997). מצד שני Snijders וצוותו מצאו כי מצב גופני ירוד (1.5-2.5 BCS) משפיע על היכולת של האאוציט (oocytes) להתפתח ולהגיע להפריה in-vitro בהשוואה לאאוציטים שנאספו מפרות בעלות מצב גופני תקין (Snijders et al, 2000). מכאן כי טווח ה-BCS 2.5-3.5 הוא הטווח בו המצב הגופני מאפשר פעילות רבייתית תקינה (פולמן, 1996).
סיכום הממצאים המוצגים עד כאן מראה כי:

- הקולטן הקצר ללפטין מבוטא בזקיק ובשחלה.
- יש הבדלים ברמת הביטוי של הקולטן Ob-Ra בשלבי ההתפתחות של הזקיק. רמת ביטוי גבוהה התקבלה בשלב של הזקיק large antral. בשלב זה מבוצע המיון לזקיק דומיננטי.
- לקולטן הקצר יש יכולת העברת סיגל.
- לפטין מסוגל דרך הקולטן הקצר להשפיע על תהליכים מטבולים שונים ברקמות הפריפריאליות.
- למצב גופני (המבוטא ב BCS) יש השפעה על הפוריות.
- שינויים במדד ה BCS (המבטא את מסת השומן בגוף הפרה), תואמים לשינויים ברמת הלפטין בדם.

ממצאים אלה מובילים אותנו להנחה כי מסת השומן אצל הפרה החולבת לאחר ההמלטה ובמהלך התחלובה יכולה להשפיע על יעילות מערכת הרבייה בכלל, ועל התפתחות הזקיך בפרט.

קשר ישיר בין המצב הגופני כפי שמוערך על פי שיטת ה BCS (Body Condition score) לבין רמת הלפטין הוכח במספר עבודות שנערכו בצאן ובבקר (Ehrhardt et al, 2000. Delavaud et al, 2000). תמונה 16 מסכמת את הקשר המשוער בין רמת הלפטין לבין מערכת הרבייה.



תמונה 16: קשר אפשרי בין רמת הלפטין לבין הפעילות של מערכת הרבייה. ריכוזי לפטין הנמוכים מ T_1 אינם מאפשרים פעילות תקינה של ציר HPG (hypothalamus-pituitary-gonadal), הפעלת מנגנון ההתבגרות המינית ושמירה על פעילות תקינה של מערכת הרבייה. רמות לפטין הגבוהות מ T_2 יכולות לפגוע בפעילות הסטרואידים השחלתיים ולהזיק לפעילות התקינה של מערכת הרבייה. נלקח מ: Caprio, 2001.

כאשר ערכנו השוואה בין פרות הנמצאות בתחלובה לבין עגלות לפני הריון ראשון מצאנו כי יש הבדלים ברמת ה BCS. בפרות בלקטציה, BCS ממוצע של 2.6 ורמת לפטין ממוצעת של 1.3 ng/ml. בעגלות לפני הזרעה וכניסה להריון, BCS ממוצע היה 3.5 ורמת לפטין ממוצעת של 4.2 ng/ml (ראה סעיף 3.7). בהסתמך על הממצאים המוצגים אנו מניחים כי התקופה בה הפרה נמצאת במאזן אנרגטי שלילי ורמות לפטין נמוכות, הפעילות השחלתית והתפתחות הזקיכים נפגעים.

4.4 סיכום.

כאשר לפטין התגלה לראשונה הסברה הראשונית הייתה כי תפקידו העיקרי של הלפטין הוא לווסת את מסת השומן בגוף. תגלית הלפטין ב 1994 הייתה מלווה בעבודה אינטנסיבית סביב נושא ההשמנה, אולם לאחר מספר שנים של מחקר גילו כי לפטין לבדו אינו מסוגל לשנות את מסת השומן באדם. לאחרונה מבוצעות יותר עבודות המתרכזות בנושאי התפתחות של רקמות פריפריאליות והשפעת הלפטין. מסיכום העבודות המוצגות במהלך המבוא והדיון ניתן להניח כי ללפטין יש תפקיד בעל חשיבות בהתפתחות רקמת העטין ומערכת הרבייה והתפתחות הזקיקים. איפיון הקולטנים השונים ללפטין הוביל בתחילה להנחה כי הקולטן הארוך ללפטין הוא המופע היחיד בעל יכולת להעביר סיגנל אל התא. לאחרונה רמזו מספר קבוצות כי כנראה לקולטן הקצר גם יש יכולת העברת סיגנל, עובדה שהוכחה מאוחר יותר.

- בעבודה אותה אנו ביצענו מצאנו כי רמת הביטוי של הקולטן הקצר Ob-Ra המבוטא בעטין משתנה במהלך השלבים שונים של מחזור החיים של הפרה החולבת. ממצאים אילו ומעבודות אחרות שנערכו בנושא זה אנו מניחים כי לפטין דרך Ob-Ra מעורב בתהליכי התפתחות העטין בבקר.
- כאשר בדקנו את התבטאות הקולטן Ob-Ra השחלה ובשלבים שונים של התפתחות הזקיק מצאנו כי רמת הביטוי של הקולטן Ob-Ra עולה בקבוצת הזקיקים בשלב 3. על סמך נתון זה ונתינים נוספים המוצגים בסקירת הספרות, אנו מניחים כי הלפטין מעורב בויסות תהליכי ההתפתחות של הזקיקים בבקר.
- כאשר בחנו את רמת הלפטין בעגלות לפני ההריון ראשון ובפרות מצאנו כי רמת הלפטין בדם והבמצב הגופני (BCS) של העגלות היו גבוהות מאלו שנמצאו בפרות.
- במקביל לבדיקת רמת הלפטין נבדקו רמות הפרוגסטרון בדם במהלך המחזור המיני. לא נמצאה התאמה בין רמת הלפטין לבין רמת הפרוגסטרון בדם.

- Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR, Magoffin DA. 1999. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1072-1076.
- Aoki N, Kawamura M, Matsuda T. 1999. Lactation-dependent down regulation of leptin production in mouse mammary gland. *Biochim Biophys Acta* 1427:298-306.
- Bado A, Lévassieur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. 1998. The stomach is a source of leptin. *Nature* 394: 790-793
- Banks SA, Davis SM, Bates SH, Myers MG. 2000. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 275:14563-14572.
- Barash IA, Cheung CC, Weigle DS. 1996. Leptin is a signal to the reproductive system. *Endocrinology* 137:3144-3147.
- Baumann H, Morella KK, Whit DW, Dembski M, Bailon PB, Kim H, Lai FC, Tartaglia LA. 1996. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8374-8378.
- Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. 1997. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 272: 32686-32695.
- Blanch D, Tellam RL, Chagas LM, Blackberry MA, Vercoe PE, Martin GB. 2000. Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and

cerebrospinal fluid in sheep. *J Endocrinol* 165:625-637.

- Caprio M, Fabbrini E, Lsidori AM, Aversa A, Faddri A. 2001. Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 12: 65-72.
- Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 12:318-320.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Cohen B, Novick D, Rubinstein M. 1996. Mudulation of insulin activites by leptin. *Science* 274:1185-1188.
 - Cowie AT, Forsyth IA, Hart IC. 1980. Hormonal control of lactation. *Monogr Endocrinol* 1980;15:1-275
- Delavaud C, Bocquer F, Chillard Y, Keisler DH, Gertlet A, Kann G. 2000. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body concentration assessed by a specific RIA in sheep. *J Endocrinol* 165:519-526.
- Duggal PS, Van Der Hoek KH, Milner CR, Ryan NK, Armstrong DT, Magoffin DA, Norman RJ. 2000. The in vivo and in vitro effect of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology* 141:1971-1976.
- Ehrhardt RA, Slepatis RM, Siegal-Willott J, Van Amburgh ME, Bell AW, Boisclair YR. 2000. Development of specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. *J Endocrinol*

166:519-528.

- Fortune JE. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 50:225-232.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Kot K. 2001. Follicle selection in cattle: Role of luteinizing hormone. *Biol Reprod* 64:197-205.
- Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P. 1997. Circulating leptin in woman: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol* 47:101-106.
- Heldin CH. 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80:213-223
- Henson MC, Castracane VA. 1999. Leptin in pregnancy. *Biol Reprod* 63:1219-1228.
- Hervey GR. 1958. The effect of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Phys* 145:336-352.
- Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG. 1997. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11073-11078.
- Hoggard N, Mercer JG, Vernon Rayner D, Moar K, Trayhurn P, Williams LM. 1997. Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in-situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 232:383-387.
- Houseknecht KL, Portocarrero CP. 1998. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domest Anim Endocrinol* 15:457-475.

- Hovey RC, Mcfadden TB, Akers MR. 1999. Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison. *J Mamm Gland Biol Neoplasia* 4:53-68.
- Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LM, Carlsson B. 1997. Expression of the leptin functional receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4144-4148.
- Kennedy GC. 1953. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc* 140:578-592.
- Kiddy DS, Hamilton-fairley D, Bush A, Short F, Anyaoku V, Reed MJ, Franks S. 1992. Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese woman with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 36:105-111.
- Laud K, Gourdou I, Belair L, Keisler DH, Djiane J. 1999. Detection and regulation of leptin receptor mRNA in ovine mammary epithelial cells during pregnancy and lactation. *FEBS Lett* 463:194-198.
- Licinio J, Negrao AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB, Mulla A, Cearnal L, Veldhuis JD, Flier JS, McCann SM, Gold PW. 1998. Synchronicity of frequently sampled, 24-h concentrations of circulating leptin, luteinizing hormone, and estradiol in healthy women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2541-2546
- Lucy MC. 2001. Reproduction loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J Dairy Sci* 84:1277-1293.
- MacDougald OA, Hwang C-S, Fan H, Land MD. 1995. Regulated expression of the obese gene product (Leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9034-9037.

- Mamluk R, Greber Y, Meidan R. 1999. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid expression for steroidogenic factor-1, steroidogenic acute regulatory protein, and cytochrome P450 side-chain cleavage in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 60:628-634.
- Mantozoros CS, Cramer DW, Liberman RL, Barbieri L. 2000. Predictive value of serum and follicular fluid leptin concentration during assisted reproductive cycles in normal woman and in woman with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 15:539-544.
- Markusfeld O, Galon N, Ezra E. 1997. Body condition score, health, yield and fertility in dairy cows. *Vet Rec* 141:67-72.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. 1997. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3:1029-1033.
- Neville MC, Medina D, Monks J, Hovey RC. 1998. The mammary fat pad. *J Mamm Gland Biol Neoplasia* 3:109-116.
- Norman AW, Litwack G. 1997. *Hormones*. Second edition. Chapter 14. Academic Press.
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269: 540-543.
- Roche JF. 1996. Control and regulation of folliculogenesis- a symposium in perspective. *Rev Reprod* 1:19-27.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A*

laboratory manual, 2nd Edition. Cold spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory press.

- Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, Becker GW, Bowsher RR, Stephens TW, Caro JF. 1996. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest* 98: 1277-1282
- Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, Johnston J, De Lancey E, Hassink SG, Funanage VL. 1998. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab* . 83:1810-1813.
- Snijders SE, Dillon P, O'callaghan D, Boland P. 2000. Effect of genetic merit, milk yield and lactation number on in vitro oocytes development in dairy cows. *Theriogenology* 53:981-989.
- Spicer JL, Francisco CC. 1997. The adipose obese gene production, Leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology* 138:3374-3379.
- Studer E. 1998. A veterinary perspective of on-farm evaluation of nutrition and reproduction. *J Dairy Sci* 81:872-876.
- Takahashi Y, Okimura Y, Mizuno I, Iida K, Takahashi T, Kaji H, Abe H, Chihara K. 1997. Leptin induces mitogen activated protein kinase dependent proliferation of C3H10T1/2 Cells. *J Biol Chem* 272:12897-12900.
- Tartaglia L, Demdski M, Wang X, Deng N, Culpper J. 1995. Identification and expression cloning of the leptin receptor. *Cell* 83:1263-1271.
- Tartaglia LA. 1997. The leptin receptor. *J Biol Chem* 272:6093-6096.

- Tomimatsu T, Yamaguchi M, Murakami T, Ogura K, Sakata M, Mitsuda N, Kanzaki T, Kurachi H, Irahara M, Miyake A, Shima K, Aono T, Murata Y. 1997. Increase of Mouse Leptin Production by Adipose Tissue after Midpregnancy: Gestational Profile of Serum Leptin Concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 240:213-215.
 - Tucker HA. 2000. Symposium: Hormonal regulation of milk synthesis. *J Dairy Sci* 83:874-884.
 - Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. 1998. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393: 684-688.
 - Wauters M, Considine RV, Van Gaal LF. 2000. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol* 143: 293-311.
 - Yanagihara N, Utsunomiya K, Cheah TB, Hirano H, Kajjwara K, Hara K, Nakamura E, Toyohira Y, Uezono Y, Ueno S, Futoshi I. 2000. Characterization and functional role of leptin receptor in bovine adrenal medullary cell. *Biochem Pharmacol* 59: 1141-1145.
 - 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.
- פולמן י. 1996. השפעת ההזנה ותנובת החלב על ביצועי הרבייה של פרות החלב. *הבקר והחלב* 268: 23-24.

ABSTRACT

Leptin, a protein hormone secreted predominantly by white adipose tissue, may play a critical role in the regulation and coordination of energy metabolism. In rodents and humans, leptin informs the central nervous system of the size of the energy reserves, coordinates adaptations to periods of nutrient insufficiency, and regulates the metabolism of key tissues involved in the storage and dissipation of energy. In addition leptin is involved in regulatory and developmental processes as puberty and in mammary gland development. The leptin receptor (OB-R) appears in two forms a short form (OB-Rs) and a long form (OB-Rl). The long form of the receptor contains an extracellular domain of 816 amino acids and is expressed mainly in the hypothalamus. It is well established that OB-Rl has the ability to transfer signals into the cells. The short form is expressed in most peripheral tissues and lately it was found that it can also pass signals into the cells.

The aim of this study was to characterize the expression of the OB-Rs in peripheral tissues of the cow in different stages of its life. The work was focused on the mammary gland and the ovary using molecular biology techniques. In addition, the levels of the hormone, leptin was measured in the sera of calves and cows.

The assumption was that the levels of expression of the OB-Rs in the udder changes according to the body score of the cow. In this work we found that the expression of the OB-Rs changed with the life span of the cow. In three months old calf and in mid lactating cow the expression was low and in 12 months old calf and pregnant calf the expression was higher.

In the ovary we assume that the levels of OB-Rs expression in the follicles change with the state of its development. The lowest expression of the receptor was found in stage one follicles (small antral) and higher expression was found in stage three follicles (large antral).

To characterize the levels of the leptin hormone in the dairy cow we analyzed two groups. One, none pregnant heifers and lactating multiparus cows. The differences in the body condition of the animals went parallel with the body score and the leptin levels in the sera. In the lactating cow the mean body score was 2.5 and the

leptin level was 1ng/ml while in the heifers, body score was 3.5 and leptin level in the blood ranged between 3-5ng/ml.

**Expression of the short leptin receptor in
peripheral tissues at different stages of the
productive life cycle in dairy cattle**

M.Sc.

**Submitted to the Faculty of Agricultural, Food
and Environmental Quality Sciences
The Hebrew University of Jerusalem**

By:

Yonatan david feuermann

Rehovot. Israel

October 2001