

NUTRIGENOMICS ANALYZE OF EXPRESSION OF EXTRACELLULAR LEPTIN RECEPTOR BY THE FOLLOWING ESSENTIAL OIL MONITORING AT THE AVIAN MODELS

Lubica Mrázová, Radoslav Židek, Mária Angelovičová, Jana Tkáčová, Martin Kliment, Martin Král, Pavol Bajzík

ABSTRACT

Leptin gene was identified in 1994 by positional cloning. His mutation is considered extreme obesity surface phenotype and infertility in *ob/ob* mice. Most of the research, which followed the discovery of this hormone, focused on the role of leptin in regulating body weight, in order to clarify the pathophysiology of obesity. Many research results show that leptin is not only important in regulating food intake and energy balance, but also performs functions such as metabolic and neuroendocrine hormone. Using herbs and essential oils depends on their antimicrobial activity. Most plants have favorable multifunctional properties, which are the specific content of bioactive components. Some authors characterize phytochemical substance such as natural substances plant origin, which leave no residues in animal products and is not necessary to keep the trade period before slaughter animals. Analyses suggest that the structural function of the receptor exists as a dimer constructively in the plasma membrane. Each receptor dimer pair is reversibly bound to one molecule of leptin. When bound, signaling pathways are responsible for beginning the activation receptor associated Janus kinase 2 (JAK2) and tyrosine phosphorylation of two key residues in the intracellular part of receptor.

Keywords: leptin receptor, gene expression, bird, hormone, essential oil

ÚVOD

Biotechnológie z hľadiska živočíšnej výroby sú orientované na využívanie živých organizmov a ich častí pre vysoko intenzívnu a opakovateľnú výrobu potravín alebo modifikáciu produktov živočíchov na špecifické použitie. Poznatky o lokalizácii a efektoch špecifických génov, ktoré v uplynulých rokoch progresívne narastali, majú význam z hľadiska kvality produkcie, resp. ďalších úžitkových charakteristík hospodárskych zvierat. Väčšina vlastností vrátane ekonomicky významných, ako je napr. produkcia mäsa a mlieka, je kódovaná viacerými génmi. Preto finálny efekt môže byť rozdielny podľa identity individuálneho špecifického génu. Dôležitá je analýza úžitkovosti u rodičov a potomkov a ich vzájomné vzťahy. Chov brojlerových kurčiat umožnil intenzívnejšie ukladanie svalovej hmoty uplatnením výsledkov stratégie genetického výberu (Havenstein et al., 2003b).

Havenstein et al. (2003b) uvádza, že produkcia kurčacieho mäsa má dôležitú úlohu z hľadiska vysokej potenciálnej produkcie v relatívne krátkom období, ale i z hľadiska vysokej dietickej hodnoty. Vysoká potenciálna produkcia daná krátkym generačným intervalom a pomerne krátkym obdobím výkrmu brojlerových kurčiat, vysoká intenzita rastu spolu s vynikajúcimi dietickejšími vlastnosťami kurčacieho mäsa predurčuje tento druh mäsa ako potravinu budúcnosti.

Aj tisícročné tradície a skúsenosti v humánnom liečiteľstve poukazujú na skutočnosť, že najprirodzenejšie riešenie problematiky udržania zdravia zvierat a potravinovej bezpečnosti, je vo využívaní biologicky účinných látok rastlín. Drdák et al. (1996) uvádza, že obsahovým látkam rastlín, ako sú alkaloidy, triesloviny a silice je určená osobitná pozornosť. Použitie rastlinných silíc ako jednej z možných alternatív za kŕmne antibiotiká, ktoré kladne ovplyvnili produkciu brojlerových kurčiat potvrdili vo svojich experimentoch,

Demeterová (2004), Mudroňová et al. (2005), Angelovičová et al. (2005), Angelovičová et al. (2006) a iní.

Podľa Opletela (1998) môžu mať rastovo-stimulačné účinky aj prírodné esenciálne oleje z korenín a aromatických bylín, ako aj rastlinné extrakty obsahujúce účinné zložky. Docie a Bikle (2003) uvádzajú, že rastlinné extrakty podobne ako antibiotiká, pozitívne ovplyvňujú príjem krmiva, prírastky telesnej hmotnosti, utilizáciu živín a zlepšujú mikrobiálnu fermentáciu v čreve. Bikler (2006) poukazuje aj na skutočnosť, že použitie fytochémy stimuluje fyziologické procesy tráviacej sústavy a zlepšuje jej odolnosť voči kolonizácii patogénnou mikroflórou

Použitie bylín a esenciálnych olejov závisí od ich antimikrobiálnej aktivity. Väčšina rastlín má priaznivé multifunkčné vlastnosti, ktoré sú dané špecifickým obsahom bioaktívnych zložiek. Kamel a McKay (2003) charakterizujú fytochémy substancie ako prírodné látky rastlinného pôvodu, ktoré nezanechávajú reziduá v živočíšnych produktoch a nie je nutné dodržiavať ochrannú dobu pred jatočným zabíjaním zvierat.

Biotechnológie z hľadiska živočíšnej výroby sú orientované na využívanie živých organizmov a ich častí pre vysoko intenzívnu a opakovateľnú výrobu potravín alebo modifikáciu produktov živočíchov na špecifické použitie. Poznatky o lokalizácii a efektoch špecifických génov, ktoré v uplynulých rokoch progresívne narastali, majú význam z hľadiska kvality produkcie, resp. ďalších úžitkových charakteristík hospodárskych zvierat. Väčšina vlastností vrátane ekonomicky významných, ako je napr. produkcia mäsa a vajec, je kódovaná viacerými génmi. Preto finálny efekt môže byť rozdielny podľa identity individuálneho špecifického génu. Dôležitá je analýza úžitkovosti u rodičov a potomkov a ich vzájomné vzťahy (Bulla, 2003).

Rozdiely medzi jednotlivcami v zisku energie po nadmernom príjme potravy nepochybne ovplyvňuje

genotyp. Obezita následkom prejedania je jednoznačne následok exogénneho faktora.

Za fyziologických podmienok tukové tkanivo predstavuje asi 1% z hmotnosti tela. Tento stav je udržiavaný prísnyimi regulačnými mechanizmami. Nadmerný príjem potravy je signálom pre mozog, znižuje sa chuť do jedla a zvyšuje sa utilizácia energie. Tento mechanizmus pôsobí ako pomalý dlhodobý feedbackový mechanizmus (Dridi et al., 2000).

Bez ohľadu na to, o ktorý mechanizmus regulácie ide, je isté, že bod citlivosti systému (set point) a jeho nastavená hladina určujú telesnú hmotnosť. Genetické (segregačné) experimenty ukázali, že obezita je regulovaná niekoľkými hlavnými génmi. Pokiaľ o centrálnom riadení chuti do jedla a príjmu potravy boli dôkazy, periférny článok feedbackového mechanizmu bol neznámy. Leptínový gén bol identifikovaný v roku 1994 pomocou pozičného klonovania (Zhang et al., 1994).

Jeho mutácia sa pokladá za podklad fenotypu extrémnej obezity a neplodnosti. Väčšina výskumu, ktorý nasledoval

po objavení tohto hormónu, sa zamerával 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. (Dridi et al., 2000).

Bola vyklonovaná a sekvenovaná kuracia leptínová cDNA, ktorá je viac ako na 90 % identická s murínovým leptínom a viac ako na 80 % identická s väčšinou iných známych leptínových sekvencií. Navyše cDNA leptínu morky bola taktiež vyklonovaná a sekvenovaná a ukazuje veľmi vysokú podobnosť so sekvenciami kuracieho leptínu. Kurací leptín má 145 aminokyselín v porovnaní so 146 aminokyselinami u cicavčích druhov (Taouis et al., 1998; Ashwell et al., 1999).

Ďalšia unikátna štruktúrna črta kuracieho leptínu je, že v porovnaní s cicavčím leptínom obsahuje nepárovaný cytozín v pozícii 3' originálnej cDNA (bez signálneho peptidu) (Dridi et al., 2000).

Leptínové receptory patria do triedy I cytokínovej receptorovej rodiny. Hoci bolo nájdených šesť izoform leptínového receptora, doteraz sú známe iba dve, čo je dávané do súvislosti s intracelulárnou signalizáciou. Najdlhšia izoforma (ObRb) plní spôsobilosť signalizácie (Eisenberg et al., 2004).

Analýzy naznačujú, že štruktúrna funkcia receptora existuje konštruktívne ako DIMER v plazmatickej membráne. Každý receptor dimérového páru sa reverzibilne viaže k jednej molekule leptínu. Pri viazaní, signálne dráhy sú zodpovedné za začiatok aktivácie receptorov spojených Janus kinázou 2 (JAK2) a fosforylácie tyrozínu dvoch kľúčových zvyškov na intracelulárnu časť receptora (Bahrenberg et al., 2002).

Osobitný význam pre narastanie účinku leptínu je naviazanie molekúl leptínu na jeho najdlhšie izoformy receptora aktivovanými radom intracelulárných signálov po JAK2 aktivácii, ktoré boli spojené s celým radom biologických akcií rôznych tkanív. Expresie dvoch najdlhších izoform leptínového receptora (ObRa a ObRb) sa zdajú byť prítomné vo všetkých cicavčích

tkanivách, aj keď ObRb je najviac exprimovaný iba v hypotalame (Hekerman et al., 2005).

Celková strata funkcie mutácií v izoforme leptínového receptora ObRb sa zdá byť vzácna v ľudskej populácii, ale polymorfizmy v oblasti génu, ktoré kódujú extracelulárne domény receptora nie sú nezvyčajné, a sú spojené s priberaním telesnej hmotnosti a adipocytmi (Banks et al., 2000).

Cieľom tejto práce bolo detegovať expresiu extracelulárneho leptínového receptora na základe analýzy cDNA u finálneho výkrmového typu brojlerových kurčiat COBB 500.

Ďalším cieľom bolo zamerať sa na rozloženie tkanivovej expresie receptora pre leptín vo vybraných orgánoch brojlerových kurčiat.

MATERIÁL A METÓDY

Analýzy sme vykonali na vzorkách, ktoré sme získali zo skupinového experimentu s brojlerovými kurčatami. Tento experiment bol situovaný na farme s halou určenou pre chov 24 000 kusov brojlerových kurčiat určených na produkciu mäsa. Na detekciu leptínového receptora sme použili vzorky tkanív a tuku brojlerových kurčiat COBB 500. Kurčatá boli chované v hale na hlbokej podstielke s dodržaným odporúčaným svetelným režimom. V experimente bola použitá vlastná technológia kŕmenia a napájania. Pokusná skupina bola zložená zo 100 kusov brojlerových kurčiat, z ktorých sme vybrali 5 kusov rovnakej telesnej hmotnosti. Tieto brojlerové kurčatá boli použité ako reprezentatívne vzorky, z ktorých sme použili vnútorné orgány a tuk na analýzy. RNA sme vyizolovali z rozdrvených častí tkanív srdca, sleziny, pečene a extracelulárneho tuku pomocou SV Total RNA Isolation System Trial Size kit. RNA bola prepísaná reverznou transkripciou pomocou jedнокrokového - 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 0,20 pmol.μl⁻¹ CASSY- F marker 5'-GTC CAC GAG ATT CAT CCC AG-3' a 0,20 pmol.μl⁻¹ CASSY - R marker 5'-CCT GAG ATG CAG AGA TGC TC-3' (Cassy et al., 2004). Ďalej boli použité primery pre pozitívnu kontrolu kvality izolovanej RNA a priebehu reverznej transkripcie pre glycerinaldehyd-3-fosfátát dehydrogenázu (GAPDH) GAPDH-F marker 5'-GTGTTATCATCTCAGCTCCCT CAG a marker GAPDH-R 5'AAAGGTGGAAGAATGG CTGTACC (Liu et al., 2006). Ďalšími zložkami boli 0,80 U GoTaq HotStar Polymeráza doplnené bidestilovanou vodou do objemu 30 μl. Zmes obsahovala tlmivý roztok GoTaq green pufor 5x (Promega, Madison USA) a amplifikácia prebehla v termálnom cykléri (PTC-150 MiniCycler™, Research, Watertown USA). Postup PCR reakcie bol nasledovný: PCR cyklus začína predenaturáciou pri teplote 94 °C po dobu 4 minút. Následne bolo zopakovaných 30 cyklov obsahujúcich denaturáciu pri teplote 94 °C po dobu 40 sekúnd a predĺžovanie pri teplote 72 °C po dobu 1 minúty. Finálne predĺžovanie fragmentov prebiehalo pri teplote 72 °C po dobu 7 minút.

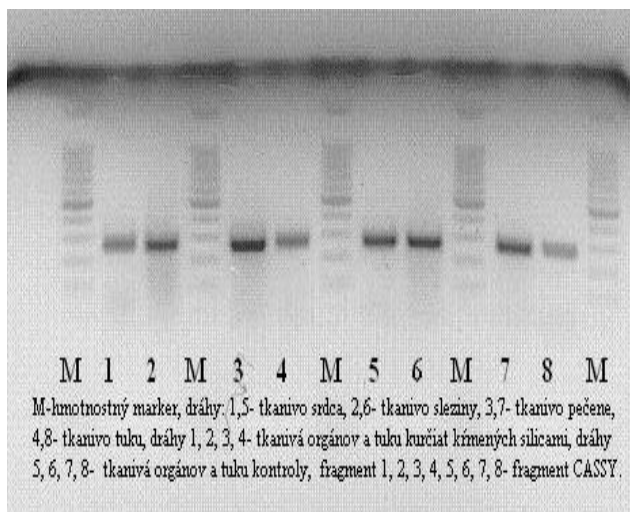


Obrázok 1 Výkrmový typ brojlerových kurčiat COBB500, Foto: Mrázová (2011)

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Obrázok 2 Expresia leptínového receptora v orgánoch a tuku výkrmového typu kurčiat COBB500

Zámerom nášho experimentu bolo optimalizovať metodiku na sledovanie expresie extracelulárneho



leptínového receptora na aviarnom modeli. Použili sme vzorky orgánov kurčiat a tuku ktoré boli kŕmené silicami a taktiež vzorky orgánov a tuku od kurčiat z kontrolnej skupiny. V priebehu experimentu sa nám úspešne podarilo vyizolovať RNA zo srdca, sleziny, pečene a vnútrotelového tuku. Získaná celková RNA po reverznej transkripcii na cDNA predstavovala templát ktorý sme použili na identifikáciu zvoleného leptínového receptora. Ako vyplýva z obrázku 2, vo všetkých analyzovaných orgánoch sa nám podarilo vyizolovať celkovú RNA, ktorá pri následnej reverznej transkripcii a PCR reakcii s použitím primérových párov CASSY-F a CASSY-R umožnili vznik fragmentov 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 a 8. Ako naznačuje dráha číslo 4, najmenší obsah izolovanej RNA bol dosiahnutý vo vnútrotelovom tuku, ktorý sme získali z kurčiat kŕmených silicami, a dráha číslo 8, ktorý sme získali od kurčiat ktoré sme zobrali z kontrolnej skupiny. M-predstavujú markéry na identifikáciu extracelulárneho leptínového receptora. V našom experimente sme použili hmotnostný marker o veľkosti 100 bp. 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 primérmami (CASSY-F a CASSY-R – 273bp), ale bol kratší ako kontrolný fragment GAPDH s dĺžkou 533bp. Z uvedeného vyplýva, že použitím primérov a postupov popísaných v metodike práce je možné pozorovať expresiu extracelulárneho leptínového receptora u hybridu COBB 500. V tkanive srdca, sleziny a pečene je pozorovaný leptínový receptor exprimovaný v očakávaných množstvách. V tkanive vnútro telového tuku sa RNA javí ako skrátená, čo by mohlo byť zapríčinené alternatívnym zostrihom molekuly (splicing). Keďže finálny výkrmový typ brojlerových kurčiat hybrid COBB 500 je dlhodobou šľachtený so zameraním na znižovanie obsahu vnútro telového tuku a zvyšovanie objemu prsnej svaloviny, budeme sa tejto problematike venovať viac.

ZÁVER

V našom experimente sa nám úspešne podarilo vyizolovať celkovú RNA z tkanív orgánov ako srdce, slezina, pečeň, a vnútro telový tuk. V tkanivách srdca, sleziny, pečene pri pomerne vysokej koncentrácii celkovej cDNA vo vzorke sa dĺžka fragmentu extracelulárneho leptínového receptora nachádza v očakávaných množstvách. Vo vnútro telovom tuku na prítomnosť leptínového receptora poukázal fragment, ktorý svojou dĺžkou nezodpovedal očakávanej dĺžke fragmentu ohraničeného navrhnutými primérmami. Ďalej sme zistili, že použitím primeru a popísaných postupov je možné pozorovať expresiu extracelulárneho leptínového receptora u výkrmového typu brojlerových kurčiat COBB 500. V tkanive vnútro telového tuku sa RNA našla v skrátenej forme. Tejto problematike sa budeme naďalej venovať.

LITERATÚRA

- ANGELOVIČOVÁ, M., MELLEN, M., ANGELOVIČ, M. 2005. Použitie pamajoránovej silice ako náhrady za antibiotikum vo výžive výkrmových kurčiat. In Dni výživy. SPU : Nitra, 2005, p. 1-5. ISBN 80-8069-530- X.
- ANGELOVIČOVÁ, M., MELLEN, M., ANGELOVIČ, M. 2005. Uplatnenie biotechnologického postupu náhrady kŕmneho antibiotika premixom škoricovej silice vo výžive výkrmových kurčiat. In Biotechnológie 2006. JU: České Budejovice, 2006, p. 134-136. ISBN 8085-645-53-X.
- ASHWELL, C. M., CZERWINSKI, S. M., BROCHT, D. M., 1999. Hormonal regulation of leptin expression in broiler chickens. In *Am. J. Physiol.*, vol. 8., 1999, no. 5, p. 226-232.
- BAHRENBERG, G., BERMANN, I., BARTHEL, A., HEKERMAN, P., HEINRICH, P. C., JOOST, H. G., BECKER, W. 2002. Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. In *Mol. Endocrinol.*, vol. 16., 2002, no. 12, p. 859-72.
- BANKS, S., DAVIS, M., BATES, S. H., MYERS, M. G. Jr. 2000. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. In *J. Biol. Chem.*, vol. 275, 2000, no. 46, p. 14563-14572.
- BULLA, J. 2003. Research and Perspectives of the Modern Biotechnologies. In *Animal Husbandry. Život. Prostr.*, vol. 37, 2003, no. 2, p. 14-16.
- CASSY, S., METAYER, S., CROCHET, S., RIDEAU, N., COLLIN, A., TESSERAUD, S. 2004. Leptin receptor in the chicken ovary: potential involvement in ovarian dysfunction of

ad libitum-fed broiler breeder hens. In *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 2, 2005, no. 72, p. 178-186.

DEMETEROVÁ, M. 2004. Súčasný trendy vo výžive hydiny. In *Slovenský veterinársky časopis*, vol. 29, 2004, no. 5, p. 38-40.

DRDÁK, M., STUDENICKÝ, J., MÓROVÁ, E., KAROVIČOVÁ, J. 1996. Základy potravinárskych technológií. Bratislava, MC, 1996, p. 512.

DRIDI, S., RAVER, N., GUSSAKOVSKY, E. E., DEROUET, M., PICARD, M., GERTLER, A., TAOUIS, M. 2000. Biological activities of recombinant chicken leptin C4S analog compared with unmodified leptins. In *Am. J. Physiol.*, vol. 279, 2000, no. 1, p. 116-123.

EISENBERG, A., BIENER, E., CHARLIER, M., KRISHAN, R. V., DJIANE, J., HERMAN, B., GERTLER, A. 2004. Transactivation of erb B2 by short and long isoforms of leptin receptors. In *FEBS Lett.*, vol. 565, 2004, no. 5, p. 139-142.

HEKERMAN, P., ZEIDLER, J., BAMBERG-LEMPER, S., KNOBELSPIES, H., LAVENS, D., TAVEMIER, J., JOOST, H. G., BECKER, W. 2005. Pleiotropy of leptin receptor signalling is defined by distinct roles of the intracellular tyrosines. In *J. Febs. J.*, vol. 272, 2005, no. 8, p. 109-119.

KAMEL, C., MCKAY, R. 2003. Plant extracts enhance performance in broilers under Clostridium perfringens challenge. In *J. Anim. Sci.*, vol. 81, 2003, no. 1, p. 103.

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 Anim. Endocrinology*, vol. 32, 2007, p. 155-166.

MUDROŇOVÁ, D., NEMCOVÁ, R., GANCARČÍKOVÁ, S., JONECOVÁ, Z., BOMBA, A. 2005. Alternatíva antibiotík v odchove mláďat HZ. In *Slovenský chov*, vol. 11, 2005, no. 1, p. 33-35.

OPLETAL, L. 2006. Performing nature – aplikovaná príroda. In *Slovenský chov*, vol. 11, 2006, no. 6, p. 44.

TAOUIS, M., CHEN, J.W., DAVIAUD, C. 1998. Cloning the chicken leptin gene. In *Gene*, vol. 65, 1998, no. 2, p. 239-242.

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, no. 13, p. 425-432.

Acknowledgments:

This work was supported by Scientific Grant Agency No financial support VEGA 1/0007/11.

Contact address:

Ing. Ľubica Mrázová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: lubica.mrazova@uniag.sk

Ing. Radoslav Židek, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: Radoslav.zidek@uniag.sk

prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: maria.angelovicova@uniag.sk

Ing. Jana Tkáčová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: tkacova.j@centrum.sk

Ing. Martin Kliment, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: mkmartinkliment@gmail.com

Ing. Martin Král, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: martinxkral@gmail.com

Ing. Pavol Bajzík, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: pavol.bajzik@uniag.sk