

קביעת הרכב חומצות אמינו אופטימאלי להשראת סינתזת חלבוני חלב בתאים אפיתליאליים מעטין בקר לחלב

דו"ח מסכם לתוכנית מחקר מספר 100-0254-362

מוגש למועצת החלב ע"י:

איתמר ברש המכון לחקר בע"ח, מכון וולקני, מנהל המחקר החקלאי בית דגן

אפריל, 2011

1. תקציר

בעבודה זו חקרנו את מעורבותן של חומצות האמינו, כמולקולות סיגנל בבקרת סינתזת חלבונים בתאי בלוטת עטין ממקור עכבר ובקר מתוך מטרה ליצור סביבה אופטימלית לפעילות תאי העטין. עקבנו אחר השפעתן על הפעילות התאית downstream לקומפלקס מס 1 של mTOR המנקז את השפעתם האנבולית של חומצות האמינו והאינסולין. על פי השפעתן על פעילות S6K1, המהווה סמן לסינתזת חלבונים, חילקנו את חומצות האמינו ההכרחיות לשלשה סוגים: בעלות השפעה חיובית (מסועפות שרשרת), נויטרליות (טריפטופן פנילאלנין ומתיונין) ובעלות השפעה שלילית (ליזין, היסטידין וטריאונין). תריאונין עכבה סינתזת חלבונים בתאי בקר ועכבר ונמצאה כבעלת האפקט המעכב החזק ביותר, שהיה מספיק דיו להתחרות באפקט החיובי של חומצת האמינו מסועפת השרשרת לאוצין. לשילוב שבין שלש חומצות האמינו המעכבות נמצא אפקט סינרגיסטי שלילי, אשר בריכוזי חומצות אמינו גבוהים דיכא לחלוטין את פעילות את S6K1 ומנע כמעט לחלוטין את סינתזת חלבון החלב ביתא קזאין. בריכוזים אלה מנעו חומצות האמינו בעלות האפקט השלילי גם את הפעילות האנבולית של אינסולין דרך מסלול חדש שבחלקו הודגם לראשונה בעבודה זו. בעבודה זו נבחנה גם התחרותיות בין חומצות אמינו בעלות אפקט חיובי ושלילי על סינתזת חלבונים ובמיוחד חלבוני חלב ונקבע, בממצאים ראשוניים, כי התנאים האופטימליים לאינדוקציה של יצור חלבונים דורשים רמות כפולות של חומצות אמינו מסועפות שרשרת מאלו הקיימות במדיום המסחרי DMEM:F12 ובהתאם, רמות נמוכות ב 25% של חומצות האמינו ליזין היסטידין וטריאונין.

Abstract

The role of essential amino acids (AA) on protein synthesis via the mTOR pathway was studied in murine mammary epithelial cells cultured under lactogenic conditions. Leu, Ile and Val increased S6K1 phosphorylation compared to that measured in AA-deprived cells. Trp, Phe and Met had no effect. Surprisingly, Lys, His and Thr inhibited S6K1 phosphorylation in both murine and bovine mammary cells. Thr exhibited the most potent inhibition, being the only amino acid that competed with Leu's positive role. In non-deprived cells, there was no observable effect of Lys, His or Thr on S6K1 phosphorylation at concentrations up to five times those in the medium. However, their addition as a mix revealed a synergistic negative effect. Supplementation of Lys, His and Thr abrogated mTOR Ser 2448 phosphorylation, with no effect on Akt Ser 473—an mTORC2 target. This confirms specific mTORC1 regulation of S6K1 phosphorylation. The individual supplementation of Lys, His and Thr maintained a low level of IRS-1 phosphorylation, which was dose-dependently increased by their combined addition. Thus, in parallel to inhibiting S6K1 activity, these AA may act synergistically to activate an additional kinase, phosphorylating IRS-1 via an S6K1-independent pathway. In cultures supplemented by Lys, His and Thr, cellular protein synthesis decreased by up to 65%. A more pronounced effect was observed on β -casein synthesis. These findings indicate that positive and negative signaling from AA to the mTOR pathway, combined with modulation of insulin sensitization, mediate the synthesis rates of total and specific milk proteins in mammary epithelial cells. Ongoing studies suggest also that optimal conditions for protein synthesis in mammary epithelial cells includes two fold higher levels of branched chain AA and lower levels (by 25%) of Lys, His and Thr.

2. מבוא

במספר רב של תאים ורקמות, חומצות אמינו אינדיודאליות משפיעות על מסלול מעבר סיגנלים הקשור בסינתזת חלבונים המקביל לזה של האינסולין. בהמשך, השפעתן של חומצות האמינו וההשפעה ההורמונאלית מתנקזות להשפעה משותפת על mTOR - קינאז המזרחן על סרין/תריאונין המבקר פעילותם של מספר גורמים חשובים בתהליך ה- initiation וה- elongation אשר מרכיבים את התהליך הכולל של תרגום ה RNA לחלבון.

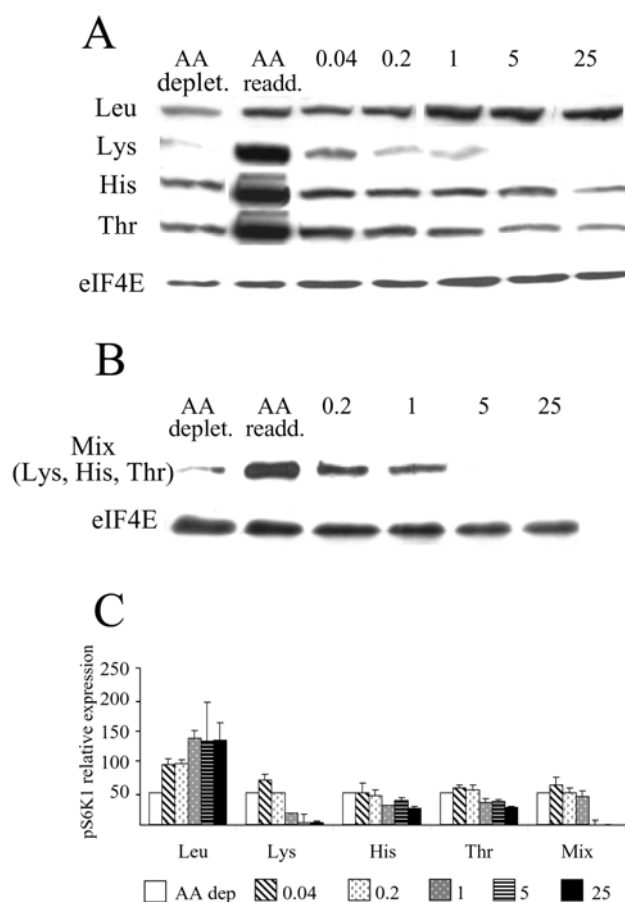
במהלך האבולוציה, mTOR הפך לחלבון בעל השפעה קריטית דרכה מועברים המסרים האנבוליים של מסלול ה PI3 kinase ה (class I) הכולל את החלבונים TSC1, TSC2, Rheb והשפעותיהן של חומצות האמינו אשר מועברות דרך PI3 kinase (class III). קיימים שני קומפלקסים חלבוניים בהם משתתף mTOR. קומפלקס מספר 1 המתווך את השפעתן של חומצות אמינו והרגיש למעכב רפמיצין. קומפלקס מס 2 מעביר בעיקר את השפעותיהם של Akt ו PKC או אינו רגיש למעכב רפמיצין. המנגנון דרכו מעביר mTOR, את השפעותיהן של חומצות האמינו כמולקולות סיגנל לא היה ברור בתחילת עבודה זו ושני חלבונים הנמצאים downstream שמשו לבחון את פעילותו האנבולית: 4EBP1 ו- S6K1. המזרחן את החלבון הריבוזומלי S6. לאחרון, נמדדה פעילות היזון חוזר על השפעתו האנבולית של האינסולין דרך עיכוב ה - IRS-I.

האפקט של חומצות אמינו, כמולקולות סיגנל המשפיעות על סינתזת חלבונים הוצג ברקמות שונות שהעיקרית שביניהן היא רקמת השריר. ברקמה זו חומצות אמינו מסועפות שרשרת ובמיוחד לאוצין הפעילו את תהליך התרגום וסינתזת החלבונים תוך פרק זמן קצר מאד. לחומצות אמינו אחרות לא נמצא תפקיד משמעותי, ודיווחים סותרים התקבלו לגבי השפעתן של ארגינין וגליצין. בתקופת התחלובה, תאים אפיתיליאליים בבלוטת העטין מיצרים כמויות גדולות של חלבוני חלב תוך פרק זמן קצר. תוך שימוש במודל של תאי בקר ועכבר במצב התמיינות ובנוכחות הורמונים לקטוגניים הראינו בעבודה קודמת כי הוספת חומצות האמינו מסועפות השרשת ובמיוחד לאוצין משפרת את היכולת האנבולית של התא האפיתיליאלי ובמיוחד את רמת סינתזת חלבוני החלב תוך פרק זמן קצר: בהעדרן של כלל חומצות האמינו ירדה רמת הזירחון של 4E-BP1 ושל S6K1 (על תראונין 389). בהתאם ירדה רמת הסינתזת של כלל החלבונים ובמיוחד זו של חלבון החלב ביתא-לקטוגלובולין. הוספת לאוצין לפרק זמן של 6 שעות בלבד לתאים ה"מורעבים" זרזה את יצור חלבון החלב מ RNA קיים, ובהתאם השיבה את רמת הזירחון של S6K1 ו- 4E-BP1. מתוך הנחה כי בטבע לא קיימים מסלולים "חד כוונים" חקרנו בעבודה זו את תפקידן של חומצות אמינו נוספות בהשראת סינתזת חלבונים ובמיוחד חלבוני חלב מתוך כונה להגיע להשפעה אופטימליות של חומצות האמינו כמולקולות סיגנל על סינתזת חלבונים בתא האפיתיליאלי של בלוטת העטין.

3. חומרים ושיטות

תרבות תאים: לניסויים שימשו תאי בלוטת עטין עכבר מקו התאים CID-9 ותאי עטין בקר מקו התאים L-1. התאים גודלו במדיום המכיל 5% סרום ואינסולין (לתאי הבקר הוסף גם הידרוקורטיזון). להתמיינות ויצור חלבוני חלב הועברו התאים למצע מטריגל, ה FCS הוסר והוסף פרולקטין. לצורך הרעבה לחומצות אמינו,

תמונה 2. לחומצות האמינו לאוצין, ליזין והיסטידין
 השפעה שלילית על פעילות S6K1 בתאי בקר. A השפעה
 אינדיודאלית. B. השפעה כתערובת. C-כימות



אכן גם בקו תאים זה נמצאה לשלש חומצות האמינו השפעה שלילית והסינרגיזם בניהן, אף הביא להשפעה רבה מהשפעתן של כל החומצות בנפרד ודיכא לחלוטין את הזירחון של S6K1 בריכוז הגבוה פי 5 מריכוז במדיום (תמונה 2). רמתו של גורם התרגום eIF4E לא הושפעה על ידי הטיפולים השונים ומהווה מדד לכמויות השוות של חלבון כללי שנלקחו לאנליזה.

בהמשך, נבחנה השפעתן של חומצות האמינו ליזין, היסטידין ותריאונין בסביבה התומכת פעילות סינתטית – כלומר בנוכחות לאוצין בריכוז גבוה פי 5 מריכוזה במדיום (תמונה 3). תריאונין התחרתה בהשפעתה החיובית של לאוצין והורידה את פעילות S6K1 ב 45% בריכוז x1 (חמישית מריכוזה של לאוצין). ברמות גבוהות יותר של תריאונין לא נמצאה כמעט פעילות של S6K1. ירידה בזרחון 4E-BP1 מתבטאת בשינוי ברמת הביטוי של צורה גמא לצורה ביתא. ניתן לראות כי גם זרחונו של 4E-BP1 מושפע מחומצות האמינו השליליות ובאופן כללי רמות גבוהות יותר של צורה ביתא (המפריעה לפעילות הסינתטית) נשמרות בנוכחות ליזין, היסטידין ותריאונין.

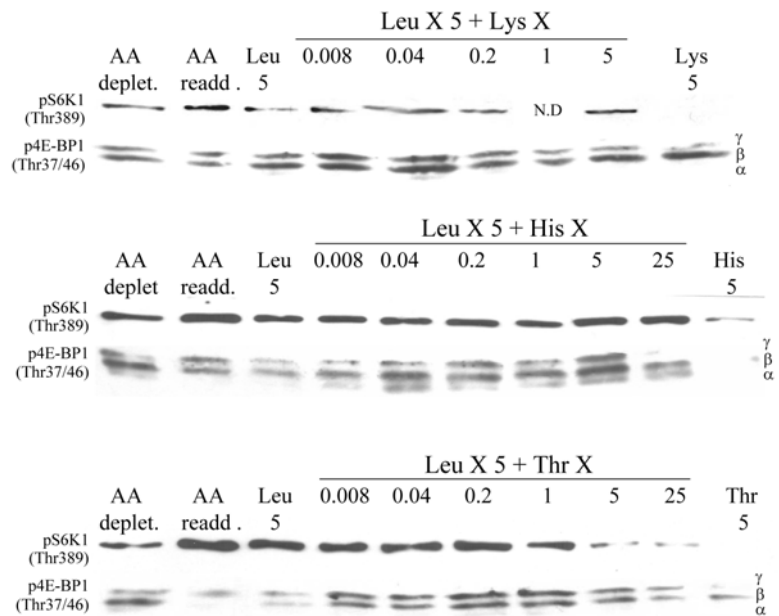
להשלמת האנליזה, נבחנה פעילותן של ליזין, היסטידין ותריאונין בתרביות שלא עברו מניפולציה ברמת חומצות האמינו. הוספה אינדיודאלית של חומצות אלו לא גרמה לשינוי בפעילות S6K1. לעומת זאת, הוספתן כתערובת הביאה לירידה בפעילותן של סמן זה כבר בריכוז השווה לריכוזן במדיום (x1) (תמונה 4).

לאחר שהראינו, בפעם הראשונה למיטב ידיעתנו, שקימות חומצות אמינו בעלות סיגנל שלילי על סינתזת חלבונים, התמקדנו במסלול האפשרי לפעילותן. בחנו את פעילות מסלול ה mTOR אשר ידוע כמרכז את

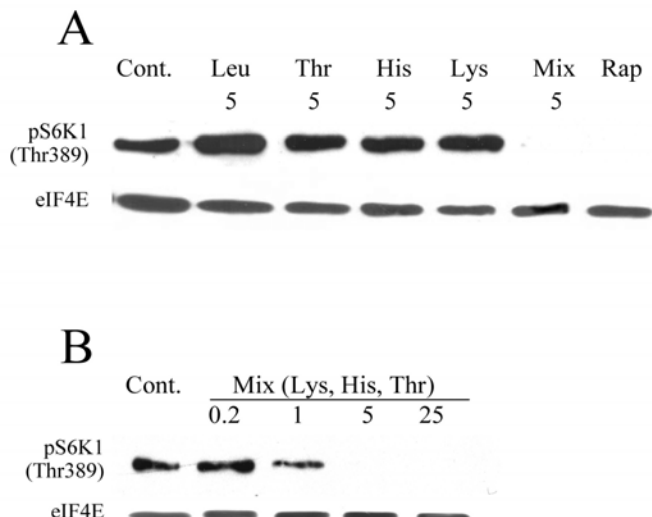
פעילותם של חומרי מזון. זרחון mTOR על סרין 2448 מושפע הן מפעילות אינסולין והן מחומצות אמינו ומבקר סינתזת חלבונים.

כפי שניתן לראות מתמונה מס. 5, רמת mTOR לא הושפעה מתוספת חומצות האמינו. לעומת זאת פעילותו עוכבה לחלוטין על ידי ליזין, היסטידין וטריאונין שהוספו אינדידואלית או כתערובת. הנסיונות המתוארים בתמונה 6 מאשרים את האפקט החיובי של כלל חומצות האמינו או לאוצין על פעילות S6K1 ו 4E-BP1 ואת האפקט המעכב של ליזין, היסטידין וטריאונין המוספות אינדידואלית או כתערובת. בתנאים אלה רמות נמוכות של פעילות IRS-1 נקבעו בביקורת, ועליה אובחנה דוקא בתאים בהם הוספו חומצות האמינו בעלות האפקט השלילי כתערובת. כפי שמראה תמונה 6 נמצאה קורולציה שלילית בין פעילות S6K1 ו IRS-1. עובדה זו מציעה כי שילוב של חומצות אלה מעכב את הפעילות הסינתטית הן ברמת חומצות האמינו והן על ידי אינסולין (המדוכא על ידי זרחון IRS-1).

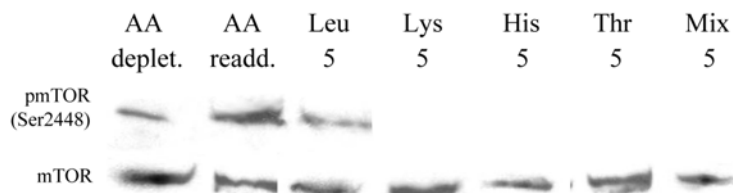
תמונה 3. תריאונין, אך לא ליזין או היסטידין מונעת את האפקט החיובי של לאוצין על פעילות סינתטית בתאי עטין עכבר.



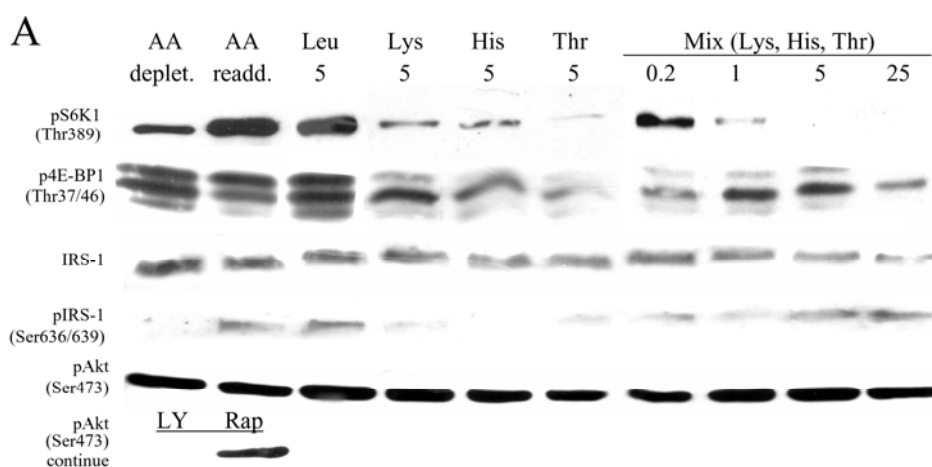
תמונה 4. הפעילות של S6K1 בתאים לא מורעבים מעוכבת על ידי תערובת של תריאונין הסטידין וליזין. A – תוספת אינדידואלית. B – תוספת כתערובת.



תמונה 5. השפעת חומצות האמינו על הפעילות הסינתטית מתבצעת דרך השפעתן על פעילות mTOR.



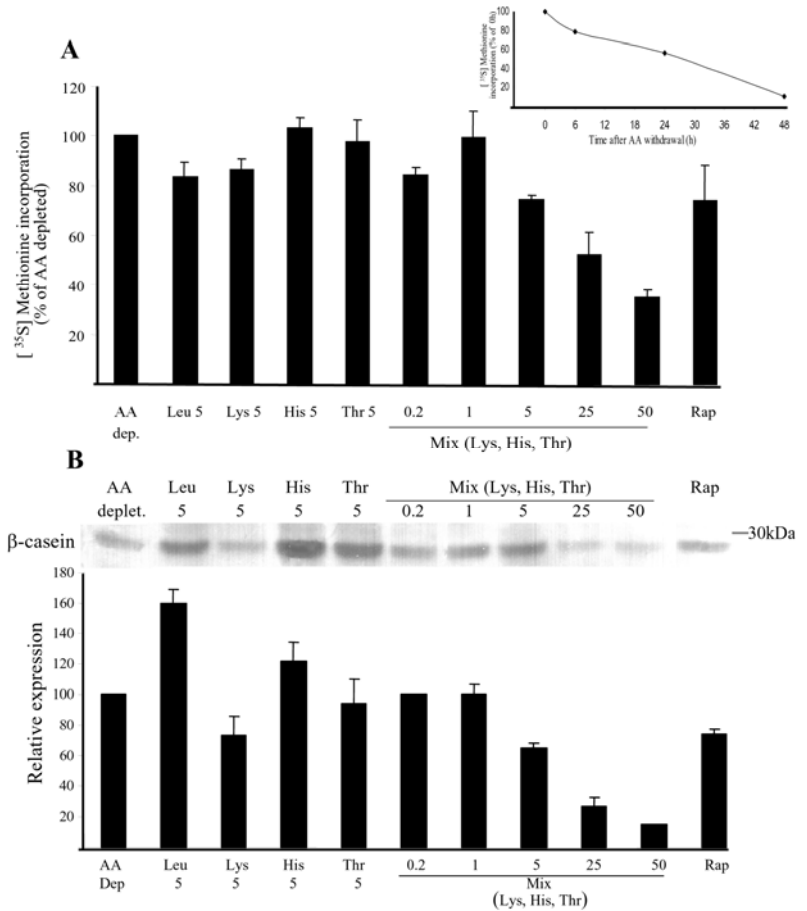
תמונה 6. חומצות האמינו המוספות כתערובת מדכאות גם את פעילות המסלול האנבולי של אינסולין על ידי זרחון IRS-1. A- אנליזה בשל אימונוהיסטוכימית. B- היחס ההפוך בין פעילות IRS-1 ו S6K1.



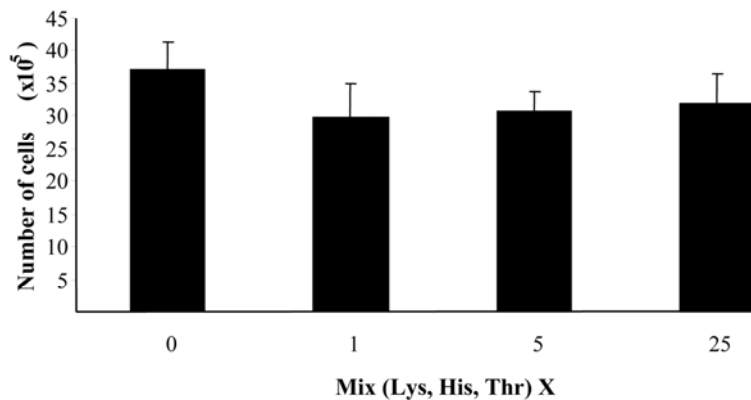
בהמשך, ביססנו והרחבנו את המחקר על השפעת השלילית של חומצות האמינו ליזין, היסטידין ותריאונין על סינתזת כלל החלבונים ובאופן ספציפי על סינתזת חלבון החלב קזאין בתאי העטין (תמונה 6). הדגמנו כי השפעה זו לא נובעת משינוי בחיוביותם של התאים (תמונה 8). כמו כן חקרנו את התחרות בין ההשפעה השלילית של חומצות האמינו ליזין, היסטידין ותריאונין להשפעה החיובית של חומצות האמינו מסועפות השרשרת בתאי עטין ממקור עכבר והראינו עקומות Dose response שונות לאפקט של חומצות האמינו בעלות האפקט השלילי במדיום המכיל חומצות אמינו נויטרליות וחומצות אמינו חיוביות (תמונה 9). תוצאות אלה מציעות כי אכן קיימת תחרות בין השפעתן של חומצות האמינו השונות, כמולקולות סיגנל על סינתזת

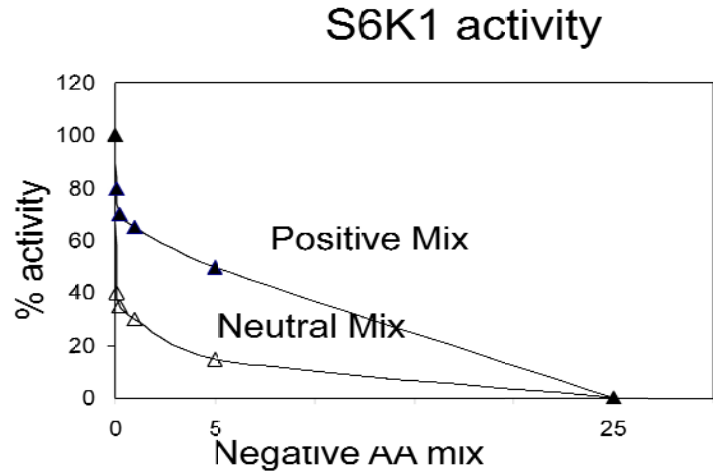
חלבונים. ברמות פיזיולוגיות לחומצות האמינו השליליות יכולת למנוע לא רק את השפעת חומצות האמינו החיוביות על סינתזת החלבונים אלא גם לדכא את הסיגנל האנאבולי של האינסולין בדרך של השפעה שלילית על IRS-1 ובכך לדכא כמעט לחלוטין את הפעילות הסינתטית בתא. המגנן מערב כנראה פעילות של אנזים לא ידוע המשפיע על זרחון IRS-1. סכמה המתארת את סיכום ממצאינו לגבי השפעת החומצות האמינו השליליות והמסלול המטבולי המעורב, זאת עפי מיטב הבנתנו מוצגת בתמונה 10).

תמונה 7. השפעתן השלילית של חומצות האמינו ליזין היסטידין ותריאונין (לחוד או כתערובת) על סינתזת כלל החלבונים וחלבון החלב קזאין בתאים אפיתליאליים ממקור עטין. זאת בהשוואה למעכב רפמיצין. המספרים על ציר ה-X הינן כפולות ריכוז החומצות במדיום

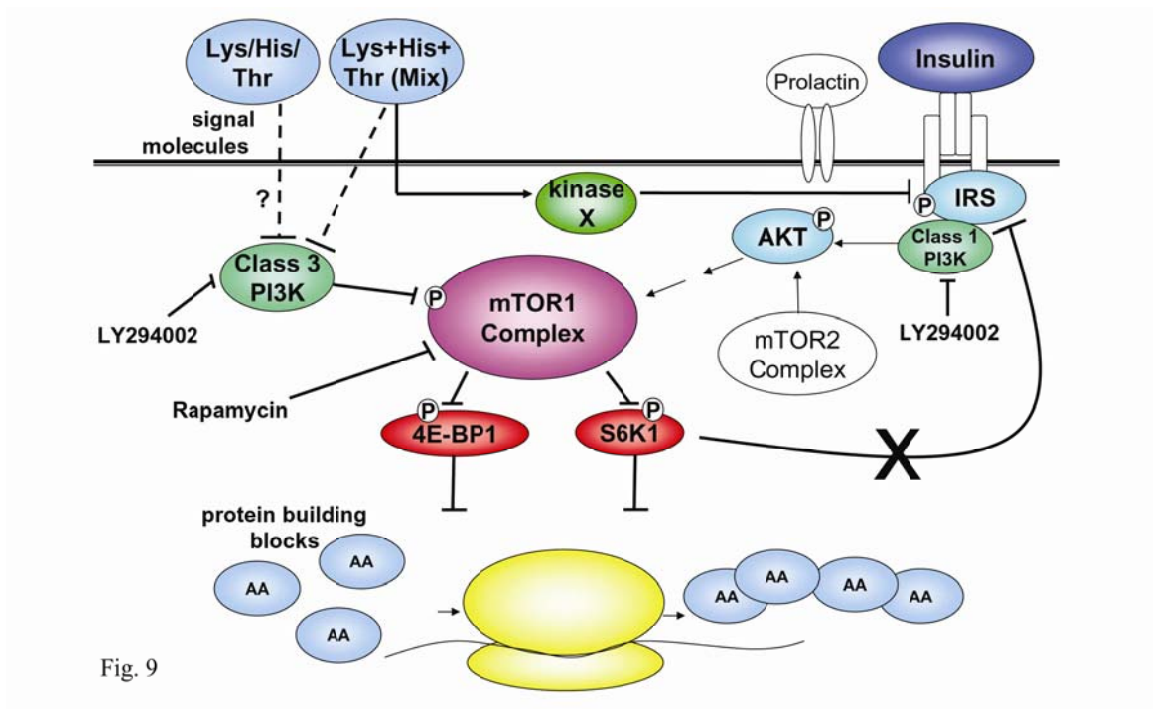


תמונה 8. לחומצות האמינו ליזין, היסטידין ותריאונין אין השפעה על חיוניות התאים בתרבית. המספרים על ציר ה-X – הינן כפולות ריכוז החומצות במדיום.





תמונה 9: התחרות בין חומצות האמינו השליליות (כתערובת) לבין חומצות אמינו נויטרליות וחיוביות (בהשפעתן על סינתזת חלבונים) מביאות לעקומות תגובה שונות של פעילות S6K1 אשר הינו סמן לפעילות סינתזת חלבונים בתא.



תמונה 10. מודל להשפעתן השלילית של חומצות האמינו על סינתזת חלבונים ודיכוי הסיגנל האנבולי של אינסולין בדרך לא ידועה (kinase x).

בניסויים שנמשכים גם עתה נראה כי על מנת להגיע לרמת פעילות אופטימלית של S6K1 אשר אמורה לשקף סינתיזת חלבון בתא האפיתליאלי רצוי להעלות את חומצות האמינו מסועפות השרשרת לרמה הגבוהה פי שתיים מרמתן במדיום DMEM/F12 ולהוריד את רמת חומצות האמינו ליזין, היסטידין ותראונין בעלות האפקט השלילי, לרמה של 75% מרמתן במדיום.

5. דיון

בעבודה זו בחנו את האפקט של חומצות אמינו כמולקולות סיגנל על המכניזם המעורב בתרגום ובסינתיזת חלבונים בתאי עטין ממוינים ממקור עכבר ובקר תחת תנאים לקטוגניים. בהתייחס להשפעתן על פעילות S6K1, חולקו חומצות האמינו לשלש קבוצות: בעלות השפעה חיובית (מסועפות השרשרת) חסרות השפעה (טריפטופן פנילאלין ומתיונין) ואלו שלהן השפעה שלילית על סינתיזת החלבון (היסטידין, ליזין ותריאונין). למרות ההשפעה הדומה של האחרונות לא נמצא להן דמיון מבני, או איפיון מולקולרי שווה. משלשתן, לחומצת האמינו תריאונין נמצא האפקט המדכא החזק ביותר אשר היה בר תחרות עם האפקט המעודד של חומצת האמינו לאוצין על סינתיזת החלבונים. אפקט סינרגיסטי נקבע להשפעה המשותפת של שלש חומצות אלה אשר דיכא לחלוטין את פעילות S6K1 ודכא את המסלולים האנאבוליים המוכונים הן על ידי האינסולין והן על ידי חומצות האמינו אשר מתנקזים להשפעה משותפת על mTOR. המסלול המטבולי דרכו מדכאות חומצות האמינו היסטידין לאוצין ותריאונין את סינתיזת החלבונים ובכללם סינתיזת חלבוני החלב מודגם בתמונה 10. עיקרו תחרות עם השפעתן החיובית של חומצות האמינו מסועפות השרשרת על פעילות mTOR. יתכן ומעורבת בכך השפעה על Vps34, מולקולה השייכת לקבוצת class III PI3K. האפקט השלילי של חומצות האמינו על סינתיזת החלבונים אינו מערב את קומפלקס מספר 2 של mTOR, זאת לאור חוסר ההשפעה על זירחון Akt, אך מונע בדרך לא ברורה את מנגנון ההיזון החודר דרכו רמה נמוכה של S6K1 היתה אמורה דוקא לעודד את הפעילות האנאבולית של אינסולין דרך IRS-1. כך, שילוב של לאוצין, היסטידין ותראונין בריכוז גבוה גרם לירידה של 65% ביכולת סינתיזת החלבונים הכללית בתא, וזאת בניגוד להשפעה החלקית מאד (25%) שנקבעה לרפמיצין המעכב רק את מסלול ה class III PI3K. האפקט השלילי המשמעותי הזה של לאוצין, היסטידין ותראונין הודגם גם על סינתיזת חלבון החלב ביתא קזאין אשר דוכא באופן ניכר.

חשוב לציין כי ריכוזי חומצות האמינו שנבחנו בעבודה זו אינם חורגים מהסקלה המאפינת את ריכוזן בדם ובפלסמה של בקר ואדם ומעניקים משמעות פיזיולוגית לתוצאות עבודה זו. יתרה מכך, לאחר פירסום התוצאות הראשוניות מעבודתנו הקשורות אך ורק באפקט החיובי של חומצות אמינו מסועפות שרשרת, המחקר קיבל אספקט ישומי בכך שבחן *in vivo* על ידי קבוצה בארה"ב והתוצאות שפורסמו מראות על השפעה חיובית של חומצות ארוכות שרשרת ומתיונין על סינתיזת חלבוני חלב וכן גם על רמות נמוכות יותר של אוריאה בחלב. השפעתן של חומצות האמינו בעלות האפקט השלילי טרם נבחנה.