

התבטאות האנזים אמינופפטידאז N

ברקמת העטין של מעלי גירה

עבודת גמר

מוגשת לפקולטה למדעי החקלאות המזון והסביבה

האוניברסיטה העברית בירושלים

לשם קבלת תואר "מוסמך"

מאת

מירי כהן

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של :

ד"ר סמיר מבג'יש, המחלקה לבעלי חיים הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה,

האוניברסיטה העברית ירושלים.

ד"ר אבי שמאי, מנהל המחקר החקלאי- מכון וולקני, בית דגן.

הבעת תודה

ברצוני להביע את תודתי העצומה לדר' סמיר מבג'יש על הלימוד, הרעיונות, התמיכה העמרה וההנחיה באוירה של אימון מלא וחברות אמיתית.

לדר' אבי שמאי על הסבלנות הרבה, האוירה הנעימה וההדרכה בשיטות הביולוגיה המולקולרית לכל אורך הדרך.

תודה מיוחדת למר שאול זמבל שלא החסיר ממני דבר והשאיר דלת פתוחה ואזן קשבת לכל בקשה וצורך.

לדר' זהבה אוני ואורית גל- גרבר על ההדרכה בנושאי הביולוגיה המולקולרית, לפרופ' דוד סקלן ופרופ' עמי אריאלי על העזרה הטכנית, ולכל חבריי במחלקה, תודה על הכל.

להוריי היקרים, שעמדו לצידי לכל אורך הדרך.

## תוכן העניינים

6	1. מבוא
6	1.1 הקדמה
7	1.2 בלוטת החלב
7	1.2.1 שלבי התפתחות בלוטת החלב
8	1.2.2 יחידת הפרשה – הנאדית
9	1.3 אספקת דם לעטין
9	1.3.1 המערכת עורקית
9	1.3.2 המערכת הורידית
9	1.4 מרכיבי החלב
9	1.5 חלבוני החלב
10	1.6 ייצור החלב בבלוטה
11	1.8 ניצול פפטידים ע"י בלוטת החלב לצורך ייצור חלב
12	1.9 מקורות הפפטידים במחזור הדם
13	1.10 מנגנון קליטת פפטידים ברקמת העטין
13	1.11 אמינופפטידאזות
14	1.12 הנחות העבודה
14	1.13 מטרות המחקר
15	2. חומרים ושיטות
15	2.1 בעלי חיים בניסוי
15	2.1.1 מנות הזנה בניסוי
15	2.2 מהלך הניסוי
15	2.2.1 ניתוח העדים
16	2.3 ניסוי מקדים
17	2.4 אנליזה כימית לקביעת ריכוז ח' אמינו חופשיות וריכוז פפטידים:
17	2.4.1 סימון הדוגמאות
17	2.4.2 דה - פרוטאיניזציה
17	2.4.3 פילטרציה
18	2.4.4 הידרוליזה
18	2.5 הכנת שלפוחיות ממברנאליות מרקמת עטין
19	2.6 פעילות ביוכימית
19	2.6.1 קביעת פעילות אנזימטית של APN
19	2.7 אפיון הממברנות המבודדות באמצעות סמנים ממברנאליים
19	2.7.1 קביעת פעילות אנזימטית של ATPase
20	2.7.2 קביעת פעילות אנזימטית של Alkaline Phosphatase
20	קביעת פעילותו של האנזים AP נמדדה בעזרת קיט מתאים (Sigma)
20	2.8 הפקת RNA מרקמת העטין
21	2.9 תכנון פריימרים ל - Aminopeptidase
21	2.10 יצירת גלאים
22	2.10.1 מהלך ושלבי הריאקציה להגברת המקטע המבודד
22	2.10.2 בידוד מקטעי ה- cDNA:
23	2.11 Northern Blot
23	2.11.1 סימון גלאי ה- cDNA בנוקלאוטיד ודיואקטיבי

23	2.11.2 בדיקת קשירת dCTP המסומן ל-cDNA
24	2.11.3 ניקוי הגלאי מן הנוקלאטידים החופשיים
24	2.11.4 היברידיזציה
25	2.11.5 חשיפה
25	Western blot 2.12
25	Blocking 2.12.1
25	2.12.2 הוספת נוגדן ראשוני
26	2.12.3 הוספת נוגדן שניוני
27	3. תוצאות
27	3.1 תכנון פריימרים ל-PCR לצורך זיהוי התבטאות הגן ל APN ברקמת העטין
28	3.2 פרסום רצף הנוקלאוטידים של מקטע מהגן המקודד לאנזים APN
28	3.3 הכנת מפה אבולוציונית לקביעת מיקום הגן בעיזים, בהשוואה לבעלי חיים נוספים
29	3.4 בדיקת הומוולוגיה בין הרצף המבודד ובין רצפים נוספים של הגן המקודד ל- APN הקיימים בבנק הגנים
29	3.5 התבטאות הגן המקודד לאנזים APN ברקמת עטין מעלי גירה
29	3.6 התבטאות האנזים APN בשלפוחיות ממברנאליות מרקמת עטין עד
29	3.6.1 בדיקת Western Blot באמצעות נוגדן פוליקלונאלי בריכוזי חלבון משתנים
30	3.6.2 בדיקת Western Blot באמצעות נוגדן פוליקלונאלי בהשוואה לביקורת חיובית
31	3.6.3 בדיקת Western Blot באמצעות נוגדן מונוקלונאלי בהשוואה לביקורת חיובית
31	3.7 בדיקת פעילות אנזימטית של האנזים APN ברקמת העטין וחישוב ערכי $V_{max}$ ו- $K_m$
32	3.8 בדיקת פעילות אנזימטית של הסמנים הממברנאליים
32	3.8.1 בדיקת פעילות אנזימטית של Alkaline Phosphatase
33	3.8.2 בדיקת פעילות אנזימטית של ATPase
33	3.8.3 בדיקת פעילות אנזימטית של $\gamma$ -GT
34	3.9 ניסוי מקדים:
36	4. דיון
42	5. סיכום
43	6. REFERENCES
50	7. ABSTRACT

מאמצים רבים מושקעים בשנים האחרונות במטרה לייצר חלב בעל תכולת חלבון גבוהה. בנוסף לניסיונות לטפח גנטית פרות בעלות חלב עשיר בחלבון, נלמד הנושא גם על היבטיו התזונתיים, תוך שאיפה להגדיל את יעילות הפיכת החלבון והאנרגיה הניתנים במנה לייצור חלב ומרכיביו (Bequette et al., 2001; Hanigan et al., 2001).

יעילות המרת חלבון הנצרך במנת ההזנה לחלבון חלב הינה נמוכה יחסית ונעה בין 25-30% (Bequette et al., 1998). ניתן להגדיל את תכולת ותנובת חלבון החלב ע"י מתן תוספים חלבוניים במנת החולבות או ע"י עירוי ישיר של חלבונים וחומצות אמינו לתוך קיבת המיצים.

חומצות אמינו חופשיות (Free Amino Acid; FAA) הנמצאות בפלסמה נחשבות כמקור עיקרי למרכיבי מזון חיוניים (נוטריינטים) הנדרשים עבור סינתזת חלבון החלב (Wang et al., 1994). עם זאת, ישנן חומצות אמינו חיוניות המצויות בפלסמה בריכוזים שאינם תואמים את הריכוז המתקבל בחלב (Bickerstaffe et al., 1974, Clark et al., 1978). ניסויי מאזן שנעשו בין חומצות אמינו חופשיות הנקלטות ע"י העטין לאלו המופרשות בחלבון החלב, מהווים מדד אמין לקביעת צרכי העטין המייצר. תוצאות ניסויים מסוג זה הראו שקליטת חומצות אמינו חיוניות בצורתן החופשית ע"י העטין עולה בהרבה על המצאותן בחלבון החלב (Bequette et al., 1998). מאידך, מתוצאות ניסויים אחרים נראה שחומצות אמינו חיוניות נקלטות בצורתן החופשית ע"י העטין בכמות קטנה יחסית בהשוואה לכמותן המתקבלת בחלבון החלב (MacRae et al., 1988). מממצאים אלו עולה כי ישנם מקורות נוספים המספקים חומצות אמינו חופשיות לעטין לצרכי סנתזה של חלבון החלב (Bequette et al., 1998).

כיום ידוע שחלק מחומצות האמינו מתקיימות בדם כפפטידים המפונים מזרם הדם אל האיברים השונים, עובדה זו מרמזת על הפוטנציאל התזונתי הקיים בפפטידים אלו (DiRienzo, 1990, Koeln et al., 1993, McCormick and Webb, 1982, Seal and Parker, 1991).

## 1.2 בלוטת החלב

בלוטת החלב משמשת ביונקים כמכשיר להזנת הוולד ע"י ייצור חלב והפרשתו (Akers, 1994).

הבלוטה היא איבר מורכב הנשלט על ידי המערכת האנדוקרינית במהלך כל שלבי התפתחותו. עיקר

ההפרשה היא אקסוקרינית (הפרשה אקטיבית) (Anderson, 1985).

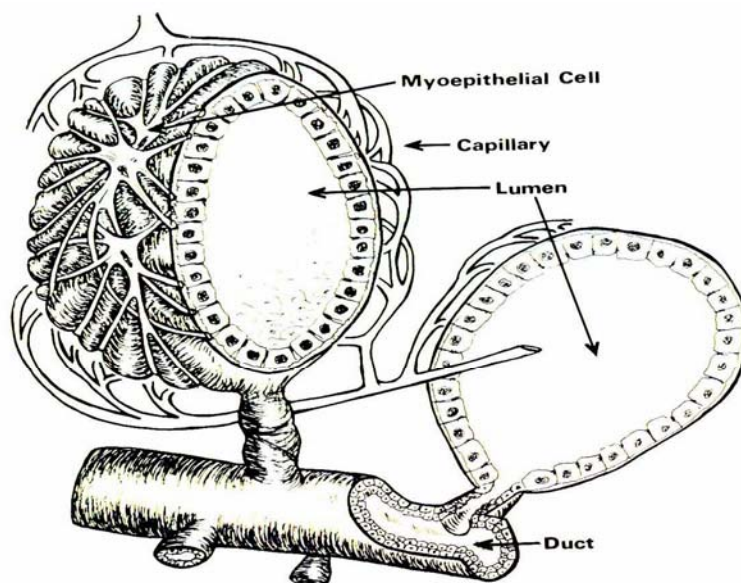


Fig. 4.1. Diagram of an alveolus surrounded by blood vessels and myoepithelial cells in the lactating mammary gland. Each alveolus contains a single layer of secretory (alveolar) cells that secrete milk into the interior lumen. Several alveoli in a group form a lobule. (Drawn by C. Andersen)

תמונה מס' 1 : הסתכלות פנימית על נאדית חלב.

### 1.2.1 שלבי התפתחות בלוטת החלב

ניתן לחלק את התפתחות בלוטת החלב ל- 4 שלבים מחזוריים (Heald, 1974):

שלב א – גדילה: מתחילה בשלב העוברי ונמשכת עד ההגעה לבגרות מינית. רקמת המזודרם עוברת אינווגניציה לרקמת האקטודרם ומתקבלים ניצני רקמת עטין בתום החודש השני להיריון. משני ניצנים אלו, יתפתחו מאוחר יותר, חלקה הקדמי והאחורי של הבלוטה. מרקמת הפרינכימה שמקורה באקטודרם מתמיינים תאי האפיתל המרכיבים את הנאדיות והתאים המרכיבים את צינורות החלב.

מרקמת הסטרומה שמקורה במזודרם מתמיינים תאי מיואפיתל, פיברובלסטים, תאי שומן, כלי דם, דפנות כלי לימפה, עצבים ורקמת התמך של העטין.

שלב ב – התמיינות: בסוף תקופת ההיריון, משגשים תאי האפיתל של רקמת העטין ומתמיינים לתאים מפרישים. במינים מסוימים נמשכת ההתמיינות גם לאחר ההמלטה.

שלב ג – לקטציה: בסמוך למועד ההמלטה מתחיל תהליך ייצור החלב. הפעילות התאית מופנית לטובת סנתזת חלב על חשבון גדילת התאים והתרבותם ולעיתים היא מופסקת לחלוטין.

שלב ד – התנוונות (involution): שלב הרגרסיה של התאים המפרישים, המסתיים באטרזיה של בלוטת החלב. תחילת שלב זה מתקיימת עם הפסקת ההנקה או החליבה.

### 1.2.2 יחידת ההפרשה – הנאדית

הרקמה המפרישה מורכבת ממערכת צינורות אוספים בעלי הסתעפויות מרובות. קצות סעיפי הצינורות הדקים מתרחבים לנאדיות (alveoli). כל נאדית (alveolus) מוקפת מבחוץ בממברנה בזאלית. בין הממברנה הבזאלית לנאדית מצויים כלי דם קפילריים ותאי מיואפיתל - תאי שריר. נמצא כי תאי המיואפיתל מתכווצים בהשפעת אוקסיטוצין ומסייעים בריקון החלב (Larson, 1985). פנימה לתאי המיואפיתל מצויים תאי אפיתל הנאדית שהם תאים מפרישים. תאים אילו נצמדים לתאים שכנים ויוצרים קומפלקס הממוקם סביב החלק האפיקלי של הבלוטה. דיאגרמה מספר 1 מתארת נאדית חלב המוקפת כלי דם ותאי מיואפיתל בבלוטת החלב. כל אלוואולה מכילה שכבה בודדת של תאים מפרישים, המפרישים חלב אל תוך הלומן (Anderson, 1985).

פרקורסורים שמקורם בזרם הדם נכנסים לתוך התאים דרך הממברנה הבזאלית והלטראלית והחלב עצמו מרוקן דרך הממברנה האפיקאלית אל תוך הלומן (Larson, 1985).

הנאדיות מאורגנות באוניות (lobules) המוקפות רקמת חיבור ומתכנסות אל צינורות אוספים, שהם למעשה נאדיות מוארכות, המנקזות חלב ממספר אוניות. מספר אוניות מאוגדות לאונה, המוקפת מחיצת רקמת חיבור עבה יותר. בין מחיצות רקמות החיבור עוברים צינורות אוספי חלב גדולים יותר המתכנסים לצינורות מאספים שמוצאם לתוך בריכת הבלוטה (Tucker, 2000).



### 1.3 אספקת דם לעטין

#### 1.3.1 המערכת עורקית

העטין מקבל את מרבית אספקת הדם העורקית מה – external pudic artery היוצא אל החלל האבדומינלי דרך תעלה אינגואינלית. הללו חודרים לעטין במיקום מדיאלי ודורסאלי לפטמות האחוריות ומשם שולחים שלוחות (right cranial mammary artery, right caudal mammary artery) אל החלק הקדמי והאחורי של העטין וכן אל בלוטות הלימפה הממוקמות מדיאלית וקאודלית אל מקום חדירת העורקים (Anderson, 1985). העורקים משני חצאי העטין מחוברים ביניהם על ידי אנסטמוזות המאפשרות זרימת דם עורקי מצד אל צד (Schmidt, 1971).

#### 1.3.2 המערכת הוריידית

הדם הורידי יוצא מהעטין בשתי זרכים אלטרנטיביות: 1. דרך ה- external pudic veins שמהלכו מקביל לעורק המתאים. 2. דרך ה- subcutaneous abdominal veins. האחרונים מקורם בחלק הקדמי של העטין מה- mammary vein והם נמשכים על פני הדופן האבדומינלית, חודרים דרך שרירי בית החזה ומתחברים אל ה- internal thoracic veins (Anderson, 1985). גם כאן קיימות אנסטמוזות רבות בין הוריידים משני חצאי העטין המאפשרות זרימת דם ורידי מצד אל צד (Schmidt, 1971).

### 1.4 מרכיבי החלב

בין מיני יונקים שונים קיימים הבדלים ניכרים בהרכב החלב (Collier, 1985). חלב פרה מסוג Holstein מכיל כ- 3.2% חלבון, 3.4% שומן ו 4.6% לקטוז. לעומת זאת, החלב המיוצר אצל נקבת אריה הים, מכיל 6.0% חלבון, 50% שומן ואינו מכיל סוכרים (Akers, 1994). חלק ניכר מההבדלים משקפים שינויים אבולוציוניים מושרים, שמטרתם להעניק לצאצאים את היכולת המקסימלית לשרוד.

### 1.5 חלבוני החלב

הרכבם של חלבוני החלב מושפע מקיומם של שני תהליכים עיקריים: 1. ביטוי הגנים המקודדים לחלבון החלב ב – Mammary Epithelial Cell (MEC). 2. מעבר של חלבוני פלסמה באופן אקטיבי דרך ה – MEC (הנתיב התוך תאי), או דרך צמתי מעבר בין תאים (Biosgard et al., 2001)

כמות החלבון בחלב משתנה בין מינים שונים, אך החלב מתאפיין בשתי קבוצות חלבונים עיקריות, קזאינים וחלבוני מי גבינה (Whey proteins). בנוסף, ניתן למצוא בחלב גם חלבוני סרום (אימיונוגלובולינים, אלבומין ואנזימים) וחלבונים ממברנאליים (Akers, 1994). בגלל אופיים ההידרופובי מסתדרים הקזאינים בחלב בצורת מיצלות המורכבות מארבעה טיפוסי קזאין עיקריים:  $\gamma$ - $\kappa$ - $\beta$ - $s2\alpha/s1\alpha$  המהווים 36, 38, 10, 13 ו-3% מכלל הקזאינים בהתאמה (Akers, 1994). ארבעת סוגי הקזאין המרכיבים את המיצלה יוצרים אינטרקציה ביניהם על ידי קשירת סידן מזוהן לשיריים האסטריים המזוהנים של כל מולקולה (Biosgard et al., 2001). המיצלות עשירות בחומצות אמינו ומכילות גם כמויות גדולות של סידן וזרחן (Jenness, 1985). כמות הקזאין בחלב הומני הינה כ-1% ואילו בחלב בקר 3%, למרות מספר זה של מיצלות בחלב, עקב קוטרן הקטן יותר של הראשונות (Jensen et al., 1995). כאשר בעל החיים נמצא במצב גופני תקין מהווים הקזאינים כ-82% מכלל החלבונים בחלב וחלבוני מי גבינה מהווים 18%. חלבוני מי הגבינה כוללים את ה- $\beta$ -lactoglobulins ו- $\alpha$ -lactoalbumins. כל החלבונים הספציפיים לחלב מסונתזים מחומצות אמינו המנותבות מזרם הדם, פנימה אל תאי האפיתל של הנאדיות המייצרות את החלב (Akers, 1994, Jenness, 1985).

## 1.6 ייצור החלב בבלוטה

במהלך התחלובה, עולה הפעילות המטאבולית בתוך בלוטת העטין כתוצאה מניתוב כמויות גדולות של חומצות אמינו ממחזור הדם אל הבלוטה, על מנת לספק את צרכי העטין המייצר (Backwell et al., 1998).

תאי האפיתל של רקמת העטין החלבני הם התאים הפעילים ביותר מבחינה מטאבולית בטבע. שילוב בין מטאבוליזם של רקמת העטין ובין מטאבוליזם של רקמות הפריפריה, הינה קריטית למניעת הפרעות מטאבוליות (Davis and Bauman, 1974).

כל חומצות האמינו החיוניות וחלק מחומצות האמינו הבלתי חיוניות הנדרשות עבור סנתזת חלבון חלב מגיעות מזרם הדם (Massey et al., 1998). הרטיקולום האנדופלסמטי (ER) הינו האתר לסנתזת חלבונים, טריגליצרידים, פוספוליפידים, דה-סאטורציה של חומצות שומן, ואסטרפיקציה של חומצות שומן לגליצרול. במיטוכונדריה מתקיימים מספר תהליכים כגון יצור ATP, יצור פרקורסורים לחומצות אמינו בלתי חיוניות, ויצור פרקורסורים לחומצות שומן. במערכת גולג'י מתרחשת סנתזת

לקטוז וגליקופרוטאינים, זרחון קזאין, ואריזת מולקולות  $K^+$ , מים, לקטוז וקזאין ואילו בציטוזול מתרחשת אקטיבציה של חומצות אמינו לפני סנתזת חלבונים (Collier, 1985).

### 1.7 גורמים המשפיעים על ביוסינתזה של חלבון החלב

תהליך ייצור החלב כולל אספקה סדירה של נוטריינטים ופרקורטורים ייחודיים למרכיבי החלב, המגיעים מזרם הדם. בהשוואה בין ריכוזי נוטריינטים בין זרם הדם הנכנס לעטין ובין זרם הדם היוצא מהעטין הוכח כי נוטריינטים מסוימים מועברים מזרם הדם לתאים, ומנוצלים לטובת תהליך ייצור החלב (Akers, 1994). ידוע כי אחד הגורמים המגבילים את כמות הפרקורטורים לחלבון החלב הנצרכת ע"י העטין, הינו קצב זרימת הדם לעטין (Collier, 1985). עליה בריכוזי סובסטרטים חיוניים כגון גלוקוז מפחיתה את קצב זרימת הדם לעטין, אולם לא משפיעה על יעילות ניצול הסובסטרט.

Bequette וחבריו (2000) הראו כי תאי רקמת עטין משתמשים במנגנון וויסות עצמי של זרם הדם המנותב לעטין בניסיון לפצות על הגבלה של חומצה אמינית בודדת. הגורמים המשפיעים על הצרת והרחבת כלי הדם של העטין טרם פוענחו במלואם. זרם הדם המנותב אל העטין מגיע אל הקפילרות העוטפות את הנאדיות, ומווסת בחלקו ע"י גורמים ואזואקטיביים מקומיים, ביניהם אצטיל כולין, היסטמין, אדנוזין ובראדיקינין. גורמים אלו מיוצרים בתגובה לשינויים תוך תאיים במטאבוליזם של רקמת העטין. טרם נבדקה מידת מעורבותם בשליטה על קצב זרימת הדם אל העטין (Prosser et al., 1996). התאים ברקמת העטין מסוגלים להגיב לשינויים תזונתיים הגורמים לשינוי בריכוז חומצות האמינו הקיימים בזרם הדם העורקי ע"י שינוי בפעילות טרנספורטרים לחומצות אמינו (Bequette et al., 2000).

### 1.8 ניצול פפטידים ע"י בלוטת החלב לצורך ייצור חלב

במחקרים שנעשו על המערכת העורקית-ורידיית של בלוטת החלב בפרות, הועלתה ההשערה שישנו מחסור בחומצות אמינו חיוניות לצורך סנתזה של חלבון החלב (Bickerstaffe et al., 1974; Metcalf et al., 1994; Guinard and Rulquin, 1994). נמצא כי חומצות אמינו חיוניות כמו פניל אלנין ותירוזין אשר אינן מסונתזות כלל בגוף בעל החיים, נמצאות בכמות גדולה יותר בחלבון החלב, מאשר במנת ההזנה הנצרכת באופן אקסוגני על ידי בעל החיים. מכאן, שקיים מקור תוספתי אנדוגני המספק

חומצות אמינו חיוניות אילו לעטין. ייתכן ומדובר בחלבונים שמקורם ברקמות שעברו דגורדציה בתהליכי פירוק חלבונים בתאים, או שחרור חלבונים מרקמות נושרות. (Shennan et al., 1997).

Backwell וחבריה (1994) הוכיחו כי רקמת העטין של עיזים חולבות יכולה לנצל די-פפטידים הניתנים באינפוזיה תוך ורידית לטובת סינתזת חלבון החלב. במחקר המשכי שביצעו בשנת 1996 הוכח כי עד 15% מכלל חומצות אמינו חיוניות הנקלטות ע"י העטין, נקלטות כפפטידים מזרם הדם העורקי. בניסוי In-Vitro שנערך בבלוטת החלב של עכברות הוכח כי בלוטת החלב מסוגלת לקלוט את חומצת האמינו ליזין ממקור של פפטידים קצרים במדיום ולנצלה לסנתזת חלבון החלב (Wang et al., 1996). כמו כן, הראו Wang וחבריו (1996) בסדרת ניסויים שערכו בתרביות תאים שנלקחו מעטין פרה כי חומצת האמינו מתיונין נקלטה ונוצלה לסנתזה של חלבוני החלב בתאים. שתי מערכות הניסוי שהוצגו לעיל מצביעות על היכולת לנצל מגוון של פפטידים קצרים כסובסטרט לחומצות אמינו עבור סינתזה של חלבונים על ידי רקמת העטין באופן יעיל באותה מידה כמו ניצול אותן חומצות אמינו במצבן החופשי.

### 1.9 מקורות הפפטידים במחזור הדם

חלקם היחסי של פפטידים מכלל חומצות האמינו הקיימות במחזור הדם נקבע לראשונה בפלטמת עגלים (McCormick and Webb, 1982). היחס בין ריכוז חומצות אמינו חופשיות ופפטידים במחקר זה עמד על 1 : 3.7 בהתאמה (Webb and Matthews, 1998). נשאלה השאלה מהו מקור הפפטידים ?

קצב שחלוף פפטידים וחומצות אמינו חופשיות נמדדו באופן כמותי בכלי הדם (PDV- Portal Drained Viscera) המנקזים דם ממערכת העיכול, הטחול והלב. כ- 79% מכלל חומצות האמינו שנמצאו בזרם הדם, במדידת קצב השחלוף לאורך ה-PDV היו פפטידים (DiRienzo, 1990).

קצב השחלוף (flux) של חומצות אמינו וריכוז פפטידים בעורק המזנטרי (MD) ובעורק הלא-מזנטרי (NMD) נמדדו בצינוורות העיכול של עגלים וכבשים. קצב השחלוף בעורק המזנטרי לא השתנה. בעורק הלא מזנטרי נתקבל קצב שחלוף מינימלי של חומצות אמינו חופשיות ואילו לגבי הפפטידים נמדד קצב שחלוף גבוה, שהיווה כ- 77% מסך כל השחלוף של פפטידים וחומצות אמינו לאורך ה-PDV (DiRienzo, 1990). לא ניתן לקבוע כי המקור לאותם פפטידים וחומצות אמינו הינו במנה הנצרכת בלבד. ריכוז הפפטידים וחומצות האמינו לאורך ה-NMD ייתכן ומקורו בחלבונים שנספגו מהלומן של

צינור העיכול, מחלבונים שמקורם ברקמות שעברו דגדגציה בתהליכי פירוק חלבונים בתאים, שחרור חלבונים מרקמות נושרות, או שילוב של מקרים אילו. התוצאות המתקבלות, מרמזות על כך שכל ארבע הקיבות במעלי גירה, ו/או התריסריון תורמים כמויות גדולות של חומצות אמינו ממקור של פפטידים למערכת הדם הפורטלית (Webb and Mathews, 1998).

### 1.10 מנגנון קליטת פפטידים ברקמת העטין

לאחרונה הוכח כי קיימים ביונקים נשאים של פפטידים ברקמות כמו אפיתל המעי הדק בחולדות (Takashi et al., 2000) ואפיתל הכליה בחזירים (Fei et al, 1994; Liang et al., 1995; ) (Miymoto et al., 1996). אותם נשאים חולקו לשתי קבוצות עיקריות: PepT-1 המתבטא בעיקר במעי הדק ו PepT-2 המתבטא בעיקר בכליה (Fei et al., 1994; Saito et al., 1995; Meredith and Boyd ) (1995).

במחקר שמטרתו בדיקת התבטאות נשאים לפפטידים ברקמות שונות במעלי גירה, הוכח כי הגן המקודד ל- PepT-1 אינו מתבטא ברקמת העטין של פרות חלב וכבשים (Chen et al; 1999). Wang וחובריו (1996) הראו כי לא קיים ביטוי לגן המקודד לנשאים של פפטידים על גבי העטין. כפי הנראה, בהיעדר נשאים מתאימים על גבי ממברנות תאי העטין, קיימים מנגנונים חלופיים לכניסת פפטידים קצרים אל תוך התאים.

### 1.11 אמינופפטידאזות

הפפטידאזות ככלל הינם קבוצה הטרוגנית של אנזימים הפועלת על מיגוון רחב של סובסטרטים (Kenny and Maroux, 1982). אמינופפטידאזות: אנזימים השייכים למשפחת האקסו-פפטידאזות (מפרקי ח' אמינו מהקצוות) וכוללים:

1. אנזימים החותכים פפטידים מהקצה ה- N טרמינלי של שרשראות פולי פפטידיות (Sanderink et al., 1988).

2. אנזימים ספציפיים לסובסטרטים די פפטידיים וטרי פפטידיים (Sanderink et al. 1988).

3. אנזימים החותכים די פפטידים מהקצה ה- C טרמינלי של החלבון (Maroux et al. 1973; Feracci ) (and Maroux 1980).

אחד האנזימים השכיחים בקבוצת הפפטידאזות הינו האנזים אמינופפטידאז (APN N). זהו גליקופרוטאין המעוגן אל ממברנת התא ושייך למשפחת ה- metallopeptidases, חלבונים המכילים אטום מתכת עבור כל תת יחידה של חלבון. באמינופפטידאז N יון המתכת הוא אבק  $Zn^{+2}$  (Lekhy et al., 1973). אנזים שכיח נוסף הינו אמינופפטידאז A אשר מכיל יון סידן  $Ca^{+2}$  בתת היחידות של החלבון (Stewart and Kenny, 1984).

### 1.12 הנחות העבודה

פפטידים הקיימים בזרם הדם מנותבים אל רקמת העטין ועוברים הידרוליזה על גבי ממברנות התאים לחומצות אמינו חופשיות אותם לחומצות אמינו חופשיות המועברות פנימה אל תאי האפיתל המפרישים. מכאן שקיימת הידרוליזה ברמה הקפילרית. האנזים אמינופפטידאז (AP) שייך למשפחת האקסופפטידאזות, אשר לה תפקיד חשוב בתהליכי העברת מסרים, (signal transduction) ותקשורת בין תאית (Hafkenschied, 1987). עד כה בודדו מספר סוגים של אנזים זה ביניהם אמינופפטידאז N, A, B, P ו-W ממספר רקמות בגוף כמו כבד וכליה של חולדה (Kirshchke et al., 1976; Watt and Cecil, 1989), ריאות של ארנב (Singh and Kalnitsky, 1980) שרידי שלד (Rhyu et al., 1992) ומעי דק בעופות (Gal-Garber and Uni 1998). הנחת העבודה הינה כי האנזים אמינופפטידאז ממוקם בצידה הבזאלי של ממברנת תאי האפיתל, ומהווה אחד מהמנגנונים התורמים לקליטת פפטידים אל תוך העטין.

### 1.13 מטרת המחקר:

1. בידוד סמן מולקולרי שימש כגלאי להתבטאות הגן המקודד לאנזים APN ברקמת העטין של מעלי גירה.
2. הבנת תהליכי התבטאות ופעילות הגן של אנזים זה בתהליכי סנתזת חלבון החלב.
3. בדיקת השפעת ריכוז פפטידים בזרם הדם העורקי על התבטאות APN

## 2. חומרים ושיטות

### 2.1 בעלי חיים בניסוי

עיזים חולבות מסוג "זאנן" הנמצאות באמצע תקופת הלקטציה שימשו לצורך הניסוי. העיזים הוחזקו בדיר הפקולטה לחקלאות תחת משטר הזנה מתאים ותנאי סביבה מבוקרים אשר אושרו ע"י ועדת האתיקה לניסויים בבעלי-חיים של האוניברסיטה העברית.

#### 2.1.1 מנות הזנה בניסוי

מנות ההזנה בניסוי תוכננו לפי צרכי קיום וייצור של העיזים (עפי טבלאות AFRC 1993). המנות סיפקו את צרכי האנרגיה המטבולית ו- 80% מצרכי החלבון המטבולי. 20% נותרים של צרכי החלבון המטבולי הושלמו ע"י עירוי לתוך קיבת המיצים, של תמיסות המכילות הידרוליזטים חומציים של קזאין (Casein Acid Hydrolysate – Sigma no. A-2427).

מנות ההזנה כללו תערובת + שחת אפונה קצוצה. האבסת המזון נעשתה באמצעות מאביס אוטומטי וחולקה ל-12 מנות שסופקו מדי שעתיים במהלך היממה. כמות הקזאין שעברה אינפוזיה אל תוך קיבת המיצים הותאמה לכמות המזון הכללית שסופקה לעז. צריכת המזון נקבעה מדי יום לפי 10% שאריות מכלל המנה היומית.

## 2.2 מהלך הניסוי

### 2.2.1 ניתוח העזים

העיזים נותחו להשתלת קאנולה בקיבת המיצים (Abomasum), אשר דרכה בוצע עירוי של התמיסה המכילה הידרוליזאטים של קזאין.

ניתוח נוסף בוצע באזור הצוואר לצורך הרמת העורק הקארוטי (Carotic artery) לאזור התת עורי על מנת לאסוף דם עורקי בשלבים שונים של הניסוי תוך כדי החדרת קטטר לעורק. כל הניתוחים בעזים בוצעו בהרדמה מלאה בהתאם להנחיות ועדת האתיקה.

### 2.3 ניסוי מקדים

קביעת ריכוזי FAA ו-PBAA בזרם הדם העורקי של עיזים באמצע לקטציה כתוצאה מאינפוזיה

של  $H_2O$  או קזאין אל תוך האבומאזום.

הניסוי נערך בעז חולבת מתוך כלל העיזים המנותחות ומטרתו הייתה לבדוק את השינוי בריכוז

פפטידים לעומת השינוי בריכוז חומצות אמינו חופשיות בפלסמה כתוצאה מעירוי קיבתי של

הידרוליזאט של קזאין בשתי רמות (Casein Acid Hydrolysate – Sigma no. A-2427).

העז הועלתה על כלוב מטבולי למשך 21 ימי אדפטציה במהלכם נחלבה פעמיים ביום: בשעות

הבוקר (08:00) ובשעות אחרה"צ (15:00).

הניסוי בוצע בשלושה שלבים עיקריים באופן הבא :

שבוע ראשון – 500 גרם מים עורו באמצעות משאבה פריסטלטית ( Minipuls 2, Gilson, )

(Villieres le Bel 95400) ישירות לתוך האבומאזום במשך 24 שעות ביממה בקצב של 18-20 גרם/שעה.

שבוע שני – 500 גרם מים המכילים כמות משתנה של הידרוליזאט קזאין עורו באמצעות

משאבה פריסטלטית (Minipuls 2, Gilson, Villieres le Bel, 95400) ישירות לתוך האבומאזום במשך

24 שעות ביממה בקצב של 20 גרם/שעה. כמות ההידרוליזאט של קזאין חושבה על סמך צריכת המזון

היומית כפרקציה מסך כל החלבון המטאבולי.

שבוע שלישי – 500 גרם מים המכילים כמות כפולה (בהשוואה לשבוע שני) של הידרוליזאט

של קזאין עורו באמצעות משאבה פריסטלטית (Minipuls 2, Gilson, Villieres le Bel, 95400) ישירות

לתוך האבומאזום במשך 24 שעות ביממה בקצב של 20 גרם תמיסה/שעה.

בתום תקופת האינפוזיה נאספו דגימות דם מהעורק הקרוטי, 3-4 פעמים במהלך היממה ע"מ

לקבוע ריכוז חומצות אמינו חופשיות בפלסמה ( Free Amino Acid; FAA ) ואת ריכוז ה- Peptide

Bound Amino Acid (PB-AA). הדגימות נשמרו בטמפ' של  $4^{\circ}C$  עד גמר האיסוף ולאחר מכן סורכזו

במשך 15 דקות במהירות של Xg3000 לצורך הפקת פלסמה. הפלסמה נשמרה ב  $-20^{\circ}C$  עד לביצוע

האנליזה.



## 2.4 אנליזה כימית לקביעת ריכוז ח' אמינו חופשיות וריכוז פפטידים:

דוגמאות הפלסמה הופשרו ע"ג קרח ואוחדו לפי נפח (מכל דוגמה נלקח נפח זהה) ל – 3

מבחנות שמוספרו באופן הבא :

1 – שבוע ראשון לניסוי

2 – שבוע שני לניסוי

3 – שבוע שלישי לניסוי

לצורך איחוד הדוגמאות נלקח נפח דומה מכל מבחנה – 200µl פלסמה.

### 2.4.1 סימון הדוגמאות במרקר פנימי (internal standard)

לכל מבחנה הוסף 100mM L-Methionine sulfone אשר שימש כמרקר פנימי של חומצות

האמינו שבדוגמאות.

### 2.4.2 דה – פרוטאיניזציה

בשלב הבא בוצעה דה-פרוטאיניזציה ע"מ להשקיע פפטידים וחלבונים גדולים ע"י

הוספת 100µl sulfosalicylic acid בריכוז של 40% לכל 1 ml פלסמה.

הדוגמאות עברו וורטקס ולאחר מכן הודגרו כ – 15 דקות בטמפ' החדר. בשלב הבא בוצע

סרכוז במהירות של  $10000 \times g$  במשך 10 דקות בטמפ' של  $4^{\circ}C$ . מתוך התרחיף המתקבל נלקחו 500µl +

500µl בופר הרצה Li-S .

### 2.4.3 פילטרציה

פילטרציה להפרדת פפטידים בוצעה עם Millipore 3000Mr cut off filters (תוצרת

Corporation Bedford, MA 01730 U.S.A) במהירות של  $5000 \times g$  למשך 3 שעות בטמפ' של

$4^{\circ}C$ . התסנין המתקבל נאסף וחולק לשניים. בחלק אחד נבדק ריכוז FAA ו PB-AA אחרי הידרוליזה.

#### 2.4.4 הידרוליזה

הידרוליזה של התסנין נעשתה עם 6N HCl ב-  $115^{\circ}\text{C}$  למשך 24 שעות:  $100\mu\text{l}$  חומצה הוספו ל-  $400\mu\text{l}$  דוגמה. הדוגמאות ייובשו ב- speed vac ולאחר מכן הורחפו הפלטים שהתקבלו ב-  $400\mu\text{l}$  בופר הרצה Li-S.

כל הדוגמאות נשלחו למחלקת ציוד בין מחלקתי של האוניברסיטה העברית לשם ביצוע אנליזה של ריכוז חומצות אמינו חופשיות (FAA) באמצעות קולונת HPLC.

#### 2.5 הכנת שלפוחיות ממברנאליות מרקמת עטין

רקמת עטין קפואה שנלקחה בביופטיה מעיזים באמצע לקטציה נשקלה לתוך מבחנה של 15 ml. לרקמה הקפואה הוסף בופר A ( $12.5\text{Mm-NaCl}/2.0\text{ mM Tris/HCl}$ , pH=8) ביחס של 10% (w/v). הרקמה עברה הומוגניזציה בעזרת אולטרה-טורקס ולאחר מכן סורכזה במשך 10 דקות במהירות של 500  $\times g$ . התרחיף (S1) הועבר למבחנה חדשה וסורכז במהירות של  $10000 \times g$  במשך 20 דקות. המשקע (P2) הורחף ב-  $20\text{ ml}$  בופר B ( $100\text{mM-mannitol}/2.0\text{mM Hepes/Tris}$ , pH=7.1) ועבר הומוגניזציה בפוליטרון. אל המבחנה הוספו  $128\mu\text{l}$  של תמיסה D ( $2.5\text{M-MgCl}_2$ ). התמיסה הועברה לכוס כימית והוספו לה  $20\text{ ml}$  של בופר B. בתום 20 דקות באמבט קרח, סורכזה התמיסה במהירות של  $2000 \times g$  במשך 10 דקות. הנוזל העליון (S3) הועבר למבחנה חדשה וסורכז במשך 30 דקות במהירות של 30000  $\times g$ . בשלב האחרון הורחף המשקע (P4) בבופר C ( $300\text{mM mannitol}$ ,  $20\text{Mm-Hepes/Tris}$ , pH=7.4, )  $0.1\text{Mm-MgSO}_4$ , 0.02% (W/V)  $\text{NaN}_3$ .

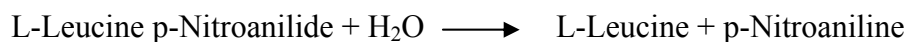
ההרחפה נעשתה ב-  $400\mu\text{l}$  בופר C. בעזרת בדיקת lowery לקביעת ריכוז חלבון נקבע ריכוז חלבון של  $0.9\text{mg/ml}$ . השלפוחיות הממברנליות הוקפאו בחנקן נוזלי ונשמרו ב-  $-80^{\circ}\text{C}$ . (השלפוחיות הממברנאליות הופקו על פי פרוטוקול העבודה של Vayro וחובריו משנת 1992).

## 2.6 פעילות ביוכימית

### 2.6.1 קביעת פעילות אנזימטית של APN

פעילות האנזים AP נמדדה בעזרת קיט מסחרי של חברת Sigma לבדיקת פעילות אנזימטית: Enzymatic Assay of Leucine Aminopeptidase. עיקרון הריאקציה: הידרוליזה של L-Leucine p-Nitroanilide חסר צבע, ע"י האנזים AP מניבה L-Leucine + p-Nitroaniline בעל צבע צהוב.

#### הראקציה:



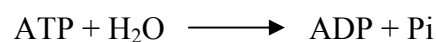
מתבצעת בנוכחות האנזים

LAP= Leucine Aminopeptidase L-Leucine p-Nitroanilide הינו חומר חסר צבע וכאשר מתקבלים התוצרים L-Leucine + p-Nitroaniline משתחרר צבע צהוב אשר עוצמתו נקראת בספקטרופוטומטר באורך גל של 405nm. לצורך חישוב ממדי הקנטיקה של האנזים נבדקה פעילותו בריכוזי סובסטרט הולכים ועולים שנעו בין 15mM-200mM ונקבעו ערכי Km (קבוע הריאקציה), וערכי Vmax (מהירות הריאקציה).

## 2.7 אפיון הממברנות המבודדות באמצעות סמנים ממברנאליים

### 2.7.1 קביעת פעילות אנזימטית של ATPase

קביעת פעילותו של האנזים ATPase נמדדה בעזרת קיט מתאים (Sigma No. A-7510). עיקרון הריאקציה: הידרוליזה של ATP חסר צבע, מניבה ADP+Pi בעל צבע כחול.



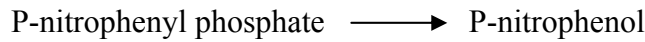
עוצמת הצבע נקראת בספקטרופוטומטר, באורך גל של 660nm בהשוואה לביקורת של ריאגנט צבע ללא אנזים. על מנת לקבוע את פעילות האנזים, נלקחו 20µl של הומוגנט, 100µl בופר ריאקציה ו 100µl תמיסת סובסטרט. זמן הריאקציה היה 5 דקות ב 37°C.

## 2.7.2 קביעת פעילות אנזימטית של Alkaline Phosphatase

קביעת פעילותו של האנזים AP נמדדה בעזרת קיט מתאים (Sigma)

עיקרון הריאקציה: ההידרוליזה של P-nitrophenyl phosphate חסר צבע, מניבה P-nitrophenol

בעל צבע צהוב.



עוצמת הצבע נקראת בספקטרופוטומטר באורך גל של 410nm בהשוואה לביקורת של ראגנט צבע ללא אנזים. על מנת לקבוע את פעילות האנזים, נלקחו 20µl של הומוגנט, 100µl בופר ריאקציה ו 100µl תמיסת סובסטרט. זמן הריאקציה היה 5 דקות ב 37°C. עצירת הריאקציה נעשתה ע"י הוספת 2ml מהחומר NaOH בריכוז 0.05M.

## 2.8 הפקת RNA מרקמת העטין

הפקת RNA נעשתה באמצעות Tri – reagent מחברת (Molecular Reaserch Center INC) אשר מתבסס על שיטתו של Chomczynski (1993). 200mg רקמת עטין הוכנסו למבחנת פלסטיק סטרילית שהכילה 2ml תמיסת Tri – reagent. התערובת נטחנה ב – Ultra Turex במהירות של 2000 סיבובים לדקה בטמפ' של 4°C והונחה להדגרה של 5 דקות בטמפ' החדר. לתמיסה שנתקבלה הוסף כלורופורם (בכמות של 0.2ml כלורופורם על כל 1ml של TRI – reagent) והתמיסה הודגרה 10 דקות בטמפ' החדר. בשלב הבא סורכזו הדוגמאות במהירות של 10000 × g למשך 15 דקות בטמפ' של 4°C. השכבה העליונה, (שהכילה את חומצות הגרעין), הועברה בתום הסרכוז לתוך מבחנת 13ml חדשה והוסף לה 1ml איזופרופנול ע"מ להשקיע את ה – RNA. הדוגמה הודגרה במשך 10 דקות בטמפ' החדר וסורכזה שוב במהירות של 8000 × g בטמפ' של 4°C. הפלט המתקבל נשטף בתמיסת אתנול 75% ולאחר מכן יובש והומס במים שעברו טיפול ב- 100µl Diethyl Pyrocarbonate (DEPC).

קביעת ריכוז RNA : בליעה אופטית (O.D) של הדגימות נקבעה באורך גל של 260nm. דרגת

הניקיון נקבעה בהתאם ליחס בליעה של 260/280 nm (Kontron Industries CM 8010 Uvikom 810) (Zurich, switzerland).

ריכוז ה – RNA בכל אחת מהדוגמאות נקבע באמצעות הנוסחא:

$$\text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{O.D}_{260} \times 40 \times \text{sample concentration}$$

$$1 \text{ O.D} = 40 \mu\text{g RNA/ml} : \text{מאחר ו}$$

לאחר ההפקה נשמר ה - RNA מומס ב - DEPC בטמפר' של  $-80^{\circ}\text{C}$  .

## 2.9 תכנון פריימרים ל - Aminopeptidase

ע"י השוואת רצפים שונים של הגן לאמינופפטידאז ממקורות שונים: כליה של עכבר (GeneBank / EMBL M25073), תאי מסט בעכבר (GeneBank / EMBL U77083), מעי של ארנב (GeneBank / EMBL X51508), מעי של אדם (GeneBank / EMBL X13276) וכליה של חולדה (GeneBank / EMBL M25073), נקבעו האיזורים השמורים בגן ומתוכם סונתזו שישה פריימרים (-Gal (Garber and Uni, 2000).

להלן הפריימרים שסונתזו :

pri.30 (forward)	5' TGGCGGGCTTCTACCGCAGCGAG-3'
pri.23 (forward)	5' CTGGGGACTGGTGACCTACCGGG-3'
pri. 23 (reversed)	5' CCCGGTAGGTCACCAGTCCCCAG-3'
pri.25 (forward)	5' CGCTGGACCCTCGAGATGGGCTT-3'
pri.25 (reversed)	5' AAGCCCATCTCGAGGGTCCAGCG-3'
pri.33 (reversed)	5' TTGGAGCAGGCGGTGCTGATGGC-3'

באמצעות הפריימרים, בוצעו מספר ריאקציות RT-PCR שמטרתן לבדוק האם קיימת התבטאות של הגן לאמינופפטידאז ברקמת עטין עז.

## 2.10 יצירת גלאים

שיטת ה - Polymerase Chain Reaction (PCR) – מאפשרת ריבוי של מקטעי cDNA ייחודיים תוך שימוש בפריימרים ספציפיים. RT – PCR מאפשר שימוש ב - RNA כבסיס תבנית (template), ליצירת cDNA .

ריאקציות ה- RT – PCR – בוצעו בעזרת קיט Access RT-PCR Reverse transcriptase של

חברת Promega לפי פרוטוקול היצרן, תוך שימוש בפריימרים שהוצגו קודם לכן.

בודד מקטע cDNA שגודלו 531bp אשר שימש כגלאי להתבטאות האנזים אמינופפטידאז

ברקמת העטין של עיזים.

### 2.10.1 מהלך ושלבי הריאקציה להגברת המקטע המבודד

1. 45 דקות ב-  $48^{\circ}\text{C}$ . בשלב זה הופך ה- RNA ל- cDNA.
2. 2 דקות ב-  $94^{\circ}\text{C}$ . בשלב זה נהרס האנזים (Reverse Transcriptase) RT.
3. 30 שניות ב-  $94^{\circ}\text{C}$ . זה נטורציה של הגדילים.
4. 1 דקה ב-  $60^{\circ}\text{C}$ . קשירת הפריימרים אל מקטעי ה- cDNA (annealing).
5. 2 דקות ב-  $78^{\circ}\text{C}$ . שלב התארכות הפריימרים.
6. 30 cycles של שלבים 3-5.
7. 7 דקות ב-  $8^{\circ}\text{C}$ . השלמת התארכות סופית.
8. שמירה ב-  $4^{\circ}\text{C}$ .

תוצרי ה- RT-PCR הופרדו באמצעות אלקטרופורזה על גבי ג'ל אגרוז שריכוזו 1%. ההרצה

בוצעה עם בופר הרצה Tris Acetate (TAE<sub>x1</sub>) במתח של 90 volt. הג'ל נצבע באמצעות Ethidium

Bromide (EtBr) שהוסף לג'ל בריכוז סופי של 0.3  $\mu\text{g/ml}$ . גודלו של מקטע ה- cDNA נקבע תוך

שימוש בסמן לגודל – DNA ladder 100 bp (Promega).

### 2.10.2 בידוד מקטעי ה-cDNA

בידודם של מקטעי ה-cDNA מהג'ל נעשה עם ערכת High Pure™ PCR Product Purification Kit של

חברת Boehringer Mannheim בהתאם להוראות היצרן.

יעילות המיצועי נבדקה ע"י הרצת 5  $\mu\text{l}$  של החומר הממוצה על גבי ג'ל אגרוז והריכוז נקבע על

סמך השוואה לסמן של bp100 (Promega).

המקטעים נשלחו ל- sequencing ביחידת הריצוף במכון ויצמן ולאחר שנבדקה הומוולוגיה לרצפים שמורים אחרים ב- Gene Bank, סומן המקטע הרלוונטי כגלאי עבור היברידיזציה ב-Northern blot.

### Northern Blot 2.11

30  $\mu\text{g}$  RNA שהופק מרקמת עטין של עיזים בלקטציה הורצו על גבי ג'ל אגרוז בריכוז 1.5% והועברו לממברנת ניילון - Hybond-N (חברת Amersham Pharmacia Biotech) בהתאם להוראות היצרן. קיבוע של ה-RNA לממברנה נעשה באמצעות חשיפה בת שתי דקות ל-U.V. איכות העברת ה-RNA לממברנה ומיקום פסי ה-RNA הריבוזומלי, 18S ו-28S נבדקו באמצעות טלטול הממברנה בחומצה אצטית 5% במשך כ-15 דקות וצביעתה בתמיסת methylene blue. בתום השטיפה צולמה הממברנה.

#### 2.11.1 סימון גלאי ה-cDNA בנוקלאוטיד רדיואקטיבי

לצורך בדיקת התבטאות האמינופפטידוזות ברקמת העטין סומנו הגלאים שבודדו בשיטת ה-RT-PCR. סימון הגלאים נעשה בשיטת Random Prime (Feinberg and Vogelstein 1984), תוך שימוש בערכה מסחרית (DNA Labling mix Beit haemek) בהתאם להוראות היצרן. 25ng cDNA, נמהלו במים עד לנפח של 11  $\mu\text{l}$  והורתחו 5 דקות על מנת להפריד את גדילי ה-cDNA וקוררה מיד בקרח למניעת הצמדות הגדילים. לתמיסה שהתקבלה הוספו: 4  $\mu\text{l}$  מערכת הסימון ו-5  $\mu\text{l}$  של ( $\text{Alpha}^{32}\text{P}$ ) dCTP.

התערובת שנתקבלה עברה אינקובציה של 20 דקות בטמפ' של  $37^{\circ}\text{C}$ . בתום פרק זמן זה, נבדקה רמת אינקורפורציה של ( $\text{Alpha}^{32}\text{P}$ ) dCTP.

#### 2.11.2 בדיקת קשירת dCTP המסומן ל-cDNA

1  $\mu\text{l}$  דגימה מתמיסת הריאקציה הוספג על גבי דסקית נייר סינון Whatman 3mm (תמר, ישראל) ונמנתה במונה  $\beta$  (Tri - Card 1600 CA). לאחר שטיפה בתמיסת TCA 5% וב-10% TCA, סולקו

הנוקלאוטידים החופשיים. הדסקית נמנתה שוב באותם התנאים. תוצאות המדידות נקבעו ביחידות CPM (Counts Per Minute) ועל סמך היחס המתקבל בין שתי המדידות נקבעה רמת אינקורפורציה (רמת קשירה) של החומר המסומן רדיואקטיבית אל ה-cDNA. נעשה שימוש רק בדוגמאות שהציגו רמת קשירה של 50% לפחות.

### 2.11.3 ניקוי הגלאי מן הנוקלאוטידים החופשיים

הפרדת הגלאי המסומן מן הנוקלאוטידים החופשיים בוצעה על גבי קולונת Sephadex G50 המכילה בופר Tris EDTA (TE<sub>x</sub>1). בשלב ראשון סורכזה הקולונה במשך 5 דקות במהירות של  $2000 \times g$  להוצאת עודפי הנוזלים. בשלב השני הוטען הגלאי כשהוא מהול ב  $200 \mu\text{l}$  מים וסורכז 5 דקות במהירות של  $2300 \times g$ . בתנאים אלו מופרד הגלאי מן הקולונה ואילו הנוקלאוטידים החופשיים נשארים בה.

### 2.11.4 היברידיזציה

ממברנת ה-RNA עברה פרה-היברידיזציה בתמיסת היברידיזציה וטולטלה באיטיות בטמפ' של  $42^{\circ}\text{C}$  למשך כ-4 שעות. לקראת סיום שלב הפרה-היברידיזציה הורתחה תמיסת הגלאי המסומן במשך 5 דקות על מנת להפריד את גדילי ה-cDNA ומיד קוררה בקרח. תמיסת הגלאי המקוררת הוכנסה לתמיסת היברידיזציה טריה. ההיברידיזציה נמשכה כ-18 שעות בתנאים זהים לתנאי הפרה-היברידיזציה. עם תום התהליך נשטפה הממברנה בתמיסות הבאות:

10% SDS-Sodium Dodecyl Sulfate וריכוזים הולכים ויורדים של SSC המכיל NaCl +

Sodium Citrate .

סדר השטיפות בוצע כדלקמן:

פעמיים ב- 1% SDS + 2xSSC כ-15 דקות בטמפ' של  $42^{\circ}\text{C}$ .

פעמיים ב- 1% SDS + 1xSSC כ-15 דקות בטמפ' של  $50^{\circ}\text{C}$ .

פעמיים ב- 1% SDS + 0.1xSSC כ-15 דקות בטמפ' של  $60^{\circ}\text{C}$ .

(השטיפות נעשו בהתאם להוראות היצרן של הממברנה, בתנור היברידיזציה תוצרת חברת

(Amersham).



### 2.11.5 חשיפה

לאחר השטיפה האחרונה, נעטפה הממברנה בניילון נצמד ונחשפה לפילם (X-ray Agfa-) בטמפר' של  $-80^{\circ}\text{C}$  בתוספת מסכים מגבירים. פרק זמן החשיפה נע בין מספר שעות למספר ימים. בדיקות חלבון קביעת ריכוז חלבון בשיטת Lowery:

הבדיקה נעשתה בעזרת קיט לקביעת ריכוז חלבון מתוצרת חברת Bio-Rad בהתאם להוראות היצרן.

### Western blot 2.12

דוגמאות החלבון על ריכוזיהן השונים נמהלו טרם ההרצה ביחס של 1:1 עם sample buffer (המכיל חומר צבע + בתא מרקפטו אתנול). הדוגמאות הורתחו למשך 10 דקות ב- $100^{\circ}\text{C}$  ועם סיום ההרתחה הועברו מיד לקרח.

הדוגמאות הורצו על גבי ג'ל אקריל אמיד בריכוז של 7.5% למשך 4 שעות במתח של 80v. לשם קביעת גודלם של החלבונים המתקבלים, השתמשנו במרקר לגודל חלבון (תוצרת חברת Bio-Rad מס. קטלוג 161-0372). בגמר ההרצה על הג'ל בוצע טרנספר על גבי ממברנת ניטרוצלולוז למשך 18 שעות. לצורך בדיקת איכות העברה לממברנה היא נצבעה בריאגנט צבעוני ponceau (תוצרת Sigma) אשר צובע באדום את כל החלבונים שעל גבי הממברנה.

### Blocking 2.12.1

מטרתו לחסום התבטאות חלבונים לא ספציפיים. טלטול הממברנה במשך כל היום בתמיסת \*1 TBST + 3% BSA.

### 2.12.2 הוספת נוגדן ראשוני

השתמשנו בנוגדן goat anti CD 13 (Aminopeptidase N), נוגדן פוליקלונאלי (תוצרת חברת Santa Cruz) במיחול עבודה של 1:50.

100µl של נוגדן נמהלו בנפח סופי של 5ml תמיסה שהכילה :

TBST × 1

3% BSA (Bovine Serum)

הממברנה טולטלה בתוך התמיסה במשך 18 שעות.

### 2.12.3 הוספת נוגדן שניוני

בתום 4 שטיפות בנות 15 דקות כל אחת עם 1x TBS-T, הוסף לממברנה נוגדן שניוני

Peroxidase-conjugated Affini Pure Donkey Anti-Goat IgG (תוצרת חברת Jackson ) במיהול

עבודה של 1:15000.

כעבור 50 דקות נשטפה הממברנה בשנית, 4 שטיפות בנות 15 דקות כל אחת. בשלב האחרון

טולטלה הממברנה 5 דקות בנוכחות החומר ECL (Enhanced Chemiluminescent substrate for

western blotting) מתוצרת אורנת. ECL מגיב עם האנזים Horse Radish Peroxidase (HRP) הקשור

לזנב הנוגדן השניוני וכתוצאה מכך משתחררים פוטונים המתורגמים לתמונה המתקבלת על גבי הפילם

החשוף.

הממברנה נחשפה לפילם רגיש מתוצרת Kodak (BioMax MS-1 Film, 829-4985) למשך 4

דקות. הפילם נסרק באמצעות סורק.

בדיקת ה- Western blot לנוכחות החלבון בוצעה פעם נוספת באמצעות נוגדן מונוקלונאלי

Aminopeptidase-N IgG<sub>2a</sub>/κ שמקורו ב- Clone 3D8 מעכבר, (תוצרת חברת Calbiochem) במיהול

עבודה של 1:100.

כנוגדן שניוני לריאקציה זו השתמשנו ב- Donkey anti-Mouse IgG (תוצרת חברת Jackson )

במיהול עבודה של 1:15000 .

### 3. תוצאות

#### 3.1 תכנון פריימרים ל-PCR לצורך זיהוי התבטאות הגן ל APN ברקמת העטין

כפי שהוזכר בפרק 2 סעיף (2.9), הפריימרים תוכננו באמצעות השוואת מספר רצפים שמורים

של הגן המקודד ל-AP ברקמת העטין הקיימים בבנק הגנים, תוך התחשבות בתנאים הבאים:

1. ה- $T_m$  שהוגדר לתכנון הפריימרים היה 58.  $T_m$  מהווה אומדן ליציבות הקשירה אל גדיל המטרה.

2. הנוסחה לחישוב  $T_m$  הינה  $T_m = 59.9 + 41(\%GC) - 674/N$ .

3. אורך הפריימרים הוגדר כ- 23 בסיסים. אורך הפריימר מהווה גורם מכריע בספציפיות שלו,

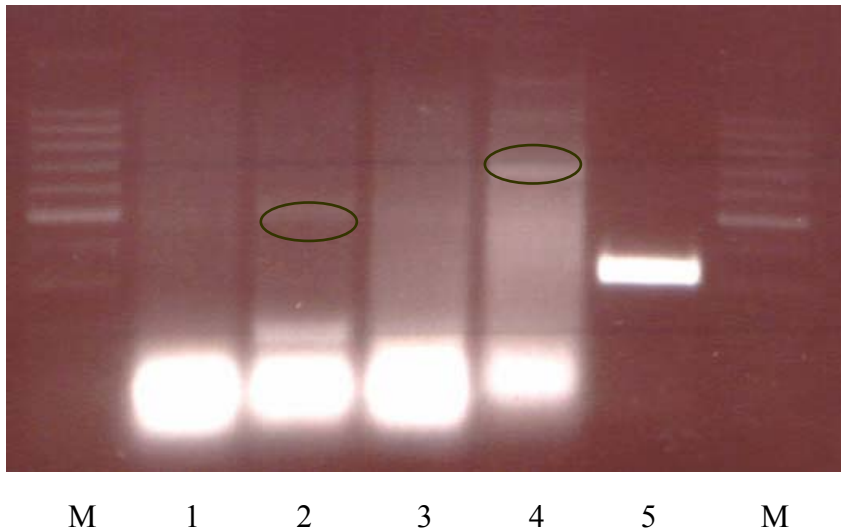
ומקובל שהרצף המקודד ל-6 חומצות אמינו לפחות הינו ייחודי בגנום. פריימרים קצרים יותר

עשויים להגביר את אקראיות התוצרים בריאקצית PCR.

4. אורך התוצר הרצוי נע בין 500-550bp. קיימת חשיבות רבה לאורכו של התוצר, מכיוון שתוצר קצר

מדי יהיה קשה לאבחנה על גבי הג'ל. התוצר המתקבל משמש כגלאי רדיואקטיבי ובאם יהיה קצר

מדי יסומן ברמה נמוכה אשר תקשה על זיהויו.



תמונה מס' 2: בדיקת הפריימרים השונים עבור הגן המקודד לאנזים APN ליצירת גלאי.

M – מרקר לגודל. 1 – 30 (forward) + 23 (reversed) – 2. 25 (forward) + 33 (reversed) – 3

3 – 30 (forward) + 33 (reversed) – 4. 23 (forward) + 25 (reversed) – 5. positive control – 5

הפריימרים מהם בחרנו להכין את הגלאי הם הפריימרים 23 forward ו-25 reversed.

### 3.2 פרסום רצף הנוקלאוטידים של מקטע מהגן המקודד לאנזים APN

רצף הנוקלאוטידים של מקטע מהגן המקודד לאנזים APN כפי שפורסם ב-Gene Bank. הרצף

מונה 531 זוגות בסיסים ושימש כגלאי, ((probe, להתבטאות הגן ברקמת העטין של מעלי גירה.

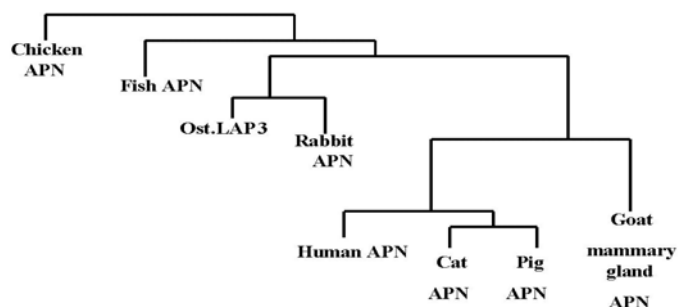
gcgctgctct atgacctca gtcttctcc agcagcaaca aagagcgagt agtcactgtg	60
attgctcatg agctggccca ccagtggttt ggaaacctgg tgacctggc ctggtggaat	120
gacctgtggc tgaatgaggg cttgacctcc tacgtggatg acctgggagc tgactatgcg	180
gagccacct ggaatctgaa agacctcatt gtgccgaacg acgtgtaccg tgtaatggct	240
gtggacgcac tggcacctc tcacctactg accaccctg cgcagcaggt caacaccct	300
gcccagatca gcgagatgtt cgataccatc tctacagca agggagcctc ggtcatccgg	360
atgctctcga atttctgac tgaggacctg tcaagaagg gcctggcgtc ctactgcag	420
gcctttgctc atcagaacac cacctacctg aacctctggg agcatctgca gatggccgtg	480
gacagtcagt cgttcatcat tctgccagac accgggagtg ccatcatgga c	531

### 3.3 הכנת מפה אבולוציונית לקביעת מיקום הגן בעיזים, בהשוואה לבעלי חיים נוספים

קיימת קירבה אבולוציונית בין APN שבודד מאדם, חזיר וחתול ובין APN שבודד מרקמת

העטין של עיזים. יחד עם זאת, קיים מרחק אבולוציוני בין APN זה, ובין APN שמקורו בדגים ובעופות.

המרחק האבולוציוני בא לידי ביטוי בדיאגרמה מס' 1.



דיאגרמה מס' 1. מפה אבולוציונית

לקביעת מיקומו של מקטע מהגן המקודד לאנזים APN ברקמת עטין עז.

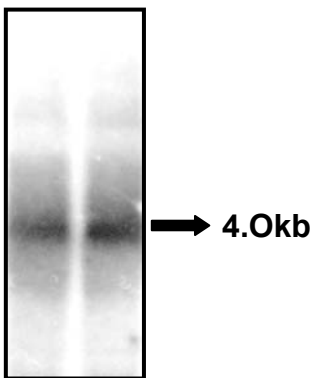
### 3.4 בדיקת הומוולוגיה בין הרצף המבודד ובין רצפים נוספים של הגן המקודד ל- APN הקיימים בבנק הגנים

על מנת לנסות ולקבוע באם הרצף שהתקבל, אכן מבטא מקטע מהגן המקודד לאנזים APN ביצענו בדיקת הומוולוגיה בין רצף זה ובין רצפים אחרים המקודדים ל- APN ופורסמו עד כה בבנק הגנים. כפי שניתן לראות מטבלה מס' 2 קיימת הומוולוגיה בין 76% (מעני של תרנגולת) ל- 84% (מעני של אדם) בין רצפים אילו ובין הרצף שמקורו ברקמת העטין של עיזים.

Organism	tissue	homology	ID
Rat	intestine	83%	GeneBank / EMBL M25073
human	intestine	84%	GeneBank / EMBL X13276
chicken	intestine	76%	Gene Bank / EMBLY17105
mouse	kidney	83%	Gene Bank / EMBL U77083
rabbit	kidney	83%	Gene Bank / EMBL X51508

### 3.5 התבטאות הגן המקודד לאנזים APN ברקמת עטין מעלי גירה

התבטאות הגן המקודד לאנזים APN נבדקה ברקמת עטין של שתי עיזים. מקטע בגודל של 4 kb התקבל לאחר היברידיזציה עם גלאי ייחודי לגן זה. Northern blot זהה בוצע על גבי רקמת עטין שנלקחה מפרה וגם בבדיקה זו נתקבל מקטע בגודל זהה.



תמונה מס' 1: Northern blot ברקמת עטין עז.

### 3.6 התבטאות האנזים APN בשלפוחיות ממברנאליות מרקמת עטין עז

#### 3.6.1 בדיקת Western Blot באמצעות נוגדן פוליקלונאלי בריכוזי חלבון משתנים

התבטאות החלבון של האנזים APN נבדקה על גבי שלפוחיות ממברנאליות שהופקו מרקמת עטין עז. השלפוחיות הממברנאליות הופקו על פי פרוטוקול העבודה (Vayro et al., 1993) שפותח עבור הפקת שלפוחיות ממברנליות מן הצד הבזאלי של תאי אפיתל של בלוטת התירוואיד. טבלה מס' 2 מציגה

שישה ריכוזי חלבון שונים שנלקחו לצורך בדיקת Western blot לקביעת ביטוי חלבון APN בשלפוחיות. ניתן לראות בתמונה מס' 2, בכל אחת מששת הדוגמאות התקבל חלבון שגודלו 140KDa שזוהה באמצעות הנוגדן הפוליקלונאלי. כמו כן, ניתן לראות מתאם חיובי בעוצמת התבטאות האנזים ובריכוז החלבון בדוגמא הנבדקת.

No.	Prot con. mg/ml
1	10.9
2	9.5
3	5
4	3
5	2
6	1

טבלה מס' 2 – ריכוזי חלבון משתנים עבור ביצוע בדיקת Western Blot.

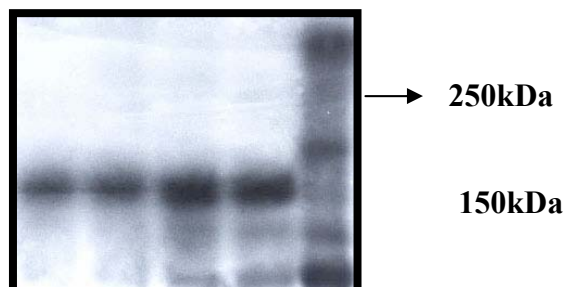


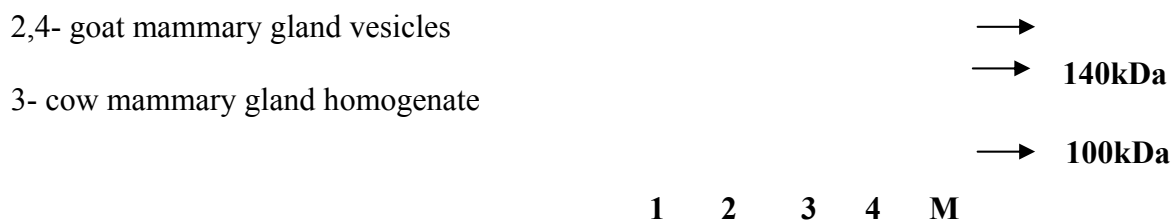
תמונה מס' 2: Western Blot עם נוגדן פוליקלונאלי בריכוזי חלבון משתנים.

### 3.6.2 בדיקת Western Blot באמצעות נוגדן פוליקלונאלי בהשוואה לביקורת חיובית

התבטאות החלבון של האנזים APN נבדקה על גבי רקמת העטין של שתי עיזים ופרה אחת. כרקמת ביקורת השתמשנו ברקמת מעי של חולדה. התקבל חלבון שגודלו 140kDa בכל אחת מהרקמות הנבדקות כולל רקמת המעי של חולדה. התוצאות מסוכמות לפניכם בתמונה מס' 3.

1- rat intestine vesicles (positive control)

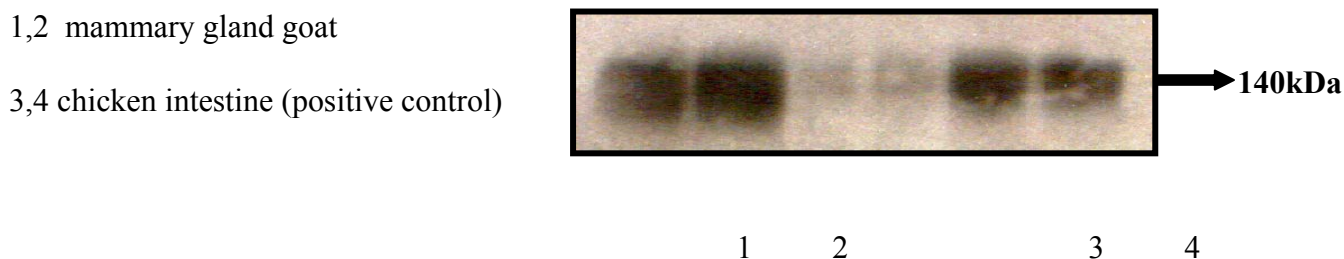




תמונה מס' 3: Western Blot באמצעות נוגדן פוליקלונאלי.

### 3.6.3 בדיקת Western Blot באמצעות נוגדן מונוקלונאלי בהשוואה לביקורת חיובית

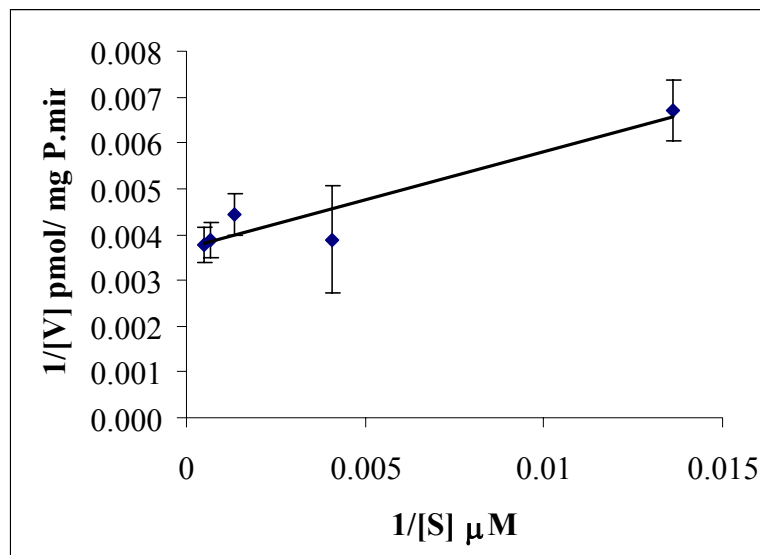
על מנת לקבוע חד משמעית כי החלבון המתקבל בבדיקת ה- Western Blot הינו APN בוצעה בדיקה נוספת עם נוגדן מונוקלונאלי. הנוגדן הנוכחי הינו מונוקלונאלי הגורם להגברת הספציפיות של הריאקציה. רקמת מעי עוף שימשה כביקורת חיובית בניסוי זה. בבדיקה זו נתקבל חלבון שגודלו 140kDa בכל אחת מהרקמות הנבדקות. על סמך תוצאות אילו ניתן לבסס את הקביעה כי החלבון המתקבל הינו APN.



תמונה מס' 4: בדיקת Western Blot עם נוגדן מונוקלונאלי בנוכחות ביקורת חיובית.

### 3.7 בדיקת פעילות אנזימטית של האנזים APN ברקמת העטין וחישוב ערכי Km ו- Vmax

בנוסף לקביעות המולקולריות של נוכחות האנזים APN ברקמת העטין של מעלי-גירה (עז ופרה) מן הראוי היה לבצע פעילות ביוכימית של האנזים על מנת לחזק הן את מיקומו קרי, על גבי הממברנות הבאזולטרליות והן אפיונו מבחינה ביוכימית.



גרף מס' 1. בדיקת פעילות אנזימטית של APN ברקמת עטין.

ערכי המדדים הקנטיים שנתקבלו מניתוח עקום הפעילות היו:  $V_{max} = 270.3 \text{ pmol/ mg}$

וערך האפיניות  $K_m$  היה  $0.57 \mu\text{M}$ .

### 3.8 בדיקת פעילות אנזימטית של הסמנים הממברנאליים

#### 3.8.1 בדיקת פעילות אנזימטית של Alkaline Phosphatase

פעילות גבוהה יותר של האנזים Alkaline Phosphatase נמצאה בשלפוחיות הממברנאליות של

תאי האפיתל של רקמת העטין, בהשוואה לפעילות שנמדדה בהומוגנאט הרקמה. הפעילות בממברנות

הייתה גבוהה פי 4~ לעומת ערך הפעילות שהתקבל בהומוגנאט.

	Protein concentration	Alkaline phosphatase	enrichment
	Prot mg/ ml	units/mg P/min	
Homogenate	20.14	2.68	3.86
PMV	8.95	10.35	

טבלה מס' 2: פעילות אנזימטית של Alkaline Phosphatase



### 3.8.2 בדיקת פעילות אנזימטית של ATPase

פעילות האנזים ATPase הרגיש ל-Ouabain נבדקה בשלפוחיות ממברנאליות ונתקבל ערך של 721.9 pmol/mg P/min. משאבת נתון-אשלגן ממוקמת באופן בלעדי על הצד הבאזולטרלי של ממברנת התאים המפרישים בעטין (Kinura, 1969; Shenan, 1992). בדיקה זו מראה שהממברנות שהופקו בשיטה שאומצה בעבודה זו הן אכן אלו שפונים לצד הקפילארי של תא האיפתל בעטין המפריש.

	Protein concentration	ATPase
	Prot mg/ ml	pmol/mg P/ min
PMV	8.95	721.9

טבלה מס' 3: פעילות אנזימטית של ATPase

### 3.8.3 בדיקת פעילות אנזימטית של $\gamma$ -GT

כצפוי, פעילות גבוהה יותר של האנזים  $\gamma$ -GT נמצאה בשלפוחיות הממברנאליות שהוכנו מרקמת העטין, בהשוואה לפעילות שנמדדה בהומוגנאט הרקמה. הפעילות בממברנות הייתה גבוהה פי 3 לעומת ערך הפעילות שהתקבל בהומוגנאט.

	Protein concentration	$\gamma$ -GT	enrichment
	Prot mg/ ml	units/mg P/min	
Homogenate	20.14	27.40	2.96
PMV	8.95	81.00	

טבלה מס' 4: פעילות אנזימטית של  $\gamma$ -GT.

### 3.9 ניסוי מקדים

השפעת עירווי הידרוליזאט של קזאין אל תוך האבאומאזום על ריכוזי FAA ו- PBAA בדם העורקי של עז הנמצאת באמצע תקופת הלקטציה.

עירווי של הידרוליזאט-קזאין בשיעור 20% ו- 40% מחלבון מטבולי נצרך (טיפול מס' 1) גרם לעליה בריכוזי כל חומצות האמינו החופשיות בדם העורקי, באופן תוספתי, בהשוואה לביקורת אינפוזיה של H<sub>2</sub>O, (טבלה מס' 5, גרף מס' 2).

AA	FAA			PBAA		
	H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	20% of MPI <sup>ab</sup>	40% of MPI <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O	20% of MPI	40% of MPI
	$\mu M$					
Met	17.6	23.8	41.1	3.9	12.5	28.5
Val	152.5	274.9	568.1	79.8	125.4	430.1
Phe	44.1	49.5	79.9	-	-	15.4
Ile	87.0	114.1	220.4	62.6	46.8	84.5
Leu	96.8	233.6	245.1	17.6	25.4	15.7
His	12.2	56.2	96.4	56.6	95.0	148.3
Lys	84.4	233.9	251.2	59.4	139.2	137.2

<sup>a</sup>H<sub>2</sub>O = 500 g H<sub>2</sub>O/d, 20% of MPI = 50 g casein hydrolysate in 500 g H<sub>2</sub>O/d, 40% of MPI = 100 g casein hydrolysate in 500 g H<sub>2</sub>O/d.

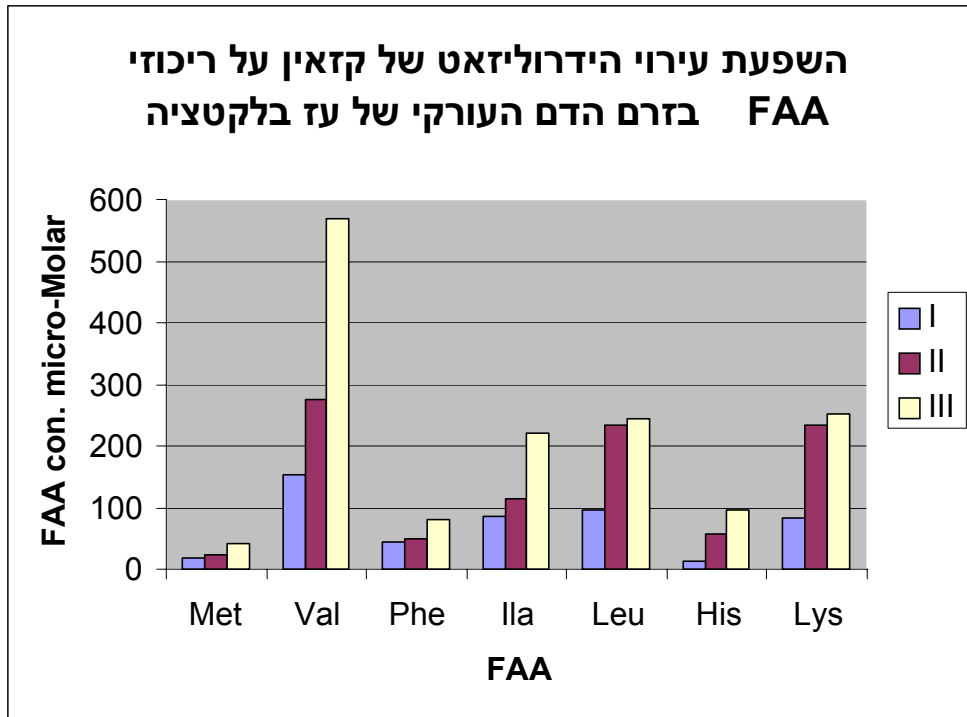
<sup>b</sup>MPI = metabolizable protein intake.

טבלה מס' 5: קביעת ריכוזי FAA ו- PBAA בדם העורקי של עז באמצע לקטציה

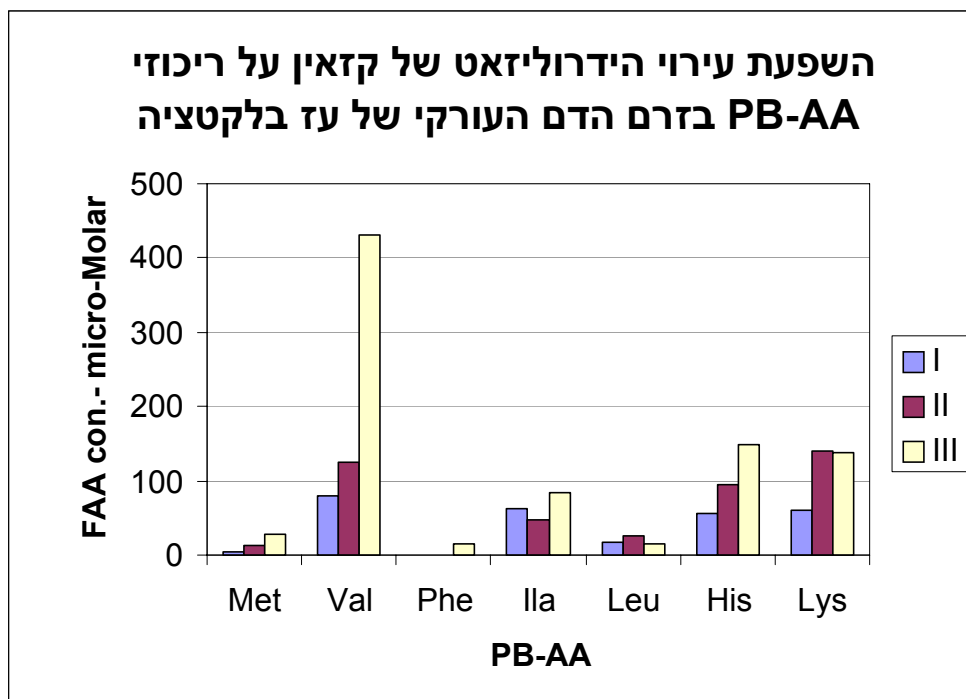
כתוצאה מאינפוזיה של תמיסת H<sub>2</sub>O או קזאין אל תוך האבומאזום.

כמו כן, נמדדה עליה דומה בריכוז חומצות אמינו קשורות לפפטידים (PBAA) בדם העורקי

למעט חומצת אמינו Phe שפפטידים נמדדו רק בעירווי הגבוה ביותר (טבלה מס' 5, גרף מס' 2).



גרף מס' 2 – השפעת עירוי הידרוליזאט של קזאין על ריכוזי FAA בזרם הדם העורקי של עז בלקטציה.



#### 4. דיון

במחקר זה נבחנה התבטאות גן המקודד לאנזים האחראי להידרוליזה של פפטידים על גבי ממברנות התאים בעטין מעלי גירה. לראשונה הוכח כי האנזים (Aminopeptidase N (APN) השייך למשפחת הפפטידאזות מתבטא ברקמת העטין של מעלי גירה (עזים ופרות). עד כה נמצא האנזים ברקמת שד ממקור הומני בתאי אפיתל בריאים (Atherton et al., 1992) ובתאים פיברובלסטיים נגועים בסרטן (Atherton et al., 1994) אולם טרם בודד הרצף הגנטי של האנזים מרקמה זו. יחד עם זאת, לא נמצאו בספרות המקצועית פירסומים הקושרים את הגן המקודד לאנזים APN לבלוטת החלב ביונקים.

רוב חומצות האמינו נקלטות בעודף ע"י העטין ומנוצלות לסנתזה של חלבוני חלב (Bequette et al., 1999). קיימות חומצות אמינו מסוימות כמו מתיונין ופניל אלנין שקליטתן בצורה החופשית ע"י העטין נמוכה מזו המתקבלת בחלב, לכן מקור נוסף בפלסמה חייב לספק את צרכי העטין. מקור זה הוא כנראה אותם פפטידים וחלבונים הקיימים ברקמת הדם (Bequette et al., 1998). עד כה נעשה שימוש בשיטות לא ישירות ע"מ למדוד במערכות ניסוי In-Vivo את התרומה של פפטידים לאספקת חומצות אמינו מסוימות עבור סינתזה של קזאינים אולם עקב הקושי הטכני במדידת ריכוזי פפטידים במערכת הדם הנושא טרם הובהר דיו (Bequette et al., 2001). קיימים מספר מנגנונים משוערים להעברה של פפטידים קצרים הנעים במחזור הדם פנימה אל בלוטת החלב (Shennan et al., 1998): 1. הידרוליזה חוץ תאית של פפטידים קצרים המלווה בקליטה של חומצות אמינו חופשיות. 2. העברה של פפטידים שלמים המלווה בהידרוליזה תוך תאית לקבלת חומצות אמינו חופשיות. 3. שילוב בין הידרוליזה ובין נשאים של פפטידים.

על סמך ממצאים קודמים, ששללו נוכחות נשאים לפפטידים על גבי רקמת העטין (Chen et al., 1995; Wang et al., 1996; Hideyuki et al., 1999) ביססנו את הנחת העבודה הגורסת כי בהיעדר נשאים מתאימים על גבי ממברנות התאים בעטין, קיימים מנגנונים חלופיים לשימוש בפפטידים קצרים ברקמת העטין. מחד, ייתכן שכניסת הפפטידים אל תוך התאים המפרישים נעשית ישירות מזרם הדם ללא נשאים או גורמים מתווכים אחרים, מאידך, ייתכן שאותם פפטידים קצרים הנעים בזרם הדם, מנותבים אל רקמת העטין בהידרוליזה קפילרית ונקלטים ע"י מנגנונים ספציפיים בצורת חומצות אמינו חופשיות המועברות פנימה אל תאי האפיתל המפרישים. עבודה זו הוכיחה בשלב ראשון כי האנזים APN האחראי להידרוליזה של פפטידים קיים על גבי ממברנות התאים המפרישים בבלוטת החלב.

עד כה בודדו אמינופפטידאזות (AP) ממספר איברים ורקמות כדוגמת כבד וכליה של חולדה (Singh and Kalnitsky, 1980), ריאות של ארנב (Kirshchke et al., 1976; Watt and Cecil, 1989) ושרירי שלד בעוף (Rhyu et al., 1992). באדם אופיינו מספר סוגים של אמינופפטידאזות מרקמות ומנזלי הגוף, ואילו שונות האחת מהשניה בעיקר בסובסטרט הספציפי עליו הן פועלות ובסוג המתכת הנקשרת אל תת היחידה של החלבון: לאוצין אמינופפטידאז, אלאנין אמינופפטידאז, אמינופפטידאז A,B,P,N,H טריפפטידאז, דיפפטידאז (Sanderink et al., 1988; Jiang et al., 2000; Shapiro et al., ) (Bunnett, 1995 1991; Terashima and

אמינופפטידאז (APN) N הינו אחד האנזימים השכיחים בקבוצת האמינופפטידאזות הפועל על מגוון רחב של סובסטרטים וספציפי לפפטידים עם רצף חומצות אמינו חסר מטען בקצה ה-N טרמינלי (Stefanovic et al., 1998). APN נפוץ בעיקר במיקרווילי של המעי ובקליפת הקורטקס של הכליה (Kenny et al., 1982). APN בודד ממספר רקמות של מספר אורגניזמים, ביניהן מעי של חזירים (Danielsen et al., 1986), נמטודות (Smith et al., 1997), ארנבים (Noren et al., 1989), אדם (Olsen et al., 1988 ועופות (Gal-Garber and Uni, 1998) וכן מכלית חזיר (Stewart and Kenny, 1984). נמצא כי APN מתבטא ברמות גבוהות בממברנת ה-brush border של תאי האנטרוציטים במעי (Danielsen et al., 2000; Gal-Garber and Uni, 1986), שם הוא משתתף בתהליך הפירוק הסופי של חלבונים על ידי חיתוך של פפטידים מהקצוות. נמצא כי רמתו של ה-mRNA המקודד לגן המבטא את APN עולה בתאי האנטרוציטים כאשר הם נודדים לאורך הווילי של המעי (Noren et al., 1989).

APN נמצא גם בתאי הפטוציטים של הכבד מעוגן לממברנת התא (Bartels and Hubbard, ) (1989; Look et al., 1989).

בכל הפרטים מהם בודד עד כה, הוכח כי APN מורכב מתת יחידה אחת במשקל של כ-160 KDa המופיעה כמונומר בארנב וכהומו דימר במינים אחרים (Feracci and Maroux 1980; Kim and ) (Brophy 1976; Hiwada et al., 1980; Olsen et al., 1991). כל תת יחידה מעוגנת לממברנת התא בצד החנקני באמצעות רצף הידרופובי של 20 חומצות אמינו החודר את הממברנה פעם אחת בלבד (Feracci ) (and Maroux 1980; Feracci et al., 1982; Maroux and Feracci., 1983). המקטע הציטופלסמטי קצר מאוד ומכיל כ-4 חומצות אמינו. בשנת 1989 הוכיחו Olsen וחבריו, באמצעות השוואת רצפי DNA, כי

APN הומולוגי לחלוטין ל-CD13, אקטו-אנזים טרנס-ממברנלי המתבטא במגוון רחב של תאים כגון מונוציטים, באזופילים, אאוזונופילים, נויטרופילים (Kehlen et al., 1998). תאי אפיתל מסוימים, פיברובלסטים ואוסטאוקלסטים (Lendeckel et al., 1994). CD13 הינו metalloproteinase קושר  $Zn^{+2}$  וייתכן שהוא משתתף בתהליכי דגרדציה של פפטידים רגולטוריים כדוגמת enkephalins במערכת העיכול (Turner et al., 1985).

ההוכחה כי APN אכן מתבטא ברקמת העטין של מעלי גירה סופקה במספר רמות ותידון בהמשך, אולם כשלב ראשון לקחנו על עצמנו להוכיח את הנחת העבודה הבסיסית, לפיה ממוקם האנזים בצידה הבזאלי של ממברנת התאים המפרישים, דהיינו קרוב לכלי הדם המזינים את העטין. לשם הוכחת הנחה זו, השתמשנו בשלושה סמנים ממברנאליים: alkaline phosphatase ATPase ו- $\gamma$ -GT המתבטאים על גבי ממברנות התאים בצידם הבזאלי ברקמות שונות. פעילותם האנזימטית של alkaline phosphatase ו- $\gamma$ -GT היתה גבוהה יותר בשלפוחיות הממברנאליות בהשוואה לפעילות שנקבעה בהומוגנטים, עם העשרה בסדרי גודל של פי 4 ופי 3 בהתאמה. במקרה של האנזים ATPase נבדקה פעילות אנזימטית בשלפוחיות ממברנאליות ועמדה על  $721.903 \text{ pmol/mg P./min}$ . ATPase קיים בכל מקום בתאים, בעוד ש Alkaline phosphatase ו- $\gamma$ -GT קיימים על גבי ממברנות התאים רק בצידם הבזאלי (Choemon et al., 1982).

בשלבי העבודה הבאים, הוכחנו כי האנזים מתבטא ברקמת העטין של מעלי גירה. הוכחה זו סופקה ברמות הבאות:

1. רמת mRNA: מקטע שגודלו 531bp בודד בריאקצית RT-PCR שבוצעה על גבי mRNA שמקורו ברקמת עטין עז חלבנית רוצף ונמצא הומולוגי ב-83% לאנזים APN שמקורו במעי אדם, חולדה וארנב. מקטע זה שימש כגלאי, (probe), בריאקצית Northern blot שבוצעה על גבי mRNA שמקורו ברקמת עטין חלבנית של עז ופרה, ובריאקציה זו בוטא לראשונה, הגן המקודד לאנזים APN ברקמת עטין כלשהיא. גודלו של ה-RNA המתקבל עמד על 4.0kb הן ברקמת העטין שמקורה מעז והן ברקמת העטין שמקורה מפרה. ערך זה שונה מהערך הקיים בספרות בהתייחס למעי של עופות, 3.5kb (Gal-Garber and Uni., 2000), מעי של ארנב, 3.4k.b (Noren et al., 1989) ומעי של אדם, 3.2k.b (Olsen et al., 1989).

2. רמת חלבון: בבדיקת Western Blot לנוכחות החלבון לאנזים APN קיבלנו תוצר שגודלו 140KDa בשתי הבדיקות שבוצעו: הראשונה באמצעות נוגדן רב שבטי (פוליקלונאלי), והשנייה בנוכחות נוגדן חד שבטי (מונוקלונאלי). נתון זה שונה מהממצאים הקיימים בספרות, המצביעים על חלבון שגודלו 160KDa כאשר הוא מתבטא ברקמת המעי, הכליה, השריר, הכבד ועוד (Feracci and Maroux, 1980; Kim and Brophy 1976; Hiwada et al 1980; Olsen et al., 1991; Shipp and Look, 1993; KDa150 הוא גודלו הוויטרופיים גודלו הוא 150KDa; Hassan and Drexler, 1995). בנוסף לכך, מתועדים בספרות גדלים נוספים של חלבון לאמינופפטידאזות שונות. אמינופפטידאז (APA) A, המכיל אטום  $Ca^{+2}$  הוא בעל משקל של 170KDa. אנזים זה בודד ממעי וכליה של חזיר, וממעי של ארנב (Benajiba and Maroux; 1980, Danielsen et al; 1984, Stewart and et al; 1984). האנזים דיפפטידיל פפטידאז IV, השייך גם כן למשפחת הפפטידאזות, נמצא בכליה ומעי של חזיר כהומודימר, עם תת יחידה במשקל מוערך של 130KDa (MacNair and Lazdunski et al., 1978; Svensson et al, 1978; Kenny, 1979). האנזים אמינופפטידאז H בודד מ- E.coli (Lazdunski et al., 1975), רקמת עור בחולדה (Jarvinen and Hopsu-Havu; 1975), כבד של חולדה (Kirshchke et al., 1976), ריאות של ארנב (Singh and Kalnitsky, 1978; Singh and Kalnitsky, 1980) ושרירי שלד בארנב (Okinati et al., 1980; Okinati et al., 1981) כאשר המשקלים המולקולריים שהתקבלו הינם 26, 27 ו- 29kDa בהתאמה. סקירה זו מצביעה על כך שקיימת שונות במשקל החלבון, בין ובתוך פפטידאזות שונות, דבר התומך בהשערה כי החלבון המתקבל בבדיקת ה Western Blot שערכנו הוא אכן APN.

3. רמת פעילות האנזים: פעילות מקסימלית ( $V_{max}$ ) ל- APN נמצאה דומה לערכים הנקובים בספרות. ערכי  $V_{max}$  שהתקבלו בניסוי עומדים על  $270\text{pmol/mg P./min}$ . מידת האפיניות של האנזים Km נמצאה נמוכה יותר מהערכים הקיימים בספרות ועומדת על  $57\mu\text{M}$ .  
Stefanovic וחבריו בדקו בסדרת ניסויים במערכות In-Vitro משנת 1998 את רמת הפעילות של האנזים APN בתרבית תאים פיברובלסטיים שמקורם ברקמת עור הומנית. ערכי פעילות האנזים שהתקבלו:  $V_{max}=330\text{nmol/min*mg}$  ו  $Km=0.63\text{mM}$ . תוספת של 10% Fetal Calf Serum לתרבית

התאים, גרמה לעליה של 63% בערכי פעילות מקסימלית של האנזים APN. ערכי אפיניות לאחר התוספת לא הוצגו.

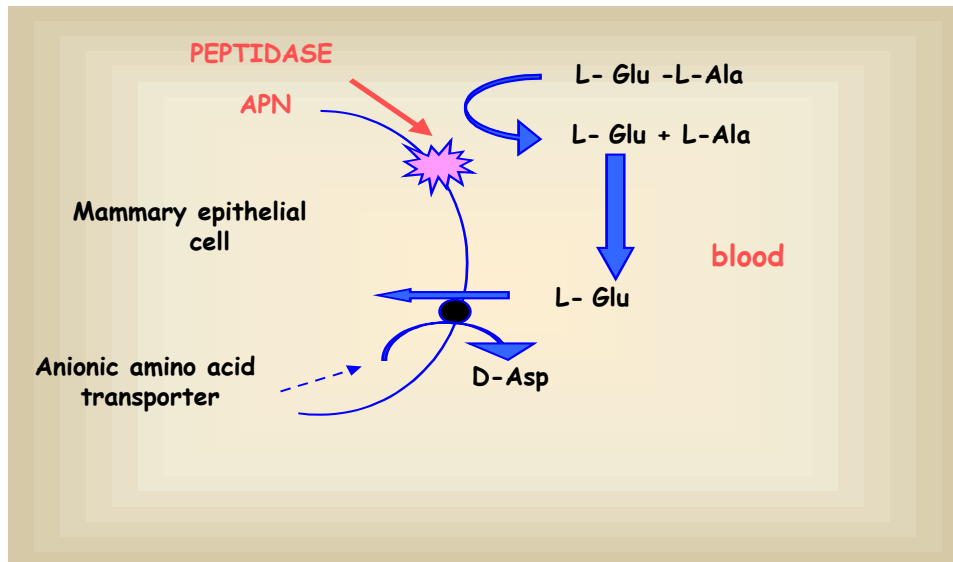
רמת הפעילות של האנזים APA נמדדה לאורך חלקי מעי ממקור הומני באדם, וכן בתריסריון ובכליה של חזיר, בשלפוחיות ממברנאליות שמוצו מתאים אפיתליאליים ברקמות אילו. ערכי פעילות שהתקבלו עבור האנזים:  $K_m=0.25\text{mM}$  וערכי  $V_{\max}=110\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ . פעילות האנזים APN (Specific Activity) ביחידות של  $\text{nmol}/\text{min}$  ביחס לכל  $\text{mg}$  חלבון נמדדה בתריסריון 67.8, ג'אוגנום 49.4 ואיליום 61.3באדם, ובתריסריון 59 וכליה של חזיר 244.1 (Hooper et al., 1994).

ניתן לראות כי ערכי הפעילות ( $K_m, V_{\max}$ ) שהתקבלו בשלפוחיות הממברנאליות אותן הפקנו מרקמת העטין מופיעים בטווח הפעילות הקיים בספרות.

תוצאות הניסוי המקדים שקיבלנו, מעידות על כך שאינפוזיה של רמות קזאין גבוהות אכן מעלה באופן תוספתי את ריכוז חומצות האמינו החופשיות בזרם הדם, אותן חומצות שיכולות להיות מנותבות אל בלוטת העטין. בדומה לחומצות אמינו חופשיות, ריכוז PB-AA בזרם הדם העורקי גדל ביחס ישר לכמות ההידרוליזאט המעורה ובהשוואה לקבוצת הביקורת למעט פניל אלאנין (Phe) ולאוצין (Leu). תוצאות אילו תואמות את התוצאות הקיימות בספרות. Chung וחבריו הראו בשנת 1995 כי אינפוזיה של  $230\text{g}/\text{d}$  הידרוליזט של קזאין לפרות בתחלובה גרמה לעליה בתנובת החלב ובכמות החלבון בחלב בהשוואה לקבוצת ביקורת וכמו כן נמצאו רמות גבוהות יותר של PBAA בזרם הדם בהשוואה לקבוצת טיפול אחרת אשר קיבלה אינפוזיה של  $180\text{g}/\text{d}$  הידרוליזאט של קזאין. הרמות הגבוהות ביותר של PBAA כאשר אונפו הידרוליזאט חומצי של קזאין (Acid Hydrolysate) בהשוואה לטיפול בהידרוליזאט אנוימטי ו-Sodium Caseinate.

המסקנה המתבקשת מתוצאות הניסוי המקדים הינה שיש ביכולתן של מניפולציות תזונתיות כאלה או אחרות, להשפיע על רמת חומצות האמינו חופשיות בדם, וכי ישנו יחס ישר בין כמות וצורת חומצות האמינו המעורות ובין רמת חומצות האמינו החופשיות הנמדדות בדם. ניתן לבסס קביעה זו על סמך ממצאיהם של Chung וחבריו (1995) שהראו כי התגובה לעירוי של החומר Sodium Caseinate, הידרוליזאט של קזאין, בפרות חלב היתה גבוהה יותר כאשר אונפו  $230\text{g}/\text{d}$  בהשוואה לאינפוזיה של  $180\text{g}/\text{d}$  מאותו החומר. התגובה התבטאה בתכולת חלבון גבוהה יותר שהתקבלה במקרה הראשון. כמו כן נמצאה בניסוי זה קורלציה חיובית ( $P=0.007$ ) בין היחס של PBAA בחומר המאונפו, ובין הריכוז





תמונה מס' 7 – מודל להידרוליזה חוץ- תאית – באמצעות פפטידאזות בבלוטת החלב.

הכללי שלהם בפלסמה. בשלב הבא יש לבדוק מהי מידת התבטאות האנזים APN לאחר עירוי

המעשיר את רמות הפפטידים בזרם הדם העורקי.

Shenan וחבריו הציגו בשנת 1999 את המנגנון הבא (תמונה מס' 7) בעזרתו ניתן לשער כיצד

מתקיימת הידרוליזה חוץ – תאית של דיפפטידים ומהו תפקידן של הפפטידאזות במודל זה:

במודל הנ"ל נעשה שימוש ב- L-Glu-L-Ala כחומר די-פפטידי טעון שלילית אשר עובר הידרוליזה באמצעות פפטידאזה מסוימת הממוקמת על גבי בלוטת החלב בצידה הבזאלי של הממברנה החוץ תאית, טרם כניסתו פנימה אל תוך התאים. דיפפטיד זה מפורק לשתי חומצות אמינו שונות: L-Glu+L-Ala הנמצאות עדיין בזרם הדם. בשלב הבא נכנסת החומצה האמינית הטעונה שלילית L-Glu פנימה אל בלוטת החלב באמצעות טרנספורטרים לחומצות אמינו טעונות שלילית הממוקמים גם כן בצידה החיצוני של הבלוטה. כניסת L-Glu פנימה מלווה בשחרור D-Asp מתוך בלוטת החלב החוצה אל זרם הדם ותלויה בנוכחות יון הנתרן המשתחרר אל זרם הדם בפעולה זו (Shenan et al., 1998). אנו משערים כי אותה פפטידאזה הממוקמת על גבי הממברנה החיצונית של התאים בעטין, הינה האנזים

.APN

## 5. סיכום

עבודה זו בחנה לראשונה את התבטאות האנזים APN ברקמת העטין של מעלי גירה. ברמת הביטוי נתקבל RNA שגודלו 4.0 bp, ברמת החלבון נתקבל חלבון שגודלו 140KDa, וברמת הפעילות הביוכימית התקבלו ערכי פעילות מקסימלית ואפיניות  $270 \text{ pmol/mg P./min}$  ו-  $57 \mu\text{M}$ , בהתאמה. מדדים אלו מחזקים את השערתנו כי מדובר באנזים APN. המכניזם הרגולטיבי שדרכו פועל האנזים וכיצד הוא מסייע, אם בכלל, בהגדלת זמינותן של חומצות האמינו המנותבות לעטין לצורך סינתזה והפרשה של חלבוני החלב טרם הובהר עד תומם. גרמים תזונתיים והרכב מנה, זמינות חומצות אמינו ופפטידים בזרם הדם עשויים להוות גורמים המשפיעים על בקרת הביטוי ופעילות האנזים APN ברקמת העטין.

## 6. REFERENCES

- Agricultural and Food Research Council. 1993. Energy and Protein requirement of Ruminants. An Advisory Manual Prepared by AFRC. Technical Committee of Responses to Nutrients. CAB Int., Wallingford United Kingdom.
- Akers, R.M. 1994. Lactation. Encyclopedia of Agricultural Science. Vol.2 635-643.
- Anderson, R. R. 1985. Mammary Gland. In. Larson, B.L. (Eds.) Lactation. The Iowa State University Press. Ames. Iowa. pp. 3-37.
- Atherton, J.A., M.J. O'Hara., L. Buluwela., J. Titley, P. Monaghan, H.F. Paterson., M.J. Warburton., and B.A. Gusterson. 1994. Ectoenzyme regulation by phenotypically distinct fibroblast sub-populations isolated from the human mammary gland. Journal of cell Science. 107, 2931-2939.
- Atherton, J.A., P. Monaghan, M.J. Warburton., and B.A. Gusterson. 1992. Immunocytochemical localization of the ectoenzyme aminopeptidase N in the human breast. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 40(5): 705-710.
- Backwell, F.C.R., 1998. Circulating peptides and their role in milk protein synthesis. In. Grimble, G.K., Backwell, F.R.C. (Eds.), Peptides in mammalian protein metabolism. Potland Press, London and Miami, pp. 69-78.
- Backwell, F.C.R., B.J. Bequette, D. Wilson, A.G. Calder, J.A. Metcalf, M.F. Franklin, D.E. Beever, G.E. Lobley, J.C. MacRae, and D.E. Beever. 1993. Peptide utilization by the mammary gland of goats. Anim. Prod. 56:419-478.
- Backwell, F.C.R., B.J. Bequette, D. Wilson, A.G. Calder, J.A. Metcalf, M.F. Franklin, D.E. Beever, G.E. Lobley, J.C. MacRae, and D.E. Beever. 1994. Utilization of dipeptides by the caprine mammary gland for milk protein synthesis. R1-R6.
- Backwell, F.C.R., B.J. Bequette, D. Wilson, J.A. Metcalf, M.F. Franklin, D.E. Beever, G.E. Lobley, and J.C. MacRae. 1996. Evidence For the utilization of peptides for milk protein synthesis in the lactating dairy goat in vivo. Am. J. Physiol. 271:R955-R960.
- Barrtels, J.R., and A.L. Hubbard, 1988. The establishment of the hepatocyte cell surface polarity during fetal liver development. Trends Biochem. Sci. 13, 181-184.
- Benajiba, A., and S. Maroux. 1980. Purification and characterization of an aminopeptidase A from dog intestinal brush border membrane. Eur. J. Biochem. 107:381-88.
- Bequette, B.J., C.E. Kyle, L.A. Crompton, V. Buchan, and M.D. Hanigan. 2001. Insulin regulates milk production and mammary gland and hind leg amino acid fluxes and blood flow in lactating goats. J. Dairy Sci. 84:241-255.

- Bequette, B.J., F.R.C. Backwell, and L.A. Crompton. 1998. Current Concepts of Amino Acid and Protein Metabolism in the Mammary gland of the lactating ruminant. *J. Dairy. Sci.* 81:2540-2559.
- Bequette, B.J., M.D. Hanigan, A.G. Calder, C.K. Reynolds, G.E. Lobely, and J. C. MacRae. 2000. Amino acid exchange by the mammary gland of lactating goats when histidine limits milk production. *J. Dairy. Sci.* 83:765-775.
- Boisgard, R., E. Chanut, F. Lavalie, A. Pauloin, and M. Ollivier-Bousquet. 2001. Roads taken by milk proteins in mammary epithelial cells. *Livestock Production. Science* 70:49-61.
- Chen, H., E.A. Wong, and K.E. Webb, 1999. Tissue distribution of a peptide transporter mRNA in sheep, dairy cows, pigs, and chickens. *J. Anim. Sci.* 77:1277-1283.
- Choemon, K., H. Hattori and K. Yamauchi. 1982. Isolation and characterization of plasma membrane from lactating bovine mammary gland. *Biochemica et Biophysica Acta*, 689: 121-134.
- Choung, J.J., and D.G. Chamberlin. 1995. Effects of abomasal infusions of sodium caseinate and of casein hydrolysates varying in the relative proportions of peptides and free amino acids on milk production in dairy cows. *Journal of Dairy Research.* 62: 423-429.
- Collier, R.J. 1985. Nutritional, metabolic, and environmental aspects of lactation. In: Larson, B.L. (Eds.) *Lactation*. The Iowa State University Press. Ames. Iowa. pp. 80-127.
- Dasnielsen, E.M., G.M. Cowell, H. Sjostorn, and O. Noren. 1986. Translational control of an intestinal microvillar enzyme. *Biochem. J.* 235:447-451.
- Dasnielsen, E.M., O. Noren, H. Sjostorn, J. Ingram and A.J. Kenny. 1980. Aspartate aminopeptidase purification by immunoabsorbant chromatography and properties of the detergent and protease solubilized form. *Biochem. J.* 189:591-603.
- DiRienzo, D.B., 1990. Free and peptide amino acid fluxes across the mesentric and non-mesentric viscera of sheep and calves, Ph. D. Dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
- Feracci, H., S. Maroux, and D. Desnuelle. 1982. The amino acid sequence of the hydrophobic anchor of rabbit intestinal brush border aminopeptidase N. *Biochem. Biophys. Acta.* 684(1):133-136.
- Feracci, H., and S. Maroux. 1980. Rabbit intestinal aminopeptidase N. Purification and molecular properties. *Biochem. Biophys. Acta.* 599(2):448-463.
- Gal-Garber, O., and Z. Uni. 2000. Chicken intestinal aminopeptidase: Partial sequence of the gene, expression and activity. *Poultry Science.* 79:41-45.

- Guinard, J. and H. Rulquin. 1994. Effects of graded levels of duodenal infusions of casein on mammary uptake in lactating cows. 2. Individual amino acids. *Journal of Dairy Science* 77, 3304-3315.
- Hafkenschied, J.C.M., 1987. Aminopeptidases and amino acid arylamidase. *Methods of Enzymatic Analysis*. Third Edition. Vol. 5. 2-9.
- Hanigan, M.D., B.J. Bequette, L.A. Crompton and J. France. 2001. Modeling mammary amino acid metabolism. *Livestock Production Science*. 70:63-78.
- Hassan, H.T., H.G. Drexler, 1995. Interleukins and colony stimulating factors in human myeloid leukemia cell lines. *Leukemia and Lymphoma*. 20:1-15.
- Hideyuki, Saito., O. Masahiro, T. Tomohiro, S. Sasaki, and K.I. Inui. 1995. Cloning and characterization of a rat H<sup>+</sup> / peptide cotransporter mediating absorption of  $\beta$ -lactam antibiotics in the intestine and kidney. *JPET*. 275:1631-1637.
- Hiwada, K., T. Ito and M. Yokoyama. 1980. Isolation and characterization of membrane bound arylamidase from human placenta and kidney. *Eur.J. Biochem*. 104:155-165.
- Hooper, N.M., R.J. Hesp, and S. Tiekou. 1994. Metabolism of aspartame by human and pig intestinal microvillar peptidase. *Biochem. J*. 298: 635-639.
- Ihara, T., Tsujikawa, T. Fujiyama, Y. and T. Bamba. 2000. Regulation of pept-1 peptide transporter expression in the rat small intestine under malnourished conditions. *Digestion*. 61:59-67.
- Jarvinen, M., and V.K. Hopsu-Hava, 1975.  $\alpha$ -N-benzoyl-L-arginine-2-naphthylamide hydrolase (cathepsin B1) from rat skin. I. Preliminary experiments with skin extract. *Acta Chem. Scan*. 29:772-780.
- Jenness, R. 1985. Biochemical and nutritional aspects of milk and colostrum. Larson, B.L. (Eds.) *Lactation*. The Iowa State University Press. Ames. Iowa. pp. 164-195.
- Jiang, Q., M. Troyanovskaya, G. Jayaraman, and D.P. Healy. 2000. Aminopeptidase- A. II. Genomic cloning and characterization of the rat promoter. *Am. of Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol*. 278: R425-R434.
- Kehlen, A., B. Goehring, J. Langner, and D. Riemann, 1998. Regulation of the expression of aminopeptidase A, aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 in renal carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by cytokines and cAMP increasing mediators. *Clin. Exp. Immunol*. 111: 435-441.
- Kenny, A. J., S.L. Stephenson, and A.J., Turner. (1987) Cell surface peptidase. In: *Mammalian Ectoenzymes*, A.J. Kenny and A.J. Turner (eds), pp. 169-210, Elsevier, Amsterdam.

- Kenny, J., and S. Maroux. 1982. Topology of microvillar membrane hydrolases of kidney and intestine. *Physiol. Rev.* 62:91-128.
- Kim, Y.S and E.J. Brophy. 1976. Rat intestinal brush border membrane peptidase I. Solubilization, purification and physiochemical properties of two different forms of enzymes. *J. Biol. Chem.* 251:3199-205.
- Kirshchke, H., J. Langner, B. Wiederanders, S. Ansorge, P. Bohley, and U. Broghammer, 1976. Intracellular protein breakdown. VII. Cathepsin L and H; Two new proteins from rat liver lysosomes. *Acta. Biol. Med. Germ.* 35:285-299.
- Larson, B.L. Biosynthesis and cellular secretion of milk. 1985. In. Larson, B.L. (Eds.) *Lactation. The Iowa State University Press. Ames. Iowa.* pp. 129-162.
- Lazdunski, C., J. Busuttil, and A. Lazdunski. 1975. Purification of Aminopeptidase H from *e.coli*. *Eur. Chem.* 60: 363-369.
- Lehky, P., J. Lisowski, D.P. Walf, H. Wacker and E.A. Stein. 1973. Pig Kidney Particular aminopeptidase. Zinc metalloenzyme. *Bioch. Bioph. Acta* 321(1):274-81.
- Look, A.T., R.A., Ashmun, L.H. Shapiro and S.C. Peiper. 1989. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD 13 (gr 150) is identical to aminopeptidase N. *J. Clin. Invest.* 83:1299-1307.
- MacRae, J. C., P.J. Buttery, and D.E. Beever. 1988. In *Nutrition and Lactation in Dairy Cows.* Pages 55-75. P.C. Gransworthy, ed. Butterworths, London, United Kingdom.
- Maroux, S., and H. Feracci, 1983. Structure and biosynthesis of aminopeptidase. *Methods Enzymol.* 96:406-412.
- Massey, K.A., C.H. Blakeslee, and H.S. Pitkov. 1998. A review of physiological and metabolic effects of essential amino acids. *Amino Acids.* 14:271-300.
- MecNair, D.C., and A.J. Kenny, 1979. Proteins of the kidney microvillar membrane. The amphipathic form of dipeptidyl peptidase IV. *Biochem. J.* 179(2):379-395.
- Metcalf, J.A., J.D. Sutton, J.E. Cockburn, D.J. Napper, and D.E. Beever. 1991. The influence of insulin and amino acid supply on amino acid uptake by the lactating bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science* 74: 3412-3420.
- National Research Council. 1989. *Nutrient Requirement of Dairy Cattle.* 6 rev. ed. Natl. Acad. Washington, DC.
- Noren, O., E. Dabelsteen, P.E. Hoyer, J. Olsen, H. Sjostrom, and G.H. Hansen. 1989. Onset of transcription of the aminopeptidase N (leukemia antigen CD 13) gene at the crypt/villus transition zone during rabbit enterocyte differentiation. *FEBS. Lett.* 259(1):107-112.

- Okinati, A., T. Nishimura, Y. Otsuka, U. Matsukura and H. Kato, 1980. A purification and properties of BANA hydrolase H of rabbit skeletal muscle, a new enzyme hydrolysing  $\alpha$ -N-Benzoyl-arginine- $\beta$  haphthylamide. *Agric. Biol. Chem.* 44: 1705-1708.
- Okinati, A., T. Nishimura, Y. Otsuka, U. Matsukura and H. Kato, 1981. Characterization of hydrolase H, a new muscle protease possessing aminopeptidase activity. *Eur.J. Biochem.* 115: 269-274.
- Olsen, J., G.M. Cowell, E. Konigshfer, E.M. Danielsen, and O. Noren. 1988. Complete amino acid seence of human intestinal aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA. *FEBS. Lett.* 238(2):307-314.
- Olsen, J., G.M. L. Lausten, U. Karnstrom, H. Sjostrom ann O. Noren. 1991. Tissue specific interactions between nuclear proteins and the aminopeptidase N promotor. *The Journal of Biological Chemistry.* 266(27):18089-18096.
- Remond, D., L. Bernard, and C. Poncet. 2000. Amino acid flux in ruminal and gastric veins of sheep: Effects of ruminal and omasal injections of free amino acids and carnosine. *J. Anim. Sci.* 78:158-166.
- Remond, D., L. Bernard, and C. Poncet. 2000. Free and peptide amino acid net flux across the ruman and the mesenteric and portal drained viscera of sheep. *J. Anim. Sci.* 78:1960-1972.
- Rhyu, M.R., T. Nishimura, Y. Kato, A. Okitani and H. Kato. 1992. Purification and properties of aminopeptidase H from chicken skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 308:53-59.
- Saito, H., Okuda, M. Terada, S. Sakai, and K.I. Inui. 1995. Cloning and characterization of a rat  $H^+$  peptide cotransporter mediating absorption of  $\beta$ -lactam antibiotics in the intestine and kidney. *275(3): 1631-1637.*
- Sanderink, J.G., Y. Artur, and G. Siest, 1988. Human aminopeptidase: a review of the literature. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 26:795-807.
- Shapiro, L.H., R.A. Ashmun, W.M. Roberts, and A.T. Look. 1991. Separate promoters control transcription of the human aminopeptidase N gene in myeloid and intestinal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry.* 266 (18): 11999-12007.
- Shennan, D.B., 1992.  $K^+$  and  $Cl^-$  transport by mammary secretory cell apical membrane vesicles isolated from milk. *J. Dairy Research.* 59: 339-348.
- Shennan, D.B., I.D. Millar and D.T. Calvert. 1997. Mammary tissue amino acid transport systems. *Proceeding of the Nutrition Society.* 56: 177-191.
- Shennan, D.B., D.T. Calvert, F.R.C. Backwell, and C.A.R. Boyd. 1998. Peptide aminonitrogen transport by the lactating rat mammary gland. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1373: 252-260.

- Shennan, D.B., F.R.C. Backwell, and D.T. Calvert. 1999. Metabolism of aminoacyl-p-nitroanilides by rat mammary tissue. *Biochimica et Biophysica Acta* 1427: 227-235.
- Shipp, M.A., and A.T. Look. 1993. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane associated enzymes. *Blood*. 82:1052-1070.
- Singh, H., and G. Kalnitsky, 1978. Alpha-N-benzoylarginine-beta-naphthylamide hydrolase, an aminopeptidase from rabbit lung. *J. Biol. Chem.* 253:4319-4326.
- Singh, H., and G. Kalnitsky, 1980. Alpha-N-benzoylarginine-beta-naphthylamide hydrolase, an aminopeptidase from rabbit lung. *J. Biol. Chem.* 255:369-374.
- Smith, T.S., M. Grahm, E.A. Munn, S.E. Newton, D.P. Knox, W.J. Coadwell, D. McMichael-Phillips, H. Smith., W.D. Smith, and J.J. Oliver, 1997. Cloning and characterization of a microsomal aminopeptidase from the intestine of the nematode. *Biochim. Biophys. Acta* 1338:295-306.
- Stefanovic, V., P. Vlahovic, and M. Mitic-Zlatkovic. 1998. Receptor-mediated induction of human dermal fibroblast ectoaminopeptidase N by glucocorticoids. *Cell-Mol-Life-Sci.* 54:614-617.
- Stewartand, J.R., and A.J. Kenny.1984. Proteins of the kidney microvillar membrane. Biosynthesis of endopeptidase 24.11, dipeptidylpeptidase IV and aminopeptidase N and A in a pig kidney slices. *Biochem. J.* 224:549-558.
- Svensson, B., M. Danielsen, M. Staun., L. Jeppesen, and H. Sjostrom. 1978. An amphiphilic form of dipeptidyl peptidase IV from pig small intestinal brush border membrane. *Eur. J. Biochem.* 90:489-498.
- Terashima, H. and N. W. Bunnett. 1995. Purification and characterization of aminopeptidase M from muscle and mucosa of the pig intestine. *Gastroenterology.* 30:696-704.
- Tucker, H.A. 1988. Lactation and its hormonal control. *The Physiology of Reproduction.* 2235-2253.
- Tucker, H.A. 1999. Symposium: hormonal regulation of milk synthesis hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective. 2000. *J. Dairy Sci.* 83:874-884.
- Turner, A.J., R. Matsas and A.J. Kenny. 1985. Are there neuropeptides-specific peptides? *Biochem. Pharmacol.* 34:1347-1356.
- Vayro, S., R. Kemp, R.B. Beechey, and S. Shirazi-Beechey. 1991. Preparation and characterization of basolateral plasma-membrane vesicles from sheep parotid glands. *Biochem. J.* 279:843-848.



- Wang, S., K.E. Webb, Jr., and R.M. Akers. 1996. Peptide-bound methionine can be a source of methionine for the synthesis of secreted proteins by mammary tissue explants from lactating mice. *J. Nutr.* 126:1662-1672.
- Watt, V.M., and C.Y. Cecil, 1989. Amino acid sequence deduced from rat kidney cDNA suggested it encodes the Zn peptidase aminopeptidase N. *J. Biol. Chem.* 264:5480-5487.
- Webb, K.E., and J.C. Matthews. 1998. Peptides absorption and its significance in ruminants protein metabolism. In. Grimble, G.K., Backwell, F.R.C. (Eds.), *Peptides in mammalian protein metabolism*. Potland Press, London and Miami, pp. 1-9.

## 7. ABSTRACT

In the current study we isolated the APN mRNA and measured its expression in the mammary gland of ruminants by using a specific cDNA probe (obtained by RT-PCR) and antibodies, respectively. Biochemical assays performed on membrane vesicles isolated from the baso-lateral side of the gland showed an enzyme with  $270 \text{ pmol.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$  with a  $k_m = 57 \text{ }\mu\text{molar}$ . The partial mRNA sequence of the APN gene was deposited in the gene bank and was 84% homologous with APN in small intestine of human, rabbit and rat.

Aminopeptidase-N (APN) is an enzyme that belongs to the metalloproteinase enzyme family, which exists in many tissues and reacts on peptides that are uncharged on their amino terminus. In the intestinal microvilli the APN enzyme plays a major role in digestion process of peptides and proteins. Until recently the APN was not reported to be present in ruminant mammary gland.

Circulating free amino acids (FAA) in plasma are believed to be the main source for milk protein synthesis in the mammary gland of ruminants. However, recently it was shown in metabolic experiments that the mammary tissue is capable of uptake and utilize circulating peptide-bound amino acid (PBAA) from plasma to fulfill metabolic requirements for milk protein synthesis and secretion. However, the mechanism in which PBAA are taken up by the gland remains to be equivocal. Hence, in this study it was hypothesized that these PBAA undergo hydrolysis on the membrane facing the circulation of the secreting epithelial cells followed by delivery of FAA into the cells.

APN is believed to be one of the main routes that might be involved in AA metabolism, protein synthesis and secretion in the mammary gland of ruminants.

# **Expression of Aminopeptidase N in Ruminants Mammary Gland**

**M.Sc. Thesis**

**Submitted to:**

**The Faculty of Agricultural, Food and Environmental Sciences**

**The Hebrew University of Jerusalem**

**By:**

**Miri Cohen**

**Revohot**

**October 2001**

This work was carried out under the supervision of:

Dr. Sameer Mabweesh, The department of Animal Sciences, The Faculty of Agricultural, Food and Environmental Sciences, The Hebrew University of Jerusalem

And

Dr. Avi Shamai,

Department of Animal Science, Agricultural Research Organization, The Volcani Center, Bet  
Dagan