

אפיון היררכיית אוכלוסיות התאים השונות בעטין בקר תוך שימוש בכלים חדשניים לקביעת השונות
ביניהן וחשיבותן להתפתחות העטין ולתהליך התחלובה

Characterization of epithelial progenitors in the bovine mammary gland

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות
ע"י

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

Itamar Barash, Institute of Animal Science, Volcani Center, P.O. Box 6, Bet-Dagan
E-mail: Itamar.barash@mail.huji.ac.il

Gat Rauner, Institute of Animal Science, Volcani Center, P.O. Box 6, Bet-Dagan
E-mail: gat.rauner@mail.huji.ac.il

יולי, 2014

תמוז תשע"ד

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

איתמר ברש

חתימת החוקר

*

1. תקציר

- 1.1 הצגת הבעיה. שימוש אפשרי בתאי גזע בעטין בבקר עשוי לתרום לשיפור ההמשכיות בתחלובה. לשם כך, יש לאפיין אותם המסגרת ההיררכיה הכללית של תאים אפיתליאליים בבלוטת החלב.
- 1.2 שיטות עבודה. הפרדת תת-אוכלוסיות התאים במכשיר FACS. בחינת ביטוי גנים ב RT-PCR, השתלות תאי בקר לבלוטת עטין של עכבר ומניפולציות סיסטמיות ורקמתיות. השתלת אוכלוסיות בקר מופרדות לאפיון פעילות תאי גזע ברקמה. טיפול בקסנתוזין ברקמת בקר מושתלת ומעקב אחרי תאים צוברי BrdU ושינוי באוכלוסיות התאים ברקמה.
- 1.3 תוצאות עיקריות. 1. תאי אפיתל מבלוטת חלב מבקר הופרדו על פי הסמנים הממברנליים CD24 ו CD49f ל- 4 אוכלוסיות: תאי גזע, תאי אב לומינליים תאים בזאליים ותאים לומינליים ממוינים. אוכלוסיות אלה אופיינו בתרבות ואוכלוסיית תאי הגזע אופיינה גם על פי יכולתה (הבלעדית) ליצור מבנים אפיתליאליים ברקמת השומן של הבלוטה העכברית לאחר השתלה. נבחנו שלש שיטות להשראת ולשיפור התנאים להשתלות ולהתפתחות מלאה של תאי בקר ברקמת עכבר. הגדלת הפיברוסיות של הרקמה, טיפול הורמונלי ויצירת כימרות עם תאי עכבר. הגדלת הפיברוסיות אפשרה קליטה טובה יותר של התאים המושתלים. טיפול בסטרואידים אפשר התפתחות מבנים פונקציונליים מבקר, אך רק במקרה בודד. נקבעה השפעה פארקרינית שלילית של רקמת השומן על התפתחות מבנים אפיתליאליים ממקור זר, הן *in vivo* והן *in vitro*. רקמת בלוטת עטין בקר הושתלה לעכברים כמודל לטיפול בקסנתוזין שנועד להשפיע על מספר תאי הגזע. התוצאות של BrdU retention, הפרדת האוכלוסיות ובחינת הפונקציונליות שלהן מראה כי טיפול בקסנתוזין, אשר דווח כמשפיע על BrdU retention בעגלות בנות 3 חודשים, אינו משפיע על אוכלוסית תאי הגזע, או כל אוכלוסית תאים אחרת לטווח הארוך בעגלה הבוגרת. יותר מכך, לקסנתוזין השפעה לטנטית ח לדיכוי חלוקת התאים בבלוטה כתוצאה מהשפעה מדכאת על ביטוי החלבון IMPDH.
- 1.4 מסקנות והמלצות: אוכלוסית תאים בבלוטת החלב של בקר אופיינה במחקר זה ויש בידנו כלים יחודיים לקבוע השפעות שונות על התפתחותה ופעילותה. בכונתנו לפתח שיטות אלטרנטיביות לטיפול בקסנתוזין – תזונתיות ופרמקולוגיות, על מנת לשפר את אוכלוסית תאי הגזע קודם להמלטה.

2.1 מטרת המחקר

המטרות הספציפיות של המחקר הן:

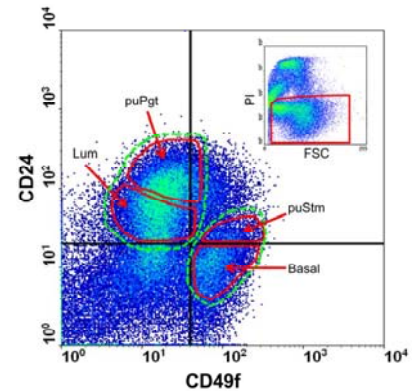
1. אפיון אוכלוסיות התאים השונות וההיררכיה התאית בעטין בקר תוך שימוש בטכנולוגיה של הפרדה על ידי FACS. מעקב אחר התמיינות תאי האב הממוינים חלקית עד לתא המחויב.
2. מעקב אחרי השינויים באוכלוסיות התאים השונות בעטין עגלות שיטפולו בקסנתוזין לשיפור מספר תאי הגזע ובעכברים מושתלים בתאי עטין בקר. קביעה ואיתור צווארי בקבוק בהתמיינות התאים עד לתא הפונקציונלי.

2.2 פרוט עקרי הניסויים

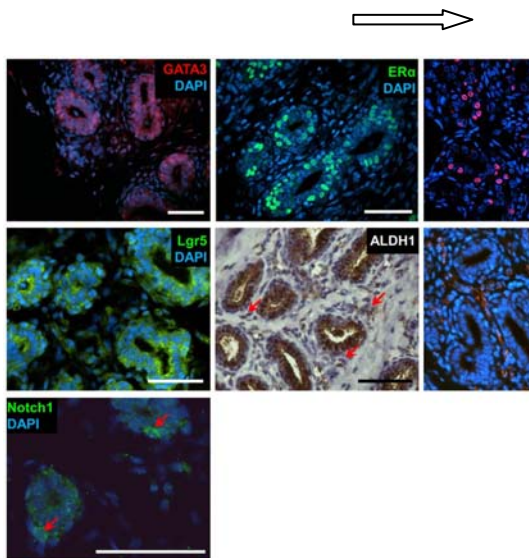
אורגנואידים הופקו מהרקמה הפרנכימתית של בלוטת החלב של עגלות בנות 7-10 חודשים והוקפאו. בהמשך, בוצע עיכול אנזימתי מלא והופקה הפרקציה האפיתיליאלית. סלקציה שלילית נערכה לתאים לא מעורבים (Lin^-) תוך שימוש בקיט ספציפי, ואוכלוסיות התאים הנבחרת הופרדה במכשיר FACS הנמצא ביחידה לשרותים ביולוגיים של מכון ויצמן לארבע תת אוכלוסיות לא מוכרות בהתאם לרמות הביטוי של הסמנים המברנליים CD24 ו-CD49f (תמונה 1). זאת על פי אינפורמציה שהתקבלה לגבי הפרדת תאי עכבר. על סמך אינפורמציה זו כונו ארבע האוכלוסיות, באופן היפותטי: תאי גזע (puStm), תאים בזאליים (Basal), תאי אב (puPgt) ותאים לומינליים ממוינים (Lum). אוכלוסיות אלה אופיינו בהתאם למדדים

הבאים: 1. ביטוי גנים נבחרים (תמונה 2). 2. מיקום החלבונים ברקמה (תמונה 3). 3. יצירת קלונים בזאליים ולומינליים ויכולת חלוקה על פני זמן (תמונה 4). ו- 4. יצירת ממסופרות צפות אשר מהוות מדד להימצאות תאי גזע (תמונה 5).

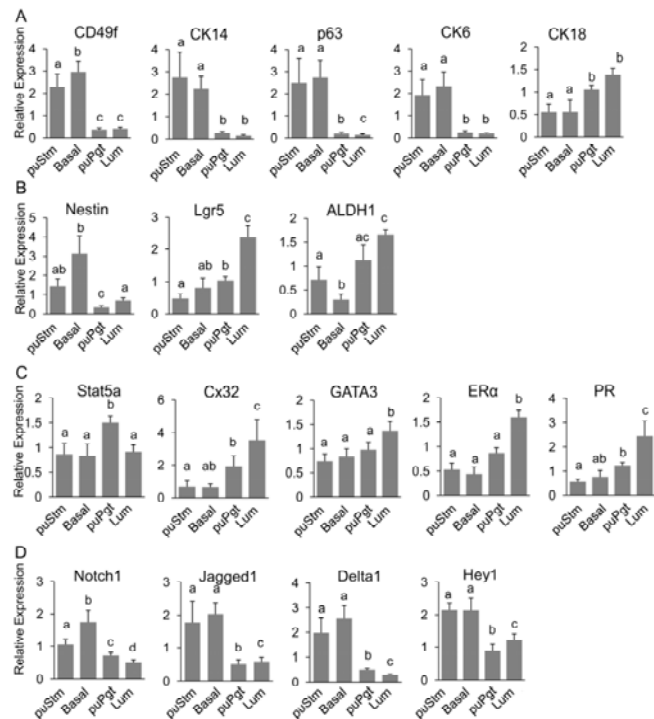
תמונה 1. הפרדת אוכלוסיית תאי בקר ל 4 אוכלוסיות תאים נפרדות.

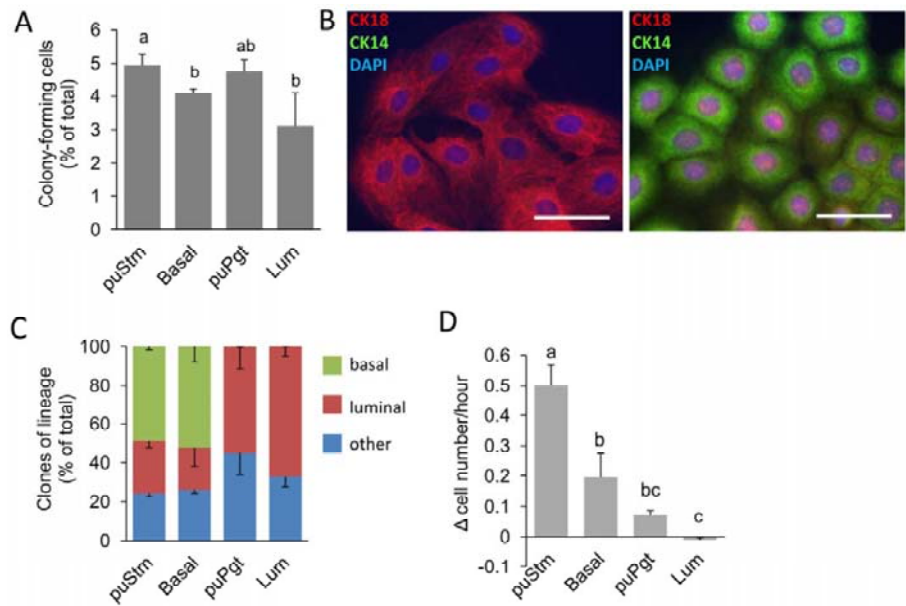


תמונה 2. אנליזת ביטוי גנים באוכלוסיות התאים המבודדות.



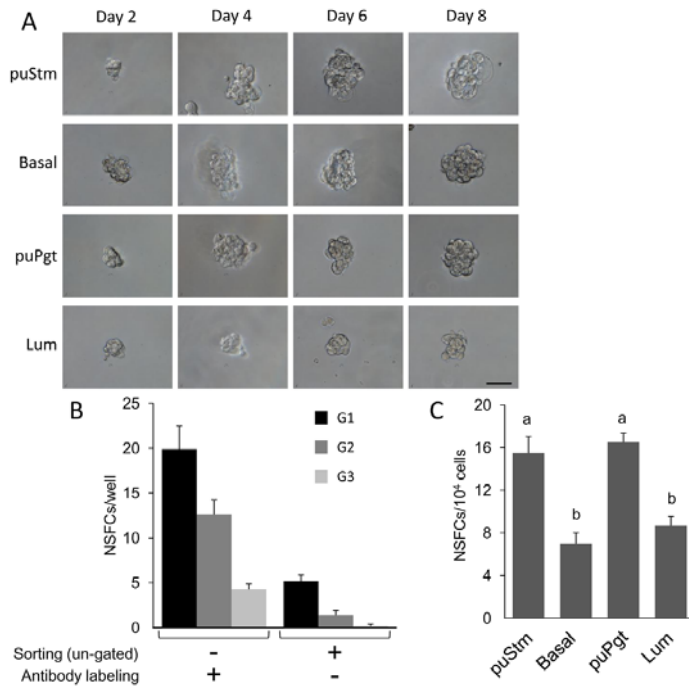
תמונה 3. מיקום חלבונים נבחרים ברקמה בשיטת אימונו היסטוכימיה.





תמונה 4. יצירת קלונים בזאליים ולומינליים (מספר וחלק יחסי, עפ"י ביטוי CK-14 ו-CK-18, בהתאמה A-C), ושינוי במספר התאים לאורך זמן (D).

תמונה 5. יצירת ממוספרות צפות בעלות מבנה לא ספרי בתרבית על ידי אוכלוסיות התאים השונות.

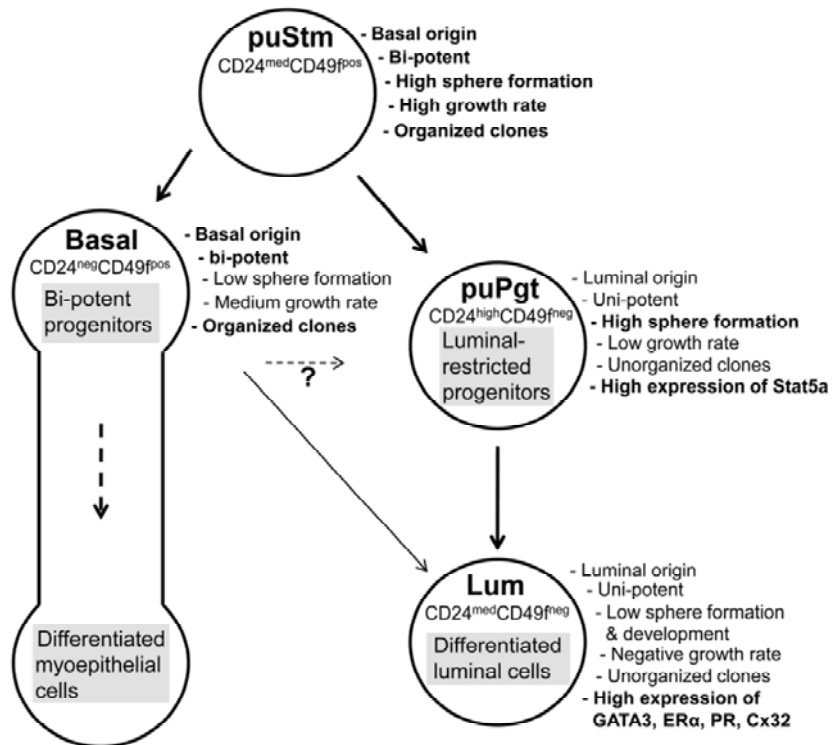


על סמך אנליזות אלה ואנליזות נוספות המתוארות בפרוט במאמר שהתפרסם על סמך תוצאות אלו:

Rauner and Barash 2012. Cell Hierarchy and Lineage Commitment in the Bovine

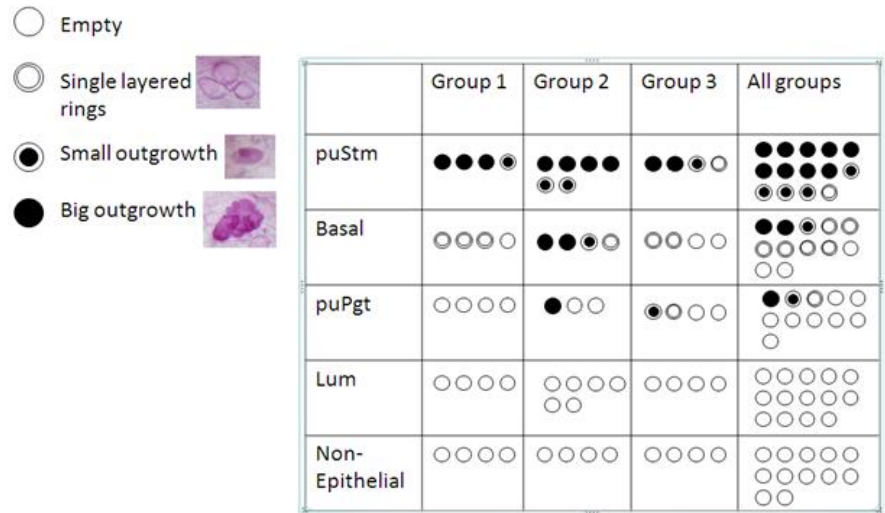
נקבע כי אכן האוכלוסיות המופרדות שונות במהותן ומהוות בסיס להיררכיה התאית בבלוטת העטין. תמונה 6 מסכמת את תרומת האנליזות השונות ומתארת את ההיררכיה התאית המתקבלת.

תמונה 6. קיבוץ האנליזות השונות של אוכלוסיות התאים המופרדות להיררכיה תאית. כתב מודגש מיצג רמות או פוטנציאל גבוה.
 PuStm- Putative Stem Cells
 PuPgt – Putative progenitors
 Lum - Luminal



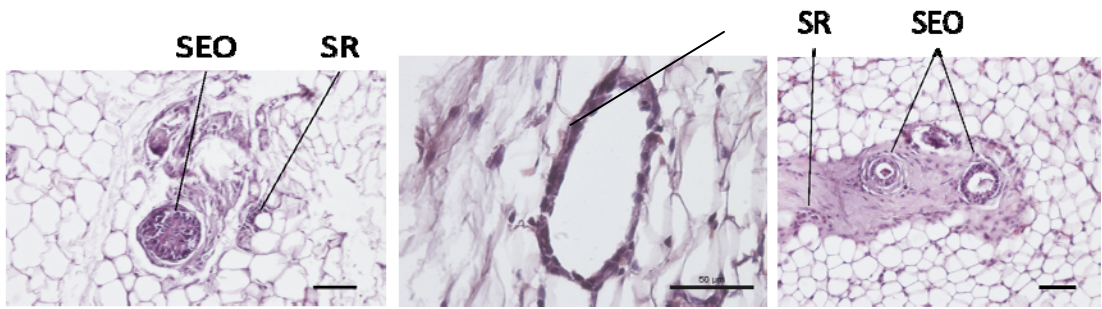
בקצרה, תאי הגזע אופיינו למקור בזאלי וכתרבות הראו "רב תכליתיות" ביכולתם לתת מוצא למושבות תאים הן ממוצא לומינלי והן ממוצא בזאלי. הם יצרו מספר רב של מושבות צפות (ממוספרות) המעידות על קיום תאי גזע, מספר חלוקות גבוה ומושבות תאים מאורגנות. (בהמשך, הועשרה אוכלוסייה מעניינת זו על ידי הכללת המאפיין של פעילות ALDH). התאים הבזאליים שמרו גם הם על רב תכליתיות ביכולתם לתת מוצא למושבות תאים אפיתליאליים בזאליים ולומינליים, ובטווח הארוך אף יצירת מושבות מאורגנות. אולם רמת יצירת המושבות הצפות ומספר החלוקות הפוטנציאליות של התאים היה נמוך מזה של תאי הגזע. תאי האב (puPgts) יצרו בתרבות מושבות לומינליות בלבד. הם עדיין שמרו על יצירת מושבות צפות רבות, אך פוטנציאל החלוקה שלהם היה נמוך יחסית. המושבות שיצרו היו בלתי מאורגנות והם הראו רמת ביטוי גבוהה של Stat5a המאפיינת תאי אב בבלוטת עטין עכבר. התאים שנקבעו על סמך רמות הביטוי של CD24 ו-CD49f נתנו מוצא למושבות לומינליות בלבד והראו רמה נמוכה של יצירת מושבות צפות ופוטנציאל חלוקה. הם יצרו מושבות לא מאורגנות בתרבות ובטאו ברמה גבוהה יחסית את הגנים ל GATA3, ERα, PR Cx32. אינטגרציה של ממצאים אלה מדגימה לראשונה כי אוכלוסיית התאים בעטין הבקר מקיימת באופן בסיסי את המדדים שנקבעו עבור אוכלוסיות דומות מעכבר ואדם. תאי גזע נותנים מוצא לתאי אב בי-פוטנטיים המתמיינים בעיקר לכוון הבזאלי/מיואפיתליאלי. תאי הגזע יוצרים גם תאי אב לומינליים, המתמיינים בכוון זה עד לתאים לומינליים ממיינים בעלי פוטנציאל יצרני. לתאי הגזע ממקור בקר נקבעו גם מאפיינים ספציפיים הכוללים ביטוי ייחודי של חלבונים.

הדרך האולטימטיבית לקביעת פעילות תאי גזע היא כמובן *in vivo*, לאחר השתלתם לרקמת השומן של בלוטת חלב שהוסרו ממנה המבנים האנדוגניים. אכן, בהמשך לעבודה זו הצלחנו להוכיח כי רק לתאי הגזע יכולת ליצור מבנים לאחר השתלתם לרקמת השומן העכברית (תמונה 7), וכי יכולת זו נשמרת גם להשתלות חוזרות (לא מודגם).

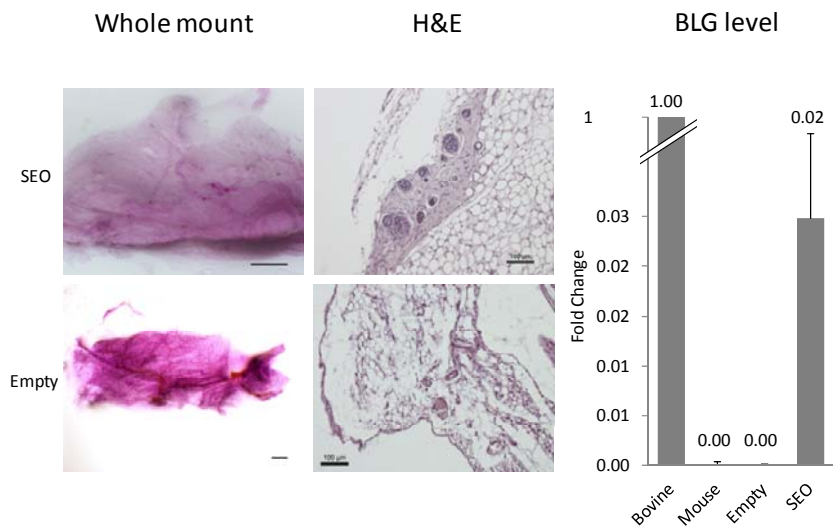


תמונה 7. תוצאות השתלת אוכלוסיות תאי עטין בקר לבלוטת העטין של עכבר מדוכא חיסונית. התוצאות מראות כי מבנים מורפולוגיים חלולים (Big outgrowth) הדומים במאפיהם לאלו של בלוטת חלב מבקר התפתחו בעיקר לאחר השתלת הפרקציה puStm. תוצאות אלה, הושלמו בבחינת הפרמטר של חידוש עצמי, אשר גם הוא יחודי לתאי גזע ו מעידות כי הנחתנו שפרקציה זו מועשרת בתאי גזע היא נכונה.

השתלת תאים מסוג אחד של יונק בסוג אחר (Xenotransplantation) מאתגרת, ובספרות לא מתוארת הצלחה בהשתלת אוכלוסיית תאים מבלוטת חלב של בקר לעכברים מדוכאים חיסונית (Nude mice). בשלב ראשון נבחנה בעבודתנו השתלת כלל אוכלוסיות התאים ממקור בלוטת חלב של בקר לבלוטות החלב של עכברים מדוכאים חיסונית NOD/SCID מהן הוסרו המבנים האפיתליאליים. 42 ימים לאחר ההשתלה בוצעה ביופסיה לבלוטה המושתלת ונגלתה התפתחותם של שני סוגי מבנים. Spherical epithelial outgrowth (SEOs) – Small rings (SRs). הינם מבנים ספריים רב שכבתיים אשר על פי רוב מתפתחים במרחב עשיר בפיברובלסטים. SRs הינן טבעות חד שכבתיות המתפתחות במגע עם רקמה שומנית (תמונה 8). זאת בניגוד לצינוריות החודרות את רקמת השומן העכברית, או ל נאדיות המתפתחות בקצה הצינוריות ממקור בקר. מקורם של המבנים המושתלים אושר לאחר קביעת קיום הרצף לגן beta-lactoglobulin הקיים רק בבקר בDNA שהופק ממבנים מקובעים בעזרת קיט מיוחד (תמונה 9). ברמת ביטוי החלבון אושר מקורם של המבנים על ידי הגבה עם נוגדן לנוקלאולין ממקור בקר או על ידי תגובה עם נוגדן שהכנו במעבדה לרצף סינתטי מהחלבון NFkB ממקור בקר בעל הומומולוגיה נמוכה לחלבון העכברי (תמונה 10) בהמשך בחרנו לא להשתמש בנוגדן שפתינו לאור ספקות שהתעוררו בהקשרת לספציפיות המוחלטת שלו לתאי בקר (ולא לעכבר).

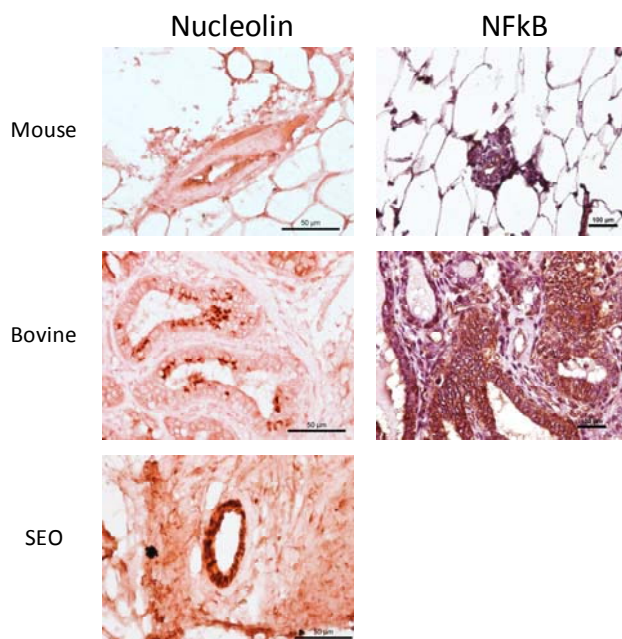


תמונה 8. מבנים ספריים וטבעתיים מתפתחים בבלוטת השומן של עכבר לאחר השתלת אוכלוסיה כללית של תאי בקר.

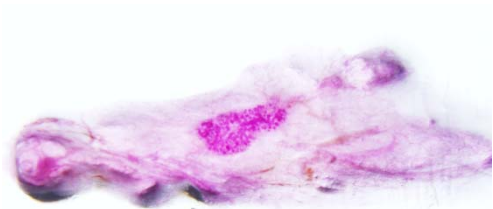
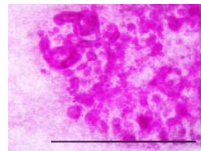


תמונה 9. אישור המקור (בקר) של SEO על ידי קביעת קיום רצף מגן ה- β -lactoglobulin.

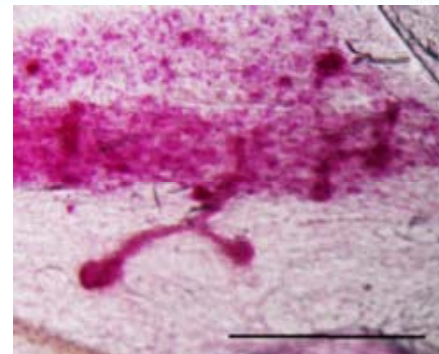
תמונה 10. זיהוי אימונוהיסטוכימי של מבנים אפיתליאליים ממקור בקר בבלוטת חלב חסרת צינוריות אנדוגניות של עכבר מדוכא חיסונית.



על מנת לגרום למבנים הספריים (SEOs) להתפתח לצינוריות, או מבנים מורכבים יותר בבלוטת החלב של העכבר נבחנו שלוש שיטות. 1. הגברת הפיברוטיות של הרקמה על ידי השתלת פיברובלסטים לפני וביחד עם השתלת אוכלוסיות התאים הכללית ממקור בקר. 2. טיפול הורמונלי נמשך באסטרוגן ופרוגסטרון. הורמונים אלה הם הגורם הסיסטמי העיקרי להתארכות הצינוריות ולהסתעפותן, בהתאמה. 3. יצירת מבנים כימריים המשלבים בין תאי עכבר ובקר. מפאת מגבלות מקום לא ניתן להביא את כל הנתונים שהצטברו והתוצאות יוצגו במפורט בדוח הבא. בקצרה, טיפול בהשתלת פיברובלסטים לא הביא לשינוי במבנה הצינוריות, טיפול הורמונלי הביא לפחות במקרה אחד ליצירת מבנים המזכירים את ה TDLU ההומני (היחידה הפונקציונלית בשד ההומני, תמונה 11) ויצירת כימרות בהרכבי תאים מסוימים הביאה ליצירת מבנים דמויי Endbuds (תמונה 12).



תמונה 11. יצירת מבנה מורכב דמוי TDLU מתאי בקר שהשתלו בבלוטת חלב מעכבר.

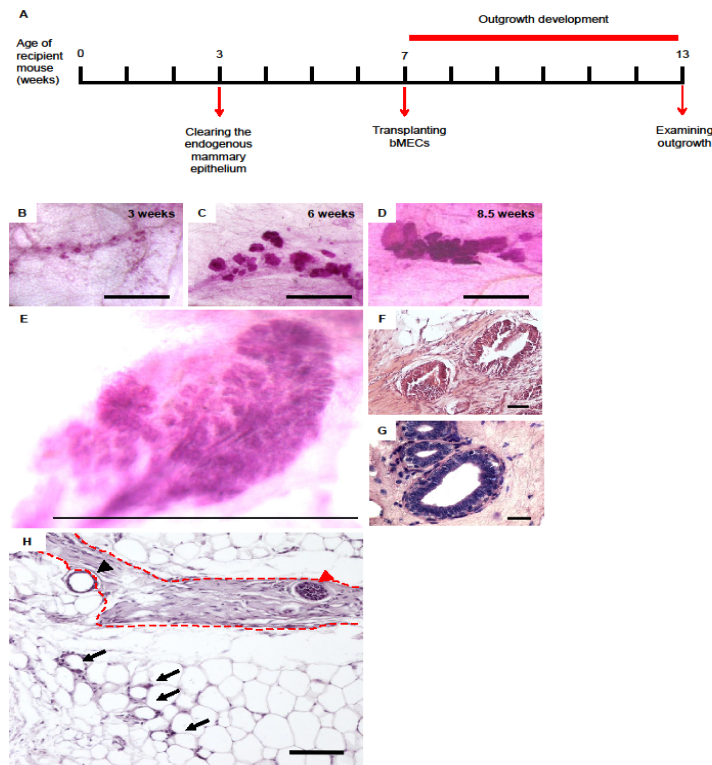


תמונה 12. יצירת Endbuds בבלוטת עטין כימריה המורכבת מתאי בקר ועכבר.

השתלת תאי בקר לרקמת השומן של בלוטת עטין עכבר NOD-SCID אפשרה התפתחות נמשכת של מבנים אפיתליאליים מבקר

על מנת לבחון את התפתחותם של התאים האפיתליאליים בסטרומה העכברית, תאים אפיתליאליים מבלוטת החלב של עגלות (7-10 חודשים) הושטלו לבלוטת החלב של עכבר מדוכא חיסונית NOD-SCID, ממנה הוסרה קודם לכן מערכת הצינוריות האנדוגנית (תמונה 13) בגיל 3 שבועות. שבועיים לאחר מכן הושטלו תאי הבקר. מבנים אפיתליאליים ממקור בקר אופיינו החל משלשה שבועות לאחר ההשתלה. אלה המשיכו להתפתח עד תום המעקב – 8.5 שבועות לאחר ההשתלה. בכך נפרץ המחסום של התפתחות בת

ששה שבועות שנקבעה בעכברים ערומים (Nude mice). המבנים ממקור בקר הכילו חלב הדומה לזה הקיים באלואלי מעטין עגלה, אך התפתחות של צינורות לא אופיינה. התפתחות המבנים הרב שכבתיים מוקמה באזורים פיברוטיים (תמונה 13H). מבנים חד שכבתיים עגולים אופיינו בגבול שבין האזורים פיברוטיים ורקמת השומן של העכבר. בין תאי השומן של בלוטת החלב של העכבר מוקמו תאים אפיתליאליים בודדים מבקר ללא כל ארגון או מורפולוגיה. הסטרומה העכברית הוצאה, נצבעה בקרמין אלום (אדום ורוד) ותחת הבינוקולר הוצאו המבנים הרב שכבתיים ממקור בקר וקובעו בבלוק פארפין. חתכים מוצגים בתמונות 13H,F.



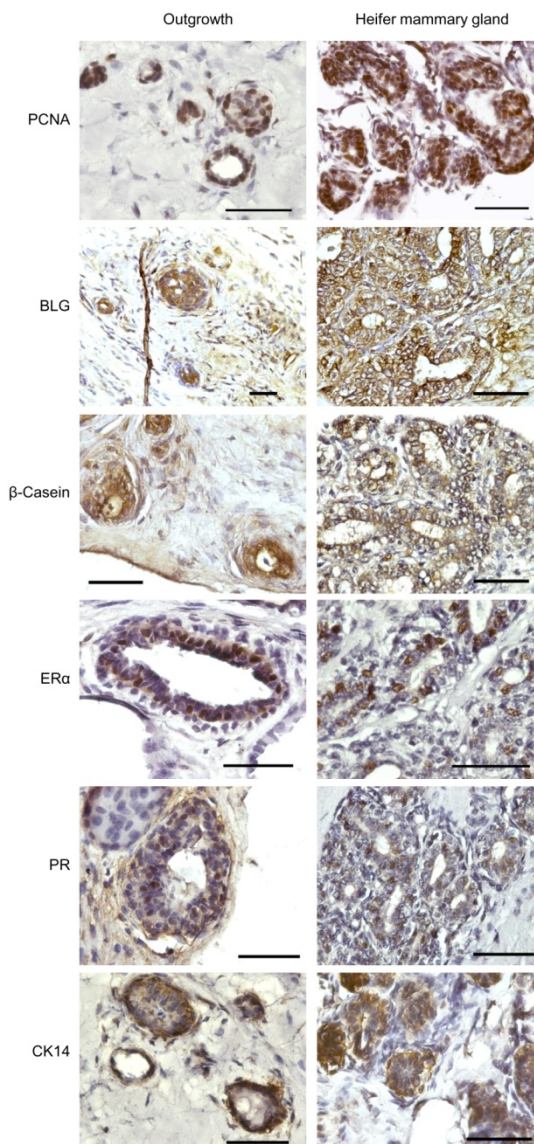
תמונה 13. יצירת מבנים אפיתליאליים ממקור בקר בבלוטת עטין של עכבר. A. פרוצדורת הניסוי. B-D התפתחות המבנים מבקר לאורך זמן. E. צביעת קרמין של Wholemount מבלוטת חלב של עגלה. F- חתך היסטולוגי של מבנה אפיתליאליים מבקר שהתפתח מבלוטת חלב של עגלה. G. חתך היסטולוגי מבלוטת חלב של עגלה. H. התפתחות המבנים הרב שכבתיים מוגבלת לאזורים פיברוטיים. בינם לבין רקמת השומן העכברית מתפתחים מבנים חד שכבתיים, ובין תאי השומן של הסטרומה העכברית קימים תאי בקר פזורים ללא התארגנות.

למבנים מבקר שהתפתחו ברקמה העכברית מאפיינים דומים לאלו של עטין העגלה

אנליזה אימונוהיסטוכימית של חתכים היסטולוגיים (תמונה 14) הראתה דמיון בין מאפייני המבנים מבקר שהתפתחו בסטרומה העכברית לבין חתכים מרקמת עטין עגלה: ביטוי PCNA העיד על קצב חלוקת תאים דומה. ביטוי חלבוני החלב ביתא לקטוגלובולין וקזאין על ידי תאים לומינליים העיד על פעילות דומה, ביטוי

ER אלפא ו PR (רצפטורים לאסטרוגן ופרוגסטרוגן, בהתאמה) על ידי תאים מרוחקים מהלומן העיד על התמינות ומורפולוגיה דומה, וביטוי ציטוקרטיין 14 בתאים החיצוניים של המבנים העיד דמיון מורפולוגי ומיקומם המתאים של התאים המיואפיתליאליים במבנים ממקור בקר שהתפתחו בעכבר.

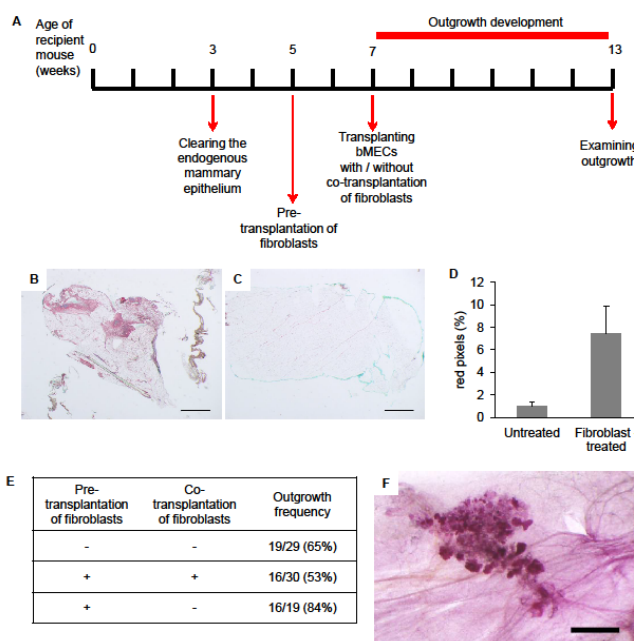
תמונה 14. איפיון אימונוהיסטולוגי של המבנים אשר התפתחו לאחר השתלת תאי בקר לבלוטת החלב העכברית בהשוואה למבנים האפיתליאליים בעטין עגלה.



השפעת הגברת הפיברוטיות של הסטרומה השומנית של עכבר על קליטה והתפתחות מבנים אפיתליאליים מבקר

לאחר שהראינו את התפתחותם של המבנים האפיתליאליים מבקר באזורים פיברוטיים בבלוטה, נבחנו האפשרות להפוך את הסטרומה השומנית מבקר לפיברוטית יותר (ובכך דומה לסטרומה של עטין הבקר) על ידי השתלת פיברובלסטים לפני ותוך כדי השתלת התאים האפיתליאליים ממקור בקר. הפרוצדורה מתוארת בתמונה 15. אכן, השתלת פיברובלסטים לפני השתלת תאי הבקר העלתה באופן משמעותי את מידת הפיברוטיות של הרקמה. זאת על פי צביעת Sirius Red (תמונה 3B-D). השתלת פיברובלסטים לפני השתלת התאים האפיתליאליים העלתה באופן מובהק את מספר הבלוטות בהן נקלטו תאי הבקר ופיתחו את המבנים הספריים עד ל- 84% מכלל הבלוטות שהושתלו. עם זאת, לא נמצא

שינוי במורפולוגיה שהתפתחה שהיתה מוגבלת למבנים ספריים בלבד ללא צינורות וללא חדירה לסטרומה של הבלוטה העכברית.



תמונה 15. השפעת הגברת הפיברוטיות של רקמת השומן על ידי השתלת פיברובלסטים על התפתחות מבנים אפיתליאליים מבקר. A. פרוצדורת הניסוי. B-D השפעת השתלת פיברובלסטים על מדד הפיברוטיות של הרקמה. B- צביעה לקולגן לאחר השתלת פיברובלסטים. C. ביקורת. D- כימות ההשפעה. E- השתלה מוקדמת של פיברובלסטים מגדילה את מספר הבלוטות בהם מתפתחים מבנים אפיתליאליים מבקר

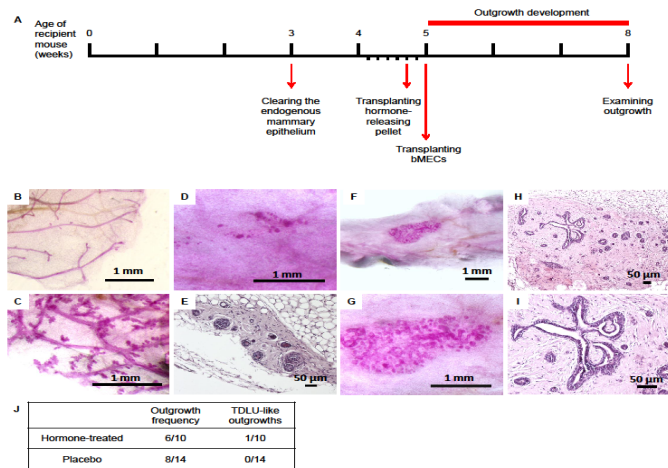
השפעת חשיפה לרמות סופר-פיזיולוגיות של אסטרוגן ופרוגסטרוגן על התפתחות המבנים האפיתליאליים מבקר

אסטרוגן ופרוגסטרוגן מבקרים את התארכות והסתעפות צינוריות החלב בבלוטת החלב המתפתחת, בהתאמה. במטרה לעודד צמיחת צינוריות חלב ממקור בקר בעכבר, נחשפו עכברים לרמות סופר-פיזיולוגיות של הורמונים אלה על ידי השתלה מוקדמת של pellet המשחרר כמויות קבועות של הורמונים אלה. הפרוצדורה מתוארת בתמונה 16.

נמצא כי אכן בלוטת חלב אנדוגניות של עכברה בתולה אשר נחשפה לרמות סופר-פיזיולוגיות של אסטרוגן ופרוגסטרוגן למשך שלשה שבועות היו מפותחות יותר מבחינת מספר הצינוריות ורמת המסועפות שלהן (תמונה 16B-C). רמות הורמונים הגבוהות לא השפיעו על מספר המבנים המתפתחים, אולם במקרה אחד התפתחה מורפולוגיה דומה מאד לזו של עטין הבקר. תמונות 16F,H מציגות מורפולוגיה אופיינית של

Terminal Ductal Units ממקור בקר אשר התפתח בסטרומה העכברית. עם זאת חדירה משמעותית לתוך הסטרומה העכברית לא הוצגה.

תמונה 16. השפעת טיפול באסטרוגן ופרוגסטרוגן על התפתחות בלוטת החלב של בקר בעכבר. A. הפרוצדורה. B, C בלוטות אנדוגניות ללא ולאחר טיפול בסטרואידים. D, E מבנים ספריים התפתחו במרבית הבלוטות. F-J התפתחות TDLU דמוי בקר בבלוטת העטין העכברית.

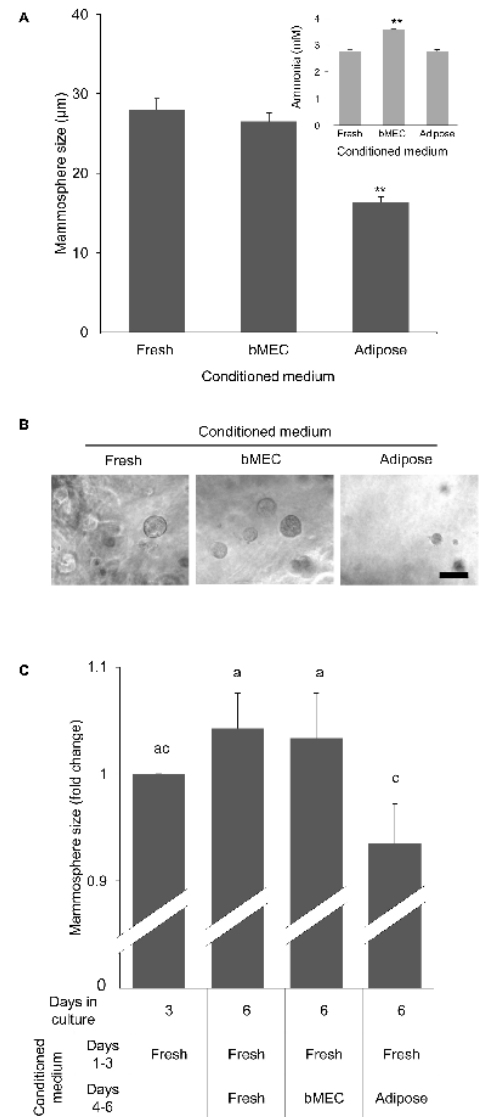


בהמשך נבחנה גם אפשרות יצירת מבנים כימריים בקר-עכבר שייצגו מורפולוגיה של בקר ברקמת הסטרומה העכברית. פרוצדורה מורכבת זו, שפותחה ופעלה עבור תאים ממקורות שונים אך לא מבקר אינה מוצגת. עם זאת היא מעידה על יחודיות תאי הבקר.

מהו מקור העיכוב של התפתחות תאי בקר בסטרומה השומנית העכברית?

על מנת לברר את הגורם (ים) המעכבים את התפתחות המבנים מבקר בסטרומה השומנית של העכבר, נערכו מספר ניסויים בתרבית (תמונה מס 17). הפרשה של גורם מעכב על ידי רקמת השומן נבחנה על ידי יצירת condition medium של רקמת השומן על ידי הדגרתו עם אקספולנטים מרקמת השומן העכברית משך 6 ימים. למדיום זה נחשפו ממוספרות אפיתליאליות המשמשות כמודל להווצרות מבנים אפיתליאליים בתוך מטריגל, בתרבית. כביקורת שימשו מדיום שהודגר עם תאים אפיתליים מבקר, או מדיום טרי. רמות אמוניה שמשו כמדד לטריות המדיום (inset). נמצא כי הדגרת תאים אפיתליאליים עם conditioned medium מרקמת השומן גרמה לדיכוי יצירת ממוספרות, או לקיומן לאחר שכבר נוצרו. ממצא זה מעיד כי קיים גורם מעכב המופרש מהרקמה השומנית המעכב התפתחות או קיום ממוספרות בתרבית ויתכן כי פועל גם בחיה עצמה לדיכוי התפתחות מבנים אפיתליאליים מבקר. את מהותו של גורם זה ודרכים לעקיפת השפעתו ראוי לברר בהמשך. בהתאם לתוכנית המחקר המקורית יחקרו בהמשך גם השפעת יצירת מבנים כימריים עכבר/בקר ברקמת השומן העכברית על אופי התפתחותם.

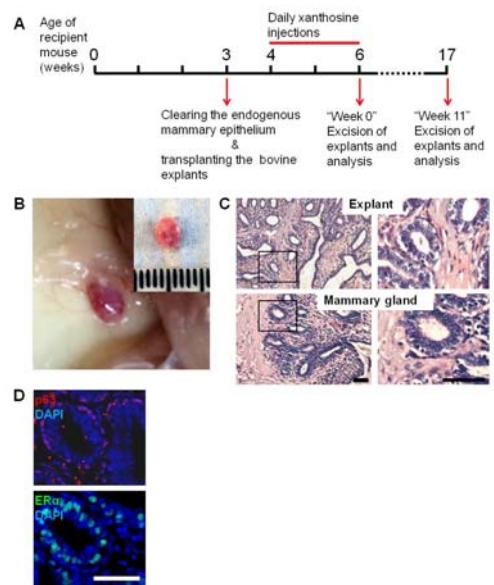
תמונה 17. השפעת Conditioned medium של רקמת שומן עכברית על התפתחות ממוספרות בתוך מטריגל בתרבית. A,B. Condition medium מרקמת השומן מדכא יצירת ממוספרות. C. גם לאחר שנוצרו הממוספרות, הוספת Condition medium מרקמת השומן מדכאת את קיומן.



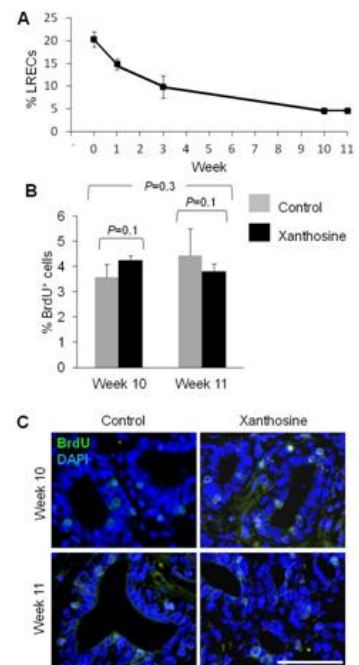
במקביל לנסינות אלה נמשך איפיון תאי גזע לאחר השתלה בתרבית ומסיונות של טיפול בקסנתוזין בעכברים הנושאים רקמת עטין מבקר למטרת בחינת שינוי במספר תאי הגזע. מ עבודה זו התבססה ובאה לבחון את ממצאיו ההקדמיים של Capuco, 2007 אשר היצעו כי טיפול בקסנתוזין עשוי לשפר את מספר תאי הגזע בבלוטת החלב.

מודל הבחינה התבסס על השתלת רקמת עטין עגלה בוגרת לרקמת השומן העכברית וקליטתה. לאחר הסרת אספקת דם נבחנה המורפולוגיה וקצב חלוקת התאים ואלה נמצאו זהות לבלוטת החלב האנדוגנית בעגלה (תמונה 18). בבחינת הקריטריון של BrdU retaining cells אשר להם מאפיין מוצע של תאי גזע לא נמצא הבדל בין הטיפול והביקורת 10 ו- 11 שבועות לאחר הטיפול (תמונה 19). גם לאחר הפרדת התאים FACS לא נמצאו שינויים בפרופורציות תאי הגזע 11 שבועות לאחר הטיפול בקסנתוזין (תמונה 20). או בביטוי גנים המשמשים כסמנים לתאי גזע (טבלה 1). באופן מפתיע נקבעה ירידה בטווח הארוך בקצב חלוקת

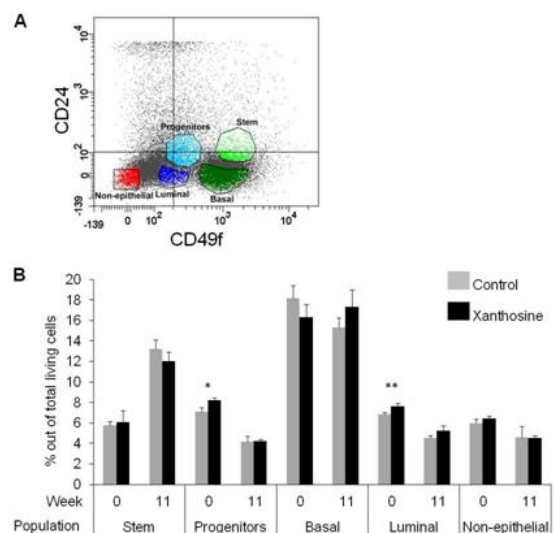
תמונה 18. מודל לבחינת השפעת קסנתוזין על תאי גזע בבלוטת החלב. A – תכנון הניסוי. B. רקמת עטין בקר מתפתחת בסטרומה השומנית העכברית. D, ביטוי אופיני של גנים - סמנים לתאים לומינליים ובזאליים.



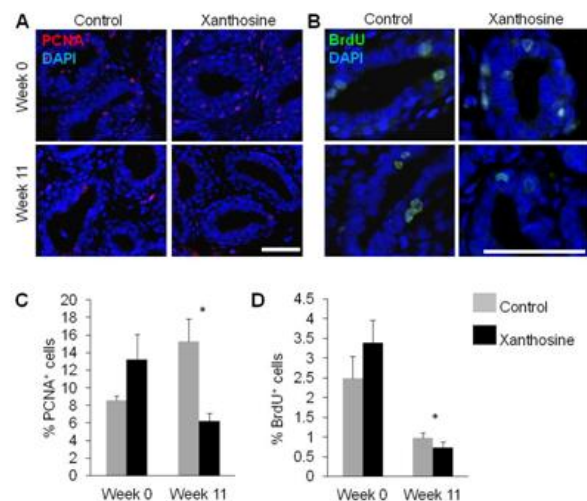
תמונה 19. לטיפול בקסנתוזין אין השפעה על תאים אוגרי BrdU בבלוטה. A. הירידה לאורך זמן במספר תאים אוגרי BrdU. B. לטיפול בקסנתוזין אין השפעה על תאים אוגרי BrdU. C. אופי האנליזה.



תמונה 20. לטיפול בקסנתוזין אין השפעה על שינוי בפרופורציות התאיות, ובכלל זה תאי הגזע, בטווח של 11 שבועות מהזרקתו.



תמונה 21. טיפול בקסנתוזין גורם לירידה בחלוקת תאים לאחר 11 חודשים.



טבלה 1. השפעת קסנתוזין על ביטוי גנים בבלוטת החלב המושתלת מבקר

Gene	Description	Week 0		Week 11	
		Xanthosine-induced change (fold control)	P	Xanthosine-induced change (fold control)	P
IMPDH2	IMPDH catalyzes the conversion of inosine monophosphate to xanthosine monophosphate; it is the rate-limiting step in guanine nucleotide biosynthesis	0.74	0.03	1.05	0.36
p53	p53 inhibits IMPDH	0.68	0.08	1.14	0.12
Ki67	Proliferation markers	0.88	0.33	0.55	0.003
Cyclin D1		0.72	0.004	0.36	0.02
CD49f	Markers of basally-located mammary epithelial cells	1.30	0.02	0.75	0.03
CK14		1.09	0.35	0.70	0.01
STAT5a	Master regulator of luminal cell differentiation [48]; highly expressed in mammary luminal progenitors	---	---	0.52	0.08
GATA3	Regulates luminal cell differentiation	0.84	0.24	0.78	0.01
CK18	Marker of luminally located mammary epithelial cells	0.65	0.06	0.62	0.20
ER α	Expressed in (some of the) fully differentiated luminal mammary epithelial cells	0.86	0.29	0.87	0.27
PTCH1	Hedgehog receptors, highly expressed in mammary stem cells; the Hedgehog pathway regulates mammary stem cell self-renewal	0.85	0.22	0.88	0.14
SMO		0.94	0.41	1.13	0.32
BMI1	A polycomb gene, downstream of the Hedgehog pathway, which regulates mammary stem cell self-renewal	1.00	0.49	0.94	0.32
NOTCH1	Receptor (NOTCH1) and ligand (Delta 1) in the Notch pathway, which regulates mammary stem cell function and fate	0.72	0.11	0.92	0.23
Delta1		0.84	0.16	0.83	0.10

Significant $p < 0.05$ values are bolded

התאים (תמונה 21) הנובעת כנראה להשפעה ארוכת טווח של ירידה בביטוי IMPDH מיד לאחר סיום הזרקת הקסנתוזין (טבלה 1).

ניתן להסיק כי הדווחים של Capuco וחבריו על שינוי בפרופרצית תאים בעלי מאפיני תאי גזע נבעו מעבודה לא מדויקת בעטין בקר, או שהיו מוגבלים לעגלות בנות 3 חודשים בהן בוצע הניסוי (אשר אינן לרונטיים לעבודה בחיה הבוגרת).

לאור החשיבות הגדולה שיש למניפולציות בתאי גזע ולעובדה שיש ביכולתנו לקבוע שינויים בכמותם ופעילותם, אנו מציעים להמשיך בכוון זה תוך שימוש במתודולוגיה אלטרנטיבית של הגבלת אספקת אנרגיה לזמן מוגבל, או טיפול ברפמיצין הפועל על מסלול מטבולי משותף (mTOR).

3. דיון מסכם

אוכלוסיית תאים אפיתליאליים מעטין עגלה הופרדה על בסיס ביטוי הסמנים הממברנליים CD24 ו-CD49f לארבע תת אוכלוסיות תאים ייחודיות המהוות את בסיס להיררכיה התאית בעטין הבקר. פיתחנו כלי עזר גנטיים והיסטוכימיים שיזהו באופן ספציפי את אוכלוסיות התאים השונות וההיררכיה ביניהן. הוכחנו כי רק תאי גזע מסוגלים ליצור מבנים אפיתליאליים לאחר השתלה לבלוטת עכבר ולשחזר תופעה זו בהשתלות חוזרות.

עסקנו גם בבחינת פרוצדורות שונות לשיפור קלטת תאי הבקר המושתלים בבלוטה העכברית ויצירת מורפולוגיה מייצגת עטין בקר. זאת על ידי הגדלת הפיברוטיות, טיפול בסטרואידים ויצירת בלוטה היברידית הכוללת תאי בקר ועכבר. שיפור בקליטה הושג על ידי הגדלת הפיברוטיות של הבלוטה וטיפול בסטרואידים הביא במקרים בודדים להתפתחות מיצגת של הבלוטה ולא רק של מבנים דמויי אלויאולי.

בהשראת דווח בספרות, בחנו את השפעת קסנתוזין על שינוי אפשרי במספר תאי הגזע בטווח של 11 שבועות תוך פיתוח מודל יחודי של בלוטת בקר מושתלת ומתפתחת ברקמת השומן של הבלוטה העכברית. תוך שימוש במודל זה לא מצאנו השפעה לקסנתוזין על שינוי בפרופורציות התאיות כולל זו של תאי הגזע. יותר מכך, לקסנתוזין אופינה השפעה לטנטית ארוכת טווח מדכאת על קצב חלוקת התאים בבלוטה. לאור חשיבות היכולת לשנות את מספר תאי הגזע, אנו מפתחים כיום שיטות אלטרנטיביות למטרה זו.

4. פרסומים:

מאמרים:

1. Rauner G. and **Barash, I.** (2012).
Cell hierarchy and lineage commitment in the bovine mammary gland.
PLoS ONE 7:e30113.
2. Rauner, G., Leviav, A., Mavor, E. and **Barash, I.** (2013).
Development of foreign mammary epithelial morphology in the stroma of immunodeficient mice.
PLoS ONE 8: e68637
3. Rauner, G. and **Barash, I.** (2014).
Xanthosine administration does not affect the proportion of epithelial stem cells in bovine mammary tissue, but has a latent negative effect on cell proliferation.
Experimental Cell Research. In press.

תקצירים:

1. Rauner G. and **Barash, I.** (2011).
Characterization of Stem-like cells in the bovine mammary gland and their potential contribution to milk production.
The 23rd Annual meeting of the Israeli society of ruminant sciences. Jerusalem.
2. **Barash, I.** and Rauner G. (2012).

Principle Cell Populations in the Bovine Mammary Gland: Delineation of Cell Hierarchy and Lineage Commitment.
 10th International Conference of the Association for Stem Cell Research (ISCCR).
 Yokohama .Japan.

3. Rauner G and **Barash I.** (2012).
 Cell hierarchy, Stem Cells, Projeitors and differentiation in the mammary Gland.
The 24th Annual meeting of the Israeli society of ruminant sciences.
4. Rauner G. and **Barash, I.** (2012).
 Delineation of Cell Hierarchy and Lineage Commitment in the Bovine Mammary Gland.
EMBO conference. Stem Cells in Cancer and Regenerative Medicine. Heidelberg, Germany.
5. Rauner G. and **Barash, I.** (2013).
 Transplantation of bovine mammary cell population and their development in the mouse fatty stroma.
The 2^{5th} Annual meeting of the Israeli society of ruminant sciences.
6. Rauner G and **Barash, I.** (2014). Isolation of a stem cell-enriched epithelial population in the bovine mammary gland.
 ILANIT Conference. Eilat Israel.
7. Rauner G. and **Barash, I.** (2014). Elucidating cell hierarchy and lineage commitment of bovine mammary epithelial cell populations - a step towards understanding bovine mammary cancer resistance. *12th International Conference of the Association for Stem Cell Research (ISCCR). Vancouver. Canada.*

תקצירים לפוסטרים

1. Rauner, G. and **Barash, I.** (2011).
 Identifying stem cells and their progenitors in the bovine mammary gland.
 Gordon Research Conference on Mammary Gland Biology. RI. USA.
2. Rauner G. and **Barash I.** (2011).
 Characterizing bovine mammary epithelial cell populations en-route to stem cell isolation. 3rd Annual meeting of the Israeli Cancer Research Association.
3. Rauner G. and **Barash I.** (2013). Impaired development of bovine mammary epithelial morphology following transplantation of dispersed cells into the mouse fad pad: new insights into epithelia-stroma interactions .
 Gordon Research Conference on Mammary Gland Biology. Stowe. Vt. USA.

3. סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה. אפיון היררכית אוכלוסיות התאים בעטין בקר ומעקב אחריהן לאחר טיפול בקסנתוזין.
עיקרי הניסויים והתוצאות.
הופרדו ואפיינו אוכלוסיות התאים בבלוטת החלב מבקר, כולל זו של תאי הגזע. הודגמה היררכיה תאית. נבחנה התפתחות תאי בקר למורפולוגיה מייצגת ברקמת הסטרומה של עטין העכבר. נקבע עיכוב על ידי רקמת השומן. נבחנו אסטרטגיות לשיפור הקליטה וההתפתחות על ידי הגברת הפיברוטיות, טיפול בסטרואידים ויצירת כימרות (עכבר בקר) והודגם שיפור על ידי הגדלת הפיברוטיות וטיפול בסטרואידים. בוצעו נסיונות בטיפול בקסנתוזין לשיפור מספר תאי הגזע, אולם לא נמצא שינוי בטווח הארוך
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
השראת התפתחות אוכלוסיות תאים נפרדות מקור בקר בעטין העכבר דורשת מניפולציה בסביבה העכברית שאינה פשוטה. רשמנו הצלחה בבחינת אפיון אוכלוסיות התאים השונות ובשיפור התפתחות תאי הגזע בסביבת רקמת השומן העכברית. לטיפול בקסנתוזין לא נמצאה השפעה על מספר תאי הגזע בטווח הארוך, ולאור חשיבות היכולת למניפולציה זו, בכונתנו לבחון אלטרנטיבות אנרגטיות ופר מקוליות אחרות.
בעיות שנוותרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר

<p>לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר?</p> <p>בהשוואה לידע באדם ובמכרסמים, אוכלוסיית תאי הבקר לא נחקרה כמעט. נראה כי לאוכלוסיה זו מאפיינים ספציפיים הדורשים זמן ואמצעים רבים לצורך אפיונם. יש להמשיך ולבחון שיטות שונות לאינדוקציה של התפתחות תאי גזע מבקר למורפולוגיה מיצגת בבלוטה. ה"ע"י השראת שינויים סיסטמיים והן על ידי השראת שינויים סביבתיים. לשינוי במספר תאי גזע יש לבחון אלטרנטיבות לטיפול המוצע בקסנתוזין.</p> <p>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.</p>	
<p>Articles in reviewed journals</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Cell hierarchy and lineage commitment in the bovine mammary gland (2012). <i>PLoS ONE</i> 7:e30113. 2. Rauner, G., Leviav, A., Mavor, E. and Barash, I. (2013). Development of foreign mammary epithelial morphology in the stroma of immunodeficient mice. <i>PLoS ONE</i> 8: e68637 3. Rauner, G. and Barash, I. (2014). Xanthosine administration does not affect the proportion of epithelial stem cells in bovine mammary tissue, but has a latent negative effect on cell proliferation. <i>Experimental Cell Research</i>. In press. <p>Abstracts</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Rauner G. and Barash, I. (2011). Characterization of Stem-like cells in the bovine mammary gland and their potential contribution to milk production. <i>The 23rd Annual meeting of the Israeli society of ruminant sciences</i>. Jerusalem. 2. Barash, I. and Rauner G. (2012). Principle Cell Populations in the Bovine Mammary Gland: Delineation of Cell Hierarchy and Lineage Commitment. <i>10th International Conference of the Association for Stem Cell Research (ISCCR)</i>. Yokohama .Japan. 3. Rauner G and Barash I. (2012). Cell hierarchy, Stem Cells, Projeitors and differentiation in the mammary Gland. <i>The 24th Annual meeting of the Israeli society of ruminant sciences</i>. 4. Rauner G. and Barash, I. (2012). Delineation of Cell Hierarchy and Lineage Commitment in the Bovine Mammary Gland. <i>EMBO conference. Stem Cells in Cancer and Regenerative Medicine. Heidelberg, Germany</i>. 5. Rauner G. and Barash, I. (2013). Transplantation of bovine mammary cell population and their development in the mouse fatty stroma. <i>The 2⁵th Annual meeting of the Israeli society of ruminant sciences</i>. 6. Rauner G. And Barash, I. (2014). Isolation of a stem cell-enriched epithelial population in the bovine mammary gland. ILANIT Conference. Eilat Israel. 7. Rauner G. and Barash, I. (2014). Elucidating cell hierarchy and lineage commitment of bovine mammary epithelial cell populations - a step towards understanding bovine mammary cancer resistance. <i>12th International Conference of the Association for Stem Cell Research (ISCCR)</i>. Vancouver. Canada. <p>Poster abstracts</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Rauner, G. and Barash, I. (2011). Identifying stem cells and their progenitors in the bovine mammary gland. Gordon Research Conference on Mammary Gland Biology. RI. USA. 2. Rauner G. and Barash I. (2011). Characterizing bovine mammary epithelial cell populations en-route to stem cell isolation. <i>3rd Annual meeting of the Israeli Cancer Research Association</i>. 3. Rauner G. and Barash I. (2013). Impaired development of bovine mammary epithelial morphology following transplantation of dispersed cells into the mouse fad pad: new insights into epithelia-stroma interactions . <i>Gordon Research Conference on Mammary Gland Biology. Stowe. Vt. USA</i>. 	
<p>פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)</p>	
רק בספריות	←
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)	X ←
חסוי – לא לפרסם	←
<p>האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - הגשתי. הייתי רוצה מאד להגיש תוכנית המשך.</p>	