

דו"ח מסכם לתוכנית מחקר מספר 362-0248-12
(שנה שלישית)

בידוד תאי גזע מעטין בקר ומניפולציה במספרם במטרה להביא לשימור רמת תחלובה גבוהה

Identification of stem cells in the bovine mammary gland and manipulation of their proportions for high and persistent milk production

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, 2013

אב, תשע"ג

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

איתמר ברש

חתימת החוקר

*

תוכן העניינים:

עמוד

1.	תקציר.....	3
2.	דוח מפורט.....	3
2.1.	מבוא ומטרות המחקר.....	3
2.2.	פרוט עקרי הניסויים.....	5
2.3.	דיון מסכם.....	17
2.4.	פרסומים מדעיים.....	17
3.	סיכום עם שאלות מנחות.....	18

1. תקציר

1.1 הצגת הבעיה. רוחניות יצור החלב תלויה בשיפור יעילות התהליך. מטרת העבודה: אפיון ההיררכיה התאית בבלוטת החלב של בקר תוך התמקדות בתאי הגזע. זאת למטרת השראת מניפולציה אפשרית במספרם, כאמצעי לשיפור ההמשכיות בתחלובה.

1.2 שיטות העבודה. אוכלוסיות תאים מהבלוטה של עגלה הופרדו במכשיר FACS לאחר פרוק הרקמה לתאים. התפתחות התאים נבחנה על ידי השתלה לבלוטת חלב מנקבת עכבר מדוכא חיסונית, ממנה הוסרו המבנים האפיתליאליים. ביטוי גנים נקבע ב RT-PCR. מיקום הביטוי נקבע באנליזות היסטוכימיות ואימונופלוורוסנטיה. מיקום התא בהיררכיה נקבע על ידי אפיון מושבות בתרבית, קצב גדילה, ממוספרות צפות, ביטוי גנים וחלבונים ספציפיים. השתלות תאי בקר לבלוטה העכברית שמשו לקביעת אופי האוכלוסיות. תאים אוגרי BrdU נקבעו באימונופלוורסנציה כמדד אפשרי לתאי גזע או תאי אב.

1.3 תוצאות עיקריות. תוך שימוש בסמנים הממברנליים CD49f ו-CD24 העשרנו 4 אוכלוסיות תאים אפיתליאליים מבלוטת החלב מבקר. אלה אופיינו כתאי גזע, תאים בזאליים, תאי אב לומינליים ותאים ממוינים. נקבעה ההיררכיה בין אוכלוסיות אלו. באנליזה *in vivo* נמצא כי רק אוכלוסית תאי הגזע נותנת מוצא להתפתחות מבנים אפיתליאליים מבקר בבלוטה העכברית. מבנים אלו התפתחו באזורים פיברוטיים ואופיינו כמבנים ספריים חלולים, אשר דמו במאפיינים המורפולוגיים, והמולקולרים למבנים האלויאולריים של הבלוטה מבקר, אולם לא יצרו מבנים צינוריים אשר יאפשרו את איכלוס כל הבלוטה העכברית. טיפול באסטרוגן ופרוגסטרון והגדלת הפיברוטיות של הבלוטה הביאו לשיפור בהתפתחות ובהקלטות התאים מבקר, אולם רק במקרה אחד התפתחה מורפולוגיה אופיינית במלואה. קסנתוזין דווח כגורם פוטנציאלי לשיפור במספר תאי הגזע. טיפול בקסנתוזין בעכברים מושתלים בפיסות רקמה מבקר, לא הביא לשינוי ארוך טווח במספר תאים אוגרי BrdU ברקמה המושתלת או בהרכב אוכלוסיות התאים בטווח הארוך עפ"י FACS. עם זאת, גורם זה הביא לשינויים בקצב חלוקת התאים 11 שבועות מהזרקתו. לכן, אפיון השפעתו של קסנתוזין נמשך.

1.4 מסקנות והמלצות: הראינו כי אוכלוסיית ספציפית של תאי הגזע הינה המקור להתפתחות בלוטת החלב בבקר. עבודה זו מהווה בסיס לפיתוח ובחינת אסטרטגיות לשיפור במספרם כדרך לשיפור ההמשכיות ביצור החלב התחלובה.

2. דו"ח מפורט

2.1 מבוא

לענף החלב מעמד מרכזי בכלכלת המדינה. יצור החלב בישראל עומד על כ- 1.2 מיליארד ליטר בשנה ומספק את מרבית הצריכה המקומית של חלב ומוצריו. ערך היצור השנתי הכולל ברפתות עולה על 2 מיליארד ₪ והמחזור הכולל בענף, במונחי מחירים לקמעונאי, עולה על 5.5 מיליארד ₪. ענף הבקר לחלב מעסיק באופן ישיר למעלה מ- 10,000 מפרנסים. בשנת 2007-2008 חלו תמורות בענף החלב אשר נבעו משינויים דרסטיים בתשומות היצור. השינוי העיקרי קשור בעלית מחירי המזון להאבסת הבקר שנבע בעיקר מעלית מחירי הגרעינים והכוספאות. מגמת שינויים אלה הינה ארוכת טווח ואכן בשנה האחרונה הופחת גם

מחיר המטרה לחקלאי. העלויות הגדלות של יצור החלב בישראל והעלייה בצריכת החלב העולמית מחייבות הערכות להוזלת עלות יצור החלב הן על מנת לשמור על אספקת חלב מלאה לאזרחי ישראל והן על מנת לשמור על רווחיות היצור.

גורם עיקרי בעל נתוני שיפור הינו חוסר יכולתן של מרבית הפרות להתמיד ברמת יצור חלב גבוהה לאורך כל תקופת התחלובה (Persistency). את רמת ההתמדה ניתן לדעתנו לשפר באופן מהותי על ידי הגדלת מאגר תאי גזע אשר יתמיינו ויחליפו את התאים האפיתליאליים המתים משך התחלובה. בכך ניתן לחסוך בהוצאות וטרינריות הקשורות בעקבות הנגרמות עקב ההריון וההמלטות ותשופר גם את רווחת החיה. הארכת משך התחלובה, הגברת יצור החלב וצמצום ימי הריק הינם שלשה גורמים אשר שיפורם עשוי להביא לשיפור יעילות יצור החלב והרווחיות.

ההתפתחות היררכית של תאים ממוצא אפיתליאלי בבלוטת העטין בלוטת העטין של פרה בתחלובה כוללת לפחות 3 סוגי תאים ממוצא אפיתליאלי: תאים אלויאולרים, צינוריים ומיו אפיתליאליים (בזאליים). בנוסף לתאים אלה אשר הינם ממוינים ומחויבים, קיים בבלוטת העטין גם גורם של התחדשות המאפשר חידוש מאגר התאים האפיתליאליים בין תחלובות עוקבות. גורם התחדשות זה הינו אוכלוסיית תאים "ראשונית" הכוללת תאי גזע בלתי ממוינים ותאי אב (progenitors) ממוינים בחלקם ומחויבים חלקית. תאי גזע הינם תאים אשר ביכולתם להתחלק חלוקה סימטרית לתאים זהים ולא ממוינים, או חלוקה א-סימטרית. בחלוקה זו תא אחד נשאר כתא גזע לא ממוין ובעל יכולת חידוש עצמי והתא האחר הינו המקור לתאי אב. לאחרונה הודגם בשתי מעבדות במקביל, כי ניתן ליצור בלוטת עטין שלמה ומתפקדת בעכבר ע"י השתלה של תא גזע בודד לרקמת שומן חסרת מבנים אפיתליאליים אנדוגניים. זיהוי תאי בת לאותו תא גזע, המוגבלים ביכולותיהם להתמייין לסוגי התאים השונים בבלוטה (אלויאולריים או צינוריים) סיפקה את ההוכחה הסופית כי בלוטת העטין אכן בנויה ומתפקדת באופן היררכי: תאי גזע מתמיינים לתאי בת אשר אלו, בתורם, ממשיכים להתמייין לסוגי תאים מוגדרים פונקציונלית או מורפולוגית.

מטרות המחקר

מטרת העל של המחקר הינה שיפור ההתמדה ביצור חלב בפרות מעדר הבקר לחלב במדינת ישראל. זאת על ידי הגדלת מאגר תאי הגזע בבלוטת העטין. ההיפותיזה היא שתאים אלה יתמיינו במהלך התחלובה לתאים יצרניים ויעכבו את הירידה בתחלובה הנגרמת בעקבות תמותת התאים האפיתליאליים הממוינים. מטרת המחקר הספציפיות מייצגות את שלבי המחקר.

1. פיתוח מתודולוגיות להעשרה [סריקה והפרדה (sorting)] של תאי גזע ותאי אב מאוכלוסיית תאים בודדים שמקורה מבלוטת החלב עטין של בקר לחלב.

2. לקבוע ולאשר בתאים אלה תכונות של תאי גזע ותאי אב. א. בתרבות, ב. על ידי השתלות של תאים שהופרדו ב FACS אל תוך רקמת השומן (הנקייה מתאים אפיתליאליים) של בלוטת עטין מעכברים מדוכאי מערכת חיסון. רקמה זו תותאם לקבלת התאים על ידי תהליך של בוויניזציה (Bovinization).

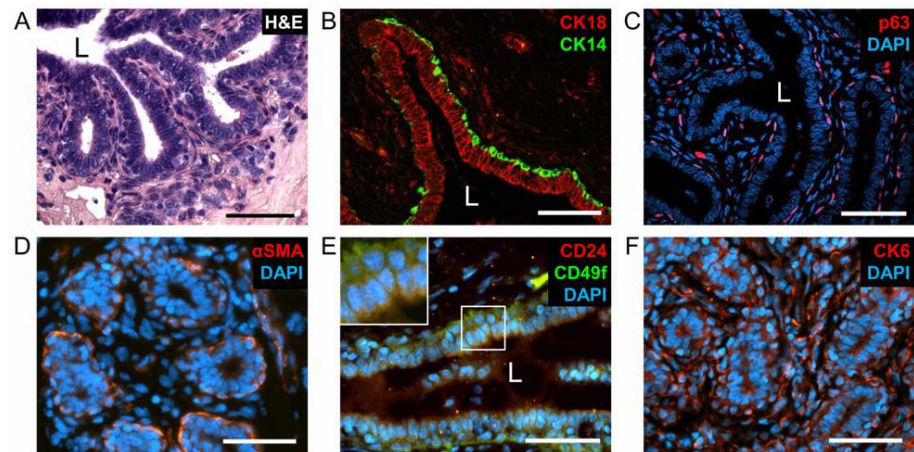
3. להשתמש במערך שפותח על מנת לבחון את האפקט האפשרי של קסנתוזין על שינוי הפרופורציות של תאי גזע ותאי אב בבלוטת העטין של בקר ועל היררכית ההתמיינות שלהם.

2.2 פרוט עקרי הניסויים

מפאת מגבלת מקום הניסויים והתוצאות מתוארים בתמציתיות. חלקם מתוארים בפרוט יתר במאמר Rauner and Barash, 2012 ו-Rauner et al., 2013. הניסויים לבחינת אפקט הקסנתוזין עדיין לא הושלמו ולכן לא פורסמו.

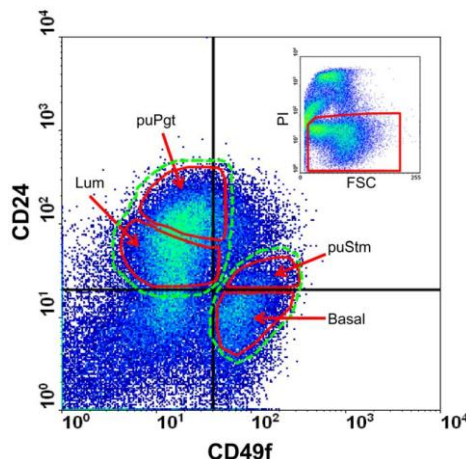
2.2.1. אפיון בלוטת החלב של העגלה

על מנת למקם סמנים פוטנציאליים בבלוטת החלב של בקר, בוצע אפיון היסטולוגי ואימונופלוורסנטי מקדים של הבלוטה (תמונה 1). בתמונה זו נראים המבנים הבסיסיים (Terminal ductal lobular units) (1A) המורכבים ממספר שכבות תאים, לומינליים ובזאליים, המקיפים את חלל הלומן. מתמונה 2 ניתן להסיק כי אוכלוסיות התאים הבזאליים הנמצאות בהיקף הצינוריות מבטאות רמה גבוהה יחסית של הסמנים החלבוניים α SMA CK14 ו-p63. לעומת זאת, אוכלוסיות התאים הלומינליים הנמצאות במגע עם חלל הלומן מבטאות רמה גבוהה של CK18. CD49f שהינו סמן לתאי גזע בעכבר נקבע בשכבה הבזאלית.



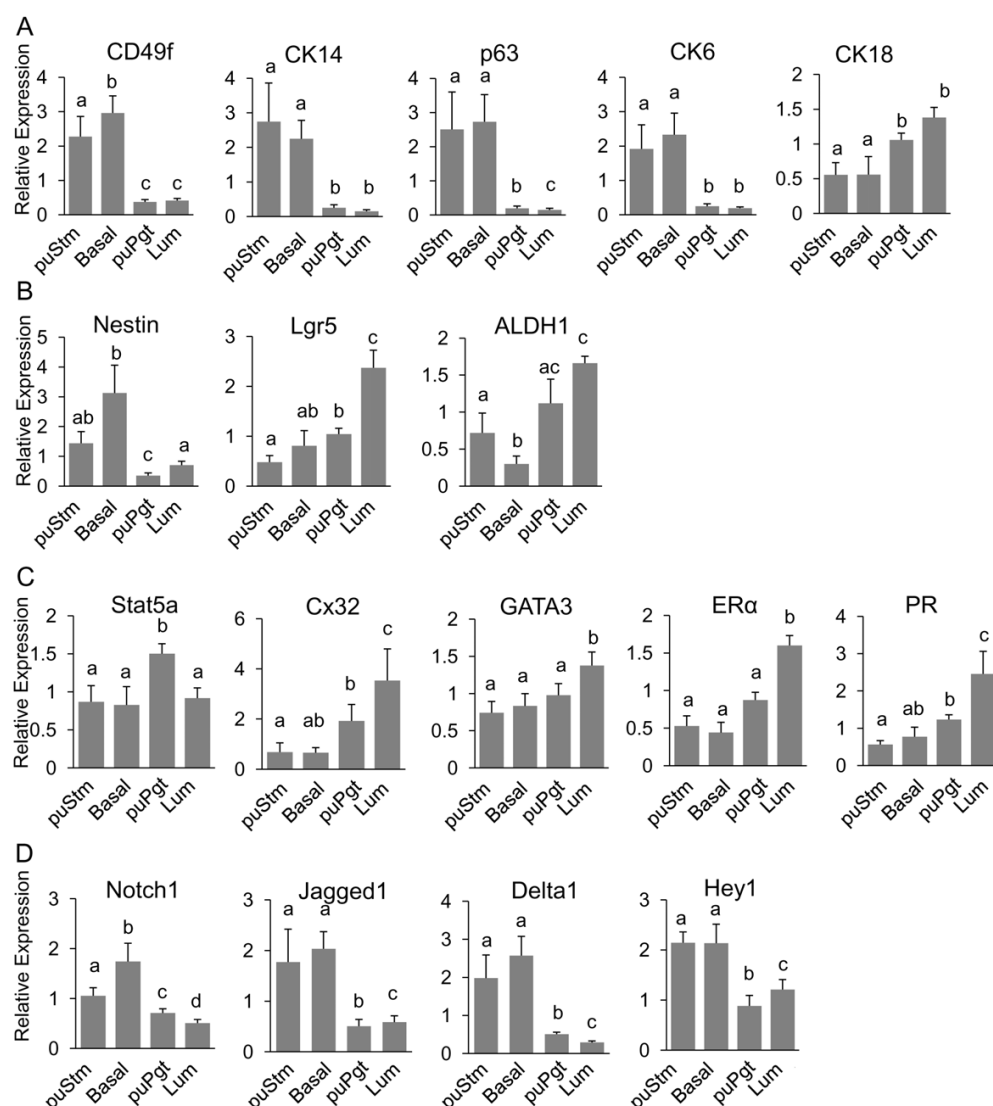
תמונה 1. אנליזה היסטולוגית (A,B) ואימונו פלוורסנטית של בלוטת החלב מעגלה.

2.2.2 העשרת אוכלוסיות אפיתיליות מבלוטת החלב של בקר. אורגנואידים הופקו מהרקמה הפרנכימתית של בלוטת החלב של עגלות בנות 7-10 חודשים והוקפאו. בהמשך, בוצע עיכול אנזימטי מלא והופקה הפרקציה האפיתילית. 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 בהתאם לרמות הביטוי של הסמנים הממברנליים CD24 ו-CD49f (תמונה 2).



תמונה 2. הפרדת ארבע אוכלוסיות תאים מבלוטת חלב ב-FACS.

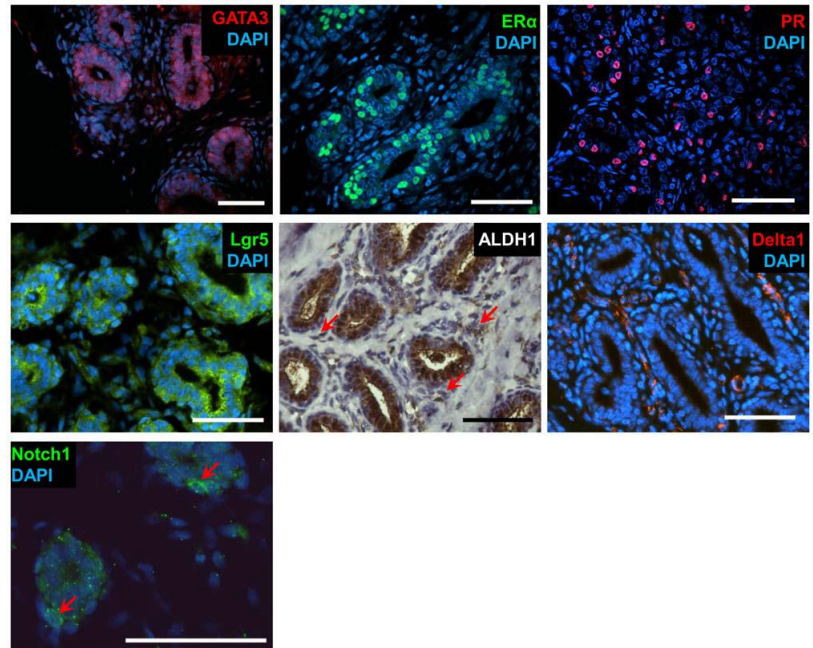
על פי מאפיינים בספרות כונו האוכלוסיות: puSTM – putative stem cells, Basal, puPgt – putative progenitors (תאי אב) ו Lum – Luminal תאים לומינליים ממוינים. האוכלוסיות שהופרדו אופיינו בתחילה לביטוי גנים ספציפיים ובהמשך לפונקציונליות. בתמונה 3 נראה ביטוי גנים בתאים מהאוכלוסיות האפיתילאלית השונות.



תמונה 3. ביטוי גנים נבחרים באוכלוסיות התאים המופרדות. A. ביטוי סמנים לומינליים ובזאליים. B. ביטוי סמנים לתאי גזע ברקמות אחרות. C. ביטוי גנים המעורבים בהתמינות לומינלית. D. ביטוי גנים המעורבים במסלול ה-Notch.

2.2.3 אנליזת ביטוי גנים. האנליזה של הסמנים המורפולוגיים (תמונה 3A) תמכה בתוצאות שהוצגו בתמונה 1 לגבי התבטאותם של גנים אלה בשכבות השונות של הרקמה. רמות Nestin, Lgr5 ו ALDH1 (תמונה 3B), סמני תאי גזע ברקמות אחרות, לא נמצאו גבוהות באופן יחסי באוכלוסיות תאי הגזע ההיפותטיות בבלוטת החלב בהשוואה לאחרות. Stat5a התבטא גבוה יחסית בתאי אב (תמונה 3C) ואילו ביטוי ERα, GATA3, Cx32 ו PR אפיין את האוכלוסיה הממוינת. מרכיבי מסלול ה-Notch (תמונה 3D) התבטאו באופן גבוה יחסית באוכלוסיות ממקור בזאלי, אולם רמת ביטוי שונה בין תאי אב לתאים ממוינים מציעה כי ניתן להשתמש בהם כסמנים לתת אוכלוסיות אלה. אישור ציטולוגי לאנליזות הגניות התקבל באנליזה אימונופלורוסנטית. מיקום לומינלי גרעיני נקבע ל ERα GATA3 PR בחלק מהתאים, אם כי לא בשכבת התאים הסמוכה ללומן (תמונה 4).

תמונה 4. מיקום ביטוי התוצרים החלבוניים של הסמנים הגניים שהוצגו בתמונה 3 בבלוטת החלב של העגלה ואשר התבטאו באופן דיפרנציאלי בין האוכלוסיות המעושרות.

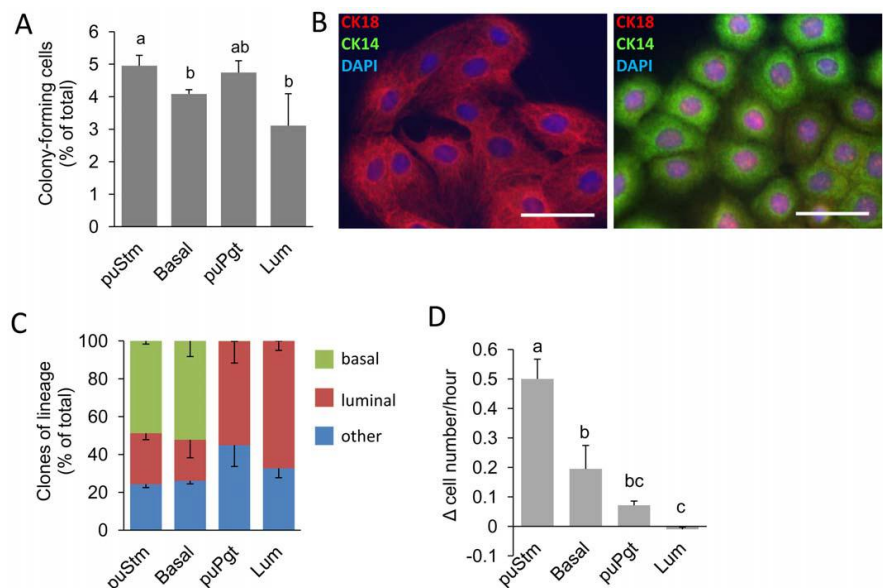


גם ALDH1 ו-Lgr5 נקבעו בשיכבה הלומינלית, אם כי בציטופלסמה. Delta1 ו-Notch1 נקבעו בשכבה הבזאלית.

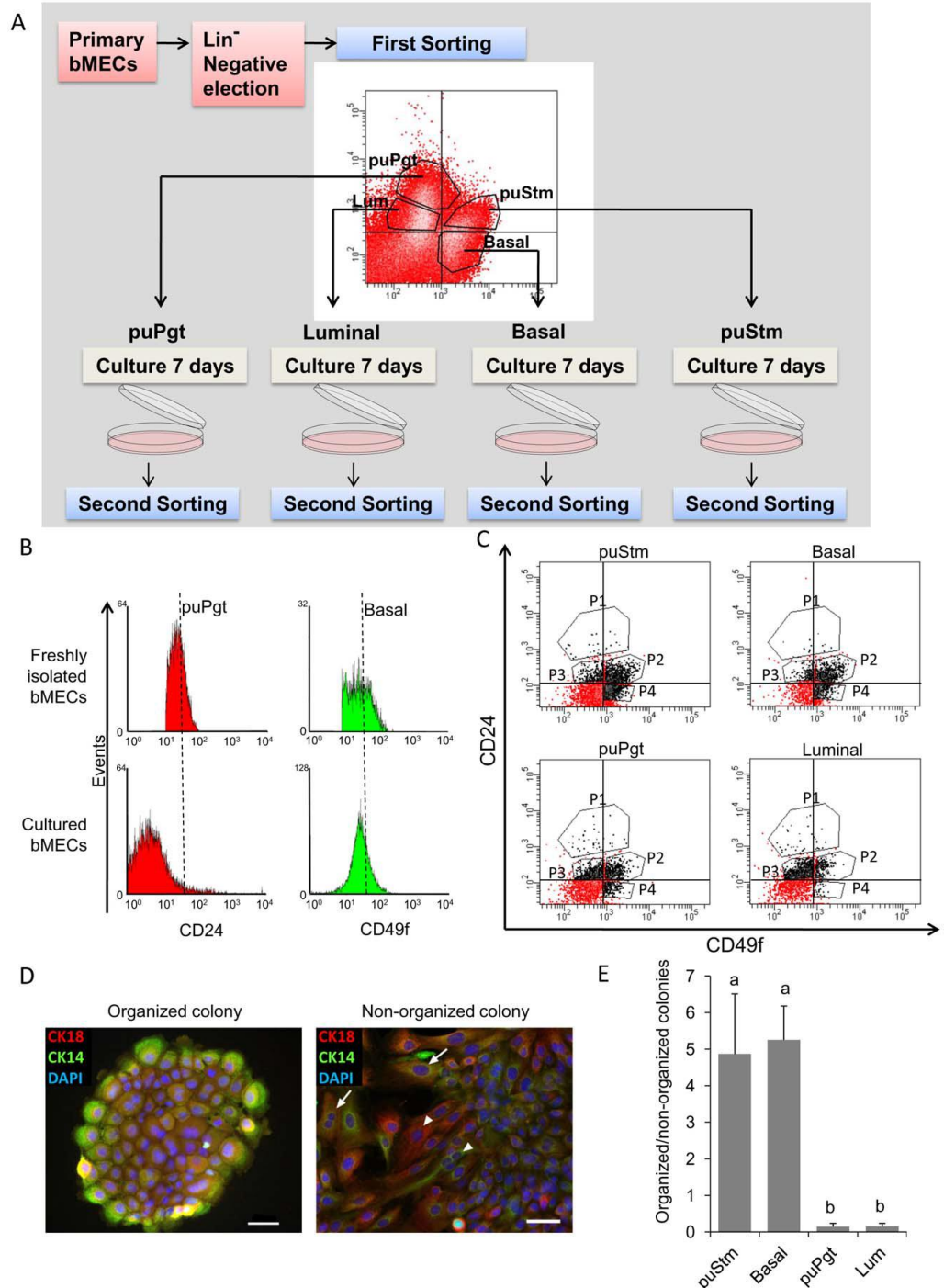
2.2.4 אנליזות בתרבית. כמות ואופי הקלונים הנוצרים מתאים בודדים בתרבית הינה מאפיין נוסף של תת-אוכלוסיות התאים המקוריות. מתמונה 5 ניתן לראות כי תאים בזאליים ובמיוחד תאים לומינלים (Lum) יצרו באופן מובהק סטטיסטי פחות מושבות מאשר האוכלוסיות אשר היו מועשרות לפי השערותנו בתאי גזע ובתאי אב, בהתאמה (בהן כ 5% מהתאים יצרו מושבות). מושבות לומינליות אופינו על פי ביטוי CK18. מושבות בזאליות אופיינו על פי ביטוי החלבון CK14. מתמונה 5 ניתן לראות כי תאים מהאוכלוסיות ה puStm וה Basal יצרו בתרבית את שני סוגי המושבות, בעוד שתאים מהאוכלוסיות puPgt ו Lum יצרו רק מושבות בעלות מאפיין לומינלי.

מדד החלוקה (proliferation rate) מאפיין את מיקומו של התא בהיררכיה התאית. בראש ההיררכיה נקבעו תאי ה puStm (תמונה 5D), ובסדר יורד אחריהם: Basal, puPgt ו Lum.

תמונה 5. מולטיפוטנטיות, יצירת מושבות וקצב פרוליפרציה גבוה מאפיינים את אוכלוסיית תאי הגזע המשוערת - puStm.



תמונה 6 מתארת את גורלן של המושבות בתרבית. למרות שרמת ביטוי של CD24, אחד משני הסמנים המשמשים בהפרדה, יורדת לאחר 7 ימי תרבית, עדיין ניתן לראות כי מושבות "שניוניות" משמרות את המאפיינים הבסיסיים של תאי המקור: מושבות שניוניות שמקורן מתאים puStm ו Basal יצרו מבנה מאורגן המזכיר את מבנה השכבות האפיתליות בעוד שמושבות שמקורן מאוכלוסיות ה- puPgt ו Lum יצרו מבנים סטוכסטיים.



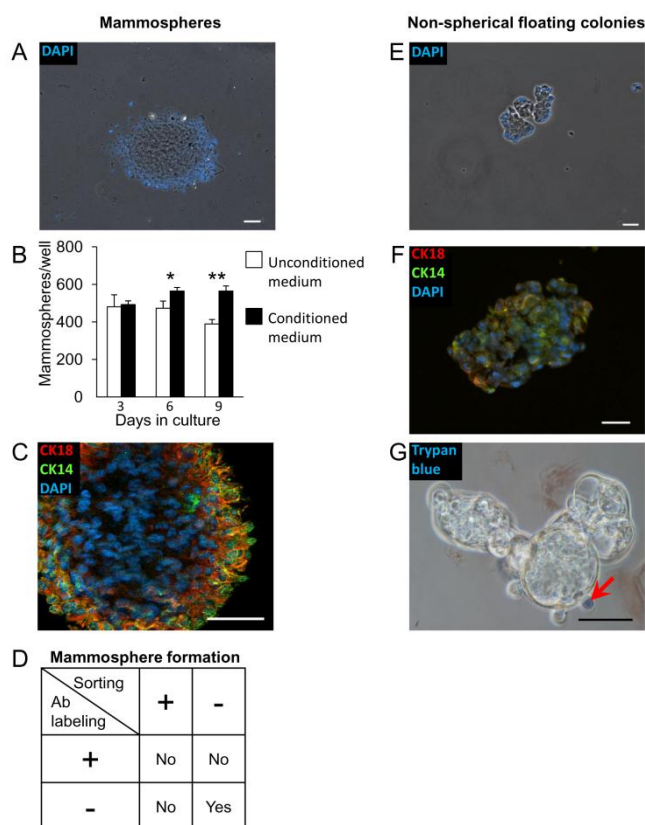
תמונה 6. אוכלוסיות תאי עטין בקר בתרבית אינה מקיימות רמות ביטוי שונות של CD24 ו-CD49f, אך שומרות על מאפייני האוכלוסיות המקוריות. A- מערכת הניסוי. B- בתרבית, ביטוי של CD24 נחלש, C- לכן האוכלוסיות השניוניות הופרדו רק על סמך קיום או העדר ביטוי הסמנים. D- שני סוגי מושבות התפתחו. מאורגנות (שמאל) ובלתי מאורגנות (ימין). E- האוכלוסיות המקוריות של תאי הגזע (ההיפותטיים) והתאים הבזאליים יוצרות מושבות מאורגנות בגודל שאוכלוסיית תאי האב הלומינליים והאוכלוסייה הלומינלית הממוינת יוצרות מושבות בלתי מאורגנות.

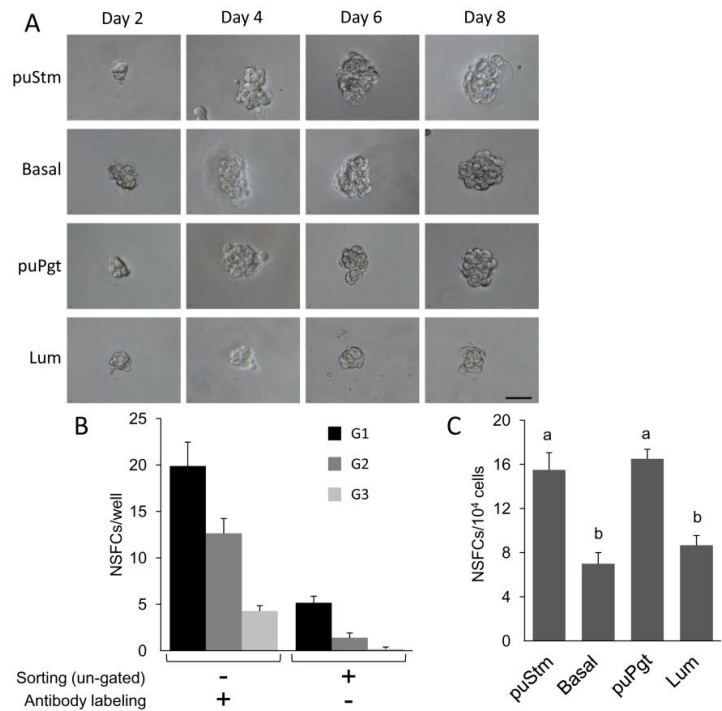
בהמשך, הוסף את המדד של יצירת ממוספרות צפות (מושבות תאים צפות) אשר מהוות מדד להימצאות תאי גזע. כפי שניתן לראות בתמונה 7, ממספרות כדוריות, המזכירות את אלו הנוצרות מתאי גזע של בלוטת חלב של עכבר, נוצרו לאחר הדגרת אוכלוסיה לא מופרדת של תאי עטין בקר. מספרן היה רב יותר לאחר הדגרה ב condition medium מתרבית תאי בקר. הן בטאו את הסמנים האפיתליאליים CK18 ו-CK14, עדות למוצאן האפיתליאלי. עם זאת, סימון התאים בנוגדנים פלוסרסנטיים ל CD24 ו-CD49f, כמו גם העברתן של האוכלוסיות ממקור בקר במכשיר הפקס מנעו, כל אחד בנפרד, את יצירת הממוספרות הקלאסיות בעלות המבנה הכדורי והביאו ליצירת Non-spherical floating colonies (NSFC's). אלה מכילות תאים אפיתליאליים חיים אך חסרות צורה כדורית אופינית ומבנה מאורגן על פי ביטוי הסמנים. בתמונה 8, ניתן לראות כי ה-NSFCs שמוצאן מהאוכלוסיות המופרדות גדלו בתרבית, פרט לאלה שמוצאן מהתאים הלומינליים. למרות שמספרן הושפע לרעה על ידי תהליכי ההפרדה, ניתן היה לקבוע כי הממוספרות הכילו תאי גזע. זאת לאור יכולת יצירה מחזורית של ממוספרות חדשות בתרביות מחודשות. מספרן של הממוספרות היה גבוה יחסית בתרבית תאי הגזע ותאי האב (puStm; puPgt) ונמוך יותר בתרבית התאים הבזאליים והלומינליים (Basal, Lum).

בניסוי נוסף שמטרתו הייתה בחינת יכולתנו להעשיר עוד יותר את אוכלוסיית תאי הגזע, בוצע שילוב של הפרדה על פי פעילות ALDH (תמונה 9). זיהינו אוכלוסיה של תאים בעלי פעילות ALDH^{br} (ALDH^{br}) המהווה 6% מאוכלוסית תאי הגזע ההיפוטטים. על פי נתונים בספרות אוכלוסיה זו עשויה להוות אוכלוסיה מועשרת מאד בתאי גזע ממקור בלוטת חלב של בקר.

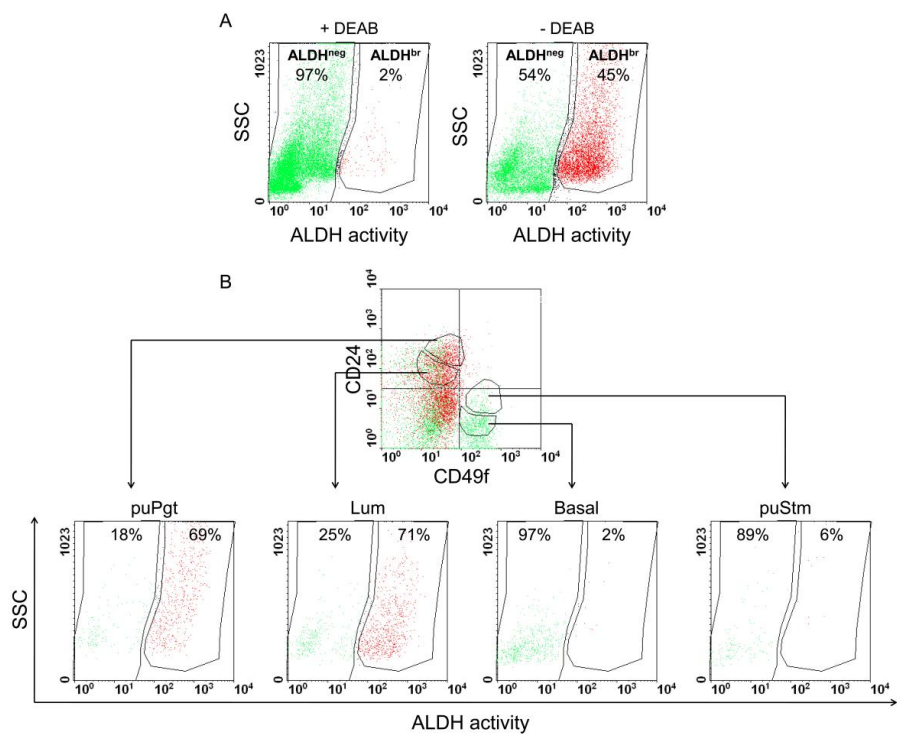
לסיכום, על סמך הממצאים שהתקבלו בניסויים השונים in vitro הגענו למסקנות לגבי ההיררכיה בעטין הבקר.

תמונה 7. ממוספרות מתפתחות באוכלוסיית תאים לא מופרדת בעוד שפרוצדורות ההפרדה גורמות להתפתחות מבנים לא כדוריים (NSFCs). A- ממוספרה אופינית. B- השפעה חיובית ל-Condition medium על הגדילה. C- ביטוי סמנים אפיתליאליים בממוספרות. D- השפעה שלילית על יצירת הממוספרות הו לסימון בנוגדן והן למעבר התאים במכשיר. E- לאחר פרוצדורת ההפרדה נוצרים מבנים לא ספריים. F- המבנים (NSFCs) מבטאים מרקרים אפיתליים באופן רנדומלי, וכוללים תאים חיים על פי צביעה בטריפן בלו. חץ אדום מסמן תא מת.





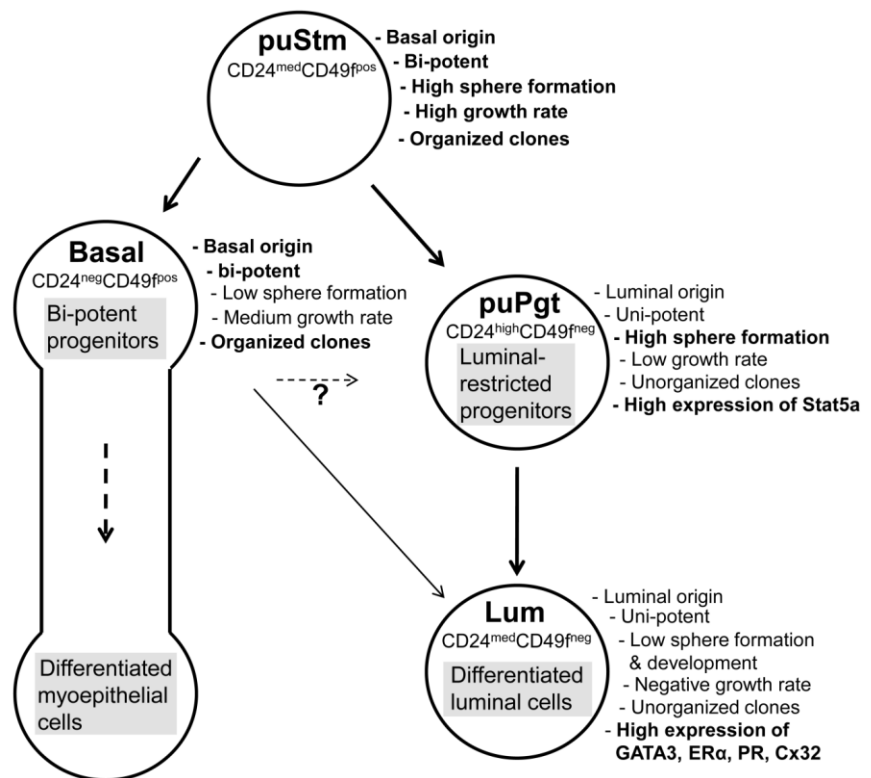
תמונה 8. התפתחות NSFCs בתרבית תלויה במוצאן. **A** - תמונה מייצגת המראה חוסר התפתחות מתאי ה- *Lum*. **B** - התפתחות 3 דורות של NSFCs מעידה על קיום תאי גזע. **C** - האוכלוסיות העשירות ב NSFCs הן אוכלוסית תאי הגזע ואוכלוסיית תאי האב.



תמונה 9. שילוב של אנליזת פעילות ALDH עם הפרדת התאים על פי ביטוי CD24 ו- CD49f. **A** - קביעת האוכלוסייה בעלת הפעילות החיובית והשלילית של ALDH על ידי שימוש במעכב ספציפי (DEAB). **B**. שילוב פעילות ALDH וביטוי הסמנים CD24 ו- CD49f מזהה תת אוכלוסיה בת 6% מאוכלוסית תאי הגזע המכילה תאים בעלי פעילות ALDH. אוכלוסיה זו מועמדת להיות אוכלוסיה מועשרת של תאים אלה.

מסקנות אלה מוצגות באילוסטרציה שבתמונה 10.

2.2.5 סיכום הממצאים לאפיון ההיררכיה התאית. תאי הגזע אופיינו למקור בזאלי רקמתי ובתרבית הראו "רב תכליתיות" (מולטיפוטנטיות) 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 כאמור 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 בתרבית מושבות לומינליות בלבד. תאים מאוכלוסייה זו עדיין שמרו על פוטנציאל ליצירת 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 CD49f ו CD24 כתאים לומינליים ממיינים נתנו מוצא למושבות לומינליות בלבד והראו רמה נמוכה של יצירת מושבות צפות ופוטנציאל חלוקה.



תמונה 10. תרומת הניסויים השונים להבנת ההיררכיה התאית בעטין הבקר.

תאים אלה יצרו מושבות לא מאורגנות בתרבית ובטאו ברמה גבוהה יחסית את הגנים ל GATA3, ERα, PR and 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 ב- פוטנטיים המתמיינים בעיקר לכוון הבזאלי/מיואפיתליאלי. תאי הגזע יוצרים גם תאי אב לומינליים,

המתמיינים בכון זה עד לתאים לומינליים ממיינים בעלי פוטנציאל יצרני. לתאי הגזע ממקור בקר נקבעו גם מאפיינים ספציפיים הכוללים ביטוי ייחודי של חלבונים.

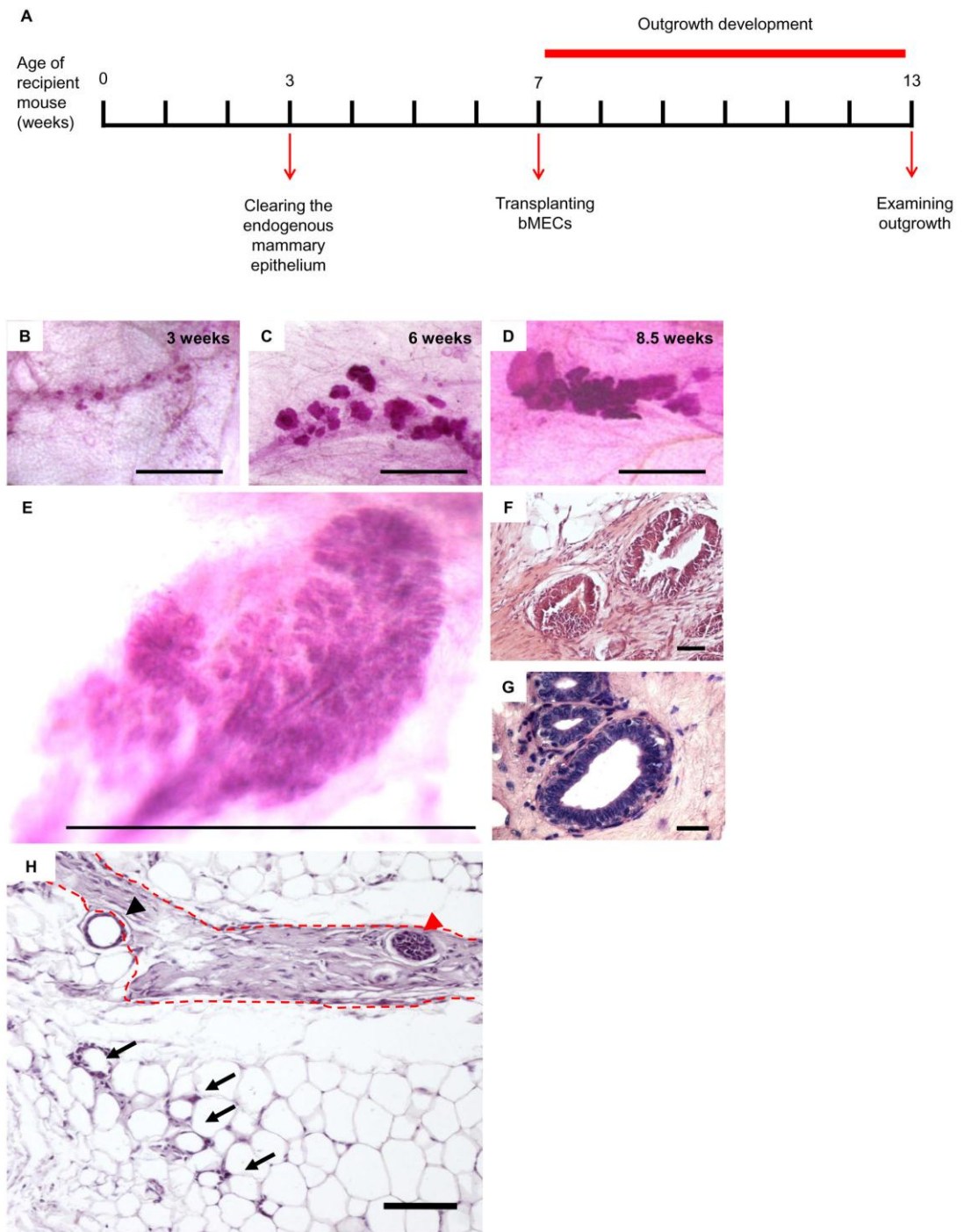
כלל הממצאים והמסקנות של פרק זה נכללים במאמר שהתפרסם לאחרונה, Rauner and Barash, 2012, PLoS ONE 7: e30113.

2.2.5 התפתחות תאי בקר בסטרומה העכברית. בהמשך, עברנו לאפיון אוכלוסיות התאים *in vivo*, שאת על מנת שניתן יהיה לבחון את השפעת טיפול בקסנתוזין על השינוי במספרם. תאים אפיתליאליים מבלוטת החלב של עגלות (7-10 חודשים) הושתלו לבלוטת החלב של עכבר מדוכא חיסונית NOD-SCID, ממנה הוסרה קודם לכן מערכת הצינוריות האנדוגנית (תמונה 11) בגיל 3 שבועות. שבועיים לאחר מכן הושתלו תאי הבקר. מבנים אפיתליאליים ממקור בקר אופיינו החל משלשה שבועות לאחר ההשתלה. אלה המשיכו להתפתח עד תום המעקב – 8.5 שבועות לאחר ההשתלה (ואף לאחר מכן). בכך נפרץ המחסום של התפתחות בת ששה שבועות שנקבעה בעכברים ערומים (Nude mice). המבנים ממקור בקר הכילו חלל הדומה לזה הקיים באלואלי מעטין עגלה, אך התפתחות של צינורות לא אופיינה. התפתחות המבנים הרב שכבתיים מוקמה באזורים פיברוטיים (תמונה 1H). 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. אנליזה מורפולוגית ואימונוהיסטוכימית הראתה זהות מחולטת בין מאפיני האלואלי בעטין העגלה למבנים הספריים שהתפתחו בבלוטת החלב של העכבר (לא מוצג. ראה Rauner et al., 2013).

בשיתוף עם תוכנית מחקר שממונה על הנהלת ענף בקר, בחנו פרוצדורות אפשריות לשיפור התפתחות מורפולוגיה מבלוטת חלב מבקר בסטרומה העכברית. אחת הפרוצדורות שהוזכרה בתוכנית מחקר זו הינה הגברת הפיברוטיות של הבלוטה העכברית על ידי השתלה מוקדמת ובו זמנית של פיברובלסטים. שתי פרוצדורות שנוספו היו טיפול באסטרון ופרוגסטרון, ושינוי הסביבה התאית על ידי השתלה בו זמנית של תאי בלוטת חלב מעכבר ובקר.

במחקר שפרסמנו השנה (Rauner et al., 2013) נמצא כי השתלה מוקדמת של פיברובלסטים לסטרומה השומנית של העכבר הביאה להגברת הפיברוטיות של הרקמה ולשיפור בקליטת תאי הבקר. עם זאת, לא נמצא שינוי במורפולוגיה הבסיסית שלהם שהמשיכה להיות מורכבת מספרות חלולות, חסרות צינוריות מקשרות. הטיפול בהורמונים הסטרואידים הביא במקרה אחד (מתוך 10) להתפתחות מורפולוגיה דמוית בקר (הוכחת התכנות) והשתלה בו זמנית של תאי בקר ועכבר לא הביאה ליצירת מבנים כימריים אלא התפתחות אינדיבידואלית של כל אחד מהמינים ללא השפעה של האחד על התפתחות האחר. המשך סעיף זה של המחקר, הממומן על ידי הנהלת ענף בקר, הדגים קיום גורם מעכב המופרש מהסטרומה השומנית והמעכב התפתחות ממוספרות (במטריג'ל, המדמות אלואלי) מבקר (Rauner et al., 2013).

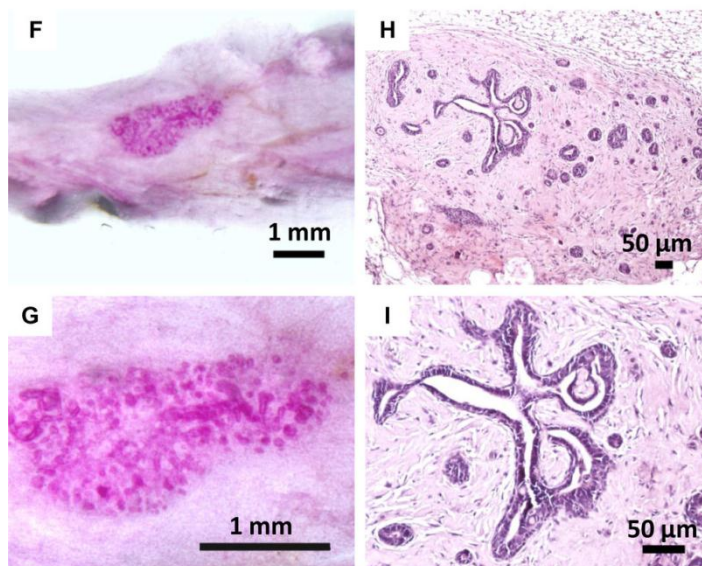
למרות שבמהלך מחקר זה לא יצרנו מתודולוגיה קונסיסטנטית להתפתחות מלאה של רקמת עטין בקר בסטרומה השומנית של העכבר, המבנים דמויי האלואלי אשר התפתחו, משמשים תשתית מספקת לבחינת יכולתן של כל אחת האוכלוסיות התאים שהופרדו ליצור מורפולוגית בקר מתפקדת (ביצור חלבוני חלב)



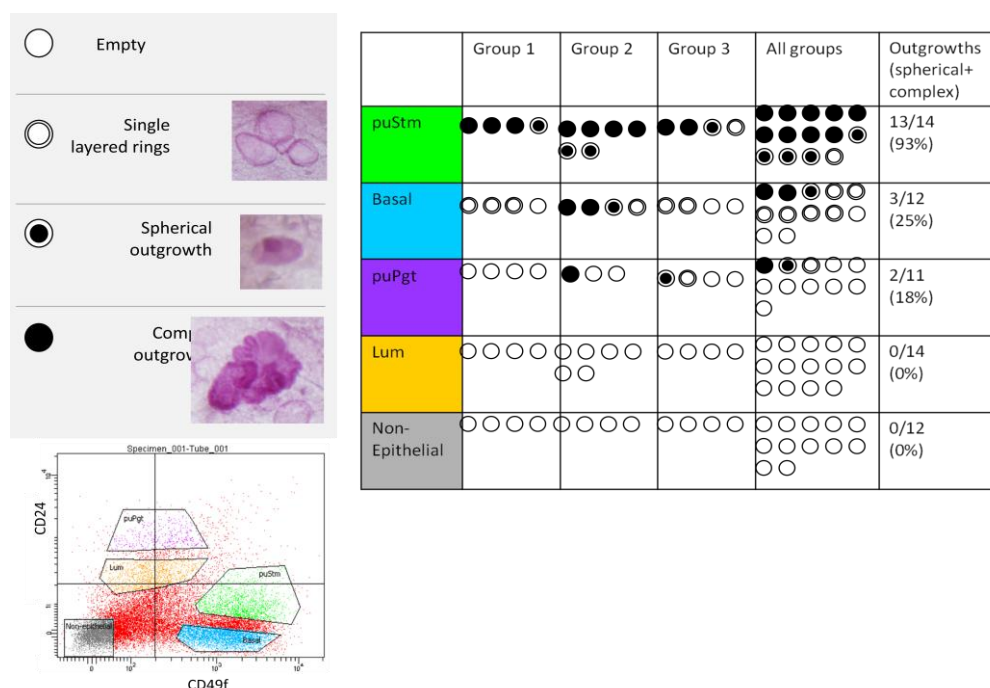
תמונה 11. יצירת מבנים אפיתליאליים ממקור בקר בבלוטת עטין של עכבר. A. פרוצדורת הניסוי. B-D. התפתחות המבנים מבקר לאורך זמן. E. צביעת קרמין של Wholemount מבלוטת חלב של עגלה. F- חתך היסטולוגי של מבנה אפיתליאליים מבקר שהתפתח בבלוטת חלב של עגלה. G. חתך היסטולוגי מבלוטת חלב של עגלה. H. התפתחות המבנים הרב שכבתיים מוגבלת לאזורים פיברוטיים. בינם לבין רקמת השומן העכברית מתפתחים מבנים חד שכבתיים, ובין תאי השומן של הסטרומה העכברית קיימים תאי בקר פזורים ללא התארגנות.

בסטרומה העכברית. אכן, בהמשך, בחנו את כושרן של 4 האוכלוסיות המבודדות מתאי בקר (תמונה 12) ליצור מורפולוגית עטין בקר בבלוטה העכברית.

תמונה 12. התפתחות מורפולוגיה של בלוטת עטין בקר בסטרומה העכברית לאחר איפול ברסטרוגן ופרוגסטרוגן. G, F צביעת קרמין של הרקמה. H, I צביעה בהמטוקסילין ואאוזין של חתר מקובע בבלוק פרפין.



בשלב ראשון, הושתלו 10,000 תאים אפיתיליאליים מהאוקלוסיות המועשרות לבלוטה, אולם לא התקבלה התפתחות באף אחת מהבלוטות המושטלות. הנחנו כי העדרם של תאי תמך ובעיקר פיברובלסטים הוא הסיבה, ויש צורך בשינוי הסטרומה על ידי תוספת תאים אשר יגרמו לסטרומה העכברית השומנית להיות יותר מתאימה לקליטת אוכלוסיות התאים האפיתיליאליים מבלוטת החלב מבקר. לכן בשלב השני עברנו להשתלות על אוכלוסיות מעורבות. לכל אחת מהאוקלוסיות המופרדות, הוסף מספר שווה של תאים לא אפיתיליאליים אשר הופרדו במקביל ב FACS. תמונה 13 מסכמת את התוצאות.

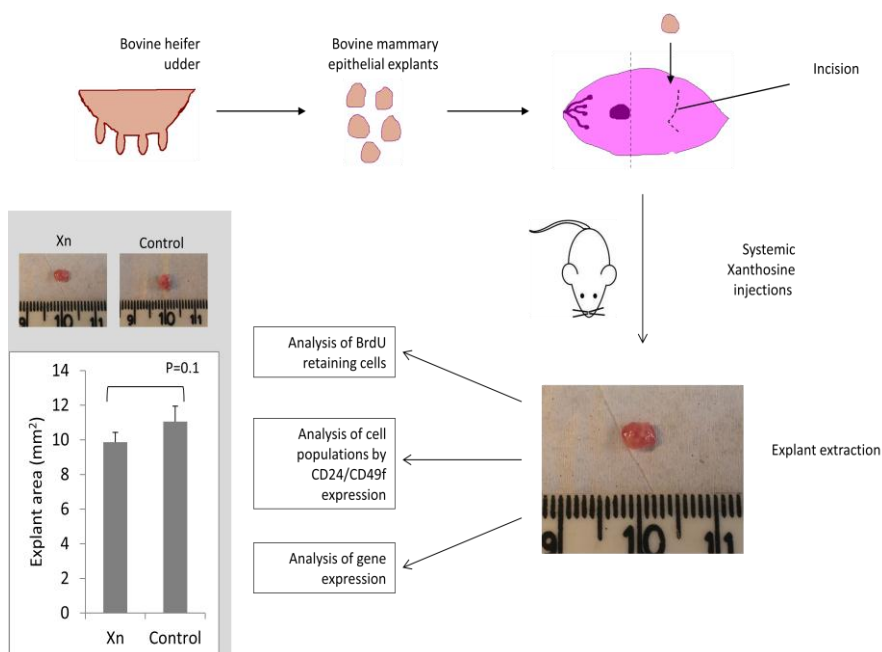


תמונה 13. תוצאות השתלה של תאים אפיתליאליים מהאוכלוסיות השונות של עטין בקר (ביחד עם מספר שווה של תאים לא אפיתליאליים).

נראה כי האוכלוסייה אשר נקבעה על סמך המחקר *in vitro* ועפ"י הספרות כאוכלוסיית תאי הגזע (puStm) היא אכן האוכלוסייה אשר מסוגלת לתת מוצא למבנים רב שכבתיים המדמים את בלוטת החלב של העגלה. האוכלוסייה הבזאלית נתנה מוצא למבנים חד שכבתיים, אשר הם כנראה התאים המיואפיתליאליים בהיקף. כיום אנו מאשרים את יכולת החידוש העצמי של אוכלוסיית תאי ה puStm על ידי השתלות סראליות כמדד משלים המאפיין את תאי הגזע בלבד. נסיונות אלו הינם בעלי לוחות זמנים ארוכים יחסית שכן יש צורך לחכות מספר פעמים תקופות של כ- 8 שבועות להתפתחות מבנים בבלוטת החלב העכברית.

2.2.6. השפעת טיפול בקסנתוזין על התאים האפיתליאליים מבקר. חלק נוסף של המחקר הוקדש לבחינת השפעתו של קסנתוזין על מספר תאי גזע ברקמה. כוון זה נבחר על בסיס עבודתו של קבוצתו של Capucco (2007) אשר הראה שיפור במספר תאים אוגרי BrdU לאחר אינפוזיה, מלווה בזריקות, של קסנתוזין לרקמת העטין של עגלות. תאים אוגרי BtdU הינם תאים אשר מתחלקים בקצב נמוך, ובעבר נחשבו למיצגים קבוצה המועשרת בתאי גזע.

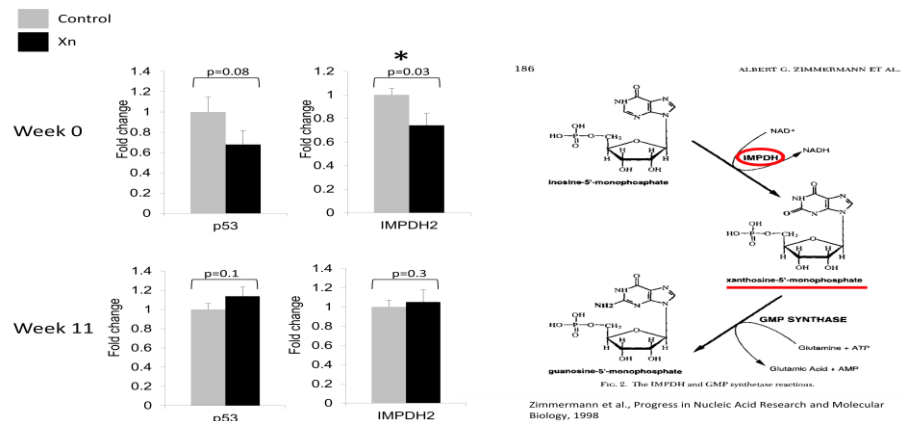
על מנת להקטין את השונות בבדיקה, ולאפשר אנליזות בלוחות זמנים יותר מורכבים בחרנו בגישה שונה מזו של Capucco שהזריק קסנתוזין לעטין העגלה, ולהשתיל פיסות רקמה מעטין בקר לסטרומה העכברית בגיל 3 שבועות. שבוע לאחר ההשתלה החל טיפול בו שבועיים בזריקות יומיות של קסנתוזין. בנוסף, הוזרק לעכברים Brdu על מנת לבחון את השפעת הקסנתוזין על מספר התאים אוגרי ה Brdu לאורך זמן.



תמונה 14. פרוטוקול הטיפול בקסנתוזין.

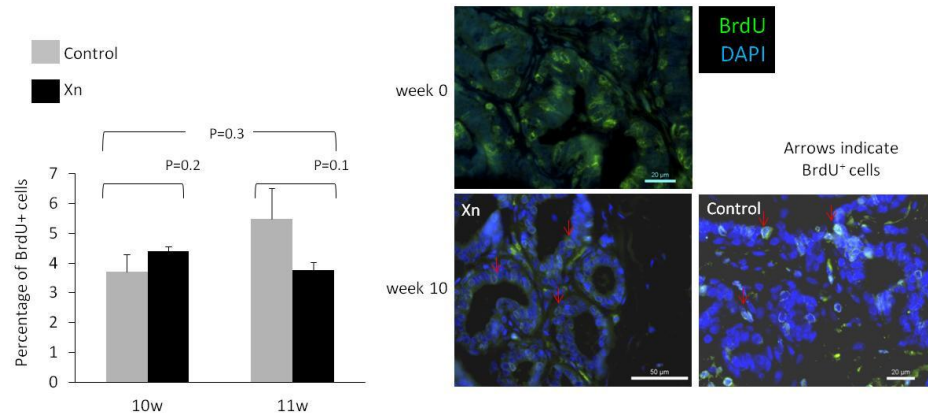
בשלבים הראשונים של הניסוי נקבעה חיוניות מלאה לשתלים מבקר בסטרומה העכברית (תמונה 14). הוצאתם לאחר שבועיים לא הראתה השפעה לקסנתוזין על גודלם. עם זאת לקסנתוזין נקבעה השפעה מטבולית על היזון חוזר של המסלול המטבולי אותו הוא מבקר ברקמת הבקר המושתלת (תמונה 15). באנליזות נוספות נראה היה כי הטיפול בקסנתוזין השפיע באופן חיובי, בטווח המידי אך לא לאורך זמן על בביטוי של הסמן הבזאלי CD49f (תמונה 18). שינוי זה לא בא לידי ביטוי בשינוי בפרופורציות בין

האוכלוסיות (לא מודגם) או בביטויים של סמנים לתאי גזע ברקמות אחרות (לא מודגם). מבחינת התאים אוגרי ה- BrdU,



תמונה 16. הזרקת קסנתוזין גורמת לירידה בביטוי האנזים האחראי על יצורו ברקמת הבקר בתום ההזרקה. מאוחר יותר רמתו של ה- IMPDH חוזרת לנורמה.

הטיפול בקסנתוזין לא גרם לשינוי משמעותי לאחר 11 שבועות של Chase (תמונה 17). במפתיע, טיפול זה גרם לירידה, בטווח הארוך, בקצב הפרולiferציה של התאים כפי שבדבר הודגם בבחינת ביטוי Ki67 (תמונה 18) ובספירת תאים מבטאי PCNA (לא מודגם). זאת ללא שינוי בביטוי גנים המאפיינים תאי גזע או תהליכי התמיינות (לא מודגם מפאת מגבלת מקום).



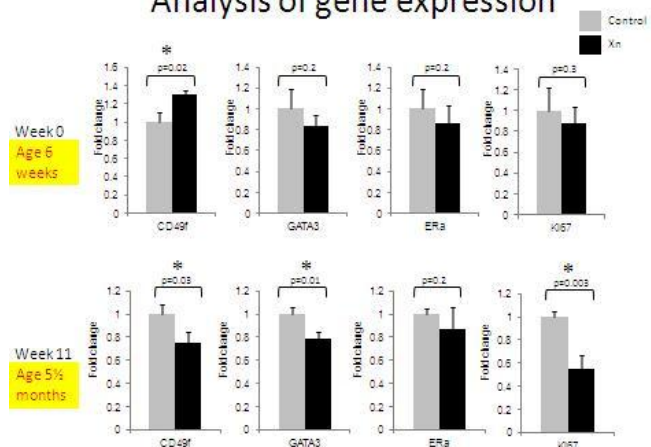
תמונה 17. העדר השפעה לקסנתוזין על מספר תאים אוגרי BrdU.

ניסויים נוספים לקביעת השפעה ישירה של קסנתוזין, מיד לאחר תום ההזרקות ובטווח ארוך ש 11 שבועות מתבצעים בתקופה זו לאפיון המורכבות האפשרית של השפעת חומר זה על אוכלוסיות

ספציפיות במערכת התאית והתמיינותם בבלוטת החלב של הבקר.

תמונה 18. קסנתוזין גורם לירידה בביטוי CK18, סמן לחלוקת תאים, 11 שבועות לאחר סיום הטיפול.

Analysis of gene expression



2.3 דיון מסכם

אוכלוסיית תאים אפיתליאליים מבלוטת חלב של עגלה הופרדה העבודה זו לראשונה, על פי התיעוד בספרות, לארבע תת אוכלוסיות תאים ייחודיות המהוות את שלד ההיררכיה התאית בעטין הבקר. ההפרדה בוצעה על ב- FACS על בסיס ביטוי הסמנים הממברנליים CD24 ו- CD49f. אוכלוסיות אלה אופיינו *in vitro* על פי פרמטרים שונים ועפ"י ביטוי גנים וחלבונים נבחרים כמועשרות בתאי גזע, תאים בזאליים, תאי אב לומינליים ותאים לומינליים ממוינים. רק השתלת אוכלוסיה שסומנה כמועשרת בתאי גזע מבלוטת חלב של בקר לסטרומה העכברית, הביאה ליצירת מבנים אלויאולריים דמויי בקר ובכך אושר מרכיב המולטיפוטנטיות של התאים. יכולת השחזור העצמי בחלוקה סימטרית נבדקת בימים אלה. עם זאת, התפתחות מושלמת של המורפולוגיה מהבלוטה מבקר בסטרומה העכברית מעוכבת כנראה פאראקרינית על ידי גורם המופרש מהמרכיב השומני של הסטרומה העכברית. לאפיון גורם זה בעבודת המשך חשיבות רבה להמשך המחקר. קסנתוזין הוצע כבעל פוטנציאל לשינוי הפרופורציות ביו חלוקה סימטרית וא-סימטרית בעין בקר. במחקר זה טיפול בקסנתוזין בעכברים נושאי שתלים מבלוטת חלב מבקר גורם לשינויים מטבוליים ארוכי טווח במאפיינים תאיים בבלוטה מבקר דוגמת חלוקת תאים, אך לא אובחן שינוי לטווח ארוך בפרופורציה בין האוכלוסיות על פי אגירת BrdU ואנליזה ב- FACS. כיום, אנו ממשיכים ובוחנים את השפעת הקסנתוזין על המאפיינים התאיים של אוכלוסיות התאים השונות הן בטווח הקצר והן בטווח הארוך. השפעה שונה של קסנתוזין בפרקי זמן שונים, מהווה יסוד לשינויים במאפייני אוכלוסיית התאים האפיתליאליים בטווחי הזמן השונים. אפיון ההיררכיה התאית בבלוטת החלב מבקר פותח לדעתנו אופקים חדשים בחקר התפתחות הבלוטה והליכי ההתמינות התאית. הוא מאפשר בחינת אפקטים של חומרים נוספים, פרט לקסנתוזין, ומסלולים מטבוליים ספציפיים על הגדלת המאגר של תאי גזע ברקמה כדרך לשיפור ההמשכיות בפעילות יצור החלב בבלוטה.

2.4 פרסומים מדעיים

- 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. Jerusalem.
- 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.
- Rauner and Barash (2012). Cell Hierarchy and Lineage Commitment in the Bovine Mammary Gland. PLoS ONE 7: e30113.
- 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.
- Rauner G. and Barash I. (2012). Cell hierarchy, Stem Cells, progenitors and differentiation in the mammary Gland. The 24th Annual meeting of the Israeli Society of Ruminant Sciences. Jerusalem.
- 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.
- 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
- Rauner G. and Barash, I. (2013). Impaired development of bovine mammary epithelial morphology following transplantation of dispersed cells into the mouse fat pad: new insights into epithelia-stroma interactions. Gordon Research Conference on Mammary Gland Biology. Stowe, Vt. USA
- Rauner G. and Barash, I. (2013). Transplantation of bovine mammary epithelial cells in the immunocompromized mouse stroma. The 25th Annual Meeting of the Israeli Society of Ruminant Sciences. Jerusalem.

3. סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
אפיון אוכלוסיות התאים בבלוטת החלב מבקר והשפעות אפשריות על מספרם של תאי הגזע.
עיקרי הניסויים והתוצאות.
אוכלוסיית תאים אפיתליאליים מבלוטת חלב של עגלה הופרדה בפעם הראשונה על פי התייעוד בספרות לארבע תת אוכלוסיות תאים ייחודיות המהוות את בסיס להיררכיה התאית בעטין הבקר. על בסיס ביטוי הסמנים הממברנליים CD24 ו-CD49f אוכלוסיות אלה אופיינו כמועשרות בתאי גזע, תאים בזאליים, תאי אב לומינליים ותאים לומינליים ממוינים. השתלת תאי גזע מבלוטת חלב של בקר לסטרומה העכברית מביאה ליצירת מבנים אליואולריים דמויי בקר. טיפול בקסנתוזין גורם לשינויים מטבוליים ארוכי טווח במאפיינים תאיים בבלוטה מבקר דוגמת חלוקת תאים, אך לא אובחן שינוי לטווח ארוך בפרופורציה בין האוכלוסיות על פי אנליזה ב FACS. כיום, אנו בוחנים את השפעת הקסנתוזין על המאפיינים התאיים של אוכלוסיות התאים השונות.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
מאפייני ההיררכיה התאית בעטין הבקר דומים, אך לא זהים, לאלו הקיימים בחיות מעבדה ובאדם. רק תאי גזע מבקר מהווים מקור להתפתחות מורפולוגית בסטרומה העכברית. התפתחות זו אינה מושלמת ודרוש מחקר נוסף לאינטראקציות עם רקמת השומן העכברית. האפקט של קסנתוזין על הפעילות התאית, כנראה הרבה יותר מורכב מהנתונים בספרות, ודרוש מחקר נוסף ויסודי לאפיון.
בעיות שונות לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנוותרה לביצוע תוכנית המחקר?
בהשוואה לידע באדם ובמכרסמים, אוכלוסיית תאי הבקר לא נחקרה כמעט. נראה כי לאוכלוסיה זו מאפיינים ספציפיים הדורשים ואמצעים רבים לצורך אפיוןם ולהעשרת האוכלוסיות לרמה גבוהה יותר. חשוב גם לפתח מערכת שתאפשר התפתחות של מורפולוגיה מושלמת של עטין בקר בבלוטה העכברית. ברור כי לקסנתוזין אפקט ארוך טווח על המערכת התאית, אולם נראה כי הוא מורכב יותר מהדוח בספרות. בידנו האמצעים, וחשוב לברר אפקט זה והשפעתו על אוכלוסיות התאים השונות.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדוח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פנטטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.
Rauner G. and Barash I. (2011). Characterizing bovine mammary epithelial cell populations- en-route to stem cell isolation. 3 rd Annual meeting of the Israeli Cancer Research Association. Jerusalem. Rauner G and Barash, I. (2011). Characterization of Stem-like cells in the bovine mammary gland and their potential contribution to milk production. The 23 rd Annual meeting of the Israeli society of Ruminant sciences. Jerusalem. Rauner and Barash (2012). Cell Hierarchy and Lineage Commitment in the Bovine Mammary Gland. PLoS ONE 7: e30113. Barash I. and Rauner G. (2012). Principle cell populations in the bovine mammary gland: delineation of cell hierarchy and lineage commitment. 10 th International Conference of the Association for Stem Cell Research (ISCCR). Yokohama .Japan. Rauner G. and Barash I. (2012). Cell hierarchy, Stem Cells, progenitors and differentiation in the mammary Gland. The 24 th Annual meeting of the Israeli Society of Ruminant Sciences. Jerusalem. 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. 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 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 Rauner G. and Barash, I. (2013). Transplantation of bovine mammary epithelial cells in the immunocompromized mouse stroma. The 25 th Annual Meeting of the Israeli Society of Ruminant Sciences. Jerusalem.
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
רק בספריות <
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) X <
חסוי – לא לפרסם <
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי?

*יש לענות על שאלה זו רק בדוח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדוח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים