

**השפעת גורם השעתוק Stat5 על התפתחות, יצרנות ותמותת תאים בבלוטת
העטין: פיתוח כלים למניפולציה מבוקרת בפעילות הגן**

Stat5 effects on mammary development, production and involution:
Developing biotechnological tools for manipulating gene expression

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

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

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

Moshe Rickenstein, Institute of Animal Science, Volcani Center, P.O. Box 6, Bet-
Dagan E-mail: Reichen@agri.huji.ac.il

יוני 2009

סיון תשס"ט

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

חתימת החוקר

*

1. תקציר

- 1.1 הצגת הבעיה. גורם השעתוק Stat5a מבקר את התפתחות בלוטת העטין וכן את תהליכי ההתמיינות, יצור החלב ושרידות התאים. Stat5a פועל ברמות שונות במעגל הפוריות, תוך השראת אפקטים שונים בכל שלב. למרות היותו הגורם הדומיננטי בכל הקשור להתפתחות התמינות ויצור בבלוטה, אופי הפעילות של Stat5a עדיין לא ברור, במיוחד בתקופת התחלובה, ומכאן הצורך למניפולציה בפעילותו.
- מטרת המחקר הכללית היתה אפיון פעילותו של Stat5a בחלונות זמנים נבחרים במעגל הפוריות ובחינת השפעתו על ההתפתחות והפונקציונאליות של הבלוטה.
- 1.2 שיטות עבודה. המתודולוגיה מבוססת על החלפת Stat5a אנדוגני ב- STAT5 טרנסגני בעל פעילות מבוקרת (על ידי דוקסיצילין במי השתיה) בבלוטת העטין, ובחינת השפעתו בשלבי מעגל הפוריות, תוך דגש על תקופת הלקטציה (תחלובה). הדבר בוצע על ידי יצור והכלאות של שלשה סוגי עכברים מוטנטיים לקבלת עכבר הנושא שלשה שינויים גנטיים בו-זמנית. מאחר ותוכנית מחקר זו מומנה ב 50% מהיקף המימון המקובל לתוכניות מדען ביוטכנולוגיה נאלצנו ליצור מתודולוגית עבודה שונה וייחודית ליצירת העכבר בעל שלשת השינויים הגנטיים אשר תתאים להיקף המימון. כתוצאה מכך מרבית תקופת המחקר הוקדשה ליצירת המודל ובחינתו, ואילו הניסיונות הביולוגיים החשובים החלו רק במחצית שנת המחקר השלישית.
- 1.3 תוצאות עיקריות. במהלך המחקר יוצרו או התקבלו עכברים הנושאים מערכת רגולטורית (on/off) של STAT5 המתבטאת ספציפית בבלוטת העטין. מערכת זו שילבנו בזני עכברים החשופים להעדר פעילות אנדוגנית. הפעילות העיקרית של STAT5 טרנסגני נמצאה בעטין, אם כי פעילות אקטופית מסוימת נמצאה גם ברקמות נוספות. תוספת דוקסיצילין למי השתיה ביטלה לחלוטין את פעילות STAT5 והגן המדווח לוציפרז בימים שונים משך הלקטציה. גורים לחיות המשונות גנטית אינם שורדים. עם זאת, גורים מאמצים wild type יונקים ונשארים בחיים. הדגמנו פעילות הטרוגנית של STAT5 בין בלוטת העטין השונות עם יתרון לבלוטה מס (5(האחורית). ביטול פעילות STAT5 החל מתחילת הלקטציה גרמה לירידה משמעותית בגדילת הגורים לאחר הלידה.
- 1.4 מסקנות והמלצות: המערכת הביולוגית לבקרה מוחלטת על ביטוי Stat5a בבלוטת העטין פועלת. ברור כי ל Stat5a חשיבות בקיום הלקטציה ויצור חלבוני החלב מעבר לתפקידו בהתפתחות הבלוטה וכנראה ניתן לשלוט בגדילת הולדות על ידי מניפולציה בביטוי. פעילותו יש להמשיך בנסיונות הביולוגיים לבחינת המרכיבים התאים והחלבוניים המושפעים מפעילות Stat5a בחלונות זמנים נבחרים על פעילות בלוטת העטין.

2. דו"ח מפורט

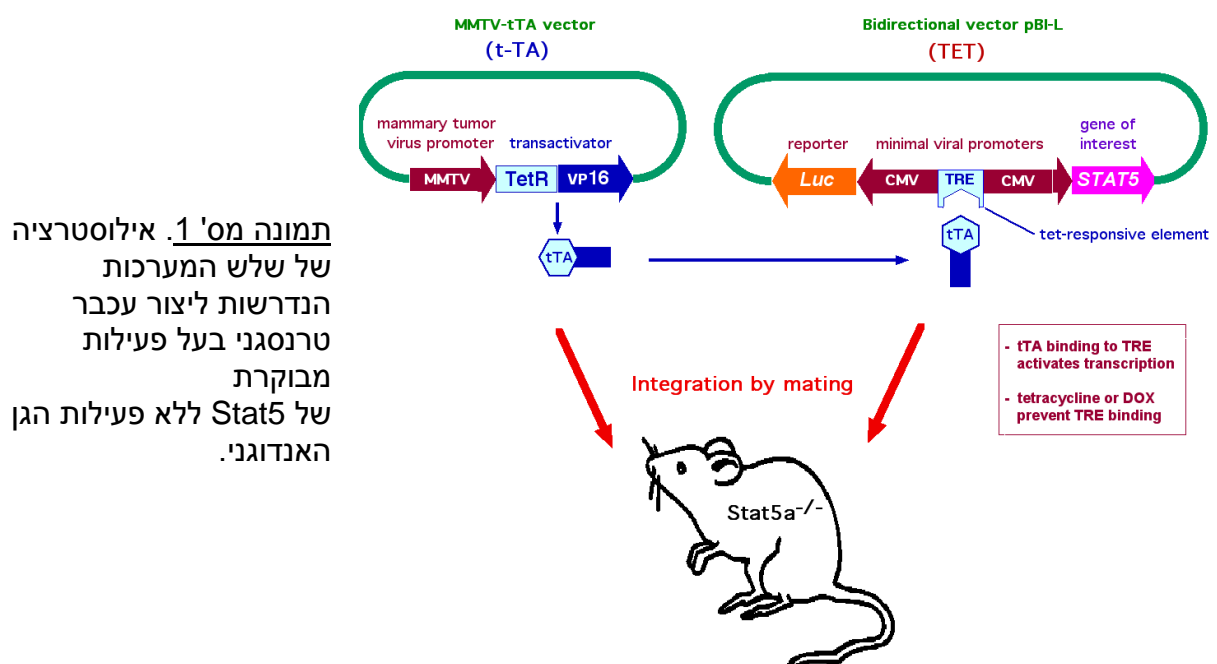
2.1 מבוא

Stat5 הינו גורם שיעתוק המופעל על ידי הורמונים וגורמי גדילה. שני וארינטים Stat5a ו- Stat5b אופיינו באדם ובעכבר. בתגובה לאינדוקציה, Stat5 עובר זירחון ודימריזציה ביטופלסמה ולאחר מכן טרנסלוקציה לגרעין שם הוא נקשר לרצפי DNA ספציפיים. Stat5 ובמיוחד הוארינט Stat5a הינו גורם חשוב בבקרת התפתחות בלוטת העטין בעת ההריון, בבקרת יצור חלבוני החלב בלקטציה ובבקרת תמותת התאים.

מטרת עבודת מחקר זו הייתה יצירת מודל עכבר שיאפשר קביעת "חלונות זמנים" לפעילותו של Stat5 בבלוטת העטין בעת מחזורי הפוריות ובחינת דרך פעילותו. לשם כך היה צורך לבחון את השפעת פעילותו של Stat5 בתקופות נבחרות. ליצירת עכבר בעל יכולת של הפעלה מבוקרת של Stat5 נדרש שילוב של שלוש מערכות שונות ונפרדות: האחת - גורמת להעדר פעילותו של ה Stat5 האנדוגני (Stat5a^{-/-}). השניה - מפעילה ביטוי של STAT5 טרנסגני (חיצוני שמקוקו מכבש והוא הומולוגי ל Stat5a מעכבר) והשלישית - מערכת בקרה הדוקה על הפעלה והפסקת הפעילות הטרנסגנית בבלוטת העטין כתגובה למתן דוקסיציקלין במי השתיה.

המתודולוגיה הבסיסית להשגת מטרה זו מוצגת בתמונה מס' 1 ומבוססת על החלפת ה- Stat5a האנדוגני ב- STAT5 טרנסגני בעל פעילות מבוקרת. לשם כך היה צורך בשילוב תכונות או יכולות גנטיות משלושה סוגים של עכברים הנושאים מודיפיקציות גנטיות:

1. עכברים הנושאים את הגן ל STAT5 טרנסגני החשוף לבקרה חיצונית. במקרה הנוכחי על ידי החלבון tTA המבוקר על ידי תוספת דוקסיצילין במי השתיה.
2. היכולת ליצר tTA, אולם אך ורק בבלוטת העטין (פונקציה של הפרומטר MMTV).
3. העדר Stat5a אנדוגני. (בנוסף, שלש המערכות צריכות להתבטא על רקע גנטי אחיד).



2.2 פרוט עקרי הניסויים

2.2.1 בניית תבנית גנטית המכילה STAT5 responsive element ויצירת חיות טרנסגניות. cDNA

ל- STAT5 טבעי ממקור כבש, אשר הינו הומולוגי ל Stat5a מעכבר ונושא אפיתופ HA המאפשר בחינתו בנפרד מהגן האנדוגני, הוחדר לתבנית ביטוי מסחרית. תבנית זו מכילה גם את הפרומטר ל-CMV הקשור לגן מדווח לוציפרז ואתר רגיש לפעילות tTA (תמונה 1). מניפולציה זו הביאה ליצירת גן דו-כיווני בו הפרומטר ל-CMV מפעיל הן את ה- STAT5 הטרנסגני והן את הגן המדווח לוציפרז שאותו ניתן למדוד בקלות. למעשה, תבנית גנטית זו מאפשרת בחינת פעילות הטרנסגן הן ע"י אנליזה של רמת האפיתופ HA והן על ידי בחינת פעילות הלוציפרז. הקונסטרוקט נוקה על קולונות מיוחדות והוכן למיקרו-הזרקה לגנום של עוברי בני תא אחד. שמונה זני עכברים טרנסגנים יוצרו. זנים אלה נושאים את הקונסטרוקט באתרים שונים בגנום. מאחר והעכברים הטרנסגנים יוצרו על רקע גנטי מעורב, היה צורך להעביר אותם לרקע גנטי של הזן FVB/N. העברה זו בוצעה על ידי הכלאות פנימיות במשך 6 דורות. לאחר מכן נבחנה רמת הביטוי של ה- STAT5 הטרנסגני, בשלב זה עדיין על רקע פעילותו של ה- Stat5 האנדוגני. כפי שיתואר בהמשך, בכל זן של עכברים נקבעה (כצפוי) רמת ביטוי שונה ל-STAT5.

2.2.2 קבלת ובחינת זן טרנסגני MMTVtTA המכיל את ה tTA טרנסאקטיבטור תחת הפרומטר של

MMTV. זן טרנסגני זה התקבל במתנה מד"ר Stanley J Korsmeyer (Howard Hughes Medical Institute, Harvard Medical School, Dana-Faber Cancer Institute, Boston) ומבוסס על פיתוח של Lothar Hennighausen ב NIH אשר החליף בו את הפרומטר המקורי, CMV, בפרומטר של MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) הפעיל בבלוטת העטין. הוא נועד לתפעול התגובה של STAT5 לטטרציקלין באופן ספציפי בבלוטת העטין. זן זה נוצר במקור על רקע גנטי של C57BL/6J. לכן, לצורך בחינת פעילות ה tTA והספציפיות לבלוטת העטין נאלצנו לשנות את הרקע הגנטי של העכברים ל FVB/N אשר קיים בעכברים הנושאים את ה STAT5 הטרנסגני ומוכר במעבדתנו. החלפת הרקע הגנטי בוצעה על ידי זווגים מתאימים במשך שישה דורות. לאור מגבלות התקציב ואופן פרישתו היה חיוני לאשר את פעילות והשפעת ה tTA על רמות ביטוי ה STAT5 הטרנסגני (על ידי יצירת עכבר המשלב שתי תכונות אלה) עוד לפני הזמנת העכבר חסר הפעילות של Stat5a אנדוגני. שחזור זן עכברים זה במעבדות JAKSON מעוברים טרנסגניים לוקח למעלה משישה חודשים. תקציר הניסיונות שנערכו לבחינת הפעילות תלוית הטטרציקלין של ה- STAT5 הטרנסגני יפורט בהמשך.

2.2.3 קבלת ובחינת עכברי Stat5a^{-/-}. עכברים הטרנזיגוטים : Stat5a^{-/+} נרכשו מ Jackson

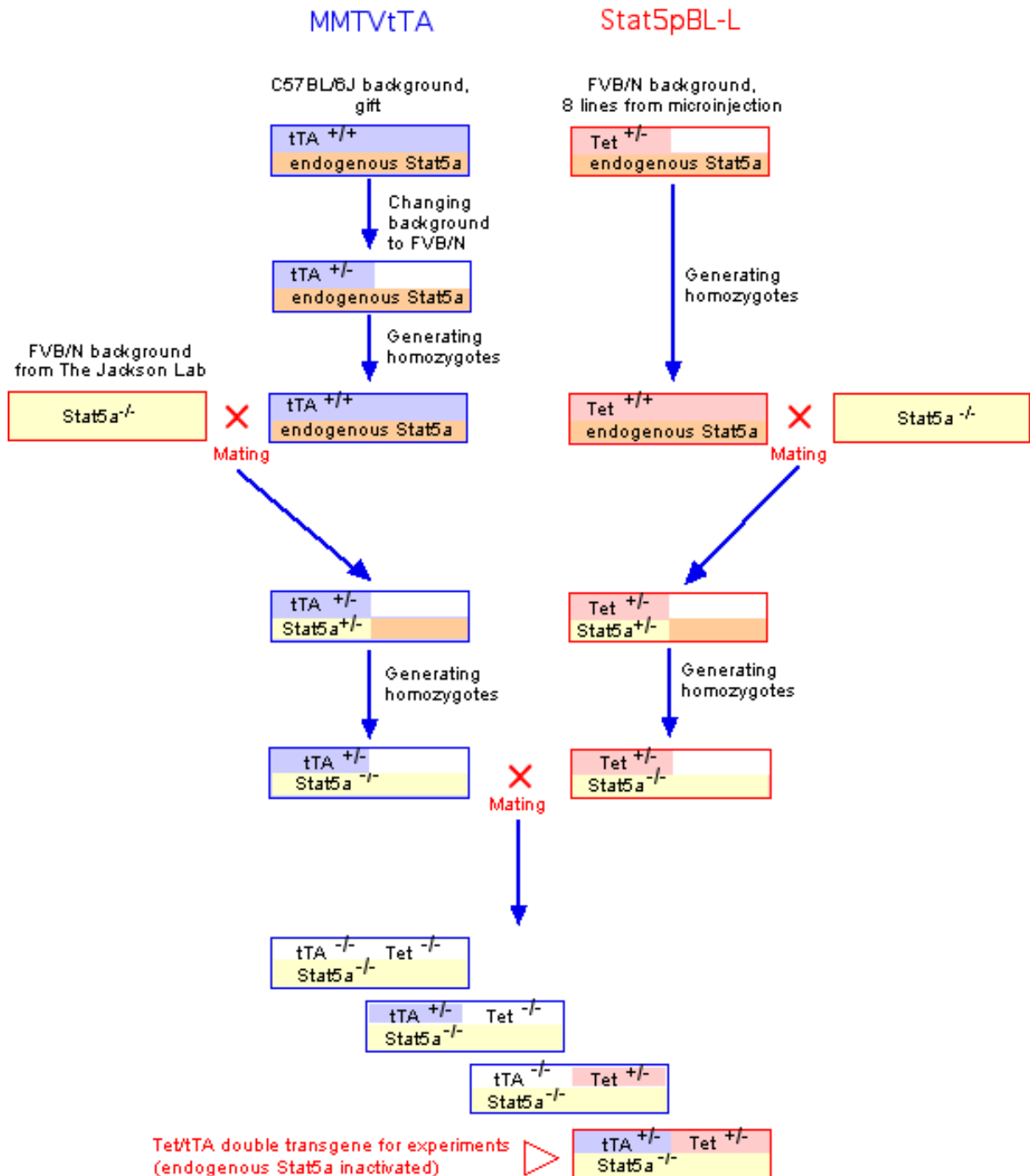
Laboratory. העכברים נשאו רקע גנטי של FVB/N. לנקבות הומוזיגוטיות של עכברים אלה חסרה היכולת להניק את גוריהן. לכן יש צורך להכין ולהשתמש באמהות מאמצות. במקרים אלה התגלתה

בעיה בשרירות הגורים. בסופו של דבר, בצענו החלפה כפולה. לאמהות $Stat5a^{-/-}$ נתנו גורים Wild type ואילו אמהות wild type נבחרו לאמץ את הגורים המוטנטיים.

2.2.4 האסטרטגיה הנבחרת: האסטרטגיה שנבחרה לשילוב התכונות הגנטיות הרצויות מתוארת בתמונה 2. אסטרטגיה זו של יצירת החיה המבוקשת בשני שלבים, נבעה מהמגבלה התקציבית של הפרויקט (שתוקצב שנתית ב 88,000 שקל פחות 25% תקורה) וחייבה יצירת חיות הומוזיגוטיות הן ל tTA (המבוקר על ידי טרציקלין) והן ל STAT5 טרנסגני (Tet). יצירת חיות הומוזיגוטיות מהטרנזיגוטיות נמשכת כ 4-5 דורות. בשלב השני - חיות הומוזיגוטיות מזנים אלה זווגו בנפרד עם עכברי $Stat5a^{-/-}$ ליצירת חיות בי-טרנסגניות הנושאות $Stat5^{-/+}$. צאצאים הטרנזיגוטיים ל tTA או Tet על רקע של $Stat5a^{-/-}$ זווגו לקבלת חיות הטרנזיגוטיות על רקע של $STAT5a^{-/-}$:
 $Tet^{+/-}/tTA^{+/-}/Stat5a^{-/-}$ אשר שמשו בניסויים.

הניסויים שנערכו:

1. בתחילה יוצרו שמונה זנים של עכברים טרנסגניים הנושאים את ה- STAT5/luciferase ומכונים בשם כללי Tet. נבחנה רמת הביטוי של STAT5 טרנסגני. לאחר זווג של נציג מכל זן בניפרד עם עכברי tTA, נבחנו עכברים הנושאים את שני הטרנסגנים הן לרמות ביטוי STAT5 והן לבקרה של ה tTA על התחלת והפסקת הביטוי של ה STAT5/luciferase בלוטת העטין בתגובה לדוקסיציקלין. זאת עוד לפני ההעברה לרקע של $STAT5^{-/-}$.
2. העברת הרקע הגנטי של החיות נושאות tTA ל FVB/N. בוצעו הכלאות עם זכרים מרקע זה במשך 6 דורות, כאשר בכל דור נבחרו החיות הנושאות את הטרנסגן באנליזה גנומית של דגימת DNA מהזנב.
3. קבלת גורים $tTA^{+/-}$. בשיטה דומה של הכלאות ובחירת צאצאים טרנסגניים מתאימים. כאשר כל השגר מכיל עכברים טרנסגניים ההנחה היא שהם הומוזיגוטיים (שנה שניה).
4. זיהוי ואפיון החיות חסרות ה Stat5 האנדוגני. כאן נתקלנו בבעיה רצינית של זיהוי, אשר נבעה מאינפורמציה שגויה שהתקבלה ממעבדות Jackson. היה צורך במיפוי חלקי של אופי השינוי הגנטי אשר עברו החיות על מנת להבין וליצר מערכות של אנליזות PCR והן של אנליזה גנומית-Southern אשר תאפשר לזהות את חיות ה Stat5K/O ותאפשר להבדיל בין חיות הטרנזיגוטיות והומוזיגוטיות (שנה שניה).
5. קבלת גורים $tTA^{+/-} Stat5a^{-/-}$ - על ידי הכלאות המתוארות בתמונה 2 (שנה שניה).
6. קבלת גורים Tet $Stat5a^{-/-}$ - על ידי הכלאות המתוארות בתמונה 2 (שנה שניה).



תמונה 2. אילוסטרציה של האסטרטגיה להכנת חיות בי-טרנסגניות בעלות פעילות מבוקרת של Stat5 על רקע Stat5^{-/-}. מודגשת השמירה על הרקע הגנטי של FVB/N.

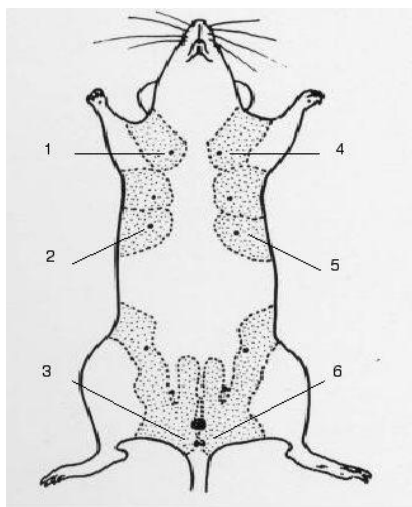
7. שילוב כל שלש המערכות. על ידי הכלאות המתוארות בתמונה 2 (שנה שלישית למחקר).

פעילות בשלב הביניים

בעכברים בי-טרנסגניים שנבנו בשלב הביניים והנושאים את הגנים ל STAT5 ו-tTA נבחנו:

1. רמת ביטוי של לוציפרז אשר אמור לדווח על רמת הביטוי של STAT5 (סעיף 1). בעבר הראינו כי רמות הפעילות של לוציפרז משתנות בבלוטות השונות כנראה כתוצאה מגרויי יניקה. לכן נלקחו דגימות נפרדות משש בלוטות עטין (תמונה 3) לצורך האנליזה. טבלה 1 מראה כי כל החיות

שנבדקו ביטאו את הלוציפרז, אם כי קיימת הטרוגניות בביטוי בין הבלוטות השונות. למרות ההטרוגניות, נתן היה לזהות בין הזנים הטרונסגניים, זנים בעלי רמה גבוהה, בינונית ונמוכה של פעילות הלוציפרז.



תמונה 3. בלוטות העטין מהן נלקחו הביופסיות ממוספרות **במספרים עוקבים**. המספרים העוקבים הינם לצורך נוחות בלבד ושונים ממספרי הבלוטות שמופיעים בספרות.

Line #	1	1	1	2	2	4	4	5	5		
Gland											
1	9508	951	111	573	22	15	10	269	4808		
2	15864	5149	811	78	14	5	2	2827	23518		
3	32364	528	1369	336	9	7	82	28422	41207		
4	27906	122	2	155	1294	2	86	1637	3470		
5	15512	6	930	2638	54	12	30	5829	20994		
6	42111	260	433	5876	443	3741	84	94	72626		
Line #	6	6	6	7	7	12	12	12	12	13	13
Gland #											
1	47	16	0	3096	179	0	1	0	3115	117	174
2	144	905	0	4662	3	480	481	46	6286	29	118
3	3748	894	1	14867	3	33322	6494	4791	1691	15647	1263
4	40	3	5	3842	179	4	532	77	3	322	67
5	122	7	2214	7865	385	1	7570	1372	945	690	157
6	6931	272	194	64866	1834	24	1039	339	1015	2129	1777

טבלה 1. פעילות לוציפרז בבלוטות העטין של חיות בי-טרונסגניות מזנים שונים הנושאות את הגן ל STAT5 ולוציפרז המופעלים על ידי tTA.

2. התלות של פעילות הפרומוטר במצבי לקטציה. מטבלה מס' 2 נראה כי אכן הפעילות של הקונסטרוקט הגנטי תלויה בהיותה של החיה במצב של הנקה. בחיות בתולדות נקבעה פעילות שולית בלבד.

Line	1	1	1	1	2	2	2	1
Stage	virgin	lactation	lactation	lactation	virgin	lactation	lactation	Tet only*
Gland #								
1	3	9508	951	111	3	573	22	2
2	3	15864	5149	811	5	78	14	3
3	1	32364	528	1369	2	336	9	7
4	5	27906	122	2	18	155	1294	3
5	2	15512	6	930	4	2638	54	2
6	2	42111	260	433	1	5876	443	7

* control, lacking system 2 (tTA)

טבלה 2. השפעת הלקציה על פעילות לוציפרז בחיות בי-טרנסגניות בהן STAT5 ולוציפרז מופעלים על ידי tTA. הדגמה פרטנית בזנים השונים

3. השפעת דוקסיצילין במי השתיה על שיתוק פעולת הפרומטר ושיתוק פעילות לוציפרז. בשלב ראשון נבחנה תוספת של דוקסיצילין ל 48 שעות. טבלה מס' 4. מדגימה כי תוספת דוקסיצילין במי השתיה אכן דכאה את פעילות הפרומטר ופעילות לוציפרז בכל בלוטות העטין בשני זנים שונים.

Line	1	1	1	1	1	12	12	12	12	12
DOX	no	no	no	yes	yes	no	no	no	yes	yes
Gland #										
1	9508	951	111	0.2	0.5	0.3	1.0	0.1	1.0	2.5
2	15864	5149	811	0.2	0.2	480	481	46	3.4	1.4
3	32364	528	1369	1.0	0.3	33322	6494	4791	1.9	0
4	27906	122	2.4	0.3	0.5	4.0	532	77	4.1	0
5	15512	6.4	930	0.3	0.6	1.0	7570	1372	3.8	1.4
6	42111	260	433	0.4	1.1	24	1039	339	1.0	1.6

טבלה 4. תוספת דוקסיצילין במי השתיה מדכאת את פעילות לוציפרז בבלוטות העטין. הדגמה פרטנית בזנים הטרנסגניים השונים.

4. הספציפיות של פעילות הלוציפרז לבלוטות העטין. לבחינת הספציפיות של ביטוי STAT5 בבלוטות העטין נבדק ביטוי באיברים ורקמות שונים, פרט לבלוטות העטין (טבלה 3). נמצא כי אכן בלוטות העטין הן האיבר העיקרי בו קיים ביטוי של Stat5. עם זאת, בזנים מסוימים נקבעה פעילות אקטופית מסוימת גם באיברים אחרים. במיוחד בכליות ובריאות.

Line	1	1	2	2	4	5	5	6	6
Mammary gland maximum	5149	1369	5876	1294	3741	28422	72626	6931	905
Salivary gland	102	1	51	687	1409	17	1409	7523	1
Kidney	4350	450	706	1208	264	384	1161	1879	19
Lung	788	582	63	281	209	1087	1140	1549	708
Liver	38	2	48	15	23	5	70	20	2
Muscle	150		63					643	
Heart	14		10					14	
Brain	80		67					1993	

Luciferase activity in tissues, %

Mammary gland maximum	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Salivary gland	2.0	0.1	0.9	53.1	37.7	0.1	1.9	108.5	0.1
Kidney	84.5	32.9	12.0	93.4	7.1	1.4	1.6	2.6	2.1
Lung	15.3	42.5	1.1	21.7	5.6	3.8	1.6	2.1	78.2
Liver	0.7	0.1	0.8	1.2	0.6	0.0	0.1	0.0	0.2
Muscle	2.9		1.1					0.9	
Heart	0.3		0.2					0.0	
Brain	1.6		1.1					2.7	

Line	7	12	12	12	12	13	13
Mammary gland maximum	1834	33322	7570	4791	6286	15647	1777
Salivary gland			955	1	26	660	44
Kidney	19	10	126	17	256	307	18
Lung	906	141	688	84	21	237	683
Liver	4	2	3	1	131	44	4
Muscle							
Heart		3					
Brain		3					

%

Mammary gland maximum	100	100	100	100	100	100	100
Salivary gland			12.6	0.0	0.4	4.2	2.5
Kidney	1.0	0.0	1.7	0.4	4.1	2.0	1.0
Lung	49.4	0.4	9.1	1.8	0.3	1.5	38.4
Liver	0.2	0.0	0.0	0.0	2.1	0.3	0.2
Muscle							
Heart		0.0					
Brain		0.0					

טבלה 3. פעילות אקטופית של לוציפרז מחוץ לבלוטת העטין. הדגמה פרטנית

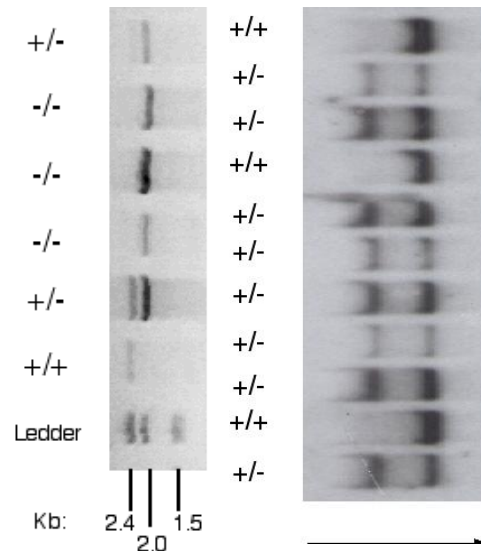
5. מידת ההתאמה בין ביטוי Stat5 לפעילות הלוציפרז. נבחנה מידת ההתאמה בין פעילות לוציפרז וביטוי STAT5 טרנסגני (עפ"י האפיטופ). תמונה מס' 4 מעידה על התאמה טובה, אם כי לא מושלמת, בין פעילות לוציפרז בבלוטות עטין ספיציפיות וביטוי STAT5 טרנסגני.

Transgenic line number	Doxycycline administration	RNA level	Luciferase activity, units /1 mg protein
1	no		27906
1	no		5149
1	no		951
1	2 days		1
1	4 days		0
5	no		23518
5	no		41207
13	no		15647
13	no		2129

תמונה 4. התאמה בין פעילות לוציפרז לביטוי STAT5 בבלוטות העטין השונות. מתן דוקסיצילין במי השתיה מדכא הן את פעילות לוציפרז והן את ביטוי STAT5 טרנסגני.

6. איפיון החיות חסרות פעילות Stat5 אנדוגני

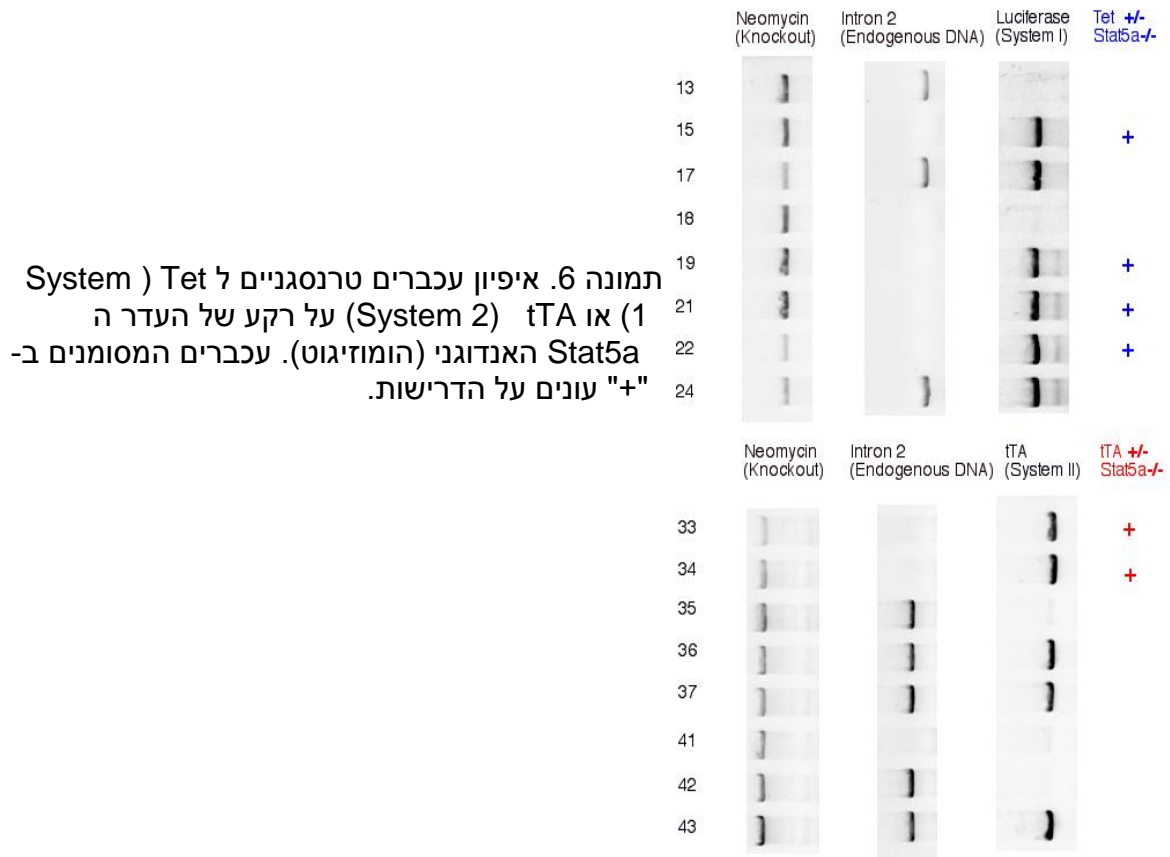
בתמונה מס. 5 אנו מדגימים יכולת הפרדה בין חיות הומוזיגוטיות והטרזיגוטיות ל-Stat5a.



תמונה 5. אנליזה של חיות הומוזיגוטיות והטרזיגוטיות ל Stat5a. שמאל: אנליזת PCR. ימין: אנליזה גנומית של דוגמאות DNA שהופקו מזנבות עכברים.

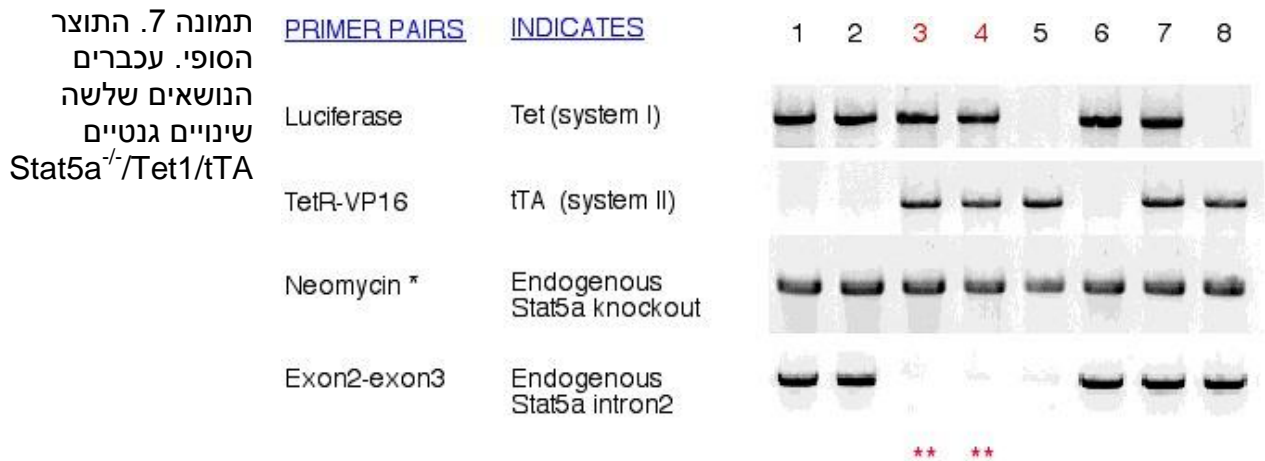
7. איפיון חיות Stat5^{-/-}, הנושאות גם את הגן ל- Tet או tTA. מתמונה 2 נתן לראות כי חיות אלה (המסומנות בחץ) הינן השלב האחרון לפני קבלת החיה הטרנסגנית הסופית בעלת שלשת

השינויים. לאיפיון חיות אלה השתמשנו במספר פרמטרים. 1. קיום הטרנסגן Tet או tTA. 2. העדר החלק מאינטרון 2 המכיל את ה Stat5 האנדוגני. 3. קיום הרצף של נאומיצין המעיד על כל שהחיות הינן Stat5^{-/-} (הומוזיגוטיות או הטרוזיגוטיות להעדר הרצף של Stat5 האנדוגני). לשם ביצוע PCR איכותי רכשנו תמיסת הפקת DNA מחברת Viagen. תמיסה זו מאפשרת ביצוע PCR על דגימות זנב זעירות (1-2 מ"מ), ללא צורך בהשקעת ושליפת ה DNA. רמת האמינות גבוהה. דוגמא לאיפיון החיות מובאת בתמונה 6.



השלב הסופי של יצירת החיות המוטנטיות

8. השלב הסופי. יצירה ואפיון חיות טרנסגניות הנושאות את המערכת הטרנסגנית המושלמת: Tet ו-tTA על רקע של Stat5a^{-/-} בחיות בעלות רקע גנטי FVB/N. מתמונה 7 נתן לראות כי אכן, לפי התחזיות הצלחנו ליצור חיות הנושאות שלשה שינויים גנטיים בגנום על ידי זווג של חיות tTA Stat5a^{-/-} X Tet Stat5a^{-/-}. חיות אלה מזווגות כיום ביסן לבין עצמם להגדלת הפרופורציות של החיות נושאות התוצר הסופי (שלשה שינויים גנטיים בו זמנית).



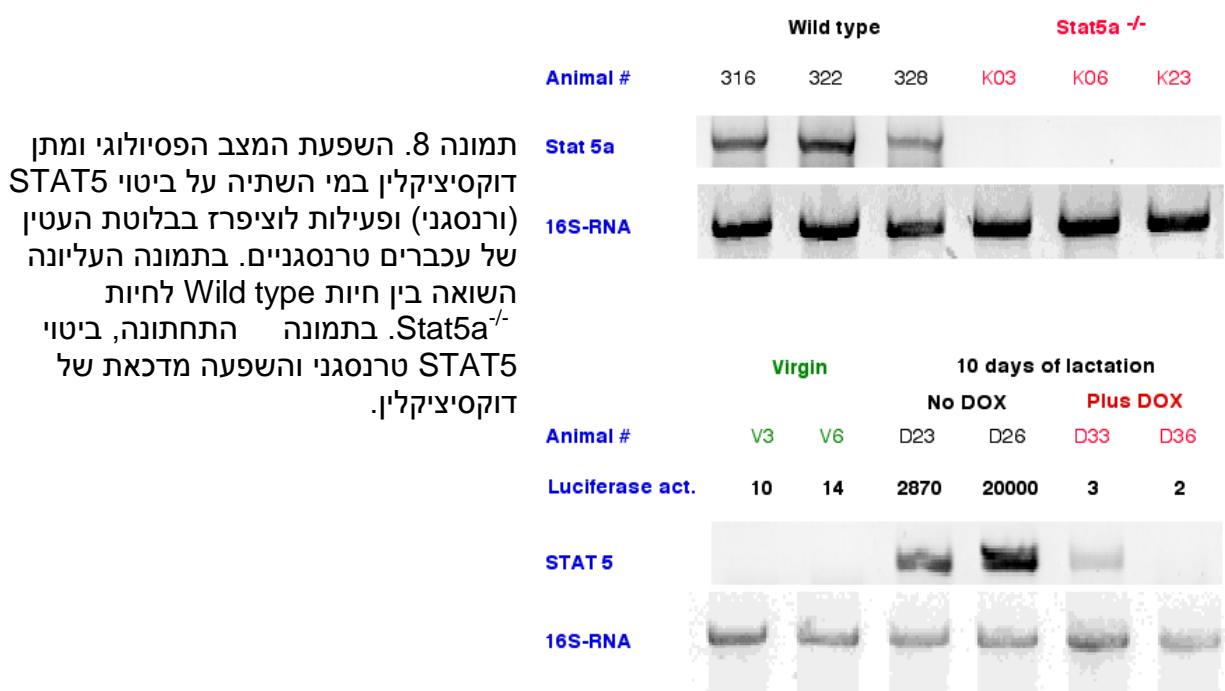
* Neomycin replaces introns 2-3 in Stat5a^{-/-} mice

** Tet-tTA-Stat5a^{-/-} mice

בעכברים אלה נתן לראות את הגן ללוציפרז המיצג את מערכת הביטוי של Stat5/Luciferase והגן ל tTA המיצג את המערכת השניה – מערכת הבקרה. הגן לניאומיצין והעדר המקטע בין אקסון 2 ל-3 בגן ל Stat5a מיצגים את העדר הפעילות של הגן ל Stat5a האנדוגני.

9. בחינת פעילות המערכת ב עכברים המשונים גנטית.

בעכברים שעמדו לראשוננו אישרנו קודם כל כי הפגיעה בגן האנדוגני ל Stat5a בטלה את פעילותו (תמונה 8). במקביל, הדגמנו גם שתוספת של דוקסיצילין למי השתיה גורמת לדיכוי הביטוי של STAT5 טרנסגני במקביל לדיכוי של פעילות הלוציפרז (תמונה 9), כך שאכן פעילות לוציפרז היא סמן אמין לפעילותו של Stat5.



תמונה 8. השפעת המצב הפסיולוגי ומתן דוקסיצילין במי השתיה על ביטוי STAT5 (ורנסגני) ופעילות לוציפרז בבלוטת העטין של עכברים טרנסגניים. בתמונה העליונה השואה בין חיות Wild type לחיות Stat5a^{-/-}. בתמונה התחתונה, ביטוי STAT5 טרנסגני והשפעה מדכאת של דוקסיצילין.

בשלב השני בחנו את פעילות לוציפרז (המשקפת את פעילותו של ה STAT5 הטרוסנגי) בחיות השונות נבחנה פעילות לוציפרז, אשר כפי שהוכח הינה בקורולציה טובה עם פעילות STAT5. מטבלה 4 ניתן לראות כי פעילות לוציפרז גבוהה בחיות בלקטציה בשני סדרי גודל בהשוואה לבתולות. קימת גם עליה הדרגתית בפעילות הלוציפרז מהיום הראשון ללקטציה עד ליום העשירי. ברמת החיה הבודדת, נראה כי קיים יתרון מובהק לפעילות שנמדדה בבלוטה מספר 5 (האחורית ביותר) בהשוואה לשאר הבלוטות.

השלב הבא בכוונתנו ליחס את פעילות הלוציפרז (המבטאת STAT5) לרמת יצור חלבוני חלב שונים בבלוטות, להגדיר את חשיבות פעילות Stat5 בשלבים שונים של הלקטציה ואת רמת התלות בין פעילות STAT5 לביטוי ויצור חלבוני חלב והתפתחות הרקמה בלקטציה.

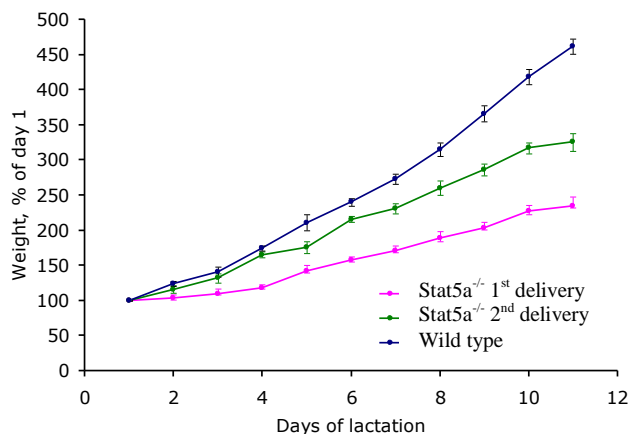
טבלה 4. ההשפעת המצב הפזיולוגי ומתן דוקסיציקלין על פעילות לוציפרז (ל 1 מ"ג חלבון) בבלוטות השונות.

Virgin		Day 1 of lactation	Day 6 of lactation		Day 10 of lactation	
			No Dox	Plus Dox	No Dox	Plus Dox
Glands						
1+2 (upper)	0.3±0.1	105±70	903±542	3.7±2.8	1547±837	1.1±0.2
3+4 (middle)	1.1±0.9	24±5	1037±671	3.0±1.0	3371±2174	2.4±1.0
5 (lower)	12.3±1.2	1262±851	15521±8737	3.0±0.5	15625±5921	1.9±0.4
Average of all sections	4.6±2.5	464±09	5821±3141	3.2±0.5	6848±2315	1.8±0.4
Maximum	13.5	3739±1362	26257±15935	6.5	28957±9066	4.1±1.6

סיכום נתונים לפעילות לוציפרז בבתולות ובזמנים שונים של לקטציה. בחיות מיניקות משך 6-10 ימים, דוקסיציקלין ניתן מיד לאחר ההמלטה.

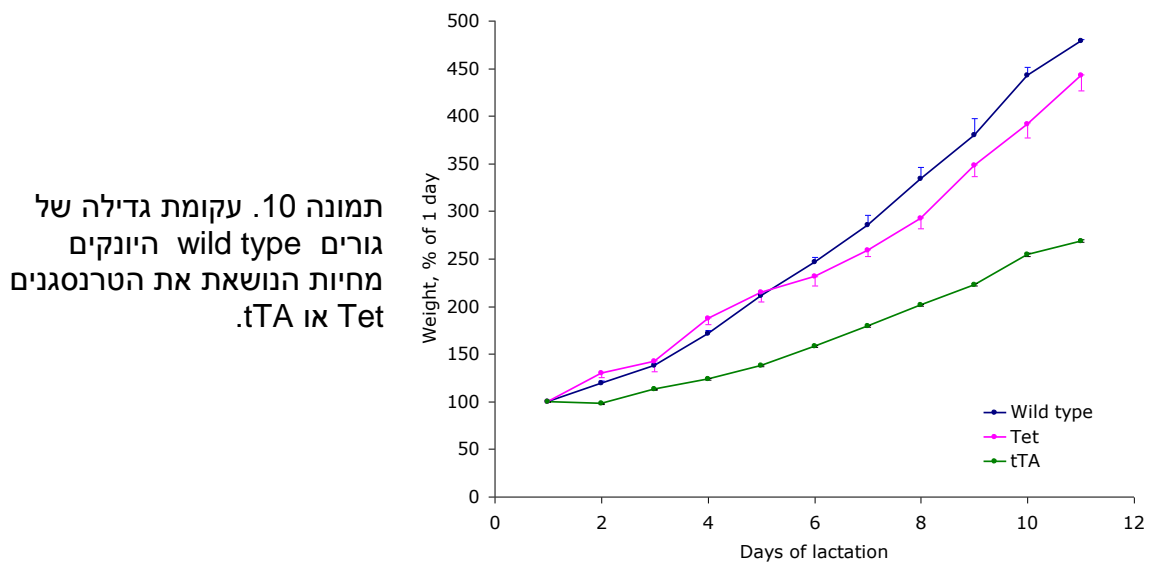
במקביל, החלנו בבחינת הפזיולוגיה של העברים המשונים גנטית. הממצא הראשון שעמד למול עינינו היה תמותת גורים בעכברים Stat5a^{-/-} אשר קבלנו ממעבדות ג'קסון. ממצא זה דווח בעבר על ידי Lothar Hennighausen (NIH) ויוחס לחוסר יכולתה של האם להניק את הגורים כתוצאה להתפתחות לקויה של בלוטת העטין בשלבי ההריון הסופיים. אנו בחנו הנחה זו על ידי החלפת הגורים המקוריים של האם בעלת חוסר הפעילות של Stat5a בגורים מחיה Wild type. להפתעתנו. כל 11 הגורים שהוספו נשאר בחיים, אם כי עקומת הגדילה שלהם היתה איטית יותר. בגיל 11 ימים הגיעו

תמונה 9. השפעת ביטול פעילותו של Stat5a על התפתחות הגורים (מאומצים, wild type) בהמלטה ראשונה והמלטה שניה.



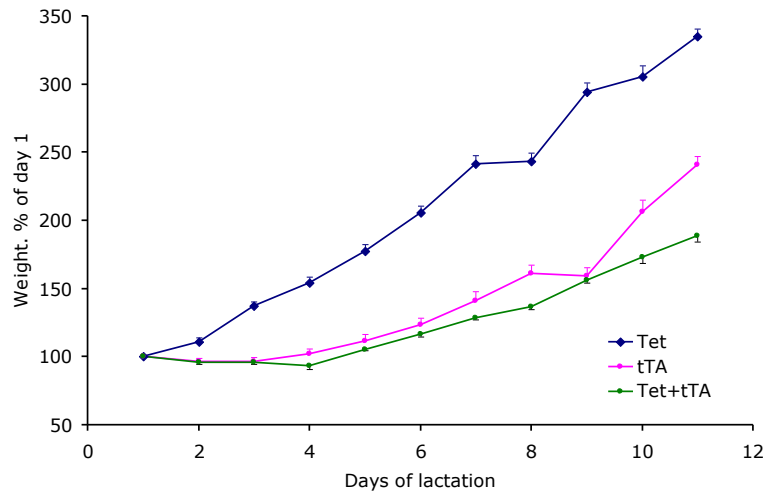
הגורים שינקו מאם חסרת פעילות Stat5a לכמחצית ממשקל גורי הביקורת. עובדה זו מוכיחה כי לפגיעה בפעילות Stat5a באם השפעה על התפתחות העוברים ברחם עובדה המתבטאת גם במשקל לידה נמוך יותר. במקביל גורים Stat5a^{-/-} אשר נתנו לאם wild type גם הם שרדו. מכאן שתמותת הולדות הטבעיים של האמהות חסרות הפעילות של Stat5a נובעת הן מפגיעה בהתפתחות בלוטת העטין והן מבעיה בהתפתחות העוברים. העובדה שחל שיפור בעקומת הגדילה של הגורים שינקו מאמהות לאחר המלטה שניה מציעה כי Stat5b מפצה במידה מסוימת על הפגיעה בהתפתחות הבלוטה כתוצאה מהעדר Stat5a אולם, פיצוי זה מוגבל הן בגלל השונות בין Stat5a ל Stat5b והן בגלל הפגיעה האפשרית בהתפתחות העוברים חסרי Stat5a.

מוערבות Stat5a בהתפתחות הגורים, הביאה אותנו לבחון בנפרד את השפעת כל אחד מהשינויים הגנטיים. נמצא כי בעוד שהחדרת הטרנסגן הכולל את STAT5 ולוציפרז (Tet) לא השפיעה על התפתחות הגורים, הרי שאלה הנושאים את הגן הרגולטורי tTA גדלו לאט יותר באופן משמעותי. לא ברורה הסיבה לדיכוי הגדילה בזן חיות זה. האפקט המעכב של tTA על גדילת הגורים הוא מענים כשלעצמו, כנראה מבטא פגיעה בהתפתחות הבלוטה ונמצא עתה בבחינה היסטולוגית



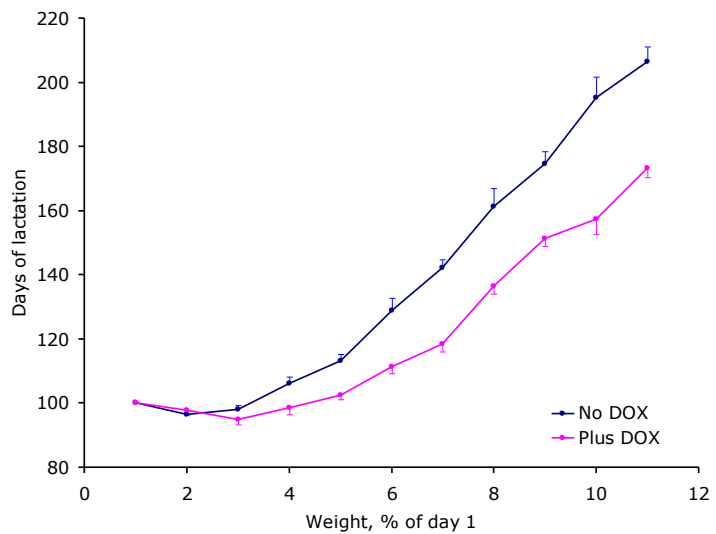
בשלב הבא, נבחנה עקומת הגדילה של גורים wild type היונקים מחיות Stat5a^{-/-} והנושאים את אחת משתי המערכות, או את שתיהן. גם על רקע Stat5a^{-/-} נמצא כי נוכחות הגן הרגולטורי tTA גרמה לדיכוי משמעותי של הגדילה, ושילוב שתי המערכות דיכא את גדילת הגורים אף יותר.

תמונה 11. tTA מדכא גדילת גורים בחיות $Stat5a^{-/-}$. השילוב של Tet ו tTA מגביר את הדיכוי בשלבים מאוחרים של התחלובה.

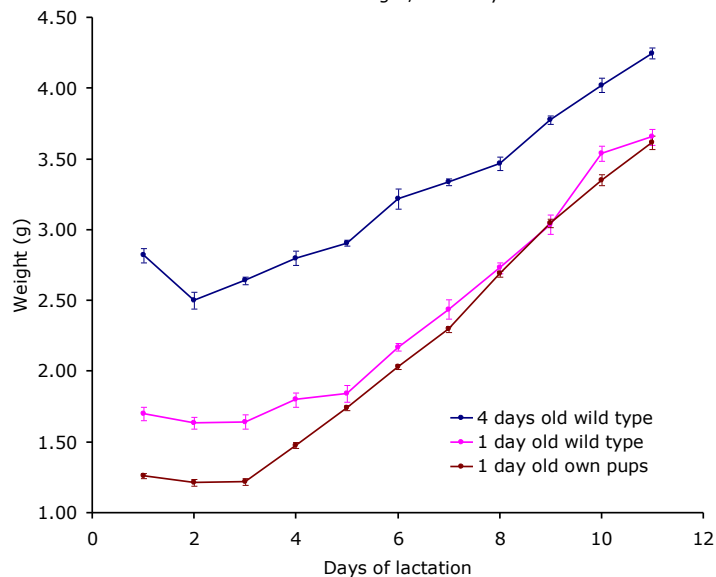


בחיות $Stat5a^{-/-}$ הנושאות את שתי המערכות הטרנסגניות Tet ו tTA מבחנה השפעת דוקסיצילין על קצב גדילת הגורים. מתמונה 12 נראה כי למרות הגדילה האיטית למרות הגדילה האיטית של החיות נושאות שלשת השינויים הטרנסגניים, לדיכוי הביטוי של ה STAT5 הטרנסגני בחיות שלא קבלו דוקסיצילין השפעה מעכבת באופן מובהק על קצב גדילת הגורים.

תמונה 12. השפעת דיכוי ביטוי STAT5 טרנסגני על קצב גדילת הגורים.



תמונה 13. יכולתה המוגבלת של בלוטת העטין בחיות הטרנסגניות מגבילה את קצב גדילת הגורים.



בכל מקרה, ברור כי כושרה של בלוטת העטין המבטאת את ה-STAT5 הטרנסגני בחיות tTA/Tet Stat5a^{-/-} לתמוך בגדילת 11 גורים מוגבל. זאת, למרות הביטוי של STAT5 טרנסגני. הוכחה לכך היא ההתכנסות של עקומות הגדילה של גורים wild type מגילים שונים לקצב הגדילה של הגורים הטרנסגניים (תמונה מס 13). בהקשר לכך, בכוונתנו לבחון שיפור אפשרי ביכולתה של הבלוטה לתמוך בגדילת הגורים בזן חיות נוסף המבוסס Tet 5 בו רמת ביטוי הלוציפרז גבוהה באופן משמעותי.

2.3 סיכום

מטרת עבודה זו היתה לימוד חשיבות ופעילותו של גורם השעתוק Stat5a בבלוטת העטין, במיוחד בתקופת הלקטציה. Stat5a הינו גורם מרכזי בבקרת פעילות בלוטת העטין. במחקרים בודדים נבחנו חשיבותו של Stat5a להתפתחות בלוטת העטין בשלבי ההריון הסופיים. בגלל מגבלת כלי המחקר (חיות Stat5a^{-/-} אשר אינן תומכות בהתפתחות מלאה של בלוטת העטין בהריון) לא ניתן היה להתקדם ולחקור בפרוט שלבים מאוחרים יותר in vivo. לכן, לא נתנה תשובה ברורה לחשיבות פעילותו של Stat5a בתקופת הלקטציה ובתקופת האינבולוציה שלאחר מכן לתהליך יצור חלבוני החלב.

לצורך בחינת חשיבותו של Stat5a בתקופות שונות של מעגל היצרנות יצרנו מערכת ביולוגית מורכבת בה החלפנו את הגן הטבעי ל Stat5a בטרנסגן תואם, המתבטא באופן ספציפי בבלוטת העטין. התבטאותו של הטרנסגן תואמת את תקופות ואופי הביטוי של ה-Stat5a האנדוגני, אולם פעילותו (on/off) בכל זמן נבחר מבוקרת על ידי מתן אנטיביוטיקה (דוקסיצילין) במי השתיה. האתגר שבהחלפת אחד הגורמים המרכזיים בבקרת פעילות בלוטת העטין בגורם מלאכותי הינו גדול. רק מספר מאד מצומצם של מעבדות בעולם נענו לאתגר מעין זה במערכות אחרות. למיטב ידיעתנו בתחום בחינת הפעילות של בלוטת העטין אנו אחת משתי מעבדות העוסקות בכך. לצורך זה, בנינו/קנינו/קבלנו שלש מערכות גנטיות שונות בעכברים ושילבנו את פעילותן. התוצאה היתה קווי עכברים חסרי פעילות אנדוגנית של Stat5a בהם הפעלנו ביטוי טרנסגן תואם ובמקביל גן לוציפרז מדווח. הפעילות של ה-STAT5 הטרנסגני תלויה בשילוב שתי מערכות: מערכת יצור כללית (Tet) ומערכת בקרה המגדירה גם את ספציפיות הביטוי (tTA) ופועלת כל עוד לא מוספים דוקסיצילין למי השתיה. מטעמי מגבלת תקציב (88,000 שקל בניכוי 25% תקורה) בחרנו באסטרטגיה איטית יחסית והשלמת יצור החיה ה-טריפל-מוטנטית התקבלה רק לאחר שנתיים וחצי של עבודה בה נבחנו כל שלבי הביניים. בשלבים אלו בחנו את שילוב ופעילות מערכת הבקרה ואת הפעילות האקטופית של STAT5/ Luciferase באיברים שונים של העכבר, פרט לבלוטת העטין. מצאנו כי אכן דוקסיצילין מבטל את פעילות הטרנסגן וכי פעילות אקטופית מסוימת קיימת באיברים שונים דוגמת כליה, כבד שריר. עם זאת לפעילות זו אין השפעה על ביצועי המערכת בבלוטת העטין.

עם השלמת בנית המערכת הביולוגית, בחנו את מרכיביה. נמצא כי אכן עכברי ה-Stat5a^{-/-} אכן לא בטאו את הגן בבלוטת העטין. נמצאה גם קורולציה מלאה בין פעילות הטרנסגן ל STAT5 לבין פעילות

התוצר של הגן המדווח לוציפרז ותוספת דוקסיציקלין למי השתיה דכאה לחלוטין את ביטוי STAT5 ופעילות לוציפרז.

את השפעת ה STAT5 הטרנסגני בדקנו בשלשה זמנים בתקופת התחלובה. כמדד ראשוני נבחר משקל הגורים. ההנחה היתה ששינוי במשקל הגורים הוא מדד טוב להרכב החלב ו/או לכמותו. נמצא כי גורים wild type הצליחו להתקיים מחלב נקבות Stat5^{-/-}. עם זאת, מסיבה שאינה ברורה עדיין, המרכיב הרגולטורי, tTA, פגע באופן חמור בגדילת הגורים ומנע אינדוקציה על ידי הפעלת הטרנסגן. למרות זאת, גם בנוכחותו של tTA, ביטול פעילות ה STAT5 הטרנסגני עם תחילת ההריון על ידי תוספת דוקסיצילין פגעה בגדילת הגורים עובדה המוכיחה את חיוניותו ומוערבותו הישירה של Stat5a בתהליך הלקטציה. כתלות במימון עתידי מתאים, נושא זה יבדק לעומק ברמת ההסטולוגיה של הרקמה וברמת ביטוי גנים רלוונטיים.

בנוסף לממצאים העקריים המוכיחים את חשיבות Stat5a לתהליך התחלובה נמצאו מספר ממצאים משניים מעניינים. לדוגמא: הטרוגניות בפעילות Stat5a בין בלוטת העטין השונות ודומיננטיות של בלוטת העטין האחורית (מס 5) בביטוי Stat5a (וכנראה בהזנת הגורים). נמצא גם שיפור בגדילה בין גורים שינקו מנקבות מוטנטיות לאחר המלטה שניה בהשוואה לראשונה, עובדה הרומזת ששיפור בהתפתחות הבלוטה לאחר ההמלטה הראשונה ויתכן וגם פעילות יתר של Stat5b שיפרו את הביצועים. כאמור הפתרון לשאלות אלה ורבות אחרות אשר נותרו בלתי פתורות נמצא כעת בהישג יד, זאת לאחר שפותחה המערכת הביולוגית.

3. סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).
 שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.
הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

<p>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה. יצירת מודל בעכבר לבחינת חלונות זמנים לפעילותו של גורם השעתוק Stat5a בבלוטת העטין. בפלטפורמה זו בדיקת השפעת Stat5a על תהליך הלקטציה והתפתחות בלוטת העטין.</p>
<p>עיקרי הניסויים והתוצאות. שלשה שינויים גנטיים אוחדו בעכבר אחד המאפשרים להפעיל ולכבות את ביטוי של STAT5 טרנסגני על רקע העדר הביטוי של הגן האנדוגני. מערכת ההדלקה והכיבוי של הטרנסגן והגן המדווח לוציפרו פעלו כמצופה, אך הגן הרגולטורי עצמו פגע במידה מסוימת בהתפתחות הולדות. התפתחות הולדות הוותה סמן ראשוני לפעילות Stat5a. נמצא שדיכוי ביטוי עם התחלת ההנקה פגעה בהתפתחות ולדות.</p>
<p>מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח? בתקופת המחקר יוצרה הפלטפורמה המדעית/נסיונית לבחינת חלונות הזמנים לפעילות Stat5a. פלטפורמה זו הושלמה ונבדקה רק בשנה השלישית למחקר בגלל תת-מימון. עם זאת כבר בנסיונות ראשוניים הוכחה חשיבותו של Stat5a לתהליך הלקטציה ללא קשר לקצב התפתחות הרקמה בהריון.</p>
<p>בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביה, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתורה לביצוע תוכנית המחקר? משיוצרה הפלטפורמה המדעית לבחינת חלונות זמנים לבחינת פעילות Stat5a בבלוטת העטין יש להשלים את בבחינת השאלות המדעיות הקשורות בהשפעתו של גורם שיעתוק זה על התפתחות בלוטת העטין, על היצור ועל שרידות התאים.</p>
<p>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פנטנים - יש לציין שם ומס' פנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.</p>
<p>לצערנו, בגלל שהפרויקט מומן במחצית מהסכום הרגיל, נאלצנו לבחור אסטרטגיה איטית ליצור החיות הטריפל מוטנטיות. עם סיום הפרויקט אנו עדיין נמצאים בביצוע הניסויים וצבירת החומר המדעי.</p>
<p>פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)</p> <p><input type="checkbox"/> רק בספריות</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) X</p> <p><input type="checkbox"/> חסוי – לא לפרסם</p>
<p>האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחית? כן* - לא -</p>

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

שנים