

הצגת הבעיה : תאי גזע סומטיים (רקמתיים) הינם גורם מפתח בהתפתחותה ובהתחדשותה של בלוטת החלב. ההיפותיזה שלנו היא שמספר תאי גזע נמצא בקורולציה להתמדה בתחלובה גבוהה בבקר, שכן תאים אלה ממשיכים להתמייין לתאים יצרניים אשר מחליפים את אלו שמתים משך התחלובה ומפסיקים לתרום ליצור החלב ומרכיביו. הבעיה בבסיס המחקר הינה כיצד לגרום לשיפור במספר תאי הגזע בבלוטת החלב.

שיטות העבודה: הגדלת מספר תאי הגזע נבחנה בשתי שיטות. האחת, הגבלת אספקת אנרגיה למשך 60 יום והשניה טיפול ברפמיצין על ידי הזרקות יומיות משך 21 יום. רפמיצין הינו מעכב פעילות mTOR. בספרות הודגם כי דיכוי פעילות mTOR בתאים במעי הנמצאים בסביבת תאי הגזע (niche) על ידי הגבלת אספקת אנרגיה מביא להפרשה פרקרינית של גורם המשפיע על מעבר של תאי גזע לחלוקה סימטרית והגברת ה-Self-renewal. בחנו את השפעת שתי השיטות באופן משלים על מספר תאי הגזע בבלוטת החלב האנדוגנית העכברית ובשתלי בלוטת חלב מבקר אשר קוימו ב-Fat pad חסר המרכיב האפיתליאלי של הבלוטה העכברית.

תוצאות עיקריות לתקופת הדו"ח הנדון: (i) הגבלת אספקת אנרגיה וטיפול ברפמיצין, כל אחד בנפרד, משפרים את מספר תאי הגזע בבלוטת החלב. תוצאה זו נקבעה לאור שיפור באורך החיים של תרבית תאים ומספר ממוספרות צפות אשר מקורן מבלוטת חלב של בקר שנחשפה לטיפולים אלה והתפתחות טובה רבה (מבחינת Take rate and occupancy) של מבנים אפיתליאליים שמקורם מתאים מבלוטת חלב של עכברות שנחשפו לטיפול בהשואה לביקורת והושתלו לבלוטת חלב "מאמצת". במקרה של הטיפול ברפמיצין, השיפור במספר תאי הגזע נקבע גם באופן ישיר. (ii) תאים מאוכלוסיה לא אפיתליאלית מהווים Niche הקולט את השפעת הגבלת אספקת האנרגיה ומעביר אותה בדרך של הפרשה פרקרינית לתאי הגזע. תוצאה זו נקבעה בשילוב של ניסויים in vivo להגבלת אספקת אנרגיה וניסויים in vitro לקביעת הפרשה פרקרינית מאוכלוסית תאים ספציפית של גורם המשפיע על תאי גזע. אנליזת RNA-Seq לקביעת מנגנון ההשפעה בוצעה והאנליזה הביואינפורמטית לקביעת המנגנון עדיין נמשכת. (iii) לטיפול ברפמיצין השפעה ארוכת טווח של שיפור בהתפתחות ופעילות בלוטת החלב. תוצאה זו נקבעה הן בבלוטת החלב האנדוגנית של עכבר והן בשתלים מבלוטת חלב של בקר המקוימים בבלוטת החלב של עכבר חסרת המרכיב האפיתליאלי.

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות: להגדלת מספרם של תאי גזע בבלוטת החלב השפעה ארוכת טווח על שיפור בהתפתחות ופעילות בלוטת החלב. בעבודה זו הושג שיפור במספר תאי גזע הן בבלוטת החלב של עכבר והן בשתלים מבלוטת חלב של בקר על ידי טיפול ארוך טווח יחסית של הגבלת אספקת אנרגיה, או טיפול קצר יותר ברפמיצין. נראה שאוכלוסיית תאים לא אפיתליאלית מעורבת בהעברת הסיגנל. יש לדעתנו לבחון את יישום התוצאות בבקר.

דו"ח מסכם לתוכנית מחקר דו שנתית מספר 20-04-49

שיפור במספר תאי הגזע בבלוטת החלב של בקר בדרך של מניפולציה אנרגטית או דיכוי פרמקולוגי זמני של

פעילות mTOR ככלי לשיפור התחלובה

Nutritional manipulation and attenuation of mTOR activity for stem cell-mediated improvement of milk production

שנת המחקר: 2 מתוך 2 שנים

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות
ע"י

איתמר ברש המכון לחקר בעלי חיים. מכון וולקני. מינהל המחקר החקלאי. ראשון לציון

Itamar Barash, Institute of Animal Science. ARO. The Volcani Center. P.O. Box 15159

Rishon LeZiyyon 7528809. E-mail: Itamar.barash@mail.huji.ac.il

רשימת פרסומים והרצאות:

Kfir, S.H. and **Barash, I.** (2019). Calorie restriction and rapamycin administration induce stem cell self-renewal and consequent development and production in the mammary gland. Exp. Cell Res. 382:111477

תוכן עינים

עמוד

4.....	מבוא
4.....	שיטות וחומרים
7.....	תוצאות
14	דיון ומסקנות
18.....	רשימת פרסומים
18.....	רשימת ספרות מצוטטת

מבוא

היפותזת המחקר בבסיסה של עבודה זו מציעה כי מספר גבוה יחסית של תאי גזע בבלוטת החלב של בקר בתחילת התחלובה מייצג את הבסיס התאי להתמדה ברמת יצור חלב גבוהה. בתורם, תאים אלו מהווים מקור למספר רב יותר של תאים ממוינים, ובכללם תאים לומינליים יצרניים אשר מתים ואינם מתחדשים במהלך תקופת התחלובה בבלוטת החלב של בקר. בהתאם, מטרת העל של המחקרים אותם אנו מבצעים כיום בבלוטת החלב הינה השגת שיפור זמני במספר תאי הגזע בבלוטה. לכן, חשוב לדעתנו להבין את הבנת המנגנון המאפשר שינויים במספר תאי הגזע ברמה הבסיסית וכמובן לבחון מעשית את השפעת השינוי על שיפור אופציונלי במדדי חלוקת תאים ויצרנות.

בהתאם לקו מחשבה זה, המחקר הנוכחי משלב מספר אספקטים: האספקט הראשון: בחינת ההיפותיזה כי תאי גזע בבלוטת החלב זקוקים לסביבתם בשביל להגיב לסיגנלים מערכתיים. במחקר זה התכוונו לבחון אם ומי מאוכלוסיות התאים אשר נמצאות בסביבתם של תאי הגזע מתווכת בהעברת הסיגנל.

האספקט השני: מתוך ההנחה שהירידה באספקת אנרגיה גורמת לירידה בפעילות (mTOR בסביבת תאי הגזע), ועל סמך ממצאים במעי הקושרים ירידה בפעילות mTOR ל self-renewal (1) שאלנו האם שימוש במעכב של mTOR- רפמיצין, יוביל גם הוא לשיפור במספר תאי הגזע?

האספקט השלישי: שאלנו האם השיפור במספר תאי הגזע שיושג (ללא קשר בגורם) יביא בתורו גם לשיפור עתידי במדדי חלוקה ויצור בבלוטת החלב? זאת כמובן לאחר שהגורם של ירידה באספקת אנרגיה או דיכוי פרמקולוגי של פעילות mTOR יסתימו.

מטרות המחקר:

1. אפיון אוכלוסית niche היפוטטטית המשפיעה על פעילות תאי הגזע.
2. השפעת הגבלת אספקת אנרגיה וטיפול ברפמיצין על פעילות תאי הגזע בבלוטת החלב.
3. השפעת החזרת המזון, או התאוששות מטיפול ברפמיצין על התפתחותה ויצרנותה של בלוטת החלב. לאור יציאתו של החוקר הראשי לגמלאות, הותאם פרויקט המחקר לשנתיים.

עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

שיטות וחומרים:

עכברים אשר שימשו במחקר: בניסוי שמשו עכברים מזן FVB/N וכן עכברים מדוכאים חיסונית מזן NOD-SCID. העכברים גודלו במחזורי יום/ לילה שווים והזנה ad libitum. למטרת ההליך הכירורגי החיות הורדמו ב-isoflurane (Abbott Laboratories, Maidenhead, England) המעורבב עם חמצן בעזרת מכונת הרדמה וטרינרית.

השתלת רקמה פרנכימתית מעטין עגלה ל De-epithelized fat pad של עכברה מדוכאת חיסונית:

בעכברות נקבות בנות 3 שבועות מדוכאות חיסונית מזן NOD SCID בלוטת החלב #4 נחשפה והרקמה שבין הפטמה לבלוטת הלימפה, בה מתפתחות צינוריות החלב הוסרה. אל תוך כיס שנוצר ברקמת השומן הנותרת (Fat pad) הושלתה חתיכה בגודל של כ-3 מ"מ³ שמקורה ברקמה פרנכימתית של עגלה מזן הולשטיין אשר הובאה מבית המטבחיים בחיפה.

הגבלת אספקת אנרגיה: הגבלת אספקת אנרגיה בוצעה על ידי הגבלת מזון לקבוצת הטיפול של 65% מזה שנצרך על ידי קבוצת הביקורת ביום הקודם. החיות המטופלות קיבלו תוספת ויטמינים למזון.

טיפול ברפמיצין: רפמיצין הוזרק IP במשך 21 ימים. 100 מיקרוליטר בריכוז של 2.08ug/ul.

טיפול באסטרוגן ופרוגסטרון: אסטרוגן הוזרק IP במשך 10 ימים. האסטרוגן הומס באתנול ונמהל ב 10%

10% Tween-80 ו-PEG-400 לפני ההזרקה. נפח ההזרקה היה 50μl והריכוז הסופי של האסטרוגן היה 0.05μg/μl. פרוגסטרון הוזרק IP במשך 10 ימים. הפרוגסטרון הומס בשמן שומשום לריכוז של 0.02μg/μl. נפח ההזרקה היה 50μl.

הפקת תאים משתלי בקר ומרקמת עכבר: לאחר הוצאתן מן החיות הרקמות נקצצו ועוכלו אנזימתית. התאים נשטפו, הורחפו, סוננו דרך חרירים בגודל 40μm ונספרו בהמציטומטר.

אנליזת קלונים (מושבות) בתרבית: תאים בודדים נזרעו בריכוז של 5000 תאים/באר בפלטה של 24 בארות. התאים גודלו במשך 3 ימים ב DMEM-F12 אשר הכיל 5% FBS, הידרוקורטיזון, אינסולין, hEGF, hFGF, כולרה טוקסין, הפרין ו B27. מדיום זה נקרא "Mammary medium". התאים גודלו באינקובטור בטמפרטורה של 37°C, בתנאי לחות של 95% ו- CO₂ 5%. לאחר התפתחותם, הקלונים קובעו ב 4% paraformaldehyde שהכיל 0.03M sucrose.

אנליזת ממוספרות צפות בתרבית: תאים בודדים נזרעו בפלטה של 96 בארות אשר אינה מאפשרת את היצמדות התאים. התאים גודלו ב- "mammary medium" באינקובטור בטמפרטורה של 37°C, בתנאי לחות של 95% ו- CO₂ 5% למשך 20 יום ולאחר מכן הממוספרות נספרו.

אנליזת חלוקת תאים בזמן מוגבל בתרבית: תאים בודדים נזרעו בריכוז של 10,000 תאים/באר בפלטה של 96 בארות. התאים גודלו ב mammary medium באינקובטור בטמפרטורה של 37°C, בתנאי לחות של 95% ו- CO₂ 5%.

זריעת התאים ב Matrigel וטיפול בפרולקטין בתרבית: תאים בודדים נזרעו בריכוז של 400,000 תאים/באר בפלטה של 6 בארות. התאים גודלו ב- mammary medium. לאחר 6 ימים, התאים מכל באר נאספו בעזרת Trypsin-EDTA solution, נספרו ונזרעו מחדש בתוך טיפת Matrigel. מטריקס זה הינו תמצית תאים סרטניים עשירה בחלבון למינין אשר יוצרת סביבה המדמה את המטריקס החוץ תאי (ECM) ויחד עם הורמונים לקטוגנים גורמת לתאים לעבור לשלב ההתמיינות. כל טיפה הורכבה מ Matrigel ו- DMEM-F12 ביחס של 1:1. ריכוז התאים בטיפה היה 1000 cells/μl. התאים ב Matrigel נזרעו בפלטה של 24 בארות וגודלו ב- "mammary medium" למשך לילה. למחרת, הוחלף המדיום למדיום על בסיס DMEM-F12 המכיל: 5%

insulin (5µg/ml), hydrocortisone (1µg/ml), prolactin (3µg/ml), gentamycin (50µg/ml), FBS streptomycin and penicillin (100 mg/ml and 100,000 U/ml, respectively). לאחר יומיים הוחלף המדיום למדיום זהה המכיל FBS 1%.

השתלת תאים: תאים בודדים שמקורם בבלוטת החלב של חיות תורמות (חיות תורמות) הורחפו ב-Matrigel ו-HF ביחס של 1:1 והוזרקו אל De-epithelized fat pad של חיות מזן C57Black (חיות מאכסנות) בעזרת מזרק המילטון בנפח של 20µl. לכל De-epithelized fat pad הוזרקו 120,000 תאים. לאחר ההשתלה החיות גודלו בבית החיות במשך 6 שבועות. בתום הניסוי נקטלו החיות, הוסר ה-fat pad ונבחנה התפתחות רשת הצינוריות המחודשת.

הפקת RNA מרקמה ותגובת Real Time PCR: RNA הופק משתלים או בלוטה אנדוגנית ונהפך ל-DNA. כימות רמת ביטוי הגנים בוצע בשיטת Quantitative Real Time PCR. בשיטה זו, כימות ה-DNA המוגבר בריאקציית ה-PCR נעשה העזרת פרימרים מתאימים על ידי קריאת כמות צבע פלורסנטי המצטבר ב-DNA הדו גדילי במהלך הריאקציה. כימות תוצרי ה-PCR נעשה ביחס לגן הביקורת elF4E.

הפקת RNA למטרת RNA-Seq וביואינפורמטיקה עכברות נקבות בנות 6 שבועות נחשפו להגבלות מזון של 65% בהשוואה לביקורת משך 6 שבועות. בסיום הטיפול, החיות נקטלו, סוספנצית תאים הופקה ו תאים Lin⁻ נלקחו להפרדה ב FACS. בהפרדה זו נאספו אוכלוסיות התאים CD49^{neg} CD24^{neg} אשר אופינו בהפרדות קודמות כאוכלוסיה לא אפיתיליאלית. 15,000 אירועים (כ 10,000 תאים) נאספו לתוך תמיסת אקסטרקציה. PA⁺RNA הופק בעזרת קיט מיוחד למספר תאים מועט ועזרים מגנטיים ונשלח לאנליזה ב INCPM. האנליזה הגנומית בוצעה על פי פרוטוקול MAR-SeQ, אשר בעיקרון בוחן רצפים מאופיינים באזור ה'3'. הדוגמאות רוצפו במכשיר אילומינה: Illumina NextSeq machine. The output was ~39 million reads per sample. האנליזות הביואינפורמטיות בוצעו לאחר הורדת האדפטורים בהתאם לפרוטוקולים בסיסיים של ה INCPM ולמסדי נתונים של גנים המקודדים לחלבונים מופרשים.

קיבוע רקמות: שתלי בקר ובלוטות חלב עכבריות קובעו בתמיסת Bouin למשך לילה ב-4°C. הוצאת המים הקיימים ברקמה בוצעה על ידי סדרת שטיפות בריכוזים עולים של אתנול. הרקמות הוצללו על ידי קסילן ולאחר מכן קובעו בבלוק פרפין. הדוגמאות בפרפין נחתכו לחתכים בעובי 4µm במיקרוטום.

קיבוע תאים בתרבית: קיבוע תאים בוצע בבאר בה גדלו התאים באמצעות תמיסת PFA 4% המכילה 0.03M סוכרוז. האנטיגן נחשף על ידי טיפול ב-0.5% Triton X-100 במשך 5 דקות.

צביעת Hematoxylin & Eosin (H&E): שיטה זו שימשה להדגמת מורפולוגית הרקמה. לאחר הסרת הפרפין נצבעו החתכים ב- Hematoxylin למשך דקה, נשטפו במי ברז ולאחר מכן נשטפו ב-Acid alcohol. החתכים נצבעו ב- Eosin במשך דקה וחצי, נשטפו ב- אתנול וקסילן, כוסו בדבק dPX על בסיס קסילן וזכוכית מכסה.

קביעת ביטוי חלבונים בשיטות Immunohistochemistry ו-Immunofluorescence: שיטות אלו נועדו לזיהוי מיקום, ביטוי ופעילות חלבונים נבחרים ברקמה ובתרבויות תאים על סמך תגובתם עם נוגדנים ספציפיים. בשיטת Immunohistochemistry, לאחר הסרת הפרפין מהרקמה, עוכבה פעילות פרוקסידאזות אנדוגניות

ונחשפו האנטיגנים. חסימת קישור בלתי ספציפי ברקמות נעשה על ידי הגבה עם Goat serum. הרקמות עברו אינקובציה למשך לילה עם נוגדן ראשוני, נשטפו והוגבו עם נוגדן שניוני. בשיטת Immunohistochemistry זיהוי הנוגדן הראשון בוצע על ידי הגבת הרקמה עם ריאגנט N-Histifine המכיל נוגדן שניוני המוצמד ל-HRP. הסיגנל נוצר לאחר תגובה עם הסובסטרט (DAB) Diaminobezidine. בשיטת Immunofluorescence זיהוי הנוגדן הראשון בוצע על ידי הגבת הקומפלקס אנטיגן-נוגדן ראשוני עם נוגדן שניוני מתאים המוצמד לצבע לצבע פלורסנטי. גרעיני התאים הוגבו עם DAPI.

אנליזת Flow cytometry. קביעת מיקום התאים בהיררכיה התאית והשפעת הטיפולים על מספרם היחסי של התאים בכל אוכלוסיה בוצע באנליזת Flow cytometry במכשיר Aria III במחלקה לשירותים ביולוגים של מכון ויצמן. להפרדת האוכלוסיות השונות השתמשנו בנוגדנים ממבאנליים מסומנים פלורוסנטיים. Lin⁻ בוצע תוך שימוש בקיט mouse mammary enrichment, על פי המלצות היצרן. המידע הנאסף נותח והוצג בעזרת התוכנה FACSDiva או FlowJo.

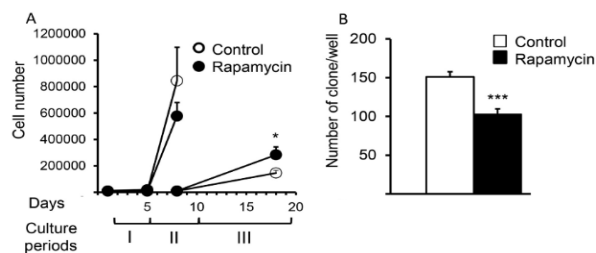
תוצאות

2. השפעת הגבלת אספקת אנרגיה וטיפול ברפמיצין על פעילות תאי הגזע בבלוטת החלב

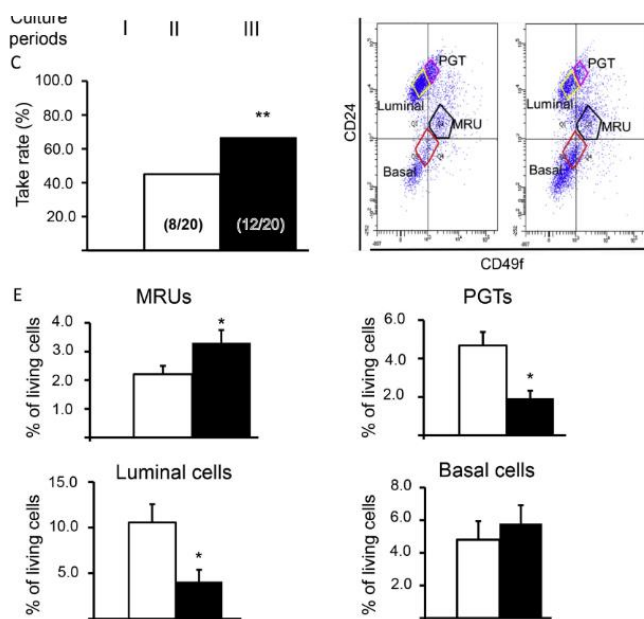
להקלת התאור בחרנו להתחיל בסיכום תוצאות השפעת הגבלת אספקת אנרגיה וטיפול ברפמיצין על פרמטרים של מספר תאי גזע בבלוטת החלב. הנסיונות חולקו כך שעבודה in vitro בוצעה בהקשר לאנליזת תאי בקר מבקר ונסיונות השתלה בוצעו בתאי גזע מבלוטת חלב של עכבר. מתמונה 1 ניתן לראות הקבלה בהשפעת הגבלת אספקת אנרגיה (Calorie restriction, CR) של כ 60 יום על שיפור במדדים הנמצאים בקורולציה ישירה עם מספרם של תאי הגזע בבלוטה, או אף על מדידה ישירה של מספרם.

ניתן לראות כי הגבלת אספקת אנרגיה בתאי בלוטת חלב מבקר הביאה לעליה במספר הממוספרות הצפות (הנוצרות מתאי גזע) (2) ולהארכת משך התרבות של תאים אפיתליאליים מבלוטת החלב המהווה מדד אופטימלי למספר תאי הגזע ההתחלתי (3). בעכבר, השיפור באוכלוסית תאי בגזע בבלוטת החלב התבטא ב Take rate גבוה יותר ובאיכלוס שטח גדול יותר של ה Fat pad השומני. טיפול ברפמיצין על ידי הזרקות יומיות משך 21 ימים גם הוא הביא להגדלה במספר התאים מבלוטת חלב של בקר המתחלקים לאורך זמן ולירידה במספר הקלונים. במקביל, בעכבר, ניתן היה למדוד את מספר תאי הגזע ולהראות באופן ישיר הגדלה במספרם של תאי הגזע וירידה במספר התאים הממוינים (תאי אב לומינליים ותאים לומינליים ממוינים). כמו כן הראינו כי הגבלת אספקת אנרגיה הביאה לעליה במספרם של הבלוטות אשר פיתחו outgrowths לאחר השתלת אוכלוסית תאים (לא מופרדת). בכך ניתן אישור עקיף כי טיפול ברפמיצין, בדומה לטיפול ארוך יותר של הגבלת אספקת אנרגיה הביא להסטת שיווי המשקל התאי בבלוטה ולשיפור במספרם של תאי הגזע.

טיפול ברפמיצין

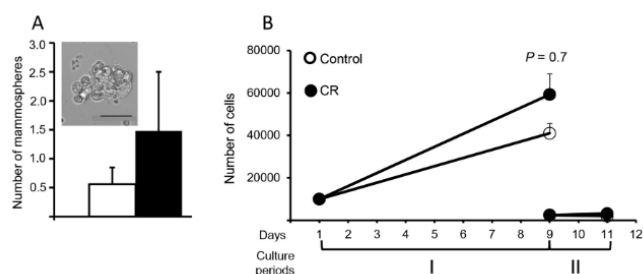


תרבית תאי בקר

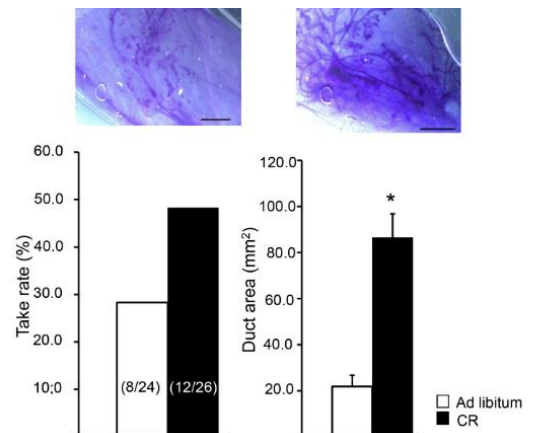


התפתחות outgrowths ואנליזת תאי גזע בעכברים

הגבלת אספקת אנרגיה (CR)



תרבית תאי בקר



התפתחות outgrowths בעכברים

תמונה 1. הגבלת אספקת אנרגיה או טיפול ברפמיצין משפרים מדדים שהינם אינדיקטיביים לעליה ב *self-renewal* של תאי גזע בבלוטת החלב של בקר ועכבר. מימין: בפנל העליון מודגמים שיפור במספר הממוספרות הצפות וקיום התרבית בשתלי בקר מעכברים מטופלים. בפנל התחתון מודגמים שיפור ב *Take rate* ובמספר הצינוריות שהתפתחו לאחר השתלת תאים מעכברים שנחשפו להגבלת אספקת אנרגיה. משמאל: למעלה, טיפול ברפמיצין משפר אף הוא את קיום הרקמה ומספר הממוספרות בתרבית תאי בקר שהוצאו משתלים. בפנל התחתון מודגמת מדידה של אוכלוסיות התאים לאחר טיפול ברפמיצין. שיפור ניכר במספר תאי הגזע וירידה מקבילה נראית במספרם של תאי האב הלומינליים ובמספר התאים הלומינליים.

1. מוערבות אוכלוסיית niche בהשפעת הגבלת אספקת אנרגיה על self-renewal של תאי גזע

מבלוטת החלב

בסעיף קודם הראינו כי הגבלת אספקת אנרגיה משפיעה חיובית על מדדים המאשרים הגדלת מספר תאי גזע בבלוטת החלב הן של עכברים והן של בקר. מדדים אלו כללו יצירת outgrowth לאחר השתלת תאים לבלוטת החלב של עכברות מדוכאות חיסונית, יצירת ממוספרות צפות בתנאים של חוסר קשר לסביבה וגדילה וחלוקת תאים לאורך זמן.

בספרות דווח כי תאי גזע הינם תאים אשר "נמנעים" מלהגיב ישירות לסיגנלים מערכתיים ולעיתים נזקקים לתווך של סביבתם על מנת להגיב לסיגנל (1). ההשפעה של תאי הסביבה על אוכלוסית תאי הגזע היא בדרך של הפרשת חומרים פארקרינית או הפרשה ללמערכת הסיסטמית. על מנת לברר אם יש אוכלוסיה פוטנציאלית, מאלה הקרובות פיזית לאוכלוסית תאי הגזע ומוגדרות כ niche, אשר משפיעה על תגובתה להגבלת אספקת אנרגיה נבחרה, לאחר מספר נסיונות פרלימרים (אשר מפאת מגבלת מקום לא יפורטו) הגישה הבאה: שלב ראשון הגבלת אספקת אנרגיה *in vivo*: עכברות נקבות נחשפו להגבלת אספקת אנרגיה של 65% בהשוואה לאלה שהוזנו *ad libitum* משך 8 שבועות.

שלב שני – הפרדת תאים: בתום הניסוי, העכברות נקטלות, בלוטת העטין מס 4 מוסרת (משני הצדדים) ומעוכלת לסוספנצית תאים. מאוכלוסיה זו מוצאים תאי גם אדומים ופיברובלסטים (Lin⁻) ושאר התאים נלקחים לאנליזת FACS על פי ביטוי CD49f ו-CD24. ארבע אוכלוסיות פוטנציאליות (כ- niche) מופרדות: 1. אוכלוסיות תאים בזאליים; 2. אוכלוסיות תאי אב לומינליים; 3. אוכלוסיות תאים לומינליים ממוינים; 4. אוכלוסיה תאים לא אפיתליאליים (תמונה 2).

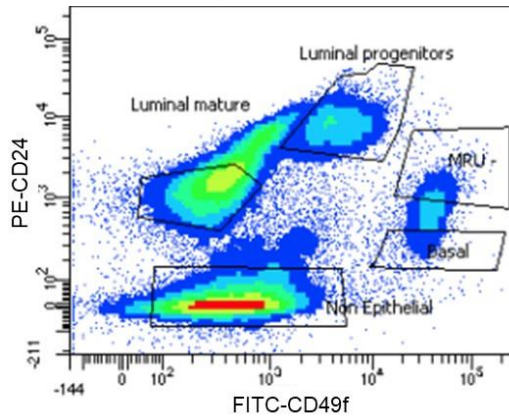
השלב השלישי מתבצע בתרבות. האוכלוסיות שהופרדו עוברות אינקובציה לפרקי זמן ובסוגי מדיומים נבחרים בתרבות. Condition medium הכולל בתוכו חלבונים מופרשים (כמובן גם בהשפעת הטיפול) נאסף ומוקפא. שלב רביעי: תאי גזע מעכברות (שלא נחשפו לטיפול) מופרדים ב FACS על פי רמות הביטוי של CD24 ו-CD49f (תמונה 2).

שלב חמישי: תאי הגזע מודגרים בתרבות עם ה condition medium (שלתוכו הופרשו חומרים) מהתאים של האוכלוסיות השונות ונבחנים פרמטרים של גדילה לאורך זמן ויצירת ממוספרות צפות אשר הם כאמור פרמטרים למספר תאי גזע התחלתיים.

בדרך זו נערכו 11 נסיונות נפרדים אשר בחנו בתורם שיפורים שונים בתחום ההפרדה ובמיוחד בתחום התרבות (לוחות זמנים, סוגי מדיומים ואספקטים טכניים נוספים). לנוחות הקורא נביא תוצאות ניסויים מיצגים.

Condition medium מאוכלוסיות תאים אפיתליאליים של בלוטת החלב אין השפעה על מדדי self-renewal של תאי הגזע מרקמה זו. טבלה מס 1 מסכמת תוצאות ניסויים בהם תאי גזע מבלוטת החלב הודגרו ב Conditioned medium שנאסף לאחר 4 ימים בתרבות של אוכלוסיות תאים אפיתליאליות שונות מבלוטת החלב ובמצבי התמינות שונים.

תמונה 2 מדגימה את הפרדת פרקציות תאיות השונות מבלוטת חלב של עכבר כפי שהופרדו ב Flow cytometry תוך שימוש בנוגדנים ל CD24 ו CD49f. תמונה דומה נקבל גם בהפרדת תאים מבלוטת חלב של בקר. ניתן לראות את פרקציות התאים האפיתליאליות (תאים לומינלים ממוינים, תאי אב (פרוגניטורס), תאים בזאליים ותאי גזע (MRU). ניתן לראות גם את פרקצית התאים הלא אפיתליאליים.



תמונה 2: הפרדת תאי בלוטת חלב ב flow cytometry
מוספנצית תאים לאחר Lin-. ההפרדה מבוססת על ביטוי דיפרנציאלי של CD24 ו CD49f. MRU- Mammary repopulation units = Stem cells.

מטבלה 1 ניתן לראות כי ל condition medium שנלקח מאוכלוסיות האפיתליאליות השונות של עכברים שנחשפו להגבלת אספקת אנרגיה לא נמצאה השפעה על מדדי self-renewal בהשוואה לעכברי ביקורת. לעומת זאת, מדיום שנאסף מתרביות של האוכלוסיה הלא אפיתליאלית של עכברים שנחשפו ל CR גרם לחלוקת תאים מוגברת של תאי גזע לאורך זמן וליצירה רבה יותר של ממוספרות צפות בתנאים של חוסר קשר עם הסביבה (שני המאפיינים העיקריים בתרבית של מספר תאי גזע, תמונות 3 ו 4). בניסוי מס 109 עסקנו רק באוכלוסיה הלא אפיתליאלית (תמונה 3). בבחינת חלוקת תאים לאורך זמן הרחבנו את הבדיקה וקיימנו את תאי הגזע משך ארבעת הימים הראשונים לתרבית גם במדיום המכיל 65% מכמות הנוטריינטים אשר מכיל מדיום רגיל. במקביל בחנו Conditioned medium שנאסף לא רק בארבעת הימים הראשונים לתרבית, אלא גם בימים 5, 6, 7 (כל יום בנפרד). הטיפולם כללו תאים מחיות ביקורת ומחיות שהוגבלו באספקת האנרגיה, אשר טופלו במדיום מלא ותאים מחיות שהוגבלו באספקת האנרגיה אשר טופלו במשך ארבעת הימים הראשונים גם במדיום חסר המהול ל 65% מהמדיום המלא ובכך למעשה "מאריך" את השפעת הגבלת אספקת האנרגיה גם לתוך התרבית. כפי שניתן לראות בניסויים אלה ל Conditioned medium שנאסף מאוכלוסית תאים לא אפיתליאליים נמצאה השפעה חיובית על מדדים של קיום בתרבית ויצירת ממוספרות צפות. פרוט הנסיונות מופיע בכותרת של תמונות 3 ו- 4.

טבלה 1. Condition medium שנאסף מאוכלוסיות תאים אפיתליאליות שונות שנחשפו בעכבר להגבלת אספקת אנרגיה אינו משפיע על קיום תרבית מאוכלוסיה מועשרת ב תאי גזע ויצירת ממוספרות מאוכלוסיה זו.

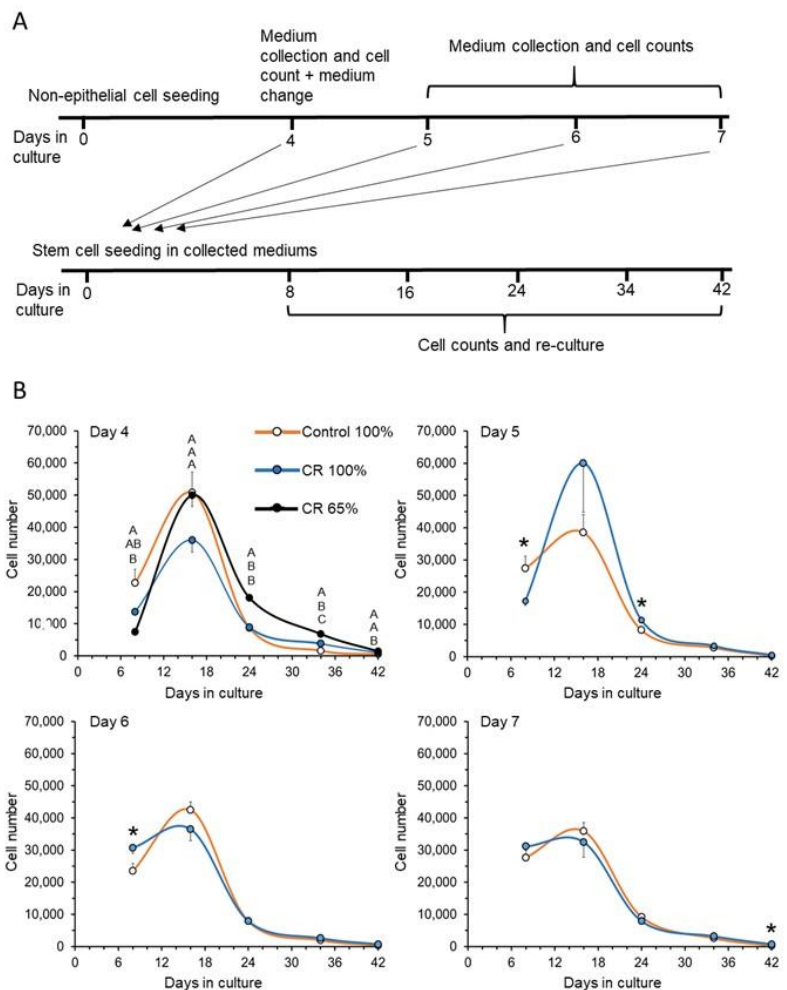
מספר תאים בתרבית

	Exp.205			Exp.206		
	Control	CR	P-value	Control	CR	P-value
Luminal progenitors	2590±517	3410±739	$P = 0.42$	6,666 ±1,201	6,000±577	$P = 0.87$
Luminal	3966±881	3486.6±104	$P = 0.64$	5,000±577	5,333.33±333	$P = 0.64$
Basal	3500±1040	2066.6±968	$P = 0.37$	6000±1,784	5000±2,342	$P = 0.74$

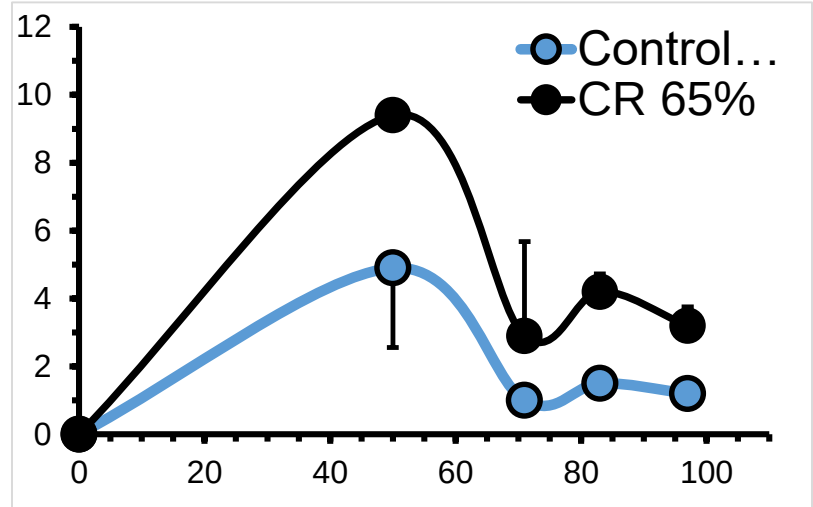
מספר ממוספרות

	Exp.205			Exp.206		
	Control	CR	P-value	Control	CR	P-value
Luminal progenitors	227±22	182 ±13	$P = 0.17$	53.±2.6	56±14	$P = 0.87$
Luminal	252.66±15	206±15	$P = 0.09$	215±20	138±10	$P = 0.04$
Basal				62±7.2	42±5.3	$P = 0.68$

תמונה 3. ל condition medium מאוכלוסיות תאים לא אפיתליאליים השפעה חיובית על מדד קיום התרבית של תאים שמקורם מאוכלוסיה מועשרת בתאי גזע.
נבחן מדיום רגיל שנאסף לאחר 4 ימים בתרבית וגם מדיום שנאסף לאחר היום הרביעי, חמישי והשישי בהתאמה (CR100%). כמו כן נבחנו השפעת קיום התרבית משך 4 הימים הראשונים במדיום מוגבל (CR65%). ניתן לראות כי למדיום המוגבל נמצאה במידה מסוימת השפעה טובה יותר על קיום התרבית מתאי גזע, עובדה המעידה על הפרשה מוגברת של מרכיב מעודד חלוקה מאוכלוסית התאים הלא אפיתליאליים.



תמונה 4. ל condition medium שנאסף מתרבית תאים לא אפיתליאליים אשר מקורם מחיות אשר הוגבלו באספקת האנרגיה וגם בתרבית נחשפו להגבלת אספקת אנרגיה של (CR65%) יש השפעה מעודדת על מספר הממוספרות הצפות שנוצרו מתאי גזע.



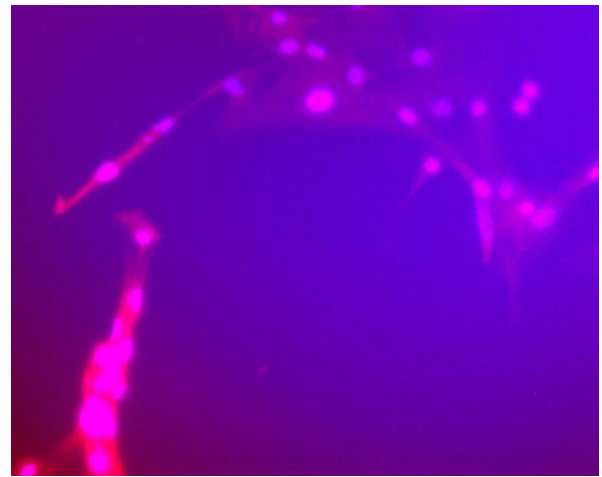
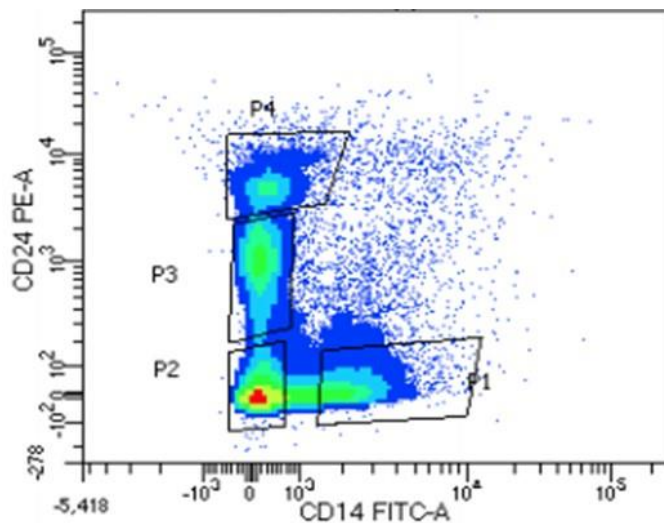
לסיכם תת פרק זה – בבחינה של מעורבות כלל אוכלוסיית התאים בבלוטת החלב באפקט החיובי של הגבלת אספקת אנרגיה על הגדלת מספר תאי הגזע, לא מצאנו השפעה לחומרים המופרשים למדיום מהאוכלוסיות האפיתליאליות השונות שנבדקו.

לעומת זאת, נמצאה השפעה חיובית, ארוכת טווח, למדיום שנאסף מאוכלוסית התאים הלא אפיתליאליים הן על מספר הממוספרות הצפות המהוות מדד לתאי גזע והן על מספר תאים שורדים בתרבית שהוא המדד הטוב ביותר למספר תאי הגזע ההתחלתי.

עדיות אלו מצביעות על השפעת הגבלת אספקת אנרגיה על הפרשה פארקרינית/ אנדוקרינית של גורם מעודד חלוקה של תאי גזע על ידי אוכלוסיה לא אפיתליאלית הנמצאת בקרבת תאי הגזע.

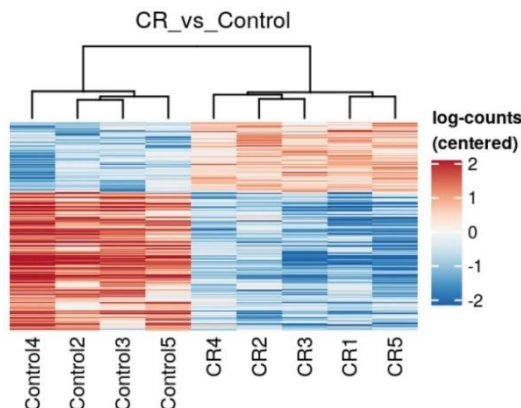
מי היא אותה אוכלוסית התאים הלא אפיתליאליים?

בהפרדה הראשונית (Lin⁻) של סוספנסית התאים שהופקו מבלוטת החלב (של עכבר ובקר) הוצאו מהתרבית תאי דם אדומים ואת אוכלוסית הפיברובלסטים. לכן העמקנו בנושא מקרופזים ותאי מערכת החיסון. אכן, בהפרדה על בסיס ביטוי CD14 אשר הינו סמן למקרופזים, אנו יכולים לראות כי חלק ניכר מהתאים הינם CD14^{positive} וכנראה מקרופזים ברמות התמינות שונות (תמונה 5). אכן, קימות עדיות שונות למעורבותם של מקרופזים בבקרת ה self renewal של תאי גזע סומטיים מרקמות שונות ובכוונתנו להמשיך ולברר את מוערבותה של אוכלוסיה זו תוך שימוש במקורות מימון עצמאיים. שאר התאים הינם תאים CD14^{neg} CD24^{neg} שמקורם כנראה במערכת החיסון או שהינם פיברובלסטים שמסיבה לא ברורה עברו את הסלקציה הראשונית.



תמונה 5. בהפרדה על בסיס ביטוי CD24 ו CD14 (שמאל) ניתן לזהות אוכלוסיות מקרופזים פוטנציאליות החיוביות ל CD14 ומסומנות ב P1. אוכלוסיות P2 היא כנראה אוכלוסיות תאים נוספת ממערכת החיסון או שאריות של פיברובלסטים. אוכלוסיות P3 and P4 הינן אוכלוסיות תאים אפיתיליות אשר אינן נכללות באוכלוסיה הלא אפיתיליאלית. ימין: אכן, מרבית התאים באוכלוסיה P1 אשר נזרעו בתרבית מבטאים CD14 ברמה גבוהה יחסית ועל כן מיצגים אוכלוסיות מקרופזים.

מה מאפיין את התגובה של אוכלוסיות התאים הלא אפיתיליאליים להגבלת אספקת אנרגיה? להבנת שאלה זו ערכנו אנליזת פרופיל ביטוי גנים (RNA-SEQ) בה בחנו את השפעת הגבלת אספקת אנרגיה. מתמונה 6 ניתן לראות את השפעת הגבלת אספקת האנרגיה על התפלגות האוכלוסיות ו Heatmap להשפעה על התפלגות ביטוי הגנים המעורבים. התמקדנו בגנים המקודדים לחלבונים מופרשים שכן גורם (חלבון?) המופרש מאוכלוסיית תאים זו אשר נחשפה להגבלת אספקת אנרגיה הוא שהביא לעליה בפרמטרים של מספר תאי גזע. לצורך חיתוך אוכלוסיות הגנים המקודדים לחלבונים מופרשים השתמשנו בשלשה מאגרי גנים: Uniport human atlas ו IPA.



תמונה 6. אנליזת hierarchical clustering להוכחת הפרדות גנומית של האוכלוסיות הנבדקות על פי הטיפול והצלחת המרכיב הטכני של האנליזה הגנומית להשפעת הגבלת אספקת אנרגיה על ביטוי גנים בבלוטת החלב.

בשיתוף עם חוקרת ב-INCPM (ולאחר תשלום עבור התמיכה הביואינפורמטית), אנו בוחנים עתה את הגנים לחלבונים הקנדידטים להשפעה על self-renewal של תאי גזע ואת מסלולי פעילותם. ראוי לציין כי אנליזה זו עוכבה מאד בגלל הפסקת פעילות ה-INCPM משך תקופת הקורונה.

3. השפעת מאוחרת של הטיפול ברפמיצין על התפתחותה ויצרנותה של בלוטת החלב

באופן פרקטי, הטיפול הפרמקולוגי ברפמיצין נראה יותר ישים כטיפול מעשי בהשוואה להגבלת אספקת אנרגיה. לכן, בחנו השפעה ארוכת טווח של טיפול זה. למחקר המשולב, שימשו שתלי בלוטת חלב של בקר בעכבר וגם בלוטות חלב אנדוגניות של עכברים.

עכברים מושתלים בבלוטת חלב של בקר טופלו משך 21 יום ברפמיצין או בממס (כבירות) ולאחר מכן נחשפו לטיפול באסטרון ופרוגסטרוגן (כטיפול מדמה התפתחות בלוטת חלב בהריון). מתמונה 7, ניתן לראות השפעה חיובית של טיפול מקדים ברפמיצין על התפתחות צינוריות בשתל ובמיוחד צינוריות קטנות בשלבי ההתפתחות הראשוניים. בצינוריות אלה אובחנה חלוקת תאים מוגברת על פי אנליזה ביטוי PCNA המעידה על מספר התחלתי גבוה יותר של תאי גזע. כל זאת ללא השפעה של הטיפול ברפמיצין על משקל החיות או על משקל השתלים.

במקביל, נבדקה גם השפעת הטיפול ברפמיצין על התוצאה היצרנית של הגברת חידוש חידוש עצמי של תאי גזע בבלוטת החלב האנדוגנית העכברית. חיות טופלו ברפמיצין או בממס ולאחר 21 יום הבלוטת הוסרו ו-130,000 תאים מסוספנסית התאים (המכילה גם תאי גזע) הושתלו ל Fat pad של "חיה מאמצת". לאחר 14 ימים, החיות נחשפו ל 10 ימי טיפול באסטרון ופרוגסטרוגן. חלק מהבלוטה הוסר לצרכי אנליזה אימוהיסטוכימית של ביטוי חלבוני חלב וחלק אחר פורק לתרבית תאים אשר לצורך דיפרנציאציה הוכנסה לתוך טיפת מטריגל וטופלה בהורמונים לקטוגניים להגברת יצור חלבוני החלב.

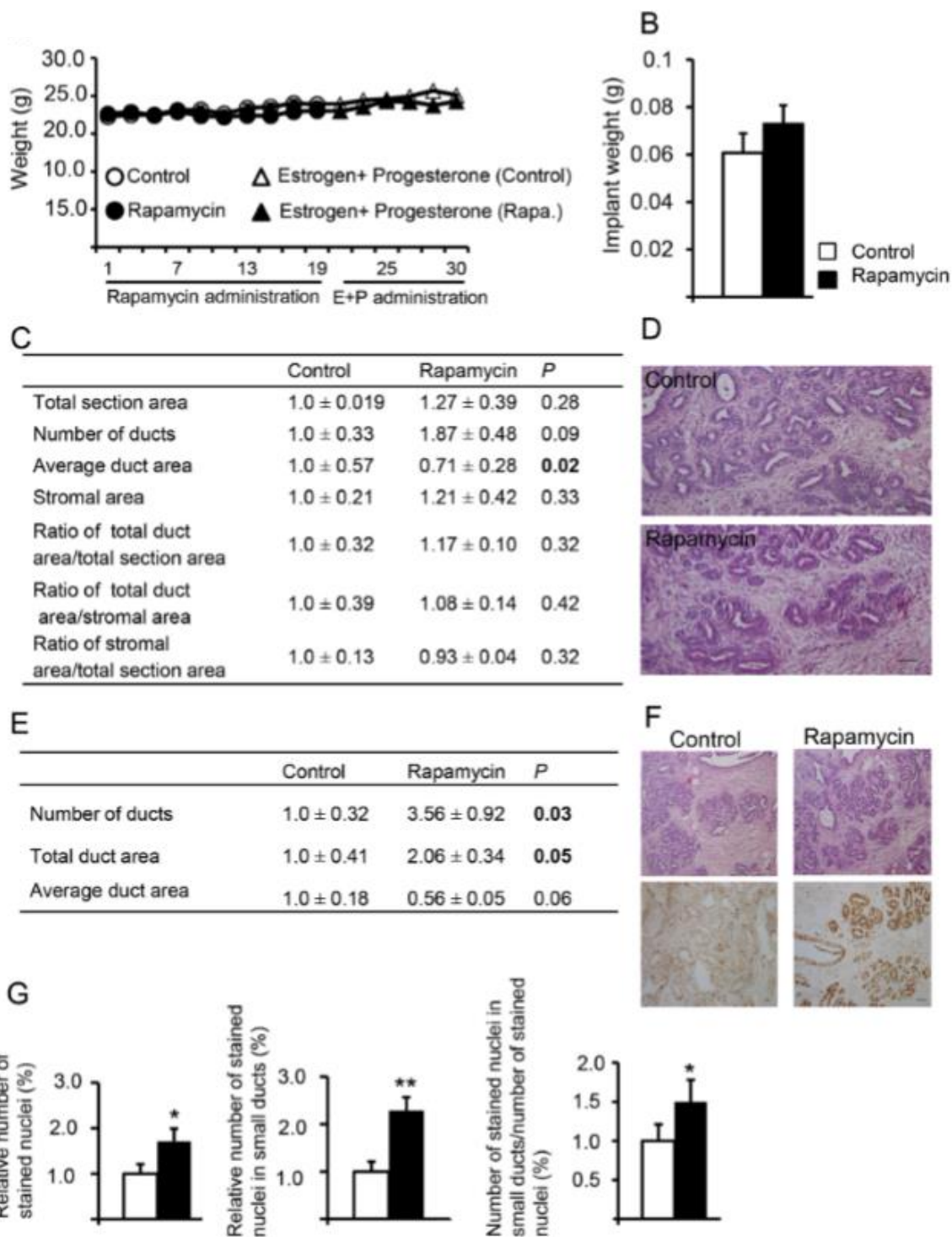
בתמונה 8 ניתן לזהות שיפור בביטוי קזאינים בבלוטת שהתפתחו מתאים מושתלים אשר טופלו ברפמיצין, וביטוי גבוה יותר של α -lactalbumin ו-WAP אשר נקבע בתרבית תאים אפיתליאליים אשר מקורם מחיות שטופלו ברפמיצין.

לסיכום פרק זה, ניתן לציין כי טיפול מוקדם ברפמיצין, אשר הגדיל את מספר תאי הגזע הן בבלוטת החלב האנדוגניות העכבריות והן בשתלי בלוטת חלב של בקר המקוימים בעכברים מדוכאים חיסונית הביא לתוצאות ארוכות טווח של שיפור בהתפתחות בלוטת החלב ובפעילותה היצרנית בקונטקסט של ביטוי וסינתיזה חלבוני חלב.

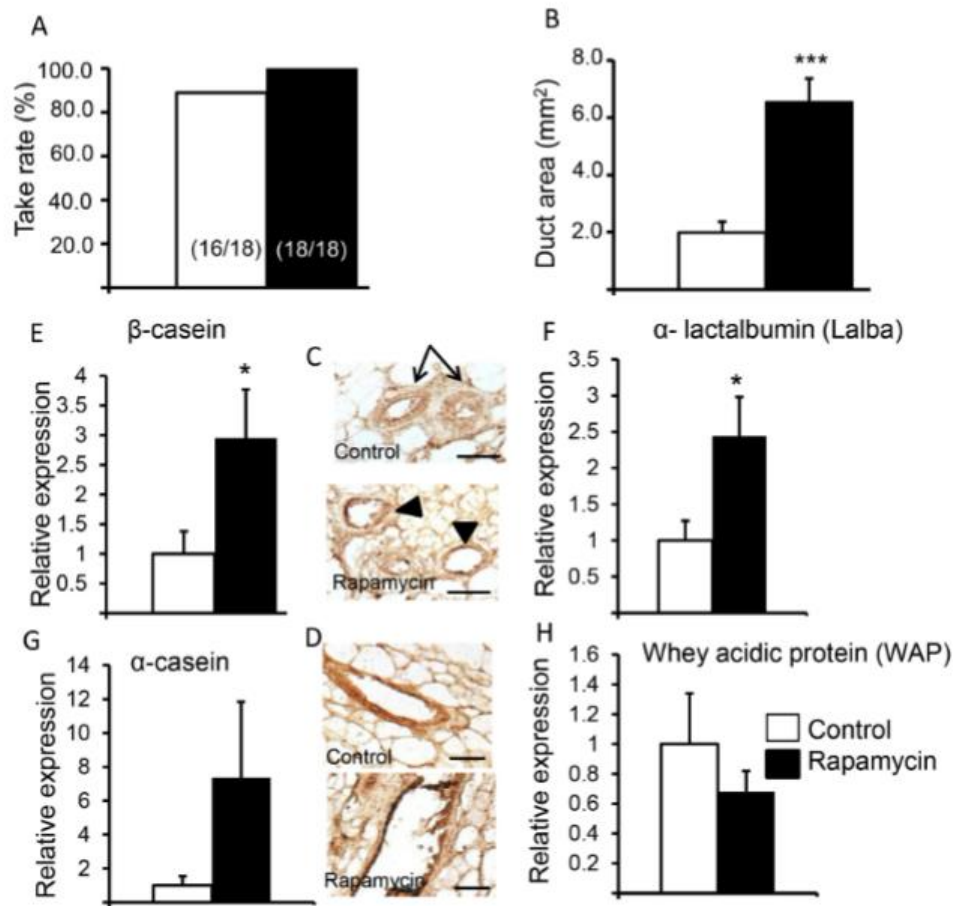
דין ומסקנות

לתאי הגזע חשיבות רבה ביצירת בלוטת החלב ובהתחדשותה בין תחלובות (4). בעבודה זו בחנו את השפעת הגבלת אספקת אנרגיה ואת השפעת התערבות ישירה במנגנון היפוטטי המעורב בהשפעה זו, אשר עיקרו דיכוי ביטוי פעילות mTOR בסביבת תאי הגזע על ידי רפמיצין, על החידוש העצמי (self-renewal) של תאי הגזע

בבלוטת החלב של עכבר ובקר והגדלת מספרם. כמו כן, חקרנו מעורבות של אוכלוסיות תאים נוספות בהעברת הסיגנל של הגבלת אספקת אנרגיה לתאי הגזע. שני הטיפולים: הגבלת אספקת אנרגיה משך 60 יום (לפחות) והזרקות יומיות של רפמיצין משך 21 יום הביאו לתוצאה דומה של עליה בפרמטרים הנמצאים בקורולציה ישירה עם מספר תאי הגזע הן בבלוטת החלב של בקר והן של עכבר. החשיבות של הזהות בהשפעת הטיפולים על בלוטת החלב של שני מיני יונקים כה שונים היא בעומק ההתפתחותי-אבולוציוני הזהה של תאי גזע בבלוטת החלב של מיני יונקים. נושא זה נחקר לעומק לאחרונה תוך השוואות למיני יונקים שונים (5), אולם בעוד ששוויון בפעילות הבלוטה ובחשיפתה להתמרה סרטנית בין מיני יונקים הוכחה, לא נמצאו נתונים לשונויות או זהות בפעילות תאי גזע. בהיבט זה עבודתנו תורמת להיבט הפילוגנטי של התפתחות הבלוטה. בהקשר של טיפול ברפמיצין נקבעה ישירות עליה במספר תאי הגזע אלה וירידה תואמת במספר תאי האב והתאים הממוינים הלומינליים. נראה ששיפור זה אינו תוצאה ישירה של הגבלת אספקת אנרגיה על תאי הגזע עצמם, אלא שהוא מתווך על ידי אוכלוסיה לא אפיתליאלית שעיקרה מקרופזים הקולטת את הסיגנל ובתורה מפרישה פרקרינית/אנדוקרינית גורם המשפיע על self-renewal של תאי הגזע שבקירבתם. אכן, אוכלוסיית תאי הגזע בבלוטת החלב היא אוכלוסיה בעלת פעילות מטבולית נמוכה (6), התלויה בסביבתה לסיגנלים התפתחותיים (7). מעורבות מקרופזים בביווגיה של בלוטת החלב והתמינות תאית הוצעה בעבר בהקשר של התפתחות הבלוטה ו-remodeling (8,9). ניתוח ביואינפורמטי של תוצאות האנליזה הגנומית להשפעת הגבלת אספקת אנרגיה על שינויים בפרופיל ביטוי הגנים באוכלוסיה הלא אפיתליאלית העלה כיווני המשך ואנו ממשיכים בחקר השערות מחקר ב"ביווגיה רטובה" של דיכוי ופעילות יתר של חלבונים בעלי מוערבות היפוטטית. ניסויים אלה נמשכים זמן רב שכן, כפי שהודגם בפרק התוצאות, הדרך היחידה לזהות פנוטיפית את השינוי במספר תאי הגזע הנגרם על ידי הגבלת מזון בחיה היא על ידי בחינת השפעת condition medium מתרבות תאים על התמינות ארוכת טווח של תאי הגזע. תוצאות השיפור במספר תאי הגזע נבחנו לאחר הטיפול ברפמיצין כאשר הרקמה הנבדקת נחשפה לאסטרוגן ופרוגסטרוגן כטיפול מדמה הריון. במצב זה, מוגברים תהליכי פרוליפרציה ודיפרנציאציה ברקמה. הן בבלוטת חלב של עכבר והן בשתלים מבלוטת חלב של בקר נמצא כי טיפול מקדים ברפמיצין הביא בסופו של דבר הן לשיפור בתהליכי פרוליפרציה בבלוטת החלב והן לשיפור בביטוי ובבסיסית חלבוני חלב. ממצא זה הינו הממצא הראשון המעיד על הקשר בין מספר תאי הגזע לפעילות בלוטת החלב. כיום בניסויי המשך שאינם קשורים ישירות לעבודה זו, אנו בוחנים את השפעת הטיפול ברפמיצין על התפתחות ופעילות בלוטת החלב של עגלות צעירות בדרך של צהחדרה דרך הפיטמה. האתגר הוא ליצור פעילות אוסצילטיבית שבה מצד אחד הוא מדכא את מסלול ה-mTOR וגורם להפרשה פרקרינית של גורם מעודד self-renewal מהמונוציטים/מקרופזים שעברו אינפילטרציה לפרנקימה (1) ומצד שני הוא עדיין מאפשר פעילות מספיקה של mTOR החיונית ליצור חלבונים ופעילות תאית בתאי הגזע (10,11). תוצאות חלקיות מצביעות על השפעה חיובית על התפתחות הבלוטה. בהתבסס על תוצאות שהובאו בעבודה זו, אנו מניחים שאכן שיפור במספר תאי הגזע מגביר את מספר התאים האפיתליאליים המתמינים בבלוטה. למיטב ידיעתנו, תהיה זו הפעם הראשונה שמניפולציה במספר תאי הגזע תביא אכן לשיפור פנוטיפי בהבטים הקשורים לבלוטת החלב בחיות המשק.



תמונה 7. הזרקת רפמיצין לעכברים נושאי שתלי בלוטת חלב מבקר משפרת את התפתחות צינוריות החלב בתקופה עוקבת שבה נחשפו החיות לטיפול מדמה הריון של אסטרוגן ופרוגסטרון. עכברות (N=9-10) מדוכאות חיסונית הוזרקו משך 21 יום ברפמיצין או טופלו בממס כביקורת. לאחר מכן כל החיות נחשפו ל 9 ימים של טיפול מדמה הריון באסטרוגן ופרוגסטרון. A. לטיפול לא היתה השפעה על משקל הגוף. B. גם משקל השתלים לא הושפע מהטיפול. C, D. מספר הצינוריות הכללי ובעיקר שטחן הושפעו מהטיפול ברפמיצין. E. השפעה משמעותית יותר היתה לטיפול ברפמיצין על מספר הצינוריות הקטנות ו G, F קצב התחלקות התאים בהן כפי שנקבע באנליזת PCNA.



תמונה 8. הזרקת רפמיצין לעכברות הגבירה את ביטוי הגנים לחלבוני חלב ואת ביטוי החלבונים עצמם ברקמה המתפתחת מתאי גזע. עכברות מזן C57black טופלו ברפמיצין משך 21 יום, או רק בממס. בסיום הטיפול, הופק תרחיף תאים ממנו הושטלו 130,000 תאים לבלוטת חלב של עכברות מאמצות, ממנה הוסר המרכיב האפיתליאלי. עכברות אלה טופלו משך 14 ימים באסטרון ופרוגסטרון על מנת לדמות הריון. A. Take rate. B. השטח שתפשו הצינוריות המתפתחות מכלל הבלוטה. C, D. אנליזה אימוהיסטוכימית המדגימה ביטוי גבוה יותר של קזאינים בצינורות המתפתחים ברקמה המושטלת בהשפעת הטיפול ברפמיצין. H-E, שיפור בביטוי הגנים לחלבוני חלב בתרבית תאים שהוכנה מהרקמה האפיתליאלית המתפתחת בתוך טיפת מטריגל ואשר טופלה בהורמונים לקטוגניים משך 5 ימים.

Kfir, S.H. and **Barash, I.** (2019). Calorie restriction and rapamycin administration induce stem cell self-renewal and consequent development and production in the mammary gland. Exp. Cell Res. 382:111477

ספרות מצוטטת

1. Yilmaz OH, Katajisto P, Lamming DW, Gultekin Y, Bauer-Rowe KE, Sengupta S, et al. mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature*. 2012;486(7404):490-5.
2. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell proliferation*. 2003;36 Suppl 1:59-72.
3. Rauner G, Barash I. Cell hierarchy and lineage commitment in the bovine mammary gland. *PLoS One*. 2012;7(1):e30113.
4. Chen X, Liu Q, Song E. Mammary stem cells: angels or demons in mammary gland? *Signal transduction and targeted therapy*. 2017;2:16038.
5. Rauner G, Ledet MM, Van de Walle GR. Conserved and variable: Understanding mammary stem cells across species. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2018;93(1):125-36.
6. Rauner G, Kudinov T, Gilad S, Hornung G, Barash I. High Expression of CD200 and CD200R1 Distinguishes Stem and Progenitor Cell Populations within Mammary Repopulating Units. *Stem cell reports*. 2018;11(1):288-302.
7. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983-8.
8. Stewart TA, Hughes K, Hume DA, Davis FM. Developmental Stage-Specific Distribution of Macrophages in Mouse Mammary Gland. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2019;7:250.
9. Dawson CA, Pal B, Vaillant F, Gandolfo LC, Liu Z, Bleriot C, et al. Tissue-resident ductal macrophages survey the mammary epithelium and facilitate tissue remodelling. *Nature cell biology*. 2020;22(5):546-58.
10. Igarashi M, Guarente L. mTORC1 and SIRT1 Cooperate to Foster Expansion of Gut Adult Stem Cells during Calorie Restriction. *Cell*. 2016;166(2):436-50.
11. Igarashi M, Guarente L. The unexpected role of mTORC1 in intestinal stem cells during calorie restriction. *Cell cycle*. 2017;16(1):1-2.