



2000-2002

תקופת המחקר:

355-0077-02

קוד מחקר:

Subject: DEVELOPMENT OF GENERIC EXPRESSION CASSETTE FOR HIGH AND SPECIFIC EXPRESSION OF CDNA'S CODING FOR NEW PRODUCTS AND AFFECTING MILK PRODUCTION

Principal investigator: BARASH ITAMAR

Cooperative investigator: RAIKHINSTEIN MOSHE

Institute: Agricultural Research Organization (A.R.O.)

שם המחקר: פיתוח תבנית גנרית לביטוי ספציפי וברמה גבוהה של CDNA'S 'נבחרים בבלוטת העטין למטרות ביוטכנולוגיות והגברת יצור החלב בבלוטת העטין.

חוקר ראשי: איתמר ברש

חוקרים שותפים: משה רייכנשטיין

מוסד: מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן 50250

תקציר

הצגת הבעיה: א. פתוח וקטורים מתאימים לביטוי ספציפי וברמה גבוהה של cDNA's בבלוטת העטין של חיות טרנסגניות ב. שימוש בוקטורים לביטוי גן רגולטורי על מנת להשפיע על הפונקציונליות של הבלוטה.

מהלך ושיטות העבודה: פיתוח וקטורים המבוססים על רצפי בקרה של גן ה - ביתא לקטוגלובולין (BLG) ובחינתם ע"י טרנספקציה לתאים ממקור עטין ובחיות טרנסגניות. מניפולציה בתפקוד בלוטת העטין על ידי שמוש בוארינטים של Signal transducer and activator of transcription 5 (Stat) המכוונים לבלוטה על ידי וקטורים אלה.

תוצאות עיקריות: שיפור של פי 10 ביעילות הביטוי של וקטור קיים המבוסס על רצפי בקרה מגן ה BLG. הדגמת היעילות והספציפיות של הוקטור המשופר בזמן אמת. זיהוי אתר מעכב טרנסקריפציה בחלק הדיסטלי של הפרומוטר ל BLG הפעיל in vitro. מניפולציה במבנה ותפקוד בלוטת העטין ע"י ביטוי מבנים גנומים הנושאים וארינטים של Stat5 תחת בקרת וקטור BLG. הדגמת עליה של עד פי 5 בסינתיות קזאין, שיפור בגדילת הולדות, ודחית תהליך האינולוציה. אפיון תהליכים סרטניים באחוז מוגבל של העכברים הטרנסגנים הנושאים וארינטים של Stat5 בגיל 10-12 חודשים.

מסקנות והמלצות: לאור השיפור שהושג בביטוי חלבוני חלב בעטין מכרסמים על ידי ביטוי יתר של Stat5 ובמיוחד זה הפעיל קונסטיטטיבית, יש לפתח שיטות לישום ההצלחה גם לחיות משק.

**פיתוח תבנית גנרית לביטוי ספציפי וברמה גבוהה של DNA's נבחרים בבלוטת העטין
למטרות ביוטכנולוגיות והגברת יצור החלב בבלוטת העטין**

Development of generic expression cassette for high and specific expression of cDNA's
coding for new proteins and affecting milk production in the mammary gland

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות (ביוטכנולוגיה)

ע"י

איתמר ברש
משה רייכנשטיין
מכון לחקר בע"ח, מכון וולקני, מנהל המחקר החקלאי בית דגן
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 shanim@agri3.agri.huji.ac.il

מרץ 2003

אדר א תשס"ג

תקציר

הצגת הבעיה: א. פתוח וקטורים מתאימים לביטוי ספציפי וברמה גבוהה של cDNA's בבלוטת העטין של חיות טרנסגניות ב. שימוש בוקטורים לביטוי גן רגולטורי על מנת להשפיע על הפונקציונליות של הבלוטה.

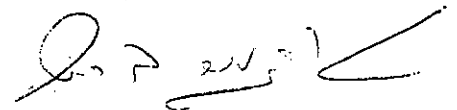
מהלך ושיטות העבודה: פיתוח וקטורים המבוססים על רצפי בקרה של גן ה - ביתא לקטוגלובולין (BLG) ובחינתם ע"י טרנספקציה לתאים ממקור עטין ובחיות טרנסגניות. מניפולציה בתפקוד בלוטת העטין על ידי שמוש בוארינטים של 5 (Stat) Signal transducer and activator of transcription המכוונים לבלוטה על ידי וקטורים אלה.

תוצאות עיקריות: שיפור של פי 10 ביעילות הביטוי של וקטור קיים המבוסס על רצפי בקרה מגן ה BLG. הדגמת היעילות והספציפיות של הוקטור המשופר בזמן אמת. זיהוי אתר מעכב טרנסקריפציה בחלק הדיסטלי של הפרומוטר ל BLG הפעיל in vitro. מניפולציה במבנה ותפקוד בלוטת העטין ע"י ביטוי מבנים גנומים הנושאים וארינטים של Stat5 תחת בקרת וקטור BLG. הדגמת עליה של עד פי 5 בסינתזת קזאין, שיפור בגדילת הולדות, ודחית תהליך האינולוציה. אפיון תהליכים סרטניים באחוז מוגבל של העכברים הטרנסגנים הנושאים וארינטים של Stat5 בגיל 10-12 חודשים.

מסקנות והמלצות: לאור השיפור שהושג בביטוי חלבוני חלב בעטין מכרסמים על ידי ביטוי יתר של Stat5 ובמיוחד זה הפעיל קונסטיטטיבית, יש לפתח שיטות לישום ההצלחה גם לחיות משק.

חתימת המוסד:

חתימת החוקר:



**פיתוח תבנית גנרית לביטוי ספציפי וברמה גבוהה של DNA's נבחרים בבלוטת העטין
למטרות ביוטכנולוגיות והגברת יצור החלב בבלוטת העטין**

Development of generic expression cassette for high and specific expression of cDNA's
coding for new proteins and affecting milk production in the mammary gland

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות (ביוטכנולוגיה)

ע"י

איתמר ברש
משה רייכנשטיין
מכון לחקר בע"ח, מכון וולקני, מנהל המחקר החקלאי בית דגן
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 shanim@agri3.agri.huji.ac.il

מרץ 2003

אדר א' תשס"ג

הממצאים בד"ח זה הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר

תקציר

הצגת הבעיה: א. פתוח וקטורים מתאימים לביטוי ספציפי וברמה גבוהה של cDNA's בבלוטת העטין של חיות טרנסגניות ב. שימוש בוקטורים לביטוי גן רגולטורי על מנת להשפיע על הפונקציונליות של הבלוטה.

מהלך ושיטות העבודה: פיתוח וקטורים המבוססים על רצפי בקרה של גן ה- β - ביתא לקטוגלובולין (BLG) ובחינתם ע"י טרנספקציה לתאים ממקור עטין ובחיות טרנסגניות. מניפולציה בתפקוד בלוטת העטין על ידי שמוש בוארינטים של 5 (Stat) Signal transducer and activator of transcription המכוונים לבלוטה על ידי וקטורים אלה.

תוצאות עיקריות: שיפור של פי 10 ביעילות הביטוי של וקטור קיים המבוסס על רצפי בקרה מגן ה-BLG. הדגמת היעילות והספציפיות של הוקטור המשופר בזמן אמת. זיהוי אתר מעכב טרנסקריפציה בחלק הדיסטלי של הפרומוטור ל BLG הפעיל in vitro. מניפולציה במבנה ותפקוד בלוטת העטין ע"י ביטוי מבנים גנומים הנושאים וארינטים של Stat5 תחת בקרת וקטור BLG. הדגמת עליה של עד פי 5 בסינתזת קזאין, שיפור בגדילת הולדות, ודחית תהליך האינולוציה. אפיון תהליכים סרטניים באחוז מוגבל של העכברים הטרנסגנים הנושאים וארינטים של Stat5 בגיל 10-12 חודשים.

מסקנות והמלצות: לאור השיפור שהושג בביטוי חלבוני חלב בעטין מכרסמים על ידי ביטוי יתר של Stat5 ובמיוחד זה הפעיל קונסטיטטיבית, יש לפתח שיטות לישום ההצלחה גם לחיות משק.

Reichenstein, M., Gottlieb, H., Damari G-M., Iavnilovich, E. and Barash, I. (2001). A new β -lactoglobulin-based vector targets luciferase cDNA expression to the mammary gland of transgenic mice. *Transgenic Research* 10: 445-456.

Barash I and Richenstein M (2002). Real-time imaging of β -lactoglobulin-targeted luciferase activity in the mammary gland of transgenic mice.

Molecular reproduction and development 61:42-48.

Iavnilovich, E, Groner B and Barash, I. (2002). Overexpression and forced activation of Stat5 in the mammary gland of transgenic mice promotes cellular proliferation, enhances differentiation and delays postlactational apoptosis.

Molecular Cancer Research (Formally Cell Growth & Differentiation) 1: 32-47.

מטרת המחקר היתה יצירת וקטורים יעילים ובעלי ספציפיות גבוהה לביטוי cDNA רצויים בבלוטת העטין ושימוש בהם לשיפור איכות החלב ולהגדלת מגוון השימושים בו.

לשם הכוונת ביטוי cDNA נבחרים לבלוטת העטין בחרנו ברצפי בקרה מהגן לחלבון החלב β -lactoglobulin (BLG). גן זה מתבטא ברמה גבוהה בבלוטת עטין של בקר אולם לא מתבטא בבלוטת העטין של מכרסמים. בעבודה זו אנו אפיינו אתרים רגולטוריים פוטנציאליים ברצפי הבקרה של גן ה-BLG ושילבנו אותם עם אתרים רגולטוריים מגנים נוספים לצורך הכוונת ביטוי של חלבונים בבלוטת העטין ברמות גבוהות. לבחינת ההשפעה של המניפולציות הגנטיות ברצפי הבקרה של ה-BLG, השתמשנו בגן מדווח – לוציפרוז המקודד לאנזים בעל פעילות ביולוגית. התבטאות אנזים זה מאפשרת את פרוק הסובסטרט - לוציפרין וגורמת לפליטת אור הנקלטת במכשירי מעקב שונים.

בנוסף לאפיון אתרי הבקרה בגן ה-BLG, נבחנו בעבודה זו השפעתן של גן רגולטורי פונקציונלי, Stat5, על ביטוי חלבוני חלב טבעיים וטרנסגניים בבלוטת העטין וכן על התפתחות, דיפרנציאציה, אינוולוציה וטרנספורמציות בבלוטה.

ברצפי הבקרה (פרומוטר) הפרוקסימליים של גן ה-BLG קיימים שניים או שלשה אתרי קשירה ל-Signal transducer and activator of transcription (Stat5). גורם טרנסקריפציה זה נתגלה ב-1994 כגורם לקטוגני המשפיע על התבטאותם של חלבוני חלב וכונה Mammary Gland Factor (MGF). מאוחר יותר, כאשר התגלה שהוא חולק מבנה משותף עם חלבונים ממשפחת ה-Stat, כונה Stat5. ל Stat5 שני וארינטים: Stat5a ו Stat5b השונים בהרכב חומצות האמינו בקצה הקרובוקסילי. Stat5a הינו בעל פוטנציאל לקטוגני משמעותי יותר מ Stat5b.

קשירה של פרולקטין לרצפטור טרנס-ממברני מביאה לדימרזציה של הרצפטור, זרחונו בחלק התוך תאי ע"י הקינאזה Jak2. קינאזה זו מזרזת גם את מולקולות ה Stat5, אשר עובר הומו- או הטרודימרזציה וטרנסלוקציה לגרעין שם הוא נקשר לאתרים ספציפיים ומפעיל את שעתוק הגנים לחלבוני חלב.

פרוט הניסויים שהתבצעו והתוצאות שנתקבלו

בשלוש שנות המחקר עסקנו בשלושה נושאים עקריים.

1. שיפור וקטור הטרנסגני קיים המבוסס על רצפי בקרה מגן ה ביתא לקטוגלובולין (BLG) ופתוח מערכת לאבחון in vivo בזמן אמת של פעילות וספציפיות רצפי הבקרה המשופרים.
2. זיהוי אתר העיכוב ברצף הגן ל - BLG ואפיון השפעתו in vitro ו in vivo.
3. השפעת כמות ופעילות Stat5 על מבנה ותפקוד בלוטת העטין.

שיפור הוקטור הטרנסגני המבוסס על רצפי בקרה מגן ה ביתא לקטוגלובולין (BLG) ופתוח מערכת לאבחון in vivo בזמן אמת של פעילות וספציפיות רצפי הבקרה המשופרים.

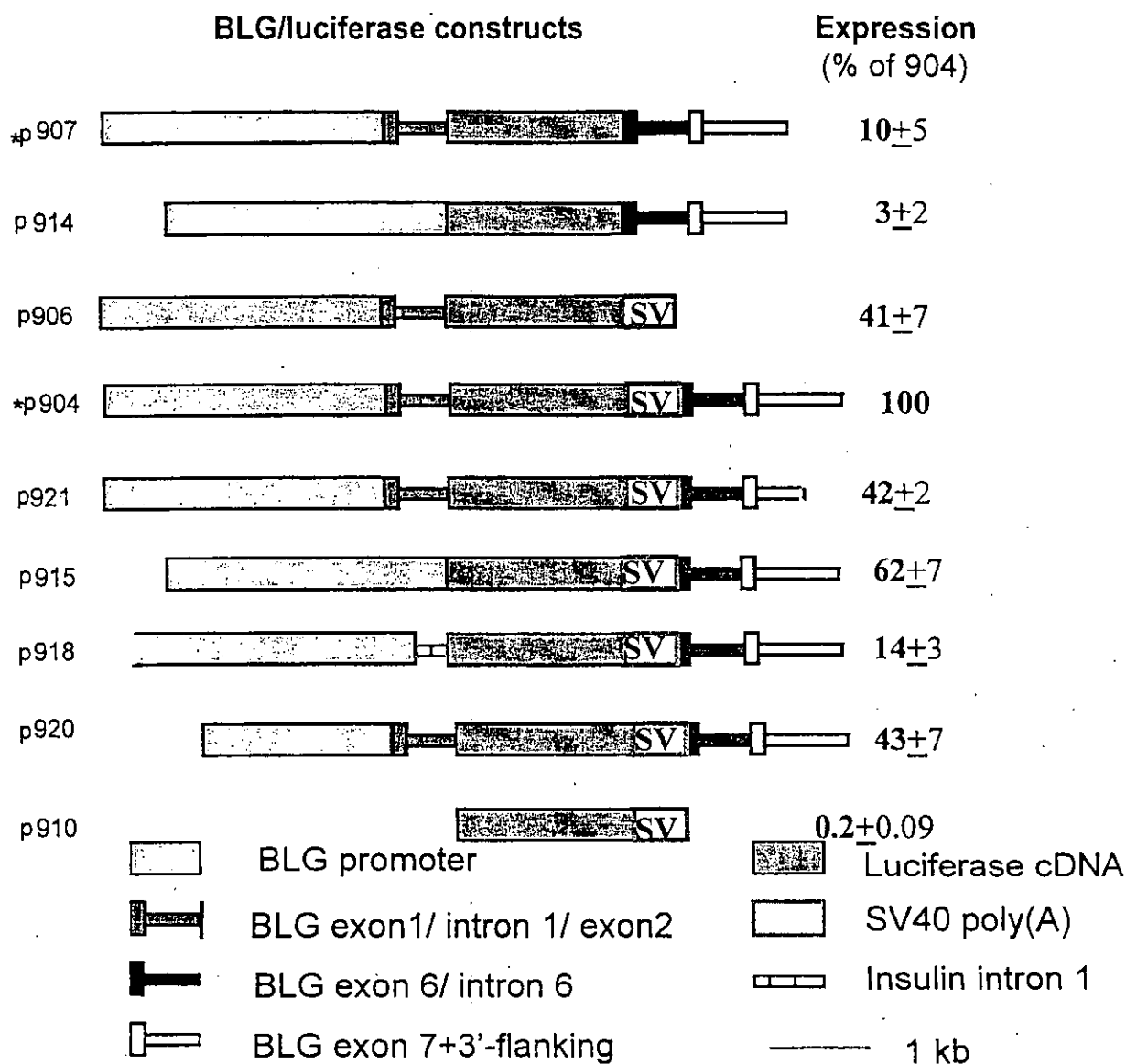
רצפים רגולטוריים באקסון 1/אינטרון 1/אקסון 2 של גן ה ביתא לקטוגלובולין (BLG) ממקור כבש שימשו אותנו כעבר לביטוי אלבומין הומני בבלוטת העטין של מכרסמים ועיזים טרנסגנים. עם זאת, אזור רגולטורי זה יצר אפקט מדכא על ביטוי האלבומין ההומני in vitro בתאי COS 7. חוסר יכולתנו לבחון את הקונסטרוקטים שיצרנו in vitro טרם החדרתם לגנום של חיות טרנסגניות מנע התקדמות מהירה בפיתוח קסטת ביטוי המבוססת על רצפי הגן ל BLG.

על מנת לנסות ולהתגבר על מכשול זה, הועמדה במעבדתנו מערכת תאית שונה המבוססת על תרבית תאי CID-9 ממקור בלוטת עטין של עכבר. כאשר אלה מודגרים על מטריקס עשיר בלמינין במדיום המכיל אינסולין אך חסר סרום התאים מפסיקים להתחלק, מתמינים ויוצרים מבנים דמויי בלוטת עטין.

גן הלוציפרז ממקור גחלילית משמש זה זמן כגן מדווח רגיש בניסויים בביטוי חלבונים בבלוטת העטין. מאחר והחלבון הנוצר אינו חלבון מופרש, כמו מרבית חלבוני החלב, התבססו האנליזות הבאות על אקסטרקט מתאים ללא אנליזות של מדיום מתרבית, או חלב מהחיה.

במערכת BLG/luciferase נתן היה לקבוע ביטוי מסוים, אם כי ברמה נמוכה יחסית, לוקטור ההברידי p907 המורכב מ cDNA של גן הלוציפרז אשר הוכנס בין אקסונים 2 ו 6 של הגן ל BLG (תמונה מס' 1). רמת ביטוי נמוכה זו מנעה קביעת תרומתם הפוטנציאלית של אתרים רגולטוריים בגן ה BLG. הגברה בפעילות הלוציפרז נבעה מתרומתו של אתר ה SV40 polyadenilation (SV40 PA). אכן, עליה מסוימת, ברמת פעילות הלוציפרז התקבלה בעקבות טרנספקציה עם וקטור p906, המכיל את ה SV40 PA בקצה 3' של הקונסטרוקט במקום רצפי BLG. תוצאה זו אינה מפתיעה שכן ידוע מעבודות קודמות כי אתר זה מכיל רצפים המגבירים שעתוק. התקדמות משמעותית לכיוון יצירת וקטור יעיל המבוסס על רצפי ה BLG נבעה מאינטראקציה מפתיעה בין רצפי ה SV40 PA ובין אלמנטים בקצה הדיסטאלי של ה BLG 3 flanking region המרכיבים את וקטור p904. אכן, תאים הנושאים את וקטור p904 ביטאו את גן הלוציפרז ברמות הגבוהות פי 10 או 2.5 בהתאמה בהשוואה לתאים אשר עברו טרנספקציה קבועה עם וקטור p907 או p906 זאת כנראה כתוצאה מכך שאתר ה SV40 נהיה מרכז מרכז לאתר פוליאדנילציה מורחב הכולל גם רצפי BLG.

התרומה של אתר ה SV 40 לפעילות הטרנסגן נראית אף יותר משמעותית בהעדר רצפים רגולטוריים מאזור BLG exon1/intron1/exon 2 כפי שנראה מהשוואה בין רמות הביטוי של וקטורים p914 ו p915. אורכו של הקצה ה 5' של גן ה BLG הוא כ 3kb. קיצור הפרומוטר ב 935bp גרמה לירידה של כ 60% בפעילות הלוציפרז ב וקטור p920 בהשוואה לוקטור p904. ירידה זו בפעילות נובעת כנראה מהעדרם של אתרי קשירה ל C/EBP, CTF/NF1, ו Stat5 הנמצאים באזור זה. לגורמים אלה חשיבות מוכחת בשיעתוק גנים לחלבוני חלב.



תמונה מס. 1 תאור סכמתי של הוקטורים BLG/Luciferase ששמשו לטרנספקציה בתאי CID-9.

אתרים רגולטורים פוטנציאליים קיימים באזור ה אקסון 1/ אינטרון 1 / אקסון 2 של גן ה BLG. קביעה זו מבוססת על סמך תוצאות שהתקבלו בעבודות קודמות שלנו הקשורות בביטוי הגן לאלבומין הומני וכן על סמך עבודות נוספות המראות כי אתרים הקרובים לאזור תחילת השיעתוק מכילים אלמנטים רגולטוריים. בהעדרם של רצפים אלה ירדה רמת הביטוי של וקטור p904 (עתה p915) ב כ 40%. בעבודות נוספות הודגם כי באינטרון הראשון של הגן לאינסולין אלמנטים רגולטוריים חשובים. לכן, בהמשך המחקר הנוכחי החלפנו את אזור האינטרון/אקסון 1 של גן ה BLG באינטרון הראשון מגן האינסולין (p918). חוסר היכולת של וקטור זה לשחזר את רמת הביטוי של הלוציפרז מעידה על העדר אינטראקציה בין רצפים רגולטוריים של גן ה BLG ורצפים אינטרוניים מגן האינסולין.

הגן המדווח לוציפרו הוכנס כאמור בין אינטרון 2 ו 6 של גן ה BLG. מסתבר כי רצפים דיסטליים באזור ה BLG 3' חשובים גם הם לביטוי ופעילות הלוציפרו. בהעדרם (p921), ירדה רמת פעילות הלוציפרו בכ 60% בהשוואה לוקטור p904.

על מנת לבדוק האם השינויים בביטוי הקונסטרוקטים השונים קשורים לשינויים בתגובתיות להורמונים לקטוגניים, נבחנה השפעת אינסולין, הידרוקורטיזון ופרולקטין על פעילות קונסטרוקטים נבחרים (טבלה מס' 1). הממצא העקרי הוא כי בכלום היתה תרומה דומה להידרוקורטיזון ופרולקטין בהשוואה לרמה הבסיסית שנקבעה בנוכחות אינסולין בלבד. האינדקציה בפעילות ההורמונלית לא היתה תלויה באורך הפרומוטר או בנוכחות גורמים תוך אינטרוניים. עם זאת יש לציין כי בניגוד לעבודות קודמות בשתלים בהן הודגמה תרומה נמוכה להידרוקורטיזון על ביטוי חלבוני חלב, בעבודה זו תרומתו של ההידרוקורטיזון לביטוי ופעילות הלוציפרו היתה משמעותית.

Construct	Composition				Luciferase activity (% of IFP)		
	BLG 5' (kb)	BLG int. 1	BLG 3'	SV 40 PA	I	IP	IFP
904	3	+	+	+	30+6	48+8 (18)	100 (52)
915	3	-	+	+	28+9	50+17 (22)	100 (50)
906	3	+	-	+	37+13	55+19 (18)	100 (45)
920	2	+	+	+	29+9	29+14 (10)	100 (61)

טבלה מס. 1. אפקטים הורמונליים בתאי CID-9 שעברו טרנספקציה עם וקטורים שונים. P- , insulin-I . F- Hydrocortisone , prolactin.

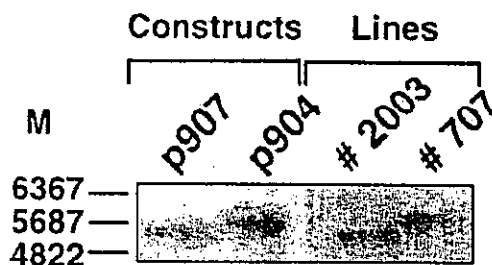
על מנת לבדוק את מידת השיפור in vivo בוקטור p904 על פני וקטור p907 אשר היה ברשותנו בתחילת העבודה יוצרו 11 זנים של עכברים טרנסגניים (טבלה מס' 2). 5 זנים נשאו את וקטור p907 ו- 6 זנים נשאו את וקטור p904 (תמונה מס' 2).

נבחנה רמת הפעילות של לוציפרו בבלוטת העטין של נקבות בלקטציה. רמות זניחות של ביטוי התקבלו בחיות טרנסגניות הנושאות את וקטור p907. אישור לכך התקבל גם באנליזה של RNA ללוציפרו (תמונה מס' 3). לעומת זאת, אנליזה של פעילות הלוציפרו בבלוטת העטין של זני חיות הנושאות את וקטור p904 הראתה פעילות גבוהה בשלשה מששת הזנים הטרנסגניים. פעילות זו לוותה גם ברמות גבוהות של RNA ברקמה.

<u>Construct</u>	<u>Line</u>	<u>Activity/ 20 mg tissue</u>	<u>Activity/ 1 mg protein</u>
p907	#2001	0.96 \pm 0.02	0.84 \pm 0.08
	#2002	0.16 \pm 0.02	0.13 \pm 0.02
	#2003	0.04 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02
	#2006	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
	#2008	0.3 \pm 0.03	0.2 \pm 0.04
p904	#706	0.04 \pm 0.005	0.03 \pm 0.005
	#707	2549 \pm 103	2546 \pm 125
	#708	2560 \pm 133	2545 \pm 125
	#709	3719 \pm 107	3641 \pm 89
	#712	0.12 \pm 0.5	0.17 \pm 0.03
	#713	0.03 \pm 0.006	0.02 \pm 0.01

טבלה מס. 2 פעילות לוציפרז בבלוטת העטין בזנים טרנסגניים. ממוצע \pm שגיאת תקן.

תמונה מס. 2. אנליזה גנומית לנוכחות
הטרנסגן בזנים הנושאים קסטת ביטוי
התחלתית (p907) או משופרת (p904).

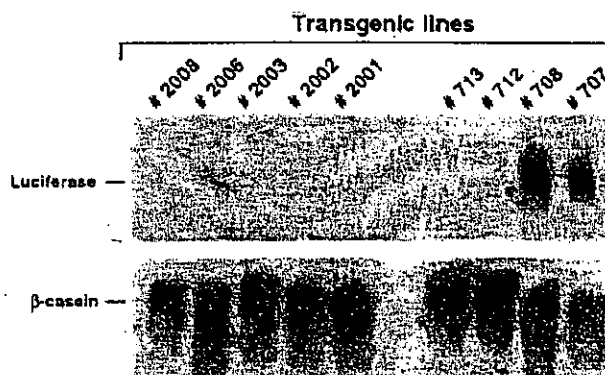


ספציפיות הביטוי הרקמתית של וקטור p904 נבחנה ברקמות שונות. באף אחת מהן לא נקבעה פעילות לוציפרז העולה על אחוז אחד בהשוואה לרמת הפעילות בבלוטת העטין (תמונה 4).

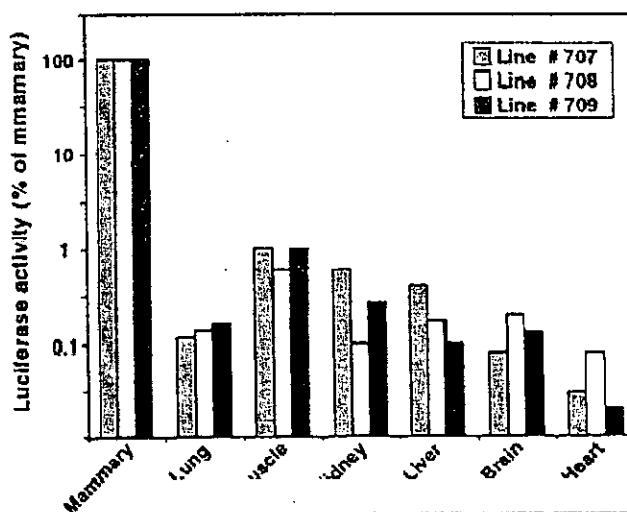
לאשר את התגובתיות של רצפי הבקרה של גן ה BLG להורמונים לקטוגניים, לאחר אינטגרציה של וקטור p904 לגנום חיות טרנסגניות הוכנה תרבית איבר מעטין של חיות בלקטציה מזן #709. מתמונה מס' 5 נתן ללמוד על אינדוקציה של כ 30% בפעילות הלוציפרז לאחר טרנספקציה עם אינסולין ופרולקטין בהשוואה לרמה הבזאלית אשר נקבעה לאחר טיפול באינסולין בלבד. תוספת של הידרוקורטיזון התבטאה בעליה נוספת של כ 40% ברמת הפעילות של לוציפרז. אופי ההשפעה הלקטוגנית נמצא דומה לזה שנקבע in vitro בתאי CID-9 (טבלה מס. 1). ההשג העקרי בפרק זה הינו בניתו של וקטור p904 היעיל פי 10 בתרבית והרבה יותר in vivo בהכונת ביטוי לוציפרז בבלוטת העטין בהשוואה לווקטור p907 אשר מבוסס על קסטת הביטוי שהיתה בידנו בתחילת העבודה.

יעילותו הרבה של וקטור p904 נובעת מאינטראקציה בין רצפי בקרה הקימים באזור ה'3 של גן ה BLG ו אזור הפוליאדנילציה של ה SV40. ביחד עם אלמנטים בפרומוטר ובאזור אקסון 1/ אינטרון 1/ אקסון 2 של גן ה BLG, מאפשר אזור הפוליאדנילציה המלאכותי של התבנית הגנומית ההברידית ביטוי גבוה וספציפי ותלוי הורמונים לקטוגנים בבלוטת העטין של חיות טרנסגניות, אשר אינו תלוי במספר עותקים של הטרנסגן.

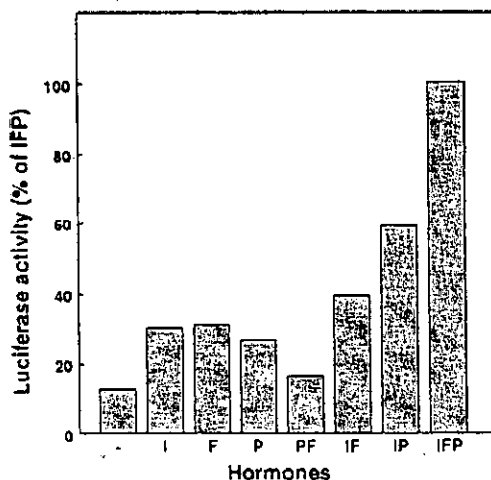
תמונה מס. 3. RNA ללוציפרז מתבטא אך ורק בזנים הנושאים את קסטת הביטוי המשופרת (p904).



תמונה מס. 4 ביטוי ספציפי של לוציפרז בבלוטת העטין של חיות טרנסגניות הנושאות וקטור p904.



תמונה מס. 5 רגולציה הורמונלית בשתלים מבלוטת עטין של חיות הנושאות את וקטור p904. insulin-I, Hydrocortisone-H, prolactin-P.

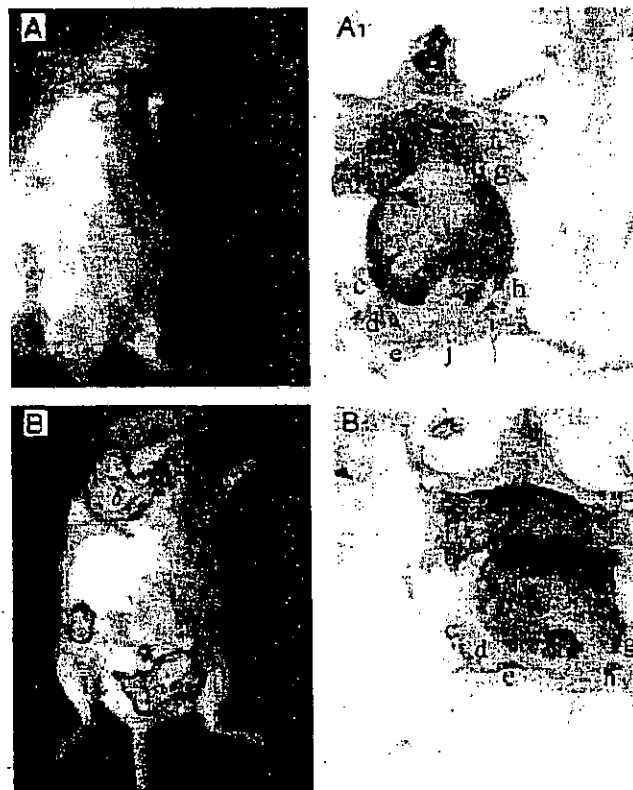


על מנת לבחון את העוצמה והספציפיות הרקמתית של וקטורים משופרים *in vivo* ופעילותם בזמן אמת

בדקנו את פעילותו של גן p904 אשר בניסויים קודמים הוכח כבעל ספציפיות לבלוטה. ביטוי הגן ההברידי BLG/luciferase הודגם *in vivo* על ידי low light imaging system. לחיות הטרנסגניות מוזרק הסובסטרט לוציפרין, והאור הנובע מפרוק הסובסטרט לוציפרין ע"י האנזים לוציפרז נקלט במערכת והופך לסיגנל כמותי בצבע אשר מודגם על פני האיבר בחיה בו הוא מתבטא.

בניסויים הראינו כי בלוטת העטין של חיות בהריון (17 ימים) תופסת שטח דומה לזה של בלוטת העטין של חיה

ביום ה-6 ללקטציה אולם רמת ביטוי הלוציפרז חלשה הרבה יותר וממוקדת ב בלוטות ה Thoracic and inguinal (תמונה מס. 6). מספר אזורים ממוקדים של ביטוי מוגבר הודגמו. ממצא זה מצביע על שונות בהתחלת הביטוי של הגנים לחלבוני חלב בבלוטות.



תמונה מס. 6. צילום של פעילות הלוציפרז בזמן אמת בבלוטות העטין של עכברים הנושאים וקטור p904

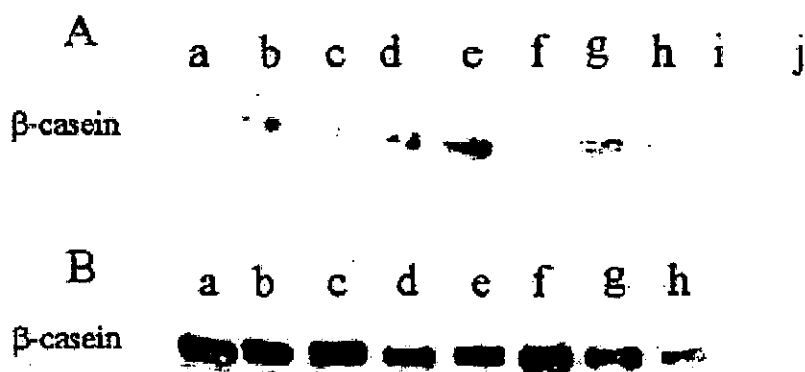
בהריון (A) ובלקטציה (B).

בבלוטת העטין של חיה בלקטציה, ואריאציה בין הבלוטות ובתוך הבלוטה בביטוי הגנים לחלבוני חלב

הודגמה. ממצא זה אושר גם על ידי אנליזה של פעילות הלוציפרז *in vitro* (טבלה מס. 3).

Mice	Region	Luciferase activity
		(% of region "a" in lactating mice)
Pregnant	a	21
	b	70
	c	2
	d	11
	e	21
	f	2
	g	6
	h	0.4
	i	3
	j	20
Lactating	a	100
	b	48
	c	3.5
	d	0.6
	e	21
	f	125
	g	40
	h	18

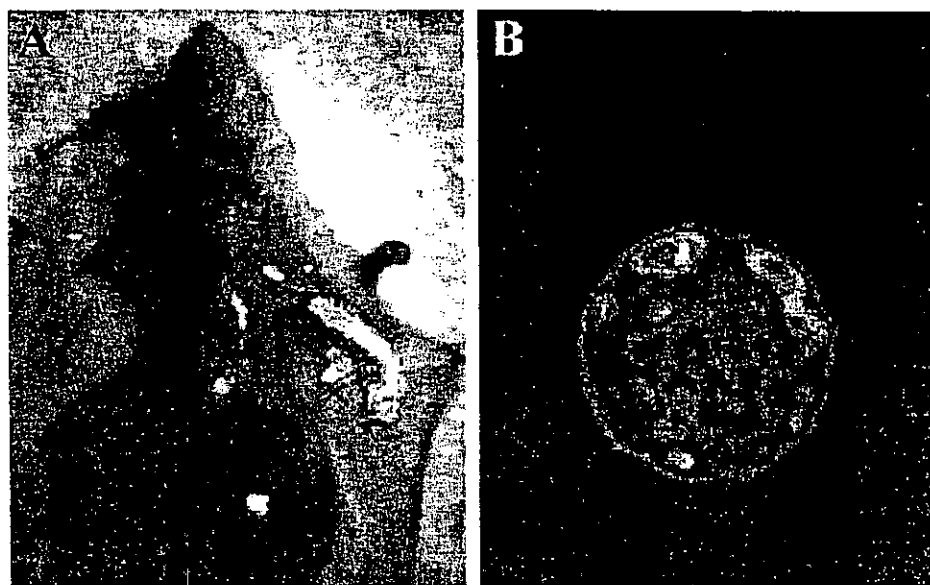
טבלה מס. 3. פעילות לוציפרז בבלוטות העטין של עכברים (הנושאים את וקטור p904) בהריון ובלקטציה. האותיות השונות מתייחסות לאזורים בבלוטה המודגמים בציור סס.



תמונה מס. 7. קביעת רמות קזאין בבלוטת העטין של לחיות טרנסגניות בהריון (A) ובלקטציה (B) הנושאות וקטור p904. האותיות השונות מתייחסות לאזורים במודמים בתמונה סס.

חוסר הקורלציה בין רמות הקזאין הדומות (תמונה מס. 7) להשתנות בפעילות הלוציפרז נובע כנראה מזמן מחצית החיים הארוך של הקזאין בהשוואה לפעילות הרפורטר.

אטימה של בלוטת עטין בצד אחד של הגוף למשך 4 שעות הביאה לביטול מוחלט של פעילות הלוציפרו ומסדה את הגן ההברידי BLG/luciferase כמכשיר אמין לאנליזה של סטימולציות קצרות טווח להפעלת הגנים לחלבוני חלב (תמונה מס. 8).



תמונה מס. 8. A דיכוי פעילות הלוציפרו על ידי חסימת בלוטה (שמאלית) ליניקת גורים. B פעילות לוציפרו בתרבית תאים אפיתליאליים שהופקו מבלוטת עטין של חיה טרנסגנית בלקטציה.

תאי עטין מחיות טרנסגניות הנושאים את הגן ההברידי קיימו את פעילות הלוציפרו גם בתרבית, ולכן יוכלו לשמש ככלי למעקב אחר התפתחות הבלוטה לאחר השתלה.

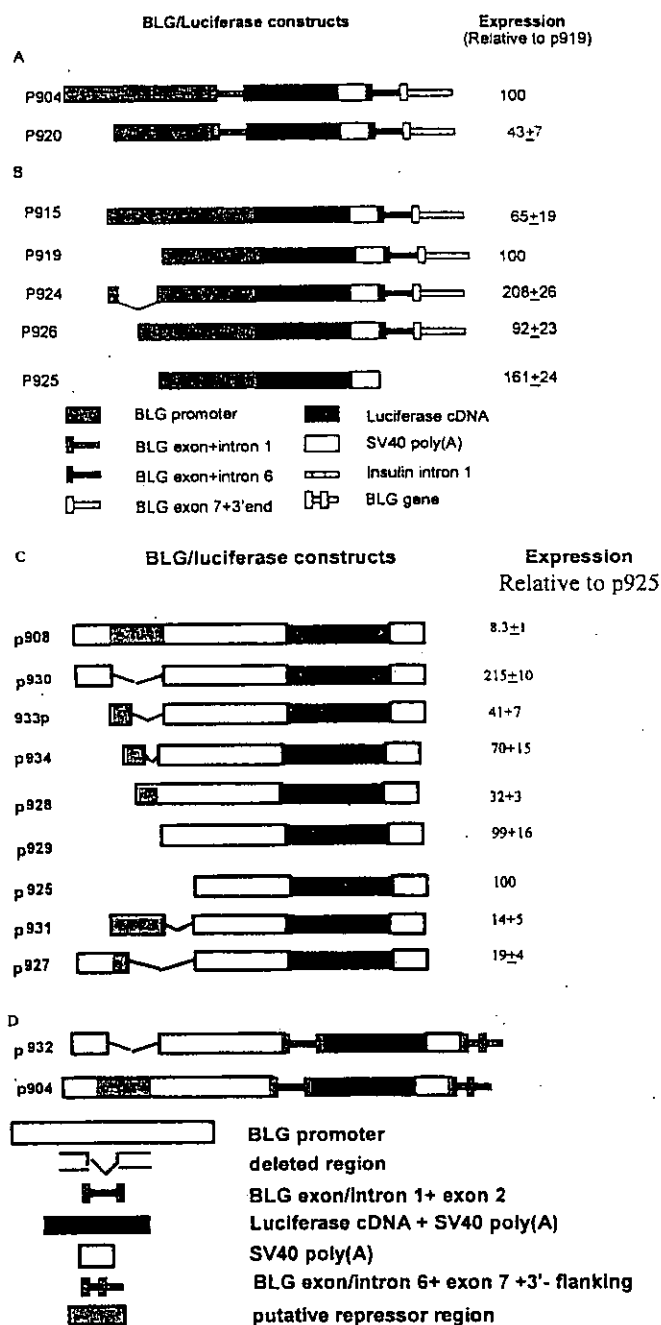
השיטה של מעקב אחר פעילות הפרומוטר בשיטת Bioluminescence אינה מצריכה לבצע ממוצעי דגימות הפעילות ההטרונגנית ברקמה ומונעת שגיאות כתוצאה מדגימת אזורים לא אקטיביים. שיטה זו מאפשרת מעקב רציף אחר פעילות הפרומוטרים לחלבוני חלב בשלבי ההריון, ולקטציה וinvolution.

המשך שיפור הוקטור הטרנסגני: זיהוי אתר העיכוב ברצף הגן ל - BLG.

וקטור p904 כולל את רצפי BLG הבאים: רצפי פרומוטר, אינטרונים 1, 6 ו רצפי 3'. בנוסף הוא מכיל את ה SV40 PA.

בהשוואה בין וקטור p904 ווקטור p920 (תמונה מס. 9A) הוכח כי קיצור הפרומוטר ב 1kb מביא לירידה בפעילות הלוציפרו בתאי בלוטת עטין שעברו טרנספקציה קבועה ודפרנציאציה על מטריקס בנוכחות הורמונים לקטוגניים. לעומת זאת, בהעדר האינטרון הראשון, קיצור הוקטור גרם במפתיע לעליה בפעילות הלוציפרו (השווה p915 ל p919 תמונה 9B).

בסדרה של וקטורים המתוארים בתמונה 9B ביססנו את נוכחותו של אתר עיכוב אפשרי 2-3 kb מתחילת אתר



תמונה מס. 9. אפיון אתר הרגולציה בפרומוטר של ה-BLG.

השעתוק. בהמשך מיקדנו את האתר לרצף בן 300 בסיסים והראינו כי אתר זה פועל כפרסור גם בהעדר רצפי אינטרונים (תמונה מס. 9C). נסיונות ראשוניים למקם רצף הרגולטורי בתוך האתר בן ה 300 בסיסים על ידי חלוקתו לתת אתרים בני כ- מאה בסיסים הצביעו, באופן כללי, על תרומה דומה של כל תתי-האתרים לעיכוב. יש לציין כי עיכוב זה לא נבע מאי תגובתיות להורמונים כפי שנתן להבין מטבלה מס. 4.

בדקנו גם את פעילותו של באתר הרגולטורי *in vivo* בחיות טרנסגניות על ידי הסרתו מהקונסטרקט הפעיל p904. הקונסטרקט חסר אתר הרגולציה שנבנה כונה p932 (תמונה מס. 9D). להפתעתנו, העדרו של אתר העיכוב של פעילות הפרומוטר ל BLG בתאים לא אפשר ביטוי גבוה של הלוציפרז בחיות. (טבלה מס. 5). את האופי ההפוך של פעילות האתר הרגולטורי בפרומוטר של ה BLG בתאים לעומת חיות נלמד בעבודת ההמשך.

Construct	Composition				Expression (% of IFP)		
	BLG 5'	BLG int.1	BLG 3'	SV40 enh	Matrigel		
	(kb)				I	IP	IFP
904	3	+	+	+	30	48 (18)	100 (52)
915	3	-	+	+	28	50 (22)	100 (50)
924	3*	+	+	+	10	26 (16)	100 (74)
925	2	-	+	+	8	35 (27)	100 (65)

טבלה מס. 4. עיכוב הביטוי של לוציפרז אינו נובע מהעדר תגובתיות הורמונלית בוקטורים השונים. I – אינסולין, F – הידרוקורטיזון, P – פרולקטין. בסוגריים – התוספת בפעילות הלוציפרז בתוספת ההורמון בהשוואה לפעילות הבזאלית שנקבעה בתוספת אינסולין בלבד.

Construct	Line #	Highest activity/100 ug protein	Avaraged activity/ 100 ug protein
p904	706	N.D.	0.003±0.0005
	707	123±81	95±67
	708	172±108	89±57
	709	565±248	255±1
	712	N.D.	0.017±0.003
	713	N.D.	0.0002±0.0001
932	U1	1.4±1	0.5±0.4
	U3	7.3±4	4.9±3.3
	U4	0.007	0.008±0.003
	U5	0.02	0.02±0.002

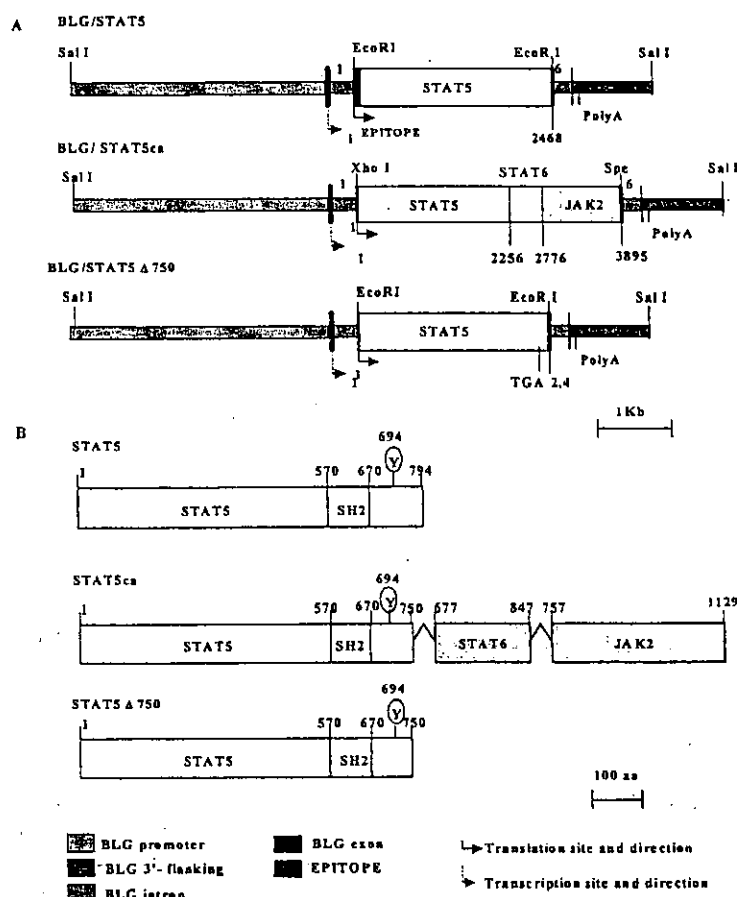
טבלה מס. 5. העדר רצף בקרה בן 300 בסיסים בגן p932 גורם לדיכוי פעילות הפרומוטר *in vivo*.

השפעת כמות ופעילות Stat5 על מבנה ולוטת העטין

Stat5 מעביר סגנלים אקסטרצלולריים של הורמונים, ציטוקינים וגורמי גדילה מהסביבה החוץ תאית לגרעין ובכך מבקר שעתוק משך תקופות הריון לקטציה וגמילת הגורים. אחד הסיגנלים החשובים אותם מבקר Stat5 הינו ההשפעה הלקטוגנית של פרולקטין על יצירת חלבוני החלב בלוטת העטין וכן גם התפתחות הלוטה עצמה. נבנו קונסטרוקטים הברידיים בהם הוכנס ה (Stat5) הנטיבי STAT5, או הפעיל קונסטיטטיבי (STAT5ca) או Dominant negative (STAT5Δ750) תחת בקרת רצפי בקרה של גן ה - BLG. זאת לשם ביטוי ספציפי בתאים אפיתליים של בלוטת העטין (תמונה מס. 10).

תמונה מס. 10.

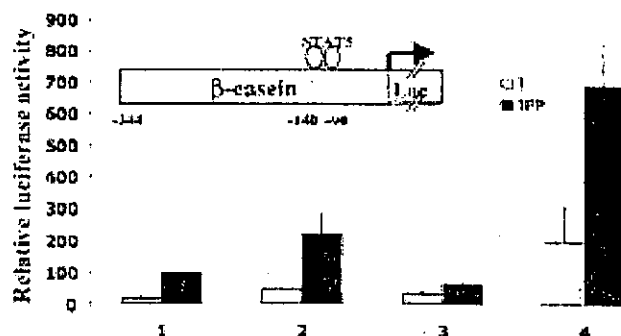
סכמה של מבנה הגנים
ההברידיים המבוססים על
רצפי ואריטים של הגן ל
Stat5 ורצפי בקרה מגן ה
BLG (A) והתוצר החלבוני
BLG/STAT5 (B).
מבוסס על הגן הנטיבי ל
Stat5 תחת רצפי בקרה של
BLG/STAT5ca.
פעיל קונסטיטטיבי.
BLG/STAT5Δ750
Dominant negative -



האמינות של רצפי הבקרה בהכוונת פעילות אוטנטית ותלוית בקרה הורמונלית אושרה ע"י החדרת הקונסטרוקטים בטרנספקציה קבועה לשני סוגי תאים ממוצא בלוטת עטין (תמונה מס' 11). בפנל A, נראית אנליזה של פעילות הפרומוטר לקואין בתאי HC-11 שעברו טרנספקציה קבועה עם ואריאנטים של Stat5 בהעדר ובנוכחות הורמונים לקטוגניים. עליה בפעילות הלוציפרו לאחר תוספת של פרולקטין ודקסמזון נקבעה בתאים שלא עברו טרנספקציה ובאלו שעברו ערנספקציה עם Stat5 נטיבי ופעיל קונסטיטטיבי (אולם לא באלה שעברו טרנספקציה עם הוואריאנט ה Dominant negative). בנוכחות הורמונים, לטרנספקציה עם ה Stat5 הטבעי ובמיוחד עם זה הפעיל קונסטיטטיבי השפעה משמעותית על פעילות הפרומוטר. מכך נובע כי בטבע קיימת מגבלה הן ברמת הכמות והן ברמת הפעילות לגורם שיעתוק זה. בפנל B של תמונה מס. 11 נתן לראות עליה גם

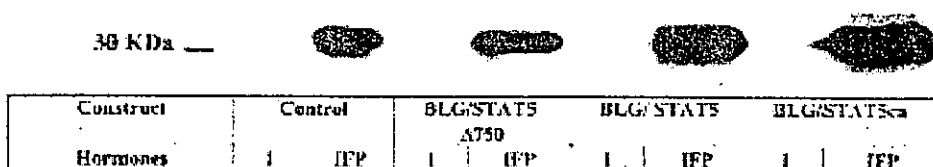
בכמות החלבון קזאין בתאים הנושאים את הווריאנט בטבעי והפעיל קונסטיטוטית. בפנל C הדגמנו את ביטוי ה Stat5 הטבעי בתאי CID-9 על מטריגל שעברו "הפצה" בכדוריות זהב הנושאות את הקונסטרוקט BLG/STAT5 הקשור לאפיטופ לצורך זיהוי.

A



β-casein/luciferase	+	+	+	+
BLG/STAT5		+		
BLG/STAT5Δ750			+	
BLG/STAT5ca				+
Insulin (I)	+	+	+	+
Hydrocortisone, Production (FP)	-	+	-	+

B



C



תמונה מס. 11. A ביטוי ורגולציה הורמונלית של casein/luciferase בתאי HC-11 שעברו טרנספקציה עם ווריאנטים של Stat5. B רמות קזאין בתאים שעברו טרנספקציה. C ביטוי STAT5 בתאי CID-9 שעברו הפצה בכדוריות זהב עליהן נספח BLG/STAT5.

לאחר שהדגמנו את יתכנות הביטוי של הקונסטרוקטים BLG/Stat5 in vitro, המשכנו ויצרנו חיות טרנסגניות הנושאות את שלשת הווריאנטים של Stat5. בפרק הראשון שיתואר, התמקדנו בווריאנטים הטבעי

(BLG/STAT5) והפעיל קונסטיטוטית (BLG/STAT5ca). כ 30% מהזנים הטרנסגניים הנושאים את הגן BLG/STAT5 וכ 25% מהזנים הטרנסגניים הנושאים את STAT5ca בטאו את החלבון המתאים ברקמת העטין. לא נמצא קשר בין רמת הביטוי ומספר העותקים (טבלה מס. 6).

Transgenic Line	Copy No.	Level of Expression
BLG/STAT5-6	4	++++
BLG/STAT5-8	2	++
BLG/STAT5ca-7	5	++
BLG/STAT5ca-8	10	+
BLG/STAT5ca-10	6	1/2+
BLG/STAT5ca-11	8	-
BLG/STAT5ca-15	10	+++
BLG/STAT5ca-19	3	++

טבלה מס. 6. מספר עותקים בגנום ורמות ביטוי בבלוטת העטין של BLG/STAT5 ו

BLG/STAT5ca.

בתמונה מס. 12 מודגמת קביעת הביטוי של הוורנט הטיבעי של Stat5 (פנל A), הספציפיות הרקמתית

(פנל B), התגובתיות למצב הפיזיולוגי (ביטוי מקסימלי בלקטציה), וחוסר ההשפעה על ביטוי ה Stat5 האנדוגני

(פנל D). מאנליזה זו נתן גם להסיק כי רמות STAT5 טרנסגני בלקטציה שוות לאלו האנדוגני.

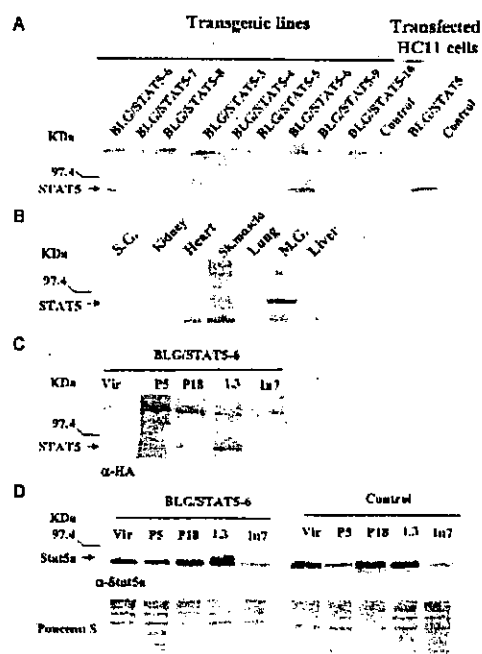
תמונה מס. 12. A - ביטוי STAT5 בבלוטת העטין

של חיות טרנסגניות. B - ספציפיות רקמתית של הביטוי. C -

תלות הביטוי במצב הפיזיולוגי של הריון ולקטציה. D - ביטוי

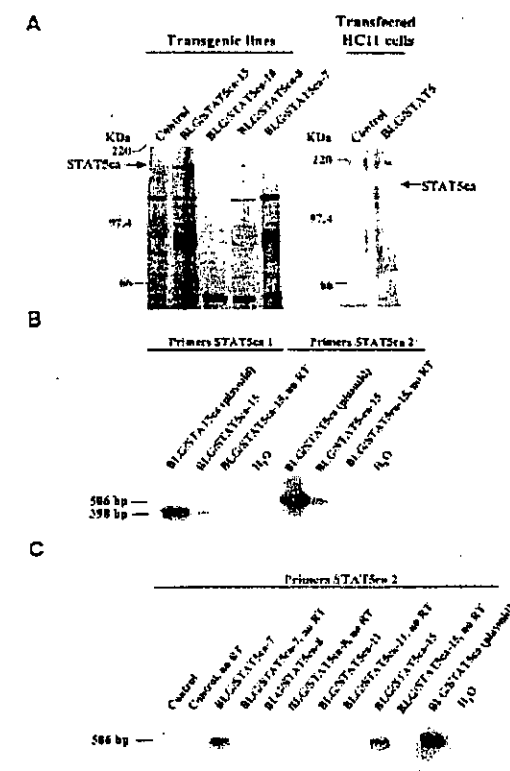
STAT5 הטרנסגני אינו משנה את אופי הביטוי של ה Stat5

האנדוגני.



חמישה זנים המבטאים Stat5 פעיל קונסטיטוטית יוצרו. החלבון הטרנסגני נקבע במשקל הצפוי (140Kda)(תמונה מס. 13 פנל A) וביטויי בזנים השונים אושר באנליזת RT-PCR על RNA שהופק מבלוטת עטין בלקטציה (פנל B,C). זן BLG/STAT5ca-11 מוסד כביקורת - זן הנושא את הטרנסגן אך לא מבטא את החלבון.

תמונה מס. 13. ביטוי STAT5ca בבלוטת העטין של זנים טרנסגניים שונים. A - ביטוי ברמת החלבון. B - RT PCR בעזרת שני פרימרים שונים. C - אנליזה RT PCR של ביטוי הטרנסגן ההיברידי בזנים שונים.

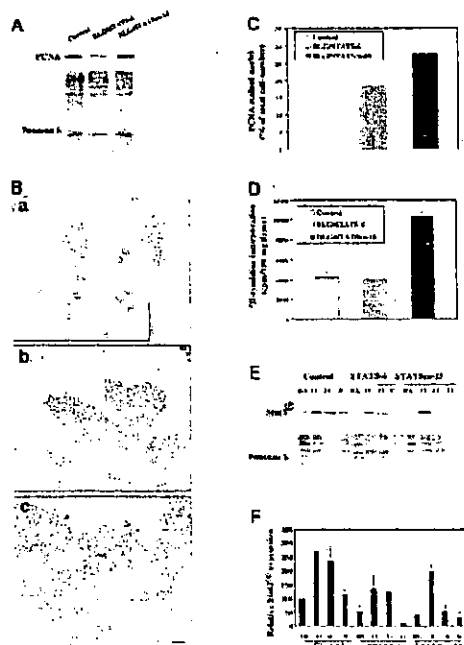
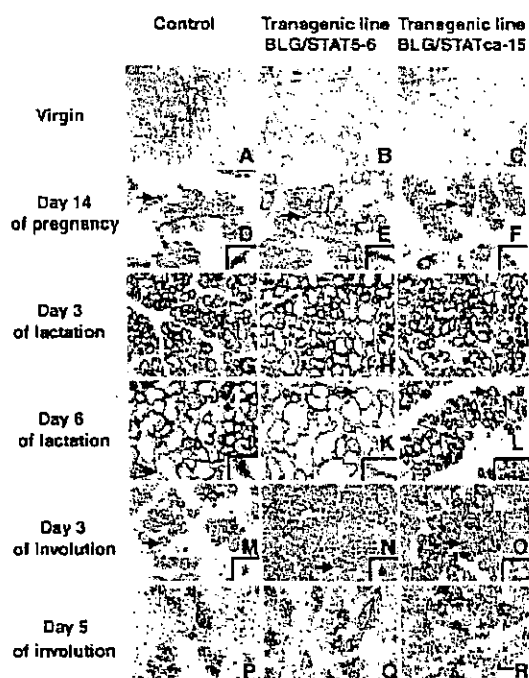


בלוטת העטין של חיות טרנסגניות הנושאות את שני הארינטים התפתחה האופן נורמלי משך ההתבגרות המינית ותחילת ההריון (תמונה מס. 14). הבדלים במורפולוגיה החלו להראות במחצית ההריון. חיות המבטאות ביתר את הארינט הטבעי הראו בלוטת עטין מפותחת יותר, בעוד שבאופן מוזר אלויאלי מכווצים וסגורים נראו בבלוטת העטין של אלו הנושאות את הארינט הפעיל קונסטיטוטית. מצב זה דומה לתמונה אשר נקבעה בבלוטת העטין של חיות K/O ל Stat5a בהבדל שבלוטת העטין בחיות BLG/STAT5ca היתה פעילה, כפי שיודגם, מבחינה פונקציונלית. יתכן והשוני המורפולוגי הזה קשור בקצב חלוקת התאים המהיר יותר בבלוטת העטין של חיות בהריון הנושאות את הארינט הפעיל קונסטיטוטית בהשוואה לחיות הביקורת או לאלו הנושאות את ה BLG/STAT5 (תמונה מס. 15). תחום נוסף בו ניכרה השפעה משמעותית לוארינט הנטיבי והפעיל קונסטיטוטית הינו עיכוב האינולוציה – הרגרסיה של הבלוטה ותמותת התאים האפיתליאליים לאחר הפסקת ההנקה. מתמונה מס. 14 נראה בברור כי בעוד שבלוטת העטין של חיות הביקורת עברה רגרסיה כמעט מלאה 3

ימים לאחר הסרת הגורים, הרי שבולטת העטין של חיות טרנסגניות נשארה מפותחת יותר עד 5-7 ימים לאחר הפסקת ההנקה. אישור ביוכימי לחיוניות הגבוהה יותר של בלוטת העטין של חיות טרנסגניות נמצא על ידי אנליזה של Stat3 אשר הינו סמן לאינולוציה. אכן, רמות גבוהות של Stat3 מזורחן נקבעו משך אינולוציה בחיות הביקורת (תמונה מס 15 פנלים E ו F).

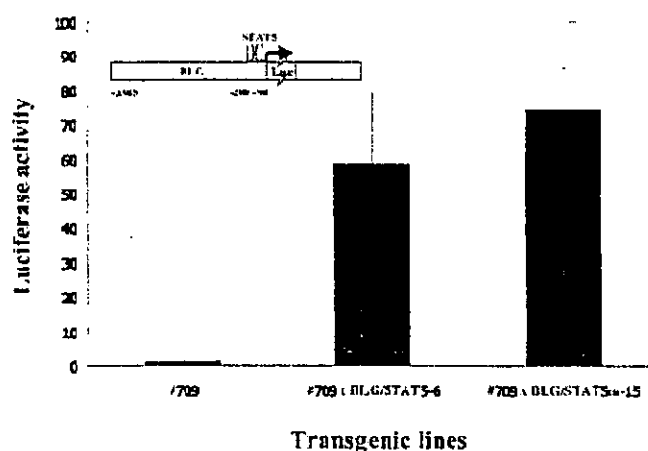
בהמשך, בדקנו את השפעת ביטוי BLG/STAT5 ו BLG/STAT5ca על הפונקציונליות של הבלוטה, כלומר יצור חלבוני החלב. כפי שניתן לראות מתמונה מס. 16 פעילות גבוהה יותר של הפרומוטר BLG הודגמה משך האינולוציה בחיות טרנסגניות כפולות הנושאות את ה BLG/Luciferase או BLG/STAT5 ו BLG/STAT5ca. רמות גבוהות יותר של ביתא קזאין יוצרו בבלוטת העטין של חיות הנושאות Stat5 נטיבי ובמיוחד פעיל קונסטיטוטית משך רוב שלבי ההריון והלקטציה והאינולוציה (תמונה מס.17). ממצא זה תומך בסברה כי רמתו של Stat5 ולא רק פעילותו מהווים גורם מגביל בסינתזת חלבוני חלב.

תמונה מס. 14 שוני במורפולוגיה של בלוטת העטין בעכברים טרנסגנים הנושאים וארינטים של Stat5. A-C whole mount, D-K צביעה בהמטוקסילין אאוזין. אינסט – הגדלה פי 3.



תמונה מס. 15. השפעת וארינטים של Stat5 על פרוליפרציה ואינולוציה בבלוטה. A אימונובלוט ל PCNA. B - אנליזה הסטוכימית ל PCNA, C – כימות מספר הגרעינים שהגיבו ל PCNA, D – איקורפורציה של תימיון מסומן DNA משתלים של בלוטת עטין של עכברים טרנסגניים. E- אימונובלוט ל pStat3 במהלך האינולוציה, F – כימות התוצאות המוצגות ב E.

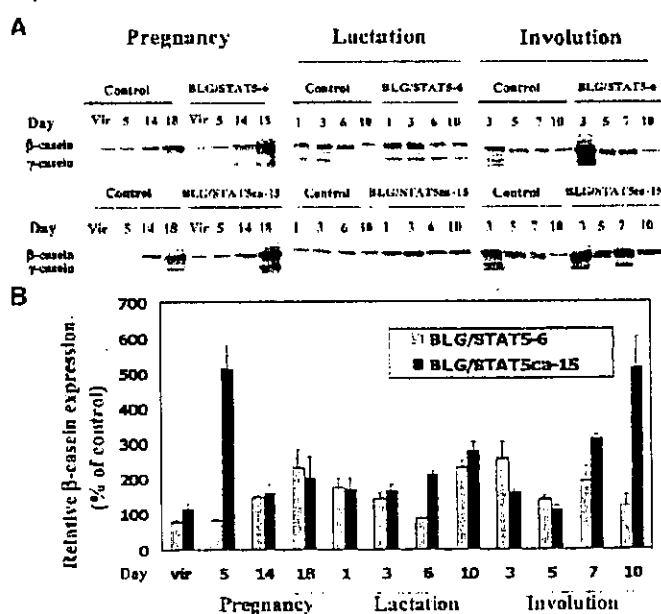
תמונה מס. 16 פעילות לוציפרז בבלוטת העטין – של חיות טרנסגניות כפולות הנושאות BLG/luciferase ווארינטים של Stat5 ביום השלישי לאינולוציה.

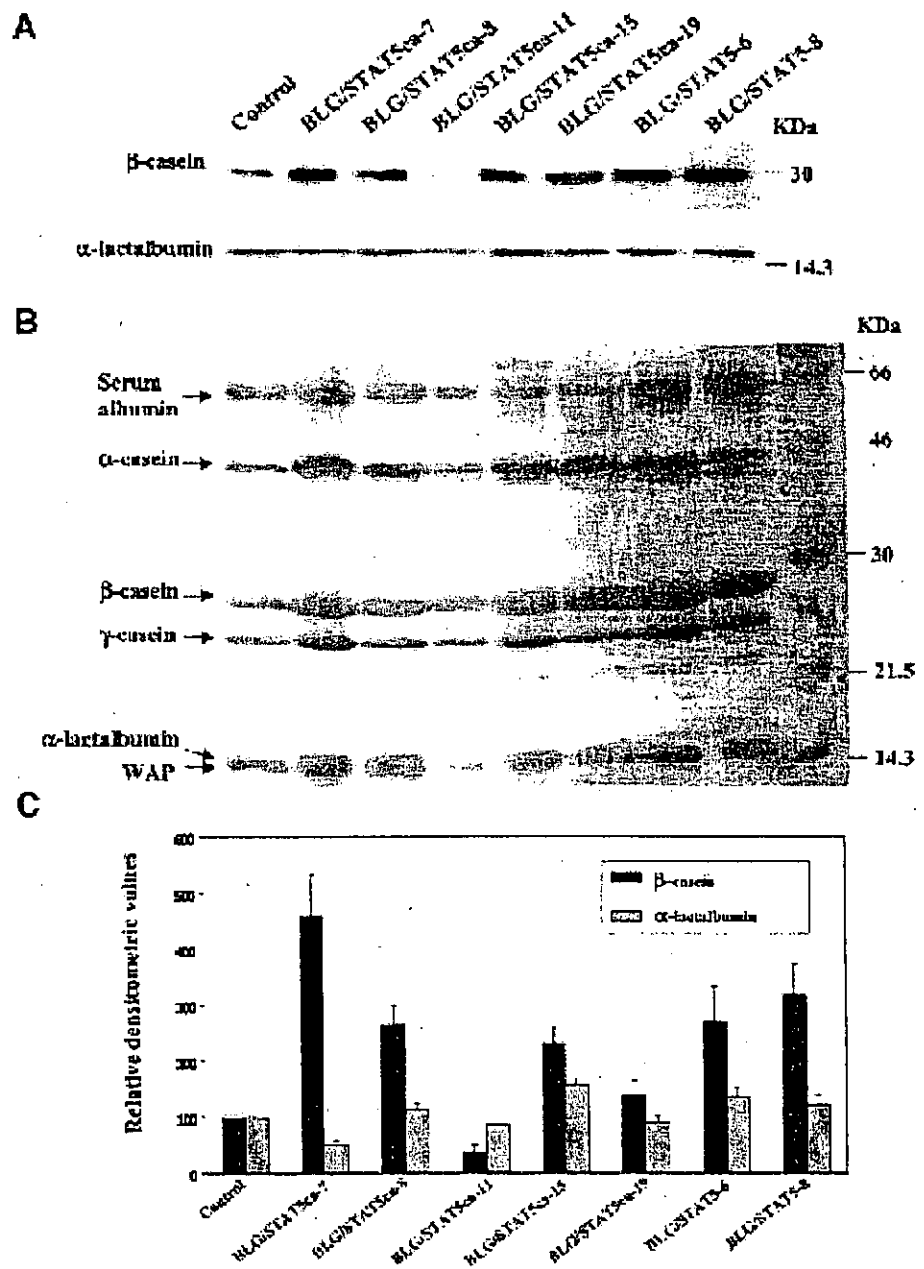


ביטוי הקזאין המוגבר לווה בהפרשת קזאין מוגברת לחלב (אולם לא alfa lactalbumin תמונה מס. 18), ובשיפור בגדילת הגורים (תמונה מס. 19).

פרק זה של העבודה ביסס והרחיב את האינפורמציה אשר נתקבלה בעבר מניסויים בתרבויות תאים ובחיות בהן עבר הגן ל Stat5 הגן אינאקטיבציה, וביסס את תפקידו של Stat5 כגורם לקטוגני מולטיפונקציונלי המבקר של חלוקת תאים, דפרנציאציה יצור חלבוני חלב ואינולוציה של בלוטת העטין. פרק זה הניח היסוד להמשך המחקר בחיות משק.

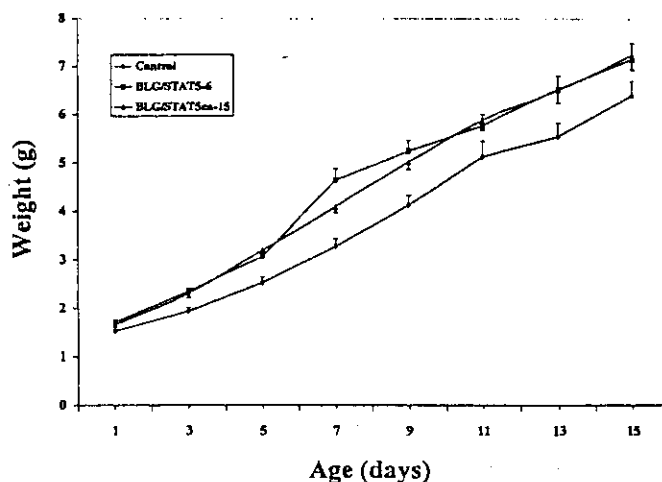
תמונה מס. 17. ביטוי החלבון קזאין בבלוטת העטין של חיות טרנסגניות בהריון, לקטציה ואינולוציה. A – אימונובלוט. B – כימות ביחס לביקורת המתאימה.





תמונה מס. 18. הפרשת קזאין ואלפא לקטאלבומין לחלב של חיות טרנסגניות ביום השישי לאחר ההמלטה. A – אימונובלוט, B קביעה על ידי צביעת קומסי של כלל החלבונים, כולל אלבומין, בחלב. C – יחוס כמות החלבונים שנקבעה באימונובלוט (A) לרמת האלבומין אשר אינו מיוצר בבלוטה ומשמש כ"רפרנס" חיצוני.

תמונה מס. 19. קצב גדילת גורים מוגבר בחיות
הנושאות את ה BLG/STAT5 ו
BLG/STAT5ca.



השפעת ד-רגולציה של Stat5 בבלוטת העטין על טרנספורמציה בתאים אפיתליאליים והתפתחות גידולים.

פעילות קונסטיטטיבית של גורמי שיעתוק ואונקוגנים זוהתה לעיתים עם טרנספורמציה תאית ותהליכים של התפתחות סרטנית. בניגוד ל Stat3, לא נמצאה אסוציאציה בין פעילות קונסטיטטיבית של Stat5 לטרנספורמציה של תאים אפיתליאליים והתפתחות סרטן שד. זאת למרות של Stat5 תפקיד חשוב ומוכח בהתפתחות הבלוטה, ודרגולציה של גורם שיעתוק זה הביאה להתמרה סרטנית בתאי דם.

במעקב אחר מצבן של החיות הטרנסגניות הנושאות Stat5 פעיל קונסטיטטיבית נתקלנו לעיתים קרובות במקרים של דלקות עטין חריפות הנובעות כנראה מרמת ביטוי גבוהה של חלבוני חלב ואינוולוציה איטית ולא מושלמת של הבלוטה.

בחיות מבוגרות בגיל 8-12 חודשים (מקביל לגיל הבלות בנשים) נקבעו מקרים של התפתחות גידולים בבלוטה. טבלה מס. 7 מסכמת את הנתונים הראשוניים שנאספו משך 3 שנים של מעקב ואנליזה סטטיסטית של כמות הגידולים. טבלה מס. 8 מסכמת את הפתולוגיה שלהם.

Transgenic line	Copy number	Expression level in mammary gland	Tested mice**	Mice with tumors	Tumorigenicity %
BLG/STAT5ca-5	2	1/2+	23	1	4.3
BLG/STAT5ca-7	5	++	38	5	13.2
BLG/STAT5ca-8	10	+	59	8	13.6
BLG/STAT5ca-9	1	+	24	2	8.3
BLG/STAT5ca-11	8	-	44	0	0
BLG/STAT5ca-14	6	1/2+	11	2	18.2
BLG/STAT5ca-15	10	+++	72	4	5.6
BLG/STAT5ca-19	3	++	48	2	4.2
Total BLG/STAT5ca Average +S.E.M			275**	24	8.7±2.1
BLG/STAT5-6	4	+++	75	6	8.0
BLG/STAT5-8	2	++	38	3	7.9
BLG/STAT5-10	6	-	35	0	0
Total BLG/STAT5 Average			113**	9	7.95
BLG/STAT5Δ750-3	5	5	16	3	18.8
BLG/STAT5Δ750-5	2	0.3	30	1	3.4
BLG/STAT5Δ750-6	8	0.9	44	0*	0
BLG/STAT5Δ750-7	3	0.3	27	1	3.9
BLG/STAT5Δ750-8	4	0.9	32	2	6.3
BLG/STAT5Δ750-9	4	8.3	38	5	13.2
BLG/STAT5Δ750-11	3	-	17	0	0
BLG/STAT5Δ750-12	2	-	8	0	0
BLG/STAT5Δ750-13	3	0.5	33	3	9.1
Total BLG/ STAT5Δ750 Average + S.E.M.			176**	15	8.5±2.2
Total transgenic population			564	48	8.5±1.3

*Several cases of mammary cysts were detected with a galactoceles morphology.

**Excluding non-expressing mice.

טבלה מס. 7 אנליזה של מספר הגידולים בזנים הטרנסגניים הנושאים וארינטים של Stat5.

נתן לקבוע כי:

1. התפתחו גידולים בנקבות בוגרות ממרבית הזנים הטרנסגניים המבטאים את כל שלשת הוריאנטים של Stat5. אחוז הגידולים נע בין 4%-19% מהאוכלוסיה בגיל המתאים.
2. לא התפתחו גידולים בזנים הנושאים, אך אינם מבטאים, את הטרנסגן.

3. ממוצע אחוז הנקבות הבוגרות בהן התפתחו הגידולים היה דומה באוכלוסיות העכברים הטרנסגנים הנושאים את שלשת הארינטים של Stat5. איתור גידולים בחיות הנושאות את הארינט המקוצר של Stat5, STAT5Δ750, מצביע על העדר מוערבות של הקצה הקרבוקסילי של Stat5, בו נמצא אתר הטרנסאקטיבציה, באינדוקציה להתפתחות הגידולים. כיום אנו נוטים להעריך כי האינדוקציה הראשונית להתפתחות הגידולים נובעת מאינטראקציה עם גורמי שעתוק נוספים באמצעות אתר ה coiled coil הנמצא סמוך ל N terminal. עם זאת נראה כי לאתר הטרנסאקטיבציה חשיבות בהכנות ההתפתחות הפנוטיפית של הגידול שכן חיות הנושאות את הארינט הפעיל קונסטיטוטית פתחו גידולים בעלי פנוטיפ יותר ספציפי ופחות גידולים באתרים אקטופיים. אנליזה גנומית של הגידולים הראתה שרובם מבטאים את הרצפטור לאסטרוגן (החיוני לטיפול תרופתי) ואלו הנושאים את הארינט הפעיל קונסטיטוטית מראים ביטוי גבוה יותר של גורם התרגום אשר משמש גם מרקר לסרטן שד eIF4F. כיום אנו ממשיכים באנליזה של ביטוי הגנים בבלוטה והקשר שלהם לסוג הטרנסגן ולפנוטיפ של הגידול.

Type of tumor	Total transgenic population		Individual transgenic populations		
	Number of tumors	% of total number of tumors	BLG/ STAT5ca	BLG/ STAT5	BLG/ STAT5Δ750
Carcinoma	5	11.9	2 (9.1)	-	3 (27.3)
Adenocarcinoma	8	19.1	5 (22.7)	1 (11.1)	2 (18.2)
Microacinar carcinoma	1	2.4	1 (4.6)	-	-
Micropapillary adenocarcinoma	6	14.3	2 (9.1)	2 (22.2)	2 (18.2)
Pappillary adenocarcinoma	13	31	9 (40.9)	2 (22.2)	2 (18.2)
Anaplastic neoplasm	1	2.4	1 (4.6)	-	-
Myoepithelial carcinoma	2	4.8	1 (4.6)	1 (11.1)	-
Malignant lymphoma	5	11.9	1 (4.6)	3 (33.3)	1 (9.1)
Keratoacintoma	1	2.4	-	-	1 (9.1)
Total	42	100%	22 (100%)	9 (100%)	11 (100%)

טבלה מס. 8. הפתולוגיה של הגידולים בחיות טרנסגניות הנושאות וארינטים שונים של Stat5.

מסקנות עקריות והשלכותיהן על המשך ביצוע המחקר

הנסיגות לשיפור הוקטור הטרנסגני הוכיחו עצמם וכיום בידנו וקטור פוטנטי ויעיל לביטוי cDNA בבלוטת העטין. תוך שימוש בוקטור זה ביטאנו וארינטיים של Stat5 בבלוטה והבאנו לשיפור של עד פי 5 בהפרשת קזאין לחלב. בגיל הבלות גרם ביטוי Stat5 להתפתחות מסוימת של גידולים שאופינו בעבודה זו. ההמלצה העקרית הינה לבחון דרכים מעשיות לישום ההשגים שהושגו במכרסמים, לחיות המשק.

סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.

1. פיתוח קסטת ביטוי יעילה וספציפית לטרנסגנים בבלוטת העטין.
א. איתור ואפיון אתרים רגולטורים ברצפי הבקרה של הגן ל ביתא לקטוגלובולין ממקור כבש.
2. בדיקת ייתכנות שינויים פונקציונליים בבלוטת העטין, הכוללים שיפור רמות החלבון, תוך שימוש בגן רגולטורי ל Stat5.

עקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.

1. פתוח קסטת גנרית פעילה פי 10 בהשוואה לקימת בתחילת הדו"ח.
2. אפיון אתרי בקרה שליליים וחיוביים בפרומוטר של הגן ל ביתא לקטוגלובולין.
3. אפיון אינטראקציה חיובית בין ה SV 40 PA site ורצפים ב BLG 3 ליצירת אתר פוליאדנילציה מורחב.
4. שיפור רמות החלבון בחלב מכרסמים הנושאים וארינט פעיל קונסטיטוטיבית של Stat5 עד פי 5 מרמת הביקורת.

הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה.

1. השלמת אפיון אתר הרפרסיה בגן ה BLG.
2. יישום ההשפעה של Stat5 במכרסמים על ביטוי חלבוני חלב בחיות משק.
3. השלמת אפיון הגידולים שהופיעו ברקמה מבחינה גנטית והאינטראקציות הבין הגנים המביאות להופעתם.

האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח?

הרצאות מוזמנות:

2001

Medical school Omaha Nebraska

Medical School Shreveport Louisiana

2002

Endocrine Society Israel

Special invitation for lecture in "Mol. Biology for M.D.s (Herzelia, Israel).

Lecture for students (special invitation) in the Faculty of Agriculture.

אבסטרקטים ופוסטרים בכנסים:

2000

Society for phosphoproteins and signal transduction. Melbourne Australia.

Gordon conference. Mammary Gland Biology. Rhoad Island. USA

2001

Gordon conference. Mammary Gland Biology. Rhoad Island. USA

2002

Gordon Conference. Mammary Gland Biology. Italy.

מאמרים:

Reichenstein, M., Gottlieb, H., Damari G-M., Iavnilovich, E. and Barash, I. (2001). A new β -lactoglobulin-based vector targets luciferase cDNA expression to the mammary gland of transgenic mice. *Transgenic Research* 10: 445-456.

Barash I and Richenstein M (2002). Real-time imaging of β -lactoglobulin-targeted luciferase activity in the mammary gland of transgenic mice.

Molecular reproduction and development 61:42-48.

Iavnilovich, E, Groner B and Barash, I. (2002). Overexpression and forced activation of Stat5 in the mammary gland of transgenic mice promotes cellular proliferation, enhances differentiation and delays postlactational apoptosis.