השפעת פרולקטין על יחסי הגומלין בין תאי השומן לבין תאי האפיתל בבלוטת החלב

חיבור לשם קבלת תואר

"מוסמך למדעי החקלאות"

מאת

חגית סימון ברנט

מוגש לפקולטה לחקלאות מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית

האוניברסיטה העברית בירושלים

אב תשע"א רחובות אוגוסט2011

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של

ד"ר אבי שמאי

המחלקה לבעלי חיים

מנהל המחקר החקלאי מכון וולקני, רחובות

ד"ר סמיר מבג'יש

המחלקה לבעלי חיים

הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה

ע"ש רוברט ה. סמית, רחובות

האוניברסיטה העברית בירושלים

תּוֹדָה.. וְשׁוּב תּוֹדָה (של סילברסטיין)

זַמְזֵם זִמְזוּם סָתוּם,
שַׁרְבֵּט קִשְׁקוּשׁ בָּלוּם,
הַמְהֵם דֶּרֶךְ מַסְרֵק יָשָׁן
שִׁיר־לֶכֶת שֶׁל שׁוּם־כְּלוּם.
תִּרְקֹד עַל הַמִּרְפֶּסֶת
רִקּוּד שְׁאֵין בּוֹ טַעַם,
תָּרֹם לַעוֹלָם אֵיזוֹ שְׁטוּת יָפָה
שֶׁלֹּא הָיְתָה אַף־פַּעַם.

תודה לד"ר אבי שמאי וד"ר סמיר מבג'יש על ההדרכה וההנחיה, על החשיפה לעולם המחקר, הרעיונות, על מתן היד החופשית במחקר והתמיכה ללכת בדרכי, ועל שהאמנתם שלמרות כל הקשיים אצליח לסיים עבודה זאת.

תודה לד"ר שלי דרוין על העזרה בהעמדת הReal Time PCR, על העזרה בניתוחים הסטטיסטיים ועל כל העצות הטובות לאורך הדרך.

תודה לד"ר נורית ארגוב על כל החשיבה המשותפת, על התמיכה לאורך המחקר ועל האמונה שלך בי.

תודה לכפיר מידה, שי רייכר ושירה חלד הייתם לי ל"חברי מעבדה". תודה על כל העזרה לאורך הדרך, הפכתם להיות חברים קרובים.

תודה לאולגה גנין ואיתי ספקטור על העזרה בהעמדת ה western blot והאימונוהיסטוכימיה, נתתם לי הרגשה שאני תמיד רצויה ושאוכל לשאול שאלות עד כמה שאצטרך.

אחרונים תודה למשפחתי, להורי ולאחים היקרים שלי שהתענינו תמיד, שעזרו לי להתגבר על כל המכשולים, שהיו תמיד מאחורי, שהאמינו בי שאני מסוגלת לגדולות.

ולאיש שלצידי, שהיה שותף לכל ההצלחות הקטנות לאורך הדרך ושתמך בי ברגעים הקשים ביותר, איציק, תודה שהייתי לי איזון ברוך ועוגן חזק במשך כל התקופה של המחקר וכתיבת עבודה זו, אין מילים שיביעו את גודל ההערכה והאהבה שלי אליך.

תוכן עניינים

1

1. רשימת קיצורים 9

2. מבוא 10

2.1 התפתחות בלוטת החלב 10
2.1.1 שלביה השונים של התפתחות בלוטת החלב 10
2.1.2 תקופת הלקטציה 10

2.2 פרולקטין 11
2.2.1 פרולקטין, הקולטן לפרולקטין ומעבר הסינגל של הפרולקטין 11
2.2.2 חשיבות הפרולקטין בהתפתחות בלוטת החלב 12
2.2.3 פרולקטין ורקמת השומן 13

2.3 רקמת השומן בבלוטת החלב 13
2.3.1 חשיבותה של רקמת השומן בבלוטת החלב 13
2.3.2 יחסי הגומלין ביו רקמת האפיתל לרקמת השומן בבלוטת החלב 14

2.4 אסטרוגן 15
2.4.1 אסטרוגן והקולטנים לאסטרוגן 15
2.4.2 חשיבות האסטרוגן להתפתחות בלוטת החלב 16
2.4.3 אסטרוגן ופרולקטין בבלוטת החלב 17

2.5 השערת המחקר: 18

3. שיטות וחומרים 19

3.1 חומרים 19

3.2 תמיסות ובופרים 20
3.2.1 תרביות תאים 20
3.2.2 Western blot 20
3.2.3 אימונוהיסטוכימיה 21
3.2.4 PCR 21

3.3 שיטות 21
3.3.1 תרבית תאים HC11 21
3.3.2 תרבית תאים 3T3-L1 22
3.3.3 הפקת RNA 22
3.3.4 קביעה כמותית של RNA 23
3.3.5 ריאקצית DNase 23
3.3.6 סינתזת הגדיל המשלים לmRNA (cDNA) ריאקצית RT-PCR 23
3.3.7 Real Time PCR 24
3.3.8 Polymerase Chain Reaction (PCR) 25
3.3.9 הפרדה אלקטרופורטית על ג'ל אגרוז 25
3.3.10 הפקת חלבון 25
3.3.11 Western blot 26
3.3.12 אימונוהיסטוכימיה 26

3.3.12 ניתוח סטטיסטי 27
3.3.13 מבנה הניסויים 27

4.1 השפעת פרולקטין על רמת הביטוי של הגן לחלבון החלב β- casein ושל הקולטנים לאסטרוגן בתאי אפיתל של בלוטת החלב.. 29
4.1.1 היחס בין רמת הביטוי של הגנים ל β- casein, ER α, ER β לבין הגן β- actin בתאי HC11 (ערכי Ct ratio).. 29
4.1.2 רמת הביטוי של הגן β- casein 30
4.1.3 רמת הביטוי של הגן ER α.. 30
4.1.4 רמת הביטוי של הגן ER β.. 31

4.2 השפעת פרולקטין על ביטוי החלבונים לקולטנים לאסטרוגן בתאי HC11 שטופלו בריכוזים עולים של פרולקטין... 32
4.2.1 ביטוי של החלבון ל ER α ו ER β.. 32

4.3 השפעת פרולקטין על רמת הביטוי של הגן AdipoQ והגן לארומאטז בתאים פרה אדיפוציטים 3T3-L1, לאחר שעברו התמיינות... 33
4.3.1 היחס בין רמת הביטוי של הגן AdipoQ לגן β- actin בתאי 3T3-L1 (ערכי Ct ratio)................ 33
4.3.2 רמת הביטוי של הגן AdipoQ.. 34
4.3.3 רמת הביטוי של הגן לארומאטז בתאי 3T3-L1, בשחלה של עברה ובבלוטת חלב של עכברה....... 35

4.4 בחינת השפעת הטיפול במדיום מותנה והטיפול בפרולקטין על רמת הביטוי של חלבון החלב β-casein ושל הקולטנים לאסטרוגן בתאי HC11 - ניסוי מקדים.. 36
4.4.1 מבנה הניסוי המקדים במדיום המותנה.. 36
4.4.2 היחס בין רמת הביטוי של הגנים ל β- casein, ER α, ER β לבין הגן β- actin בתאי HC11 (ערכי Ct ratio).. 37
4.4.3 רמת הביטוי של הגן β- casein 38
4.4.4 רמת הביטוי של הגן ER α.. 39

4.5 השפעת פרולקטין על יחסי הגומלין בין תאי האפיתל של בלוטת חלב לבין תאי שומן על רמת הביטוי של חלבון החלב β- casein ושל הקולטנים לאסטרוגן.. 40
4.5.1 היחס בין רמת הביטוי של הגנים ל β- casein, ER α, ER β לבין הגן β- actin בתאי HC11 (ערכי Ct ratio).. 40
4.5.2 רמת הביטוי של הגן β- casein בתאי HC11 שטופלו במדיום מותנה................................ 41
4.5.3 רמת הביטוי של הגן ER α בתאי HC11 שטופלו במדיום מותנה..................................... 42
4.5.4 רמת הביטוי של הגן ER β בתאי HC11 שטופלו במדיום מותנה..................................... 42

4.6 השפעת ההורמונים אסטרוגן ופרולקטין על רמת הביטוי של הגן לחלבון החלב β-casein והגנים לקולטנים של אסטרוגן.. 43
4.6.1 היחס בין רמת הביטוי של הגן ל β-casein לבין הגן β-actin בתאי HC11 (ערכי Ct ratio). 43
4.6.2 רמת הביטוי של הגן β-casein 44
4.6.3 היחס בין רמת הביטוי של הגן ל ER α לבין הגן β- actin בתאי HC11 (ערכי Ct ratio).............. 45
4.6.4 רמת הביטוי של הגן ER α.. 45
4.6.5 היחס בין רמת הביטוי של הגן ל ER β לבין הגן β-actin בתאי HC11 (ערכי Ct ratio), ערכים ממוצעים של שני טיפולי הפרולקטין (0,1µg/ml).. 46
4.6.6 רמת הביטוי של הגן ER β ערכים ממוצעים של שני טיפולי הפרולקטין.............................. 47

4.7 תוצאות Western Blot לביטוי החלבונים ER α ו ER β.. 48
4.7.1 ביטוי החלבון ל ER α בתאי HC11.. 48
4.7.2 ביטוי החלבון ל ERβ בתאי HC11... 49

5. דיון 50

5.1 השפעת הפרולקטין על תאי בלוטת החלב ותאי השומן... 51

5.2 יחסי הגומלין בין רקמת האפיתל לרקמת השומן.. 53

5.3 השפעת אסטרוגן ופרולקטין על ביטויהקולטנים של אסטרוגן בתאי האפיתל............................. 54

6. רשימת ספרות 56

תקציר

במשך התפתחותה של בלוטת החלב רקמת האפיתל נמצאת בסביבה של רקמת חיבור ורקמת שומן. היום ידוע כי רקמת השומן של בלוטת החלב אינה רק רקמה תומכת אלא גם רקמה חיונית להתפתחותה התקינה של בלוטת החלב ורקמה מפרישת הורמונים . בשנים האחרונות נחקרים יחסי הגומלין בין רקמת השומן לבין רקמת האפיתל בתאים נורמליים , בתאים סרטניים ובשלבים שונים של התפתחות הבלוטה. עבודות שבחנו את יחסי הגומלין בין שתי הרקמות בתקופת הלקטציה הראו כי נוכחותה של רקמת השומן השפיעה על ביטוי חלבוני החלב והצטברותם בבלוטה , וכן על הצטברותן של בועיות שומן בתאי האפיתל . השפעה זו של רקמת השומן יכולה להוות גורם חשוב בוויסות כמות והרכב החלב. בנוסף מחקרים אלו הראו כי רקמת השומן בבלוטת החלב מפרישה חומרים המשפיעים באופן פראקריני על רקמת האפיתל.

אסטרוגן מיוצר ומופרש בעיקר בשחלה , עם זאת בשנים האחרונות עבודות שונות הראו כי במינים שונים, רקמות שומניות יכולות לייצר ולהפריש אסטרוגן . תפקידו של אסטרוגן בזמן הלקטציה אינו ברור ומשתנה בין מינים שונים . מסקנות מחקר שנערך במעבדתנו לאחרונה הראו כי לאסטרוגן יש תפקיד בוויסות הלקטציה בעטין שלחיות המשק, וכי לרקמת העטין יש את היכולת לייצר אסטרוגן באופן מקומי בהשפעת פרולקטין . בעקבות ממצאים אלו השערת המחקר שלנו הייתה כי בעקבות גירוי של פרולקטין רקמת השומן מפרישה הורמונים שונים וביניהם אסטרוגן. האסטרוגן המופרש מרקמת השומן והפרולקטין גורמים לשינוי בביטוי של חלבוני החלב ושל הקולטנים לאסטרוגן בתאי האפיתל.

ההשערה נבחנה בשני קווי תאים עכבריים , תאי אפיתל של בלוטת החלב (HC11) ותאים פרה-אדיפוציטים (3T3-L1). מודל זה הועמד על מנת לבודד את ההשפעה של פרולקטין על תאי השומן בנפרד ועל תאי האפיתל בנפרד , ולאחר מכן לבדוק את השפעת יחסי הגומלין . בשלב הראשון נבחנה ההשפעה של פרולקטין על כל קו תאים בנפרד . בשלב השני נבדקה ההשפעה של יחסי הגומלין בין שני סוגי תאים אלה בהשפעת פרולקטין עלי ידי השימוש במדיום מותנה. בשלב השלישי נבחנה ההשפעה של פרולקטין ואסטרוגן על תאי האפיתל . בכל שלב נבדקה רמת הביטוי של חלבון החלב β-casein ורמת הביטוי של הקולטנים לאסטרוגן.

תוצאות המחקר הראו כי פרולקטין אכן יכול לשנות את רמות הביטוי של הקולטנים לאסטרוגן, רמות עולות של פרולקטין העלו את רמת הביטוי של הגנים לשני הקולטנים לאסטרוגן ER α ו ER β. לעומת זאת כאשר נבחנה ההשפעה של אסטרוגן ופרולקטין ביחד על רמות הביטוי של הקולטנים מצאנו כי אסטרוגן לבד העלה את רמת הביטוי של שני הקולטנים שלו אך תוספת של פרולקטין העלתה את רמת הביטוי של ER α בלבד. רמת

הביטוי של חלבון החלב β-casein לא הושפעה מרמות האסטרוגן עם כי ניתן היה לראות מגמת עליה ברמת הביטוי של הגן כתלות בריכוזי האסטרוגן , לעומת זאת , תוספת של פרולקטין למדיום העלתה את רמ ת הביטוי של גן זה . שני הקולטנים לאסטרוגן מבוטאים בבלוטת החלב של עכברה בזמן הלקטציה , אך מחקרים שונים מצביעים על השפעות שונות של אסטרוגן על הקולטנים שלו בתקופה זו . בנוסף יש מחקרים המצביעים על כך שתפקיד הקולטנים אינו לתווך את פעילות האסטרוגן אלא לפעול בשיתוף עם גורמי השיעתוק העולים בעקבות הגירוי של הפרולקטין ובכך להגביר את הביטוי של חלבוני החלב.

בתאי השומן רמות עולות של פרולקטין גרמו לעליה ברמת הביטוי של הגן לאדיפונקטין , גן המבוטא בתאי שומן בוגרים ומשמש כסמן להתמיינות תאי שומן . תוצאה זו יכולה להעיד על מעורבות של פרולקטין בהתמיינות תאי שומן , וביניהם תאי שומן בבלוטת החלב . השערת המחקר הייתה כי בעקבות גירוי של פרולקטין תאי השומן יפרישו אסטרוגן. השערה זו נבחנה על ידי בדיקת רמות ביטוי של הגן לארומאטז , אנזים מפתח בייצור האסטרוגן , אך בניגוד להשערתנו לא מצאנו ביטוי של ה גן לארומאטז בתאי השומן . בנוסף בדקנו ביטוי של גן זה בתאי אפיתל שהופקו מרקמת בלוטת החלב אך גם שם לא מצאנו ביטוי של גן זה.

יחסי הגומלין בין שני סוגי התאים נבדקו במחקר זה על ידי שימוש במדיום מותנה . המדיום המותנה הוא מדיום שבו הודגרו תאי האפיתל לאחר שנאסף מתאי השומן שטופלו בטיפולים השונים. כאשר נבחנה השפעתו של המדיום המותנה ביחס למדיום רגיל , הראנו כי טיפול במדיום מותנה העלה את רמת הביטוי של ER α ושל חלבון החלב β casein בתאי האפיתל, אך לא השפיע על רמות הביטוי של ER β. בשלב השני ביקשנו לבדוק את השפעתו של מדיום מותנה שנאסף מתאי שומן שטופלו בריכוזים עולים של פרולקטין . במקרה זה לא נראה שינוי ברמת הביטוי של הקולטנים לאסטרוגן ושל חלבון החלב β casein, בין סוגי הטיפולים השונים בתאי האפיתל שטופלו במדיום המותנה . תוצאות אלה מראות כי תאי השומן מפרישים חומרים מסיסים למדיום אשר יכולים להשפיע על תאי האפיתל, מעורבותו של הפרולקטין בתהליך זה והשפעתו על תאי השומן לא ברורה.

נראה כי פרולקטין משפיע על התמיינות תאי השומן , אך אסטרוגן אינו אחד מהגורמים המסיסים המופרשים מתאי השומן בעכברים בעקבו ת הגירוי של פרולקטין . לעומת זאת פרולקטין משפיע על רמת הביטוי של הקולטנים לאסטרוגן בתאי האפיתל . גורמים נוספים אשר משפיעים על רמת הביטוי של הקולטנים לאסטרוגן ושל חלבוני החלב לא נבדקו במחקר זה, ומחקר נוסף יידרש על מנת לקבוע בוודאות את קשרי הגומלין המתקיימים ב ין פרולקטין, אסטרוגן והקולטנים לאסטרוגן בבלוטת החלב, ואת מעורבתם של תאי האפיתל ותאי השומן בקשרי גומלין אלה.

1. רשימת קיצורים

AF1 - Activation Function 1
AF2 - Activation Function 2
A.U. - Arbitrary units
BSA - Bovine Serum Albumin
C.M. - Conditing Medium
Ct - Cycle threshold
DBD - DNA Binding Domain
DDW - Double Distilled Water
DEPC - diethylpyrocarbonate
DMEM - Dolbecco’s Modified Eagle’s Medium
E – Estrogen
EDTA - EthylenediamineTetra-acetic Acid
EGF - epidermal growth factor
ER α – Estrogen receptor alpha
ER β – Estrogen receptor beta
ERE - estrogen response elements
FCS - Foetal Calf Serum
F.C. - Fold of Change
g - gram
HGF - Hepatocyte growth factor
IGF-1- insulin like growth factor-1
JAK2 - Janus kinase 2
kDa - kilo Dalton
K/O – knockout
LBD - Lignad Binding Domain
L - Liter
M –Molar
mM – miliMolar
µM - microMolar
M.G. – Mammary Gland
µg – micro gram
µl - microliter
ml – milliliter
mg – milligram
nm – nanometer
ng - nanogram
PBS - Phosphate Buffer Saline
PCR - Polymerase Chain Reaction
Prl – Prolactin
SDS - Sodium Dodecyl Sulfate
TBS-T - Tris Buffer Saline with Tween
STAT - signal transducer and activator of transcription
TBE – Tris Borate EDTA
TEB - Terminal End Buds

2. מבוא

2.1 התפתחות בלוטת החלב.

2.1.1 שלביה השונים של התפתחות בלוטת החלב.

מרבית התפתחותה של בלוטת החלב מתרחשת לאחר השלב העוברי, התפתחות זו מתרחשת בהתאם לפרופיל ההורמונאלי של אותו אורגניזם. שתי רקמות עיקריות מרכיבות את בלוטת החלב, הפרנכימה המורכבת מתאי האפיתל הבונים את צינוריות החלב ומייצרים את החלב, והסטרומה המורכבת מרקמת השומן ורקמת החיבור (Fat Pad). הבלוטה מתפתחת בארבע שלבים עיקריים, בסוף השלב העוברי קיים מבנה בסיסי של צינוריות החלב שממוקם בתוך רקמת השומן המרכיבה את מרבית הבלוטה. השלב הראשון הוא שלב גדילת הבלוטה. עד לבגרות המינית הבלוטה מתפתחת בהתאם להתפתחות הגוף (התפתחות איזומטרית), בבגרות המינית מתרחשת גדילה אינטנסיבית של הבלוטה (התפתחות אלומטרית). בשלב זה נוצרות, מתארכות ומסתעפות צינוריות החלב (ductal morphogenesis), עד למילוי של רקמת השומן בצינוריות. במשך מחזורי הביוץ ממשיכה גדילת הצינוריות והסתעפותן. גדילת הצינוריות מתרחשת מתוך מבנים מיוחדים הנמצאים בקצה הצינורית. מבנים אלה נקראים Terminal End Buds (TEB) והם בעלי קצב חלוקה גבוה המאפשר להם חדירה אל תוך רקמת השומן. שלב הגדילה קורה בהשפעתם של ההורמונים אסטרוגן ופרוגסטרון המופרשים מהשחלה. השלב השני, הוא שלב התמיינות הבלוטה, בשלב זה נוצרות ומתפתחות נאדיות החלב (alveolar morphogenesis), והוא מתרחש במשך ההיריון וקצת לאחריו. שלב זה מתרחש בעקבות הפרשתם של ההורמונים: פרולקטין, הורמוני השילייה ופרוגסטרון. השלב השלישי הוא שלב הלקטציה (lactation), בשלב זה נוצר החלב ומופרש, והוא מתרחש לאחר הלידה/המלטה. בשלב זה כמות תאי השומן הבוגרים בבלוטה היא הנמוכה ביותר. השלב הרביעי הוא התנוונות (involution), הוא מתרחש לאחר גמילת הצאצאים ובו מתנוונת בלוטת החלב וחוזרת למצבה הקודם לפני ההיריון. בשלב זה תאי האפיתל עוברים אפופטוזיס ואת מקומם תופסים בחזרה תאי השומן (Hennighausen and Robinson, 2005; Hovey et al., 2002; Lamote et al., 2004; Neville et al., 2002)

2.1.2 תקופת הלקטציה.

תאי האפיתל בבלוטת החלב עוברים התמיינות במהלך ההיריון. תהליך זה מחולק לשני שלבים עיקריים אשר בסופם הבלוטה נמצאת בתהליך הפרשת חלב מלא, לקטציה. השלב הראשון מתרחש כבר באמצע ההיריון ובו מתחילים להתבטא רוב הגנים הקשורים בתהליך ייצור החלב. בעכברה ניתן לזהות שלב זה גם באופן מורפולוגי, על ידי התפתחות של בועיות שומן קטנות בתוך הציטופלסמה של תאי האפיתל. ההורמונים המשתתפים בשלב זה הם פרוגסטרון פרולקטין ו/או הורמון השילייה. בשלב זה פרוגסטרון מעכב הפרשה פעילה של

חלב. השלב השני מתרחש סביב ההמלטה , הבלוטה עוברת שלב נוסף בהתמיינות שמוביל בסופו של דבר להפרשת הקולסטרום ואחר כך הפרשת החלב . שלב זה מאופיין בעלי ה נוספת בביטוי של הגנים לחלבוני החלב , סגירה של tight junctions בין תאי הנאדיות ותזוזה של טיפות שומנים ציטופלסמתיות ומיצלות קזאין לעבר החלל של הנאדיות. ירידה של רמת הפרוגסטרון ועליה של רמת הפרולקטין חיונית על מנת לאפשר התרחשות של השלב השני. כאשר מתחילה היניקה ישנה עליה נוספת ברמת הביטוי של רוב הגנים הקשורים בתהליך הפרשת החלב ומתרחשת התחלקות נוספת של תאים אשר מרחיבה את שטח הפנים של נאדיות החלב. (Neville et al., 2002).

2.2 פרולקטין

2.2.1 פרולקטין, הקולטן לפרולקטין ומעבר הסיגנל של הפרולקטין.

במהלך התפתחותה של בלוטת החלב משתתפים הורמ ונים רבים . עם זאת , ההורמון הפפטידי פרולקטין הוא השחקן הראשי המוביל את התפתחותה של בלוטת החלב לבלוטה מייצרת חלב בזמן ההיריון ואחריו . פרולקטין הוא הורמון במשקל 23kDa המיוצר בתאים הלקטוטרופיים בהיפופיזה (בלוטת יותרת המוח), בנוסף להיפופיזה הפרולקטין מיוצר במקומות נוספים בגוף כגון תאי האפיתל של בלוטת החלב , בשלייה, ברחם, במוח ובתאי המערכת החיסונית. פעילות הפרולקטין מתווכת על יד הקולטן לפרולקטין , קולטן זה הוא קולטן ממשפחת Class I cytokine receptor superfamily. קיימים מספר סוגים שונים של הקולטן לפרולקטין אשר נבדלים באורך השייר הציטופלסמתי שלהם . הביטוי של הקולטנים השונים משתנה בנקודות שונות במשך ההתפתחות של בלוטת החלב, ובכך הם אחראים על פעילות שונה של הפרולקטין בכל שלב התפתחותי (Oakes et al., 2008). העברת הסיגנל של הפרולקטין מתרחשת בכמה מסלולים , אך העיקרי והחשוב ביותר הוא מסלול הJAK/STAT. כל מולקולת פרולקטין מכילה שני אתרי קשירה לקולטן . בשלב הראשון פרולקטין נקשר לקולטן באתר הקשירה הראשון. יצירת החיבור הראשוני של הורמון - קולטן הוא דרישת קדם לקשירת האתר השני של אותו פרולקטין לקולטן נוסף. לשייר הציטופלסמתי של הפרולקטין תפקיד חשוב בהעברת הסיגנל , החלק הזה של הקולטן הקרוב לממברנה נמצא באופן תמידי באסוציאציה עם Tyrosine kinase שנקרא Janus kinase 2 (JAK2). אקטיבציה של JAK2 נעשית על ידי פוספורילציה נגדית עם JAK2 נוסף, בעקבות הדימרזציה שהתרחשה אחרי קשירת הקולטן לליג אנד. בהמשך JAK2 שעבר פוספורילציה, גורם לפוספורילציה של טירוזינים לאורך השייר הציטופלסמתי של הקולטן . פוספורילציה זו חשובה, מכיוון שהיא משמ שת עוגן לקשירה של חלבונים בעלי אתר SH2. בכל סוגי הקולטנים לפרולקטין מתרחשת הפוספורילציה של JAK2, אך הפוספורילציה לאורך השייר הציטופלסמטי מתרחשת רק בקולטן מהסוג הארוך . משפחת חלבוני ה STAT (signal transducer and activator of transcription) ידועה כמתווכת סיגנל של קולטנים

ציטוקינים. משפחת חלבוני הSTAT מכילה 8 חלבונים, ארבעה מתוכם STAT3 , STAT1, STAT5a וSTAT5b ידועים כגורמים מתווכים לק ולטן לפר ולקטין. בחלבוני הSTAT קיים אתר קשירה הנקרא SH2 שבאמצעותו הם נקשרים לשייר של הקולטן שעבר פוספורילציה. בזמן עגינתם על הקולטן הם עוברים פוספורילציה על ידי JAK2. לאחר שחלבון STAT עבר פוספורילציה הוא מתנתק מהקולטן ומתחבר לחלבון STAT אחר שעבר פוספורילציה. בשלב האחרון דימר של חלבוני STAT עובר טרנסלוקציה לגרעין ומאקטב שם פרומוטורים שונים של הגנים הרלוונטיים. מבין חלבוני ה STAT הידועים כמתווכים את פעילותו של פרולקטין, STAT5 הוא המזוהה ביותר עם הקולטן הארוך של הפרולקטין (Freeman et al., 2000).

2.2.2 חשיבות הפרולקטין בהתפתחות בלוטת החלב.

חשיבות הפרולקטין להתפתחות בלוטת החלב נבחנה במחקרים שנעשו בעכברים knockout (K/O) לפרולקטין ולקולטן לפרולקטין . התפתחות בלוטת החלב בשל ב האיזומטרי (עד ההתבגרות) לא נפגעת בעכברים בהם קיים K/O לפרולקטין או לקולטן לפרולקטין . בנוסף בעכברים אלו נוצרו Terminal End Buds (TEB) נורמליים אשר אפשרו את הפרוליפרציה של תאי האפיתל בהתבגרות ובכך א ת יצירת צינוריות החלב הארכתן והסתעפותן. מחקרים אלה הובילו למסקנה כי התארכות והסתעפות צינוריות החלב מתרחשת תחת בקרה של גורמים רבים וביניהם הורמוני השחלה, אך נראה כי פרולקטין אינו משמעותי בתהליך זה . לעומת זאת שני תהליכים משמעותיים בהתפתחות בלוטת החלב , המובילים לייצור חלב נפגעו בעכברים בהם קיים K/O לפרולקטין ולקולטן לפרולקטין. הראשון הוא הגדילה הצידית (side branching) של צינוריות החלב והשני הוא תהליך יצירת נאדיות החלב שהתבטא בשני היבטים, פגיעה ביצירת alveolar buds, כאשר הTEB מגיעים לקצה של רקמת השומן הם מתמיינים לתאים שלאחר מכן ייצרו את נאדיות החלב (alveolar buds), וכתוצאה מכך פגיעה ביצירת נאדיות חלב ממ וינות. שני תהליכים אלה תלויים בפרולקטין באופן שונה . הגדילה הצידית של צינוריות החלב תלויה בפרוגסטרון, ולכן הפרולקטין משפיעה באופן עקיף על תהליך זה . הפרולקטין מאפשר את תחזוקת הגוף הצהוב האחרא י על הפרשת הפרוגסטרון. בהעדר פרולקטין אין הפרשה של פרוגסטרון ולכן לא מתרחשת הגדילה הצידית של צינוריות החלב . נאדיות החלב, לעומת זאת, תלויות באופן ישיר בפרולקטין . בעכברות בהם היה K/O לקולטן של הפרולקטין בלבד לא התפתחו נאדיות חלב המסוגלות להפריש חלב. בעכברות בהן היה K/O לפרולקטין בלבד כן נצפתה התפתחות של נאדיות חלב אבל הייתה ירידה ניכרת בפרוליפרציה לעומת קבוצת הביק ורת, בזמן ההמלטה . ההתפתחות הזאת של נאדיות חלב יכולה להיות מוסברת על ידי הימצאותם של הורמנים נוספים היכולים לאקטב את הקולטן לפרולקטין כגון הורמו ני השיל ייה, אך הורמ ונים אלה אינם מספיקים להביא את בלוטת החלב להתפתחות האופטימאלית (Brisken et al., 1999; Oakes et al., 2008)

2.2.3 פרולקטין ורקמת השומן

הפרולקטין מתפקד באורגניזם גם כהורמון מטבולי, וככזה הוא משפיע על רקמת השומן בגוף באופן יומיומי וכן בזמן הלקטציה. בתקופת הלקטציה חלים שינויים ברקמת השומן, חלק משינויים אלה קשורים בפרולקטין. בתקופה זו הפרולקטין מתנהג כחיישן פיזיולוגי המגיב לדרישה לייצור חלב ע"י ידי ניתוב הנוטריינטים לייצור החלב ולא לרקמת השומן. ברקמת השומן בבלוטת החלב פרולקטין מווסת בין אנזימים עיקריים הפועלים בייצור שומנים, ובכך מגביר את הייצור של שומנים בבלוטת החלב (Ben-Jonathan et al., 2006). כיום ידוע כי הקולטן לפרולקטין מצוי ברקמת השומן בעכברים, מעבר לכך התגלה כי הביטוי של הקולטן הארוך לפרולקטין, עולה בעכברות בזמן הלקטציה ביחס לעכברות בהיריון ולעכברות בתולות (Ling et al., 2000). במחקרים שנעשו *in vitro* בקו תאים פרה אדיפוציטים מסוג 3T3-L1 ו NIH-3T3 נמצא כי רמת הביטוי של הקולטן לפרולקטין עולה בזמן התמיינות התאים. בנוסף ידוע כי בתאים אלה פרולקטין מעלה את רמת הביטוי של שני גורמי שעתוק עיקריים באדיפוגנזה (Nanbu-Wakao et al., 2000). ממצאים אלה מעידים על כך שהשפעת הפרולקטין על בלוטת החלב מתבצעת גם דרך רקמת השומן בבלוטה.

2.3 רקמת השומן בבלוטת החלב.

2.3.1 חשיבותה של רקמת השומן בבלוטת החלב.

בבלוטת החלב הרקמה התומכת (הסטרומה) נקראת Mammary fat pad והיא מורכבת מרקמת שומן ו מרקמת חיבור קולגנית. רקמה זו מאפשרת את המעבר של כלי דם וכלי לימפה, היא מספקת מטריקס תלת ממדי להתפתחות של תאי האפיתל ויצירת צינוריות החלב וכן משמשת כמצע להתפתחות ה Basement membrane. היום ידוע כי רקמה זו אינה רקמה תומכת בלבד, ובנוסף היא משמשת כאזור מקומי לפעילות הורמונאלית וסינתזה של גורמי גדילה. במהלך התפתחות בלוטת החלב כמות השומנים ברקמת השומן משתנה בהתאם לשלב ההתפתחותי, משקל רקמת השומן ללא אפיתל עולה במקביל להתפתחות הבלוטה בשלב ההתבגרות וההיריון. לעומת זאת בשלב הלקטציה משקל הרקמה השומנית יורד בעקבות ניוד של שומנים. השינויים האלה מעידים על כך שרקמת השומן אינה משמשת רק כמצע גידול והתפתחות לרקמת האפיתל אלא גם משמשת כמאגר שומנים עבור הבלוטה (Hovey et al., 1999).

מעבר לחשיבות רקמת השומן כמקור לשומנים, במשך שני העשורים האחרונים הולכת ומתבהרת חשיבותה של הרקמה כרקמה מפרישת הורמונים. בין ההורמונים הידועים כמופרשים מרקמת השומן בגוף מצויים הורמונים פפטידיים כגון לפטין אדיפיסין אדיפונקטין hepatocyte growth factor (HGF), ציטוקינים שונים וביניהם פרולקטין, וכן הורמונים סטרואידים כגון אסטרוגן. בדומה לרקמת השומן בגוף נמצא כי רקמת השומן בבלוטות החלב גם היא מפרישה הורמונים וגורמים מסיסים אחרים החיוניים להתפתחותה התקינה של

בלוטת החלב בשלביה השונים (Brandebourg et al., 2007; Kershaw and Flier, 2004; Landskroner-Eiger et al., 2010; Siiteri, 1987).

2.3.2 יחסי הגומלין ביו רקמת האפיתל לרקמת השומן בבלוטת החלב.

במשך התפתחותה של בלוטת החלב, תאי האפיתל נמצאים בסביבתה התמידית של רקמת השומן. בשנים האחרונות הולכת ומתבהרת חשיבות יחסי הגומלין הקיימת בין שתי רקמות אלה. מחקרים שנעשו על מנת לבחון את תפקידה של רקמת השומן בהתפתחות הבלוטה מעידים על כך כי רקמת השומן חיונית להתפתחות המבנה האפיתלי אלי של הבלוטה. כאשר השתילו רקמת אפיתל מבלוטת החלב ברקמות שונות בגוף כגון רקמות שומן (לבן וחום), החלל הפריטניאלי או בעין, רקמת האפיתל הצליחה להתפתח רק ברקמות השומן. ממצאים אלה מעידים על כך כי לרקמת האפיתל של בלוטת החלב יש דרישה הכרחית לסביבה של רקמת חיבור שומנית על מנת לפתח את המבנה הצינורי שלה. ממצא חשוב נוסף שנלמד מניסוי של השתלת רקמת אפיתל ברקמת שומן מעיד על כך שמספר תאי האפיתל בבלוטת החלב מוכתב מכמות רקמת השומן ב- mammary fat pad. בהתבסס על כך שכמות החלב מוכתבת ממספר תאי האפיתל, נפח רקמת השומן יכול להיות גורם משמעותי הקובע את כמות החלב המיוצר (Hovey et al., 1999). בנוסף למחקרים שנעשו בעכברים *in vivo,* בשנים האחרונות חוקרים שונים פיתחו שיטות *in vitro* על מנת לחקור את יחסי הגומלין בין רקמת האפיתל לרקמת הסטרומה (Fat pad) בבלוטת החלב. במחקר שנעשה על ידי Zangani וחבריו, פותח מודל *in vitro* בחולדות כדי לחקור לראשונה את יחסי הגומלין בין רקמת האפיתל בבלוטת החלב לבין רקמת השומן של בלוטת החלב באופן ספציפי. מחקר זה ניסה לדמות מצב של היריון ולקטציה ולכן רקמת האפיתל טופלה בהורמונים לקטוגנים. הם הראו כי כאשר רקמת האפיתל גדלה בנוכחות של תאי השומן נצפתה עליה משמעותית בצבירת הקזאין בתאי האפיתל ובצבירת השומנים. בנוסף הם הראו כי נוכחותה של רקמת השומן כיוונה את רקמת האפיתל להתמיינות ויצירת יותר מבנים אלבאולרים, ולא לכיוון של פרוליפרציה. מחקר זה משמעותי מכיוון שהוא מראה לראשונה כי רקמת השומן של בלוטת החלב מפרישה חומרים מסיסים המשפעים על רקמת האפיתל (Zangani et al., 1999). במחקר נוסף שערכה קבוצה זו נבחנה ההשפעה של פיברובלסטים מבלוטת החלב (אשר מהווים חלק מה mammary fat pad) על רקמת האפיתל. בדומה למחקר הקודם גם כאן נוכחותם של הפיברובלסטים העלתה את כמות תאי האפיתל, את מספר המבנים האלבאולריים שנוצרו ואת מצבורי הקזאין בתאים. חשוב לבחון את יחסי הגומלין בין תאי האפיתל לבין הפיברובלסטים מכיוון שהם יותר קרובים אל רקמת האפיתל מאשר רקמת השומן (Darcy et al., 2000). מחקר נוסף שנערך לאחרונה בחן את השפעתה של רקמת השומן על התפתחות רקמת האפיתל בבלוטת החלב, מחקר זה נעשה במודל תלת מימדי. בדומה למחקרים הקודמים מחקר זה מצא כי רקמת השומן משפיעה על שגשוג תאי

האפיתל, אך במחקר זה לא נמצאה השפעה של רקמת השומן על ההתמיינות הלקטוגנית. בנוסף נמצא במחקר זה כי הסתעפות צינוריות החלב מושפעת מנוכחותה של רקמת השומן, דבר היכול להעיד כי הסתעפות צינוריות החלב מושפעת מגורמים פאראקריניים (Pavlovich et al., 2010)

2.4 אסטרוגן

2.4.1 אסטרוגן והקולטנים לאסטרוגן.

ההורמון הסטרואידי אסטרוגן הוא מיטוגן חזק הקשור בו ויסות של גדילה, התמיינות ותפקוד של מגוון רקמות שונות בגוף. פעילות האסטרוגן מתווכת על ידי שני קולטנים: Estrogen Receptor α (ER α) ו Estrogen Receptor β (ER β). שני הקולטנים שייכים למשפחת הקולטנים הגרעיניים (Steroid Hormone Super Family of Nuclear Receptors). שני הקולטנים מחולקים לשלושה אזורים עיקריים: האזור הטרמינלי, אזור שנקשר ל DNA ה- DNA Binding Domain (DBD), ואזור קושר ליגנד Lignad Binding Domain (LBD). האזור הטרמינלי הוא אזור שאינו תלוי בליגנד והוא קשור ביצירת קשר של חלבון- חלבון ואקטיבציה של שעתוק של גן מטרה. אזור זה נבדל בין שני סוגי הרצפטורים ובכך משתנה השפעת האסטרוגן בתא כאשר הוא נקשר לאחד משני הרצפטורים. בנוסף, אזור זה מקודד ל(AF1) Activation Function 1, מבנה חשוב בהעברת הסיגנל של האסטרוגן. האזור שנקשר לDNA, DBD, מכיל שני מבנים של zinc fingers. מבנים אלה חיוניים להצמדות שני קולטנים יחד (דימריזציה), ולקשירה של הקולטנים לרצפים ספציפיים על גבי ה DNA. אזור זה כמעט הומולוגי לחלוטין בין שני הרצפטורים. האזור שקושר את הליגנד, LBD, קושר את הליגאנד ובנוסף מתווך את הצמדות הקולטנים, את מעבר הטרנסלוקציה לגרעין וביטוי של גן המטרה. אזור זה מקודד למבנה נוסף החשוב בהעברת הסיגנל של האסטרוגן, שנקרא Activation Function 2 (AF2). בין שני הרצפטורים ההומולוגיה באזור זה גבוהה מאד, ולכן הם קושרים ליגאנדים שונים בזיקה דומה (Hall et al., 2001; Nilsson et al., 2001).
מסלולים שונים בהם מועבר הסיגנל של אסטרוגן על ידי הקולטנים שלו, ידועים כיום. במסלול הקלאסי, קשירת הליגנד לקולטן משנה את המבנה המרחבי של הקולטן. לאחר מכן שני קולטנים עוברים צימוד (דימריזציה). זוג קולטנים עובר טרנסלוקציה לגרעין שם הוא מתחבר ל(ERE) estrogen response elements שהם רצפים ספציפיים, פלינדרומים הפוכים. לאחר הקשירה לDNA גן המטרה עובר שעתוק. מבנה של קולטן קשור בליגנד יכול להפעיל העברת סיגנל גם דרך גורמי שעתוק אחרים כמו Fos/Jun או SP-1, ובכך להפעיל שעתוק של גנים אחרים שבפרומוטור שלהם אין EREs (Heldring et al., 2007; Marino et al., 2006). במסלולים האחרים הקולטנים לאסטרוגן יכולים להפעיל שעתוק גנים ללא קשירה ישירה של ליגנד לקולטן. במסלולים אלה, גורמי גדילה פוליפפטידים כגון epidermal growth factor (EGF) ו insulin like growth factor-1 (IGF-1) מאקטבים את הקולטנים

לאסטרוגן ומגבירים את הביטוי של גנים התלויים בהם . התהליך בו מתרחשת פעילות זאת עוד לא ברור לחלוטין אך נראה כי שינוי במצב הפוספורילציה של הקולטנים לאסטרוגן על ידי קינאזות בתא , הנגרם בעקבות פעילות גורמי הגדילה , קשור בהפעלה של הקולטנ ים ללא תלות בליגנד. בנוסף היום ידוע כי כאשר מבוטאים שני סוגי הקולטנים, ER α ו ER β באותו התא ER β יכול להיות אנטגוניסט לER α. נראה כי ER β מעכב את פעילותו של ER α על ידי שינוי בביטוי של גורמי שעתוק בתא ועליה בפירוק של הקולטן עצמו (Hall et al., 2001; Heldring et al., 2007).

2.4.2 חשיבות האסטרוגן להתפתחות בלוטת החלב.

האסטרוגן הוא אחד ההורמונים המרכזיים בהתפתחות בלוטת החלב , בזמן הבגרות המינית אסטרוגן הוא אחד הגורמים הראשונים המתחילים את התפתחות הבלוטה , ביחד עם פרוגסטרון הוא גורם לתחילת גדילת צינוריות החלב. הקולטן העיקרי לאסטרוגן בזמן זה הוא ERα, מחקרים שנעשו בעכברות בעלי קולטן פגוע או לא קיים (K/O) הראו כי עכברות אלה היו עקרות וכי התפתחות והארכה של צינוריות החלב תלויה לחלוטין בקולטן זה. לעומת זאת כאשר נבחנה התפתחות בלוטת החלב בזמן זה, בעכברות עם חוסר בקולטן ל ER β לא נצפה שינוי במורפולוגיה של הבלוטה (Mallepell et al., 2006; Saji et al., 2000).

בזמן ההיריון אסטרוגן מופרש מהגוף הצהוב לאורך כל ההיריון , ורמתו עולה לקראת סוף ההיריון. במשך ההיריון אסטרוגן חשוב להתפתחות נאדיות החלב (lobuloalveolar). הקולטן העיקרי לאסטרוגן בזמן זה הוא ER β, מחקרים בהם לקחו רקמת אפיתל מעכברות בהן היה חסר הקולטן ל ER α והשתילו אותה ברקמת fat pad של עכברה *wt*, ראו כי ייצור של חלבוני החלב לא נפגע, מכאן ניתן להסיק כי השעתוק המופעל בעקבות קשירה של אסטרוגן לקולטן ER α אינו הכרחי ליצירת גירוי לקטוגני . בעכברות בהם היה חוסר של הקולטן לER β ראו כי חלל נאדיות החלב וצינוריות החלב היה גדול יותר , כמות האפיתל המפריש הייתה קטנה יותר והייתה ירידה בכמות הנאדיות עבור יחידת שטח. מכאן הסיקו כי הקולטן לאסטרוגן מסוג ER β חיוני להמשך התפתחות הבלוטה לאחר ההתבגרות בזמן ההיריון והלקטציה וכי הסיגנל המועבר דרכו חיוני להתפתחות תקינה של נאדיות החלב והאפיתל המפריש (Brisken and Rajaram, 2006; Forster et al., 2002; Saji et al., 2000). השפעת האסטרוגן על התפתחות הבלוטה מתרחשת גם על ידי תגובה הדדית עם הורמונים נוספים, לדוגמה, אסטרוגן משרה שיחרור הורמונים הגורמים לשחרור של הורמ וני התירואיד, וכן גורם להפרשת פרולקטין בהיפופיזה. בבלוטת החלב בעכברה, הוא מעלה את כמות הקולטנים לפרולקטין (Neville et al., 2002; Topper and Freeman, 1980; Weihua et al., 2003).

השפעתו של האסטרוגן ותפקידו בתקופת הלקטציה אינה ברורה, ומשתנה בין מינים שונים. רוב המחקרים מצביעים על כך שבלוטת החלב אינה מגיבה לאסטרוגן בזמן הלקטציה , וכי האסטרוגן אף יכול לעכב את הלקטציה בכך שהוא גורם לפגיעה בהפרשת החלב . בנוסף בזמן הלקטציה רמות האסטרוגן בפלסמה נשארות נמוכות עד לגמילת הצאצאים. למרות זאת, בתקופה זו רוב תאי האפיתל מציגים את שני הקולטנים לאסטרוגן . ממצאים אלה מעידים על מורכבות תפקיד האסטרוגן והקולטנים שלו בזמן הלקטציה (Hatsumi and Yamamuro, 2006; Saji et al., 2000). לעומת זאת מחקרים מוקדמים שנעשו בחיות משק, פרות כבשים ועיזים מראים כי לקראת ההמלטה יש עליה ברמת האסטרוגן בווריד העטין לעומת רמתו בשאר הגוף . מחקרים אלה מצביעים על כך שאסטרוגן מופרש מהעטין וכי יכולה להיות לו חשיבות לתקופת הלקטציה (Maule Walker et al., 1983). בדומה למחקרים אלו , מחקר מאוחר יותר שנעשה בפרות הראה כי סביב ההמלטה עולה רמת האסטרוגן בווריד העטין לעומת רמתו בדם הפריפרי . מחקר זה אף מצא כי לרקמת העטין בתקופת הלקטציה יש יכולת לייצר אסטרוגן. שני ממצאים אלה מעידים על כך שרקמת העטין מייצרת אסטרוגן , ובנוסף מחקר זה מראה כי רמת האסטרוגן המופרשת מהעטין נמצאת בקורלציה עם רמות הפרולקטין סביב ההמלטה . מעבר לממצאים אלו מחקר זה הראה כי קיימת קורלציה בין רמת הפרשת האסטרוגן לבין פרות בעלות תנובת חלב גבוהה (Janowski et al., 2002). בדומה למחקר זה, במחקר שנעשה לאחרונה במעבדתנו נמצא כי בתרביות רקמה מעטין פרה עולה רמת הביטוי של חלבון החלב β- lactoglobulin כאשר התרביות גדלו בנוכחות של אסטרוגן , פרולקטין ולפטין במדיום , ביחס לתרביות שגדלו בנוכחות פרולקטין ולפטין בלבד . בנוסף בתרביות משותפות של רקמת עטין ותאי שומן שגדלו בנוכחות של ריכוזים עולים של פרולקטין במדיום נמצא כי רמת הביטוי של ארומטאז, אנזים מפתח בסינתזת האסטרוגן , עלתה ביחס לריכוזי הפרולקטין בתאי השומן אך לא ברקמת העטין. ממחקרים אלו עולה כי לאסטרוגן יש תפקיד בוויסות הלקטציה בעטין בחיות משק, וכי לרקמת העטין יש את היכולת לייצר אסטרוגן באופן מקומי בהשפעת פרולקטין (Feuermann et al., 2006).

2.4.3 אסטרוגן ופרולקטין בבלוטת החלב.

חשיבותם של פרולקטין ואסטרוגן בהתפתחות בלוטת החלב הובילה חוקרים רבים לבדוק האם קיים מנגנון בו הם פועלים יחד בהתפתחות הרגילה וכן בהתפתחות סרטנית וכן את השפעתם אחד על השני . ברמת הגוף ידוע כי בהיפופיזה אסטרוגן גורם לעליה בסינתזת הפרולקטין והפרשתו (Muldoon, 1986). בבלוטת החלב של עכברה , פרולקטין מעלה את הענות בלוטת החלב לאסטרוגן, ומעלה את רמת הביטוי של ER α (Arendt et al., 2009). ריצוף של הפרומוטורים לקולטנים לאסטרוגן בגוף הצהוב של חולדה הראה כי בשני הקולטנים רצפים שמזוהים עם גורם השעתוק STAT5 (STAT5 response elements),

המזוהה ביותר עם מפל האירועים שמופעל בעקבות קשירת פרולקטין לקולטן שלו. ממצא זה מראה כי פרולקטין יכול להיות מעורב בביטוי של הקולטנים לאסטרוגן ברמת השעתוק (Frasor and Gibori, 2003). בדומה לגוף הצהוב , בבלוטת החלב נמצא כי הקולטן לאסטרוגן יכול לפעול בשיתוף עם STAT5b, ולהשפיע על הפורמוטור של חלבון החלב β casein. שני הקולטנים לאסטרוגן יכולים לפעול בצורה זו אך נמצא כי ER β פועל בעוצמה חזקה יותר מאשר ER α (Bjornstrom et al., 2001). מחקרים אלה ונוספים מעידים על מנגנון בו אסטרוגן ופרולקטין פועלים יחד . מנגנון זה יכול להשפיע על התפתחות בלוטת החלב בשלביה השונים ובפרט בתקופת הלקטציה.

2.5 השערת המחקר:

רקמת השומן מפרישה הורמונים וגורמים מסיסים שונים המשפיעים על התפתחותה של בלוטת החלב בשלביה השונים. בזמן הלקטציה ההורמון המרכזי המשפיע על בלוטת החלב הוא הפרולקטין. הפרולקטין גורם לשינויים הן ברקמת האפיתל והן ברקמת השומן . בעקבות הגירוי של הפרולקטין רקמת השומן מפרישה הורמונים שונים וביניהם אסטרוגן . האסטרוגן המופרש מרקמת השומן והפרולקטין גורמים לשינוי בביטוי של חלבוני החלב ושל הקולטנים לאסטרוגן בתאי האפיתל.

ההשערה נבחנה בשני קווי תאים עכבריים , תאי אפיתל של בלוטת החלב (HC11) ותאי פרה-אדיפוציטים (3T3-L1). מודל זה הועמד על מנת לבודד את ההשפעה של פרולקטין על תאי השומן ב נפרד ועל תאי האפיתל בנפ רד, ואחר כך לבדוק את השפעת יחסי הגומלין . בשלב הראשון נבחנה ההשפעה של פרולקטין על כל קו תאים בנפרד . בשלב השני נבדקה ההשפעה של יחסי הגומלין בין שני סוגי תאים אלה בהשפעת פרולקטין . בשלב השלישי נבחנה ההשפעה של פרולקטין ואסטרוגן על תאי האפיתל. בכל שלב נבדקה רמת הביטוי של חלבון החלב β-casein ורמת הביטוי של הקולטנים לאסטרוגן.

3. שיטות וחומרים

3.1 חומרים

תאים: תאי HC11 ותאי 3T3-L1 נרכשו מחברת American Type Culture Collection (ATCC) Virginia USA.

מחברת בית העמק תעשיות ביולוגיות בע"מ, ישראל נרכשו החומרים הבאים:

DMEM:F12 (1:1) without L-Glutamine ,NUTRIENT MIXTURE F12 (HAM) , DMEM without L-glutamine ,L-Glutamine solution 200 mM (29.2 mg/ml) ,Pen-Strep-Ampho solutin (Penicillin: 10000 units/ml Streptomycin: 10mg/ml Amphotericin B 0.025 mg/ml) ,Trypsin EDTA solution C (EDTA 1:5000 (0.02%)) ,Foetal Bovine Serum (FBS), Water-DEPC treated, hank's salt balced suolation, SDS solution 10%, EZ ECL, Acrylamide.

מחברת Sigma Aldrich (St. Louis, MO) נרכשו החומרים הבאים:

Prolactin, Insulin, HidroCortisol, IBMX, Estrogen, β -mercaptoethanol, BSA, Formaldehyde 36.5%, Aprotonin (מעכב פרוטאזות), Tween 20, Triton X-100, PMSF(מעכב פרוטאזות) , Ponceau S solution, TBE

מחברת Amaresco MA USA נרכשו החומרים הבאים:

Glycine, Tris ($C_4H_{11}NO_3$), Ethidium Bromide

מחברת Merck USA נרכשו החומרים הבאים:

DMSO, NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$

מחברת ABgene UK נרכשו החומרים הבאים:

Kit Verso להפקת cDNA ,Absolute Blue QPCR SYBR MIX ,Thermo-Fast 96 well PCR Det plates

מחברת Bio-Lab Israel נרכשו החומרים הבאים:

Methanol, Ethanol, Chloroform, Isoprpanol, Aceton

מחברת Fermentase נרכש סמן גודל להרצת חלבונים ו-6X Loading Dye להטענת דוגמאות הDNA בג'ל האגרוז וסמן גודל לDNA.

מחברת Bio-Rad USA נרכשו החומרים הבאים:

TEMED, APS (ammonium persulfat), 0.5M Tris pH 6.8, 1.5M Tris pH 8.8

מחברת Eastman Kodak, N.Y. USA נרכשו החומרים הבאים:

פילים בדרגות רגישות שונות, אמולסיה, Developer, Fixer.

מחברת Schleicher & Schuell Germany נרכשו: Nitrocellulose Transfer Membrane.

מחברת Santa Cruz, USA נרכשו הנוגדנים לאנליזת ה Westren והאימונוהיסטוכימיה.

מחברת Molecular Research Center inc. נרכש טריראגנט.

מחברת Hispanagr, Spain נרכש Agarose low EEO.

מחברת Greiner bio-one, Germany נרכשו צלחות לתרביות התאים.

מחברת Corning, USA נרכשו מבחנות פלסטיק, טיפים, פיפטורים.

מחברת NUNC, Denmark נרכשו ממברנות לסינון.

3.2 תמיסות ובופרים

3.2.1 תרביות תאים

מדיום גידול תאי HC11 - מדיום (1:1) DMEM-F12 בתוספת אינסולין 1µg/ml, גלוטמין בריכוז 2mM, אנטיביוטיקה 100 U/ml Penicillin, 0.1 mg/ml Streptomycin, $0.25*10^{-3}$mg/ml Amphotericin B ו 10% FCS.

מדיום הרעבה תאי HC11 – מדיום הגידול ללא FCS.

מדיום ניסוי תאי HC11 – מדיום הרעבה בתוספת הידרוקרטיזון בריכוז 1µg/ml, אינסולין בריכוז 5µg/ml, ופרולקטין על פי פרוטוקול הניסוי.

מדיום גידול תאי 3T3-L1 - מדיום DMEM בתוספת גלוטמין בריכוז 2mM, אנטיביוטיקה 100 U/ml Penicillin, 0.1 mg/ml Streptomycin, $0.25*10^{-3}$mg/ml Amphotericin B ו 10% FCS.

מדיום התמיינות תאי 3T3-L1 - מדיום הגידול בתוספת אינסולין 1µg/ml, הידרוקריטיזון 1µM, 0.5mM IBMX, ו 10% FCS.

מדיום ניסוי תאי 3T3-L1- מדיום הגידול בתוספת אינסולין 1µg/ml ופרולקטין על פי פרוטוקול הניסוי.

3.2.2 Western blot

- Lysis Buffer (SBN)

1 mM EDTA, 50mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 1% (v/v) NP4O, 1 mM Aprotinin, 1 mM PMSF.

-Protein Sample Buffer

0.5 ml β-mercaptoethanol, 0.2 g SDS, 0.8 ml 1M Tris pH 6.8 1 ml Glycerol, 0.5 mg Bromophenol blue, 7.5 ml DDW

-Resolving gel 10%

4.9 ml DDW, 2.5 ml 30% acrylamide 1% Bis, 2.5 ml 1.5M Tris pH 8.8,100 µl 10% SDS, 10 µl TEMED, 60 µl 10% APS.

-Stacking gel 5%

3 ml DDW, 625 µl 30% acrylamide 1% Bis, 1.25 ml 1.5M Tris pH 6.8, 50 µl 10% SDS, 10 µl TEMED, 30 µl 10% APS.

-Running buffer

per 1 liter: 3.025 gr Tris (Hydroxymethyl) aminomethane, 14.4 gr Glycine, 1 gr SDS, DDW.

-Transfer buffer

per 1 liter: 3 gr Tris (Hydroxymethyl) aminomethane, 14.4 gr Glycine, 200 ml Methanol, DDW.

-TBS x10

80 g NaCl, 30 g Tris, 2 g KCl, 1 L DDW DEPC.

-TBS-T

per 1 liter: 100 ml TBS, 1µl Tween-20, DDW

תמיסת Blocking ל- western blotting

5% nonfat milk in TBS-T.

3.2.3 אימיונוהיסטוכימיה

10x PBS (pH7.4)

80 g NaCl, 2 g KCl, 2g KH_2PO_4, 11.34 g Na_2HPO_4,1 L DDW DEPC.

תמיסת A x100-

150 mg $CaCl_2$, 2 g $MgCl_2$ in 100 ml PBS.

תמיסת Blocking לאימונוהיסטוכימיה-

3% BSA in solution A.

3.2.4 PCR

תמיסת TBE נרכשה מחברת סיגמא ונמהלה בDDW לריכוז של 0.5%.

3.3 שיטות

3.3.1 תרבית תאים HC11

התאים גודלו במדיום הגידול בצלחות פלסטיק 10 cm ב 37° C ו CO_2 5%, המדיום הוחלף כל יומיים עד הגעה לקונפלואנטיות.

לצורך הניסוי, כאשר התאים הגיעו לקונפלואנטיות הוחלף מדיום הגידול במדיום הרעבה, למשך יומיים. מדיום הרעבה הוחלף כל 24 שעות. לאחר גידול התאים במדיום הרעבה למשך יומיים הוחלף המדיום למדיום הניסוי. בתום הניסוי נקצרו התאים לצורך הפקת RNA או חלבון.

לצורך הקפאה, כאשר התאים הגיעו לקונפלואטיות נשאב מדיום הגידול, ולכל צלחת הוספו 4 מ"ל Trypsin EDTA על מנת לעכל את התאים . לאחר איסוף התאים סורכזה המבחנה במהירות 1000 g למשך שלוש דקות. עודפי הטריפסין נשאבו תוך השארת נפח מינמלי של 0.5 ml טריפסין. הפלט שהתקבל הורחף במדיום הקפאה שהכיל DMSO 10%, 40% FCS, ו50% מדיום (1:1) DMEM-F12. התאים נשמרו בהקפאה -80^oC.

3.3.2 תרבית תאים 3T3-L1

התאים גודלו בצלחות פלסטיק 10 cm ב 37^o C ו 5% CO_2 במדיום הגידול, המדיום הוחלף כל יומיים עד הגעה לקונפלואנטיות.

לצורך הניסוי , לאחר הגעה לקונפלואנטיות הודגרו התאים יומיים נוספים במדיום הגידול , לאחר מכן הוחלף המדיום למדיום התמיינות ל משך יומיים. לאחר יומיים הוחלף המדיום למדיום הגידול בתוספת של 1µg/ml אינסולין למשך שמונה ימים (יום אפס הוא היום בו ניתן מדיום ההתמיינות), המדיום הוחלף כל יומיים . בתום שמונה ימי התמיינות התאים טופלו בפרולקטין למשך יומיים על פי פרוטוקול הניסוי . בתום הניסוי נק צרו התאים לצורך הפקת RNA.

לצורך הקפאה, כאשר התאים הגיעו לקונפלואטיות נשאב מדיום הגידול, ולכל צלחת הוספו 3 מ"ל Trypsin EDTA על מנת לעכל את התאים . לאחר איסוף התאים סורכזה המבחנה במהירות 1000 g למשך שלוש דקות. עודפי הטריפסין נשאבו תוך השארת נפח מינימלי של 0.5 ml טריפיסין. הפלט שהתקבל הורחף במדיום הקפאה שהכיל DMSO 10%, 40% FCS, ו50% מדיום DMEM. התאים נשמרו בהקפאה -80^oC.

לצורך איסוף מדיום מותנה , התאים גדלו כמתואר לעיל , לאחר הטיפול בפרולקטין , נשאב המדיום. התאים נשטפו ב 5 מ"ל של hank's salt balced suolation ולאחר מכן הוחלף המדיום למדיום הגידול שהכיל 1µg/ml אינסולין ו FCS 0.5% ל24 שעות. אחרי 24 שעות נאסף המדיום למבחנות על פי הטיפולים השונים , המבחנות סורכזו ב 1000 rpm על מנת להפטר משאריות תאים , לאחר הסרכוז המדיום עבר סינון דרך ממברנה 0.2µ. למדיום המסונן הוספה תמיסת F12 בריכוז 10% והורמונים על פי פרוטוקול הניסוי.

3.3.3 הפקת RNA

הפקת Total RNA מהתאים נעשתה לפי Chomczynski and Sacchi 1987. (Chomczynski and Sacchi, 1987). לכל צלחת הוספה 1 ml תמיסת הפקה Tri Reagnet. בעזרת cell scalper נקצרו התאים ונאספו למבחנת אפנדורף. לכל מבחנה הוסף 0.2 ml של כלורופורם, המבחנות עורבבו וסורכזו ב 4^oC ב 12,000 rpm למשך 15 דקות. בתום הסרכוז הופרדה הפאזה המימית מכל מבחנה ואליה הוסף איזופרופנול ביחס של 1:1.

המבחנות עורבבו והודגרו למשך שעתיים בטמפרטורה של ‎-20ºC. בתום ההדגרה המבחנות סורכזו פעם נוספת ב ‎4ºC ב 12,000 rpm למשך 15 דקות. בתום הסרכוז הורחקה הפאזה הנוזלית והתקבל פלט RNA. פלט הRNA נשטף פעמיים, פעם אחת באתנול 75% ובפעם השנייה באתנול 100% לאחר כל שטיפה סורכזו המבחנות ב 12,000 rpm למשך 15 דקות. לאחר הסרכוז הורחקה הפאזה הנוזלית הפלט יובש והורחף ב 30µl מים שטופלו נגד DNase ו RNase וב DEPC. ה RNA המומס נשמר ב ‎-80ºC, עד לקביעה כמותית של הRNA.

3.3.4 קביעה כמותית של RNA

כמות ה RNA נקבעה בעזרת מכשיר ספקטרופוטומטר NanoDrop 1000 . מכל 1.5µl דוגמה נקראה במכשיר באורך גל של 260nm ואורך גל של 280nm.

3.3.5 ריאקצית DNase

ריאקצית DNase נעשתה בעזרת קיט שנרכש מחברת Ambion (Austin, Texas). לצורך הריאקציה נלקחו 20µg מTotal RNA שהופק מהתאים. לRNA הוספו מים, בופר ואנזים DNase לנפח סופי של 25µl. המבחנות הודגרו ב‎37ºC למשך חצי שעה. בתום חצי שעה הוספו לכל מבחנה 3µl של Stop Reaction על מנת לעצור את פעילות האנזים. לאחר 2 דקות בהם הודגרו המבחנות עם ה Stop Reaction המבחנות סורכזו ב10,000rpm למשך 2 דקות. בתום 2 דקות התקבל משקע, הפאזה הנוזלית ובה הRNA הנקי, הופרדה ונשמרה ב‎-80ºC, עד לקביעה מחודשת של כמות ה RNA. לאחר קביעת כמות ה RNA בוצעה ריאקצית RT-PCR.

3.3.6 סינתזת הגדיל המשלים לmRNA (cDNA) ריאקצית RT-PCR

הכנת ה cDNA נעשתה באמצעות האנזים Verso™ Reverse Transcriptase על פי הוראות היצרן (ABgene UK). הריאקציה בוצעה בנפח סופי של 20µl. בשלב הראשון ל 1µg של Total RNA שהופק מהתאים הוספה תערובת תחלים (primers) של Oligo-dT ו- Random Hexamer ביחס של 3:1 בהתאמה, בנפח סופי של 12µl. התחלים האלה איפשרו בשלב השני לסנתז את הגדיל המשלים. לאחר הצמדות התחלים ב‎70ºC ל-5 דקות, הוספו בשלב הבא 8µl של תערובת (5x) cDNA synthesis buffer, ‏dNTP's (500µM each), ואנזים Verso™ Reverse Transcriptase. לאחר מכן הודגרו המבחנות ב ‎47ºC למשך שעה, ולאחר מכן 2 דקות ב‎95ºC על מנת להפסיק את פעילות האנזים. הcDNA נשמר ב‎-20ºC.

Real Time PCR 3.3.7

התחלים לגנים השונים תוכננו במעבדתנו על ידי תוכנת Primer Express^{TM} 3.0 או נלקחו מפרסומים קודמים וסונתזו על ידי חברת סינתזה . טבלא מספר 1 מפרטת את כלל הגנים שתוכננו לריאקצית הReal Time PCR.

טבלה מספר 1: התחלים שתוכננו לראקציית הReal Time PCR.

הגן	sequence (5'-3')		מספר רישום ב Gene bank	reference
	Forward	Reverse		
β- casein	AGAGGATGTGCTCCAGGCTA	AATGACAGGCCCAAGAGATG	NM_009972	
ER α	CTAGCAGATAGGGAGCTGGTTCA	GGAGATTCAAGTCCCCAAAGC	NM_007956	
ER β	TCTGGACACCTCTCTCCTTT	CAACCGCTCCCGCCAAGCTT	NM_207707	Fujimoto N. et al., 2007
AdipoQ	AGCCGCTTATATGTATCGCTCA	TGCCGTCATAATGATTCTGTTGG	NM_009605	
Aromatse 1	ACACCATGTCGGTCACTCTGTACT	TTTATGTCTCTGTCACCCACAACA	NM_007810	
Aromatse 2	CAATCCTGAAGGAGATCCACACT	CTGGTACCGCATGCTTTCATT		
Aromatse 3	CGGAAGAATGCACAGGCTCGAG	CGATGTACTTCCCAGCACAGC		You-Qiang S. et al., 2006
β- actin	AGTGTGACGTTGACATCCGTA	GCCAGAGCAGTAATCTCCTTCT	NM_007393	

רמת הביטוי של הגנים נבדקה בשיטת Real Time PCR, כאשר עבור כל דוגמה נקבע Ct (Cycle threshold) שהינו מספר המחזורים הדרוש לקבל סיגנל פלורסנטי מסוים . ככל שה ct נמוך יחסית כך רמת הביטוי של הגן גבוהה יותר באופן יחסי . בכל ניסוי עבור כל גן נבדקה עקומת כיול במיהולי cDNA בריכוזים 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 עבור ERα וERβ ובריכוזים 1:5, 1:25, 1:50, 1:125, 1:250 עבור β-actin, AdipoQ, β-casein. יעילות הריאקציה חושבה ונלקחה בחשבון בחישוב השתנות הביטוי , להלן. תערובת הReal Time בכל מבחנה הכילה 1µl של cDNA מהול על פי עקומת הכיול, 0.5µl מכל תחל בריכוז 5µM, 5µl של ABsolute Blue SYBR Green ROX Mix (2X) ו 3µl מים, סה"כ נפח הראקציה 10µl. הריאקציה בוצעה במכשיר Step One Plus (Applied biosystems). תנאי הריאקציה היו 15 דקות ב95ºC לצורך אקטיבציה של האנזים ודנטורציה ראשונית , 40 מחזורים של חצי דקה ב 95ºC - דנטורציה ודקה ב60ºC -annealing-extetion. בסיום 40 מחזורים בוצעה עקומת דיסוציאציה על מנת לוודא תוצר אחד בראקציה . האמפליפיקציה של

הcDNA נעשתה בבארות נפרדות, ב-3 חזרות. על מנת לבדוק את השינוי בביטוי של הגנים (Fold of Change- F.C.) השתמשנו בשיטתו של Pfaffl, 2001 (Pfaffl, 2001), כך ששינוי הביטוי עבור כל גן חושב על פי הנוסחה הבאה:

$$F.C. = \frac{(1+E_{Target})^{\Delta cT_{Target}(Control - Sample)}}{(1+E_{Ref})^{\Delta cT_{Ref}(Control - Sample)}}$$

הניתוחים הסטטיסטים נעשו על ה Ct Ratio. ערך זה מייצג את היחס בין הגן הנבדק לגן המנרמל בתוך אותו הטיפול.

3.3.8 Polymerase Chain Reaction (PCR)

ראקצית הגברה למקטעי cDNA נעשתה בנפחים סופיים של 20µl. תערובת הראקציה כללה 2µl מדוגמת ה cDNA, 1µl מכל תחל שתוכנן עבור ראקציית ה Real Time PCR (טבלה מספר 1) (Forward/Reverse) בריכוז 5µM, 2µl Reaction Buffer 10x (Fisher Biotec,Australia), 1.2µl $MgCl_2$ בריכוז 25mM, dNTP's בריכוז 10mM כל אחד, 0.5 units של FB1 DNA Polymerase (Fisher Biotec,Australia) ומים DEPC treated להשלמת הנפח. ראקצית הPCR נעשתה במכשיר Thermo Hybaid PCR express.

תוכנית הPCR הייתה: א. דנטורציה התחלתית ב94^oC למשך 3 דקות. ב. 35 מחזורים של דנטורציה ב94^oC ל45 שניות, Annealing ב61^oC ל30 שניות, Extension ב72^oC ל45 שניות. ג. Extension סופי ב72^oC למשך 10 דקות. ד. שמירה ב4^oC עד להרצה.

3.3.9 הפרדה אלקטרופורטית על ג'ל אגרוז

אלקטרופורזה של DNA נעשתה בג'לים אופקיים המכילים 2% אגרוז בבופר TBE X0.5 שהוסף להם אתידיום ברומיד (0.5-1µg/ml) והורצו במתח של 75 volt למשך שעה וחצי מכשיר ההרצה מסוג 150 minis של חברת Major Science. לקביעת גדלים הורץ סולם בגודל של עד 100bp.בתום ההרצה נבדק הג'ל באור .U.V וצולם.

3.3.10 הפקת חלבון

הפקת חלבון מהתאים וכימות חלבון.

בסוף הניסוי נשאב המדיום מהצלחות וכל צלחת נשטפה ב PBS. לאחר שאיבת הPBS לכל צלחת הוסף 0.5 ml של Lysis Buffer SBN בתוספת מעכבי פורטאזות PMS ואפרוטונין. הנוזל גורד מהצלחות ע"י מגרדת גומי, ונאסף למבחנות מסומנות. המבחנות הודגרו למשך חצי שעה על קרח ולאחר מכן סורכזו ב 12,000 rpm למשך חצי שעה ב4^oC. בסיום הסרכוז הועברה הפאזה הנוזלית למבחנה חדשה . הדוגמאות נשמרו ב -80^oC עד לקביעה כמותית

של החלבון. קביעה כמותית של החלבון נעשתה בעזרת קיט Protein Assay Kit (Pierce, BCA USA), כאשר החלבון BSA שימש כסטנדרט לעקומת כיול . 5µl מהחלבון הממוצה נבדקו בפלטת ELISA של 96 בארות, עם 2 חזרות עבור כל דוגמה. לכל באר הוספו 200µl של תמיסת BCA שהוכנה מ(Bicinchonic acid solution) Reagent-A ו Reagent-B ($4\%\ CuSO_4X5h_2O$) ביחס של 1:50. לאחר 30 דקות אינקובציה ב 37^oC בחושך נערכו קריאת באורך גל של 540nm במכשיר ELISA reader (Biotech, USA). ריכוז החלבון חושב לפי עקומת הכיול.

3.3.11 Western blot

דוגמאות החלבון (40µg) עורבבו עם Sample Buffer 5x והורתחו ב95^oC למשך 5 דקות, לצורך דנטורציה. החלבונים הופרדו על גבי ג'ל SDS-PAGE במכשיר הרצה Power PAC 300, Biorad בבופר הרצה- Running Buffer במתח 150V. בסיום ההרצה החלבונים הועברו לממברנת ניטרוצלולוז על ידי זרם חשמלי של 200mA למשך שעה וחצי ב Transfer Buffer. לבדיקת אחידות כמות החלבונים נצבעה הממברנה בתמיסת Ponceau S. אתרים לא ספציפיים בממברנה נחסמו ב Blocking Solution למשך שעה ולאחר מכן הודגרה הממברנה במ שך שעה בטמפרטורת החדר עם נוגדן ראשוני בתמיסת TBS-T (שמות הנוגדנים והמיהול מופרטים בטבלא מס). לאחר מכן נשטפה הממברנה 3 פעמים עם TBS-T כל שטיפה במשך 15 דקות, בשלב הבא הודגרה הממברנה עם נוגדן שניוני בתמיסת TBS-T למשך שעה בטמפרטורת החדר . בסוף ההדגרה נשטפה הממ ברנה 3 פעמים עם TBS-T כל שטיפה במשך 15 דקות. זיהוי חלבונים ספציפיים נעשה על ידי Enhanced chemiluminescence (ECL) וחשיפה לפילים בזמנים שונים על פי הצורך . מיקום החלבון המבוקש נקבע על פי סמן גודל לחלבונים.

טבלה מספר 2: הנוגדנים ששימשו לזיהוי החלבונים באנליזת הWestern blot.

נוגדן שניוני western		נוגדן ראשוני				
מיהול	נוגדן	מיהול	נוגדן	Mw	מספר קטלוגי	חלבון
1:5000	Goat α Rabbit	1:2000	Rabbit	66kDa	SC-7202 SC-542	ER α
1:5000	Goat α Rabbit	1:1500	Rabbit	56kDa	SC-8974	ER β

3.3.12 אימיונוהיסטוכימיה

זכוכיות מכסות בגודל 25X75X1.0mm עוקרו באוטוקלב והונחו בפלטות של 6 בארות, תאי HC11 נזרעו על גבי הזכוכיות וגודלו על פי פרוטוקול הניסוי . בתום הניסוי, המדיום נשאב מהבארות, והבארות נשטפו שלוש פעמים למשך 5 דקות בתמיסה A. התאים עברו פיקסציה 4% PFA למשך 10 דקות, ו-2 דקות נוספות עם אצטון. לאחר מכן נשטפו הבארות שלוש פעמים למשך חמש דקות עם 0.05% טריטון לליזיס הממברנה. בשלב הבא הוספה

לבארות תמיסת Blocking למשך שעה בטמפרטורת החדר על מנת לחסום אתרים לא ספציפיים. לאחר מכן הוסף הנוגדן הראשון מהול בתמיסת ה- Blocking למשך שעה בטמפרטורת החד ר. בתום השעה נשטפו הבארות בתמיסה A שלוש פעמים , כל שטיפה במשך 5 דקות. הנוגדן השני הוסף לבארות מהול ב- DDW למשך שעה בחדר חשוך . הנוגדן השני נשטף עם תמיסה A, שלוש שטיפות , כל שטיפה חמש דקות . על מנת לצבוע את הגרעינים הוסף DAPI למשך 10 דקות לבארות . לאחר מכן הודבקו הזכוכיות לזכוכית נושאת באמצעות דבק FloroGel. החתכים צולמו במיקרוסקופ פולרנסטי (Nikon Eclipse) בהגדלה המתאימה.

טבלה מספר 3: הנוגדנים ששימשו לזיהוי החלבונים באנליזת האימונוהיסטוכימיה

נוגדן שניוני western		נוגדן ראשוני				
מיהול	נוגדן	מיהול	נוגדן	Mw	מספר קטלוגי	חלבון
1:200	Goat α Rabbit	1:1000	Rabbit	66kDa	SC-7207	ER α
1:200	Goat α Rabbit	1:1000	Rabbit	56kDa	SC-8974	ER β

3.3.12 ניתוח סטטיסטי

תוצאות הניסויים נותחו במודל של ניתוח שונות Oneway ANOVA. השוואת הממוצעים נעשתה באמצעות מבחן Tukey-Kramer או באמצעות מבחן each pair student's t-test להשוואה בין הטיפולים השונים לקבוצת הביקורת . הניתוחים נעשו באמצעות תוכנת JMP 7.0. התוצאות מוצגות כממוצע ± שגיאת תקן.

3.3.13 מבנה הניסויים

ניסוי מספר 1 - תאי HC11 גודלו עד קונפלואנטיות . לאחר יומיים הרעבה טופלו ה תאים למשך 48 שעות במדיום התמיינות בריכוזים שונים של פרולקטין , 0, 0.01, 0.1, 1. 10µg/ml סה"כ חמישה טיפולים. לכל טיפול היו 3 חזרות. הביקורת בניסוי היו הצלחות ללא טיפול הפרולקטין. בתום הניסוי הופק RNA.

לצורך אימיונוהיסטוכימיה התאים גדלו בנוכחות ההורמונים למשך 96 שעות כאשר המדיום הוחלף אחרי יומיים.

ניסוי מספר 2 - תאי 3T3-L1 גודלו עד לאחר ההתמיינות + 8 ימים. לאחר מכם טופלו התאים למשך 48 שעות במדיום הניסוי בריכוזים שונים של פרולקטין, 0, 0.01, 0.1, 1. 5, 10µg/ml סה"כ שישה טיפולים. לכל טיפול היו 3 חזרות. הביקורת בניסוי היו הצלחות ללא טיפול הפרולקטין. בתום הניסוי הופק RNA.

ניסוי מספר 3 - ניסוי במדיום מותנה (Conditionig Medium C.M.). תאי 3T3-L1 גודלו על פי המתואר בניסוי מספר שתיים , וטופלו בריכוזים שונים של פרולקטין 0, 1, 5, 10µg/ml. עבור כל טיפול היו 3 חזרות מלבד הטיפול ללא פרולקטין ממנו היו 6 חזרות. בתום הניסוי נאסף המדיום מכל 3 צלחות בעלות אותו טיפול ביחד. לאחר איסוף המדיום המותנה כמתואר לעיל הוספו למדיום המותנה ההורמונים הבאים הידרוק ורטיזון בריכוז 1µg/ml, אינסולין בריכוז 5µg/ml, ופרולקטין בריכוז 1µg/ml. קבוצת הביקורת בניסוי זה הייתה הקבוצה שלא טופלה בפרולקטין ובנוסף כאשר הוספו ההורמונים לאחר איסוף המדיום המותנה לא הוספה לה פרולקטין.

ניסוי 4 – תאי HC11 גודלו עד קונפלואנטיות. לאחר יומיים במדיום הרעבה הוחלף המדיום למדיום ניסוי בתוספת של 1µg/ml פרולקטין, לצורך התמיינות למשך 48 שעות. לאחר מכן חולקו הצלחות לשתי קבוצות לצורך הניסוי . בכל קבוצה טופלו התאים במדיום הניסוי בתוספת ריכוזים שונים של אסטרוגן 0, 1, 10,100 ng/ml. קבוצה אחת גדלה בנוכחות 1µg/ml פרולקטין והקבוצה השנייה ללא נוכחות פרולקטין. לאחר 48 שעות במדיום הניסוי הופק RNA.

לצורך הפקת חלבון התאים גדלו בנוכחות ההורמונים למשך 96 שעות כאשר המדיום הוחלף אחרי יומיים.

4. תוצאות

4.1 השפעת פרולקטין על רמת הביטוי של הגן לחלבון החלב β- casein ושל הקולטנים לאסטרוגן בתאי אפיתל של בלוטת החלב.

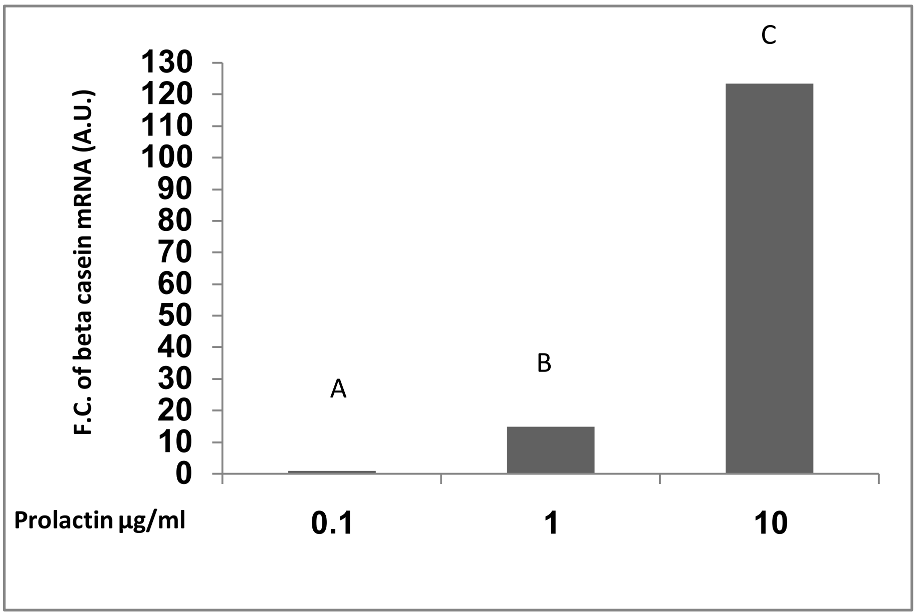
השפעת הפרולקטין על רמת הביטוי של הגן לחלבון החלב β casein ושל הגנים של לקולטני האסטרוגן נבחנה בקו תאים מבלוטת החלב של עכברה - HC11. התאים הודגרו במדיום הגידול עד קונפלואנטיות. לאחר יומיים במדיום הרעבה, טופלו התאים למשך 48 שעות במדיום התמיינות בריכוזים שונים של פרולקטין, 0, 0.01, 0.1, 1. 10 µg/ml סה"כ חמישה טיפולים. הביקורת בניסוי היו הצלחות ללא טיפול הפרולקטין. בתום הניסוי הופק RNA, ונמדדה רמת הביטוי של הגנים השונים.

4.1.1 טבלה מספר 4: היחס בין רמת הביטוי של הגנים ל β- casein, ER α, ER β לבין הגן β- actin בתאי HC11 (ערכי Ct ratio).

ריכוזי פרולקטין	Ct ratio β- casein	Ct ratio ER α	Ct ratio ER β
0 µg/ml Prolactin	1.8692±0.0309[A]	1.5622±0.0115[A]	1.6026±0.0201[A]
0.01 µg/ml Prolactin	1.7425±0.0309[B]	1.5477±0.0115[A]	1.6056±0.0201[A]
0.1 µg/ml Prolactin	1.4419±0.0309[C]	1.5631±0.0115[A]	1.5867±0.0201[A]
1 µg/ml Prolactin	1.2377±0.0309[D]	1.5391±0.0115[AB]	1.5670±0.0201[AB]
10 µg/ml Prolactin	1.0943±0.0309[E]	1.4761±0.0115[B]	1.4860±0.0201[B]
	P<0.0001	P=0.0044	P=0.0035

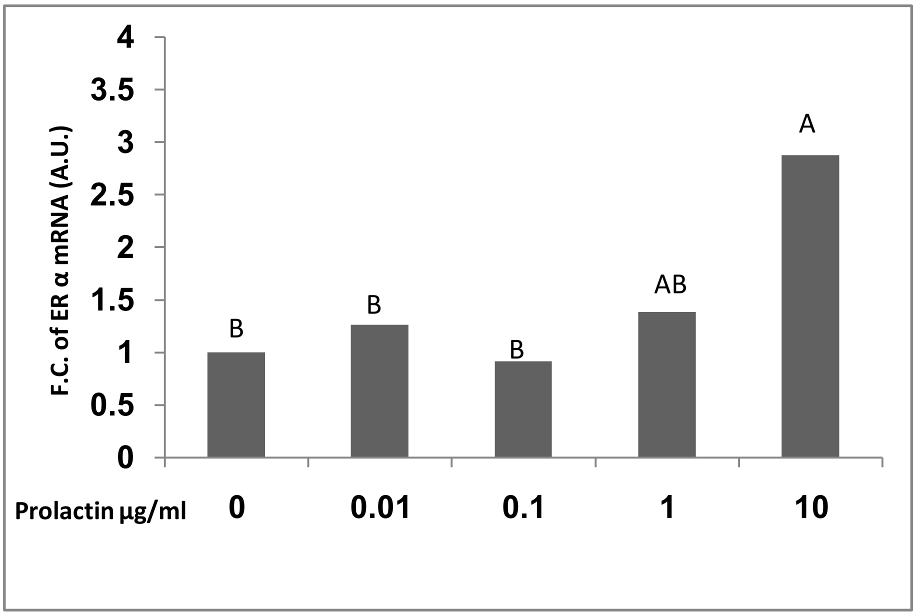
ערכים בטבלה מיצגים ממוצע ± שגיאת תקן (n=6) ערכים המסומנים באותיות שונות נבדלים בהבדל מובהק יחס נמוך מעיד על התבטאות גבוהה יותר ולהפך. הניסוי נערך פעמים בכל ניסוי 3 חזרות.

טבלה מספר 4 מציגה את רמת הביטוי של הגן ל β- casein, הגן ל ER α והגן ל והגן ל ER β ביחס לרמת הביטוי של הגן β- actin. התוצאות הגרפיות (F.C.) עבור כל גן מוצגות באיורים להלן. ניתן לראות כי רמת הביטוי של כל הגנים עלתה ביחס לעליה בריכוזי הפרולקטין. העלייה ברמת הביטוי של הגן β- casein הייתה מובהקת בין כל ריכוזי הפרולקטין. העלייה ברמת הביטוי של ER α וER β הייתה מובהקת רק בין הריכוז הגבוה ביותר של הפרולקטין (10 µg/ml) לבין שאר ריכוזי הפרולקטין.



4.1.2 איור מספר 1: רמת הביטוי של הגן β- casein בתאי HC11 שטופלו בריכוזים עולים של פרולקטין.

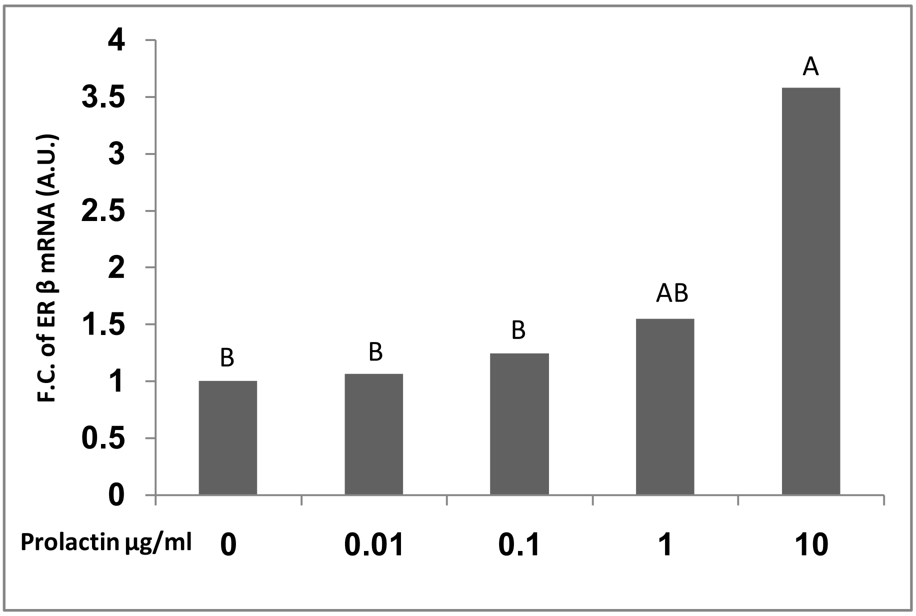
ניתן לראות באיור מספר 1 כי יש עליה תלוית ריכוז ברמת הביטוי של הגן ל β- casein עד פי 125 בקרוב, ובכל ריכוז רמת הביטוי של הגן לβ- casein נבדלת באופן מובהק מהריכוזים האחרים.מכיוון שבריכוזים µg/ml 0,0.01 פרולקטין רמת הביטוי של הגן הייתה כמעט אפסית השוו הטיפולים לרמת הביטוי בריכוז µg/ml 0.1 פרולקטין. הניתוח הסטטיסטי נערך באמצעות מבחן ניתוח שונות חד גורמי לגורם הפרולקטין כגורם קבוע. גורם הפרולקטין נבדל באופן מובהק P<0.0001.



4.1.3 איור מספר 2: רמת הביטוי של הגן ER α בתאי HC11 שטופלו בריכוזים עולים של פרולקטין.

ניתן לראות באיור מספר 2 כי יש עליה תלוית ריכוז ברמת הביטוי של הגן ER α כשבריכוז µg/ml 10 פרולקטין רמת הביטוי היא הגבוהה ביותר , פי 3 מהביקורת (µg/ml 0

פרולקטין). בריכוזים הנמוכים 0, 0.01, 0.1,1 µg/ml רמת הביטוי של הגן ל ER α אינה נבדלת באופן מובהק. לעומת זאת רמת הביטוי של הגן נבדל באופן מובהק בין הריכוז הגבוה ביותר, 10µg/ml לבין הריכוזים הנמוכים 0, 0.01, 0.1 µg/ml. הניתוח הסטטיסטי נערך באמצעות מבחן ניתוח שונות חד גורמי לגורם הפרולקטין כגורם קבוע. גורם הפרולקטין נבדל באופן מובהק P=0.0044.

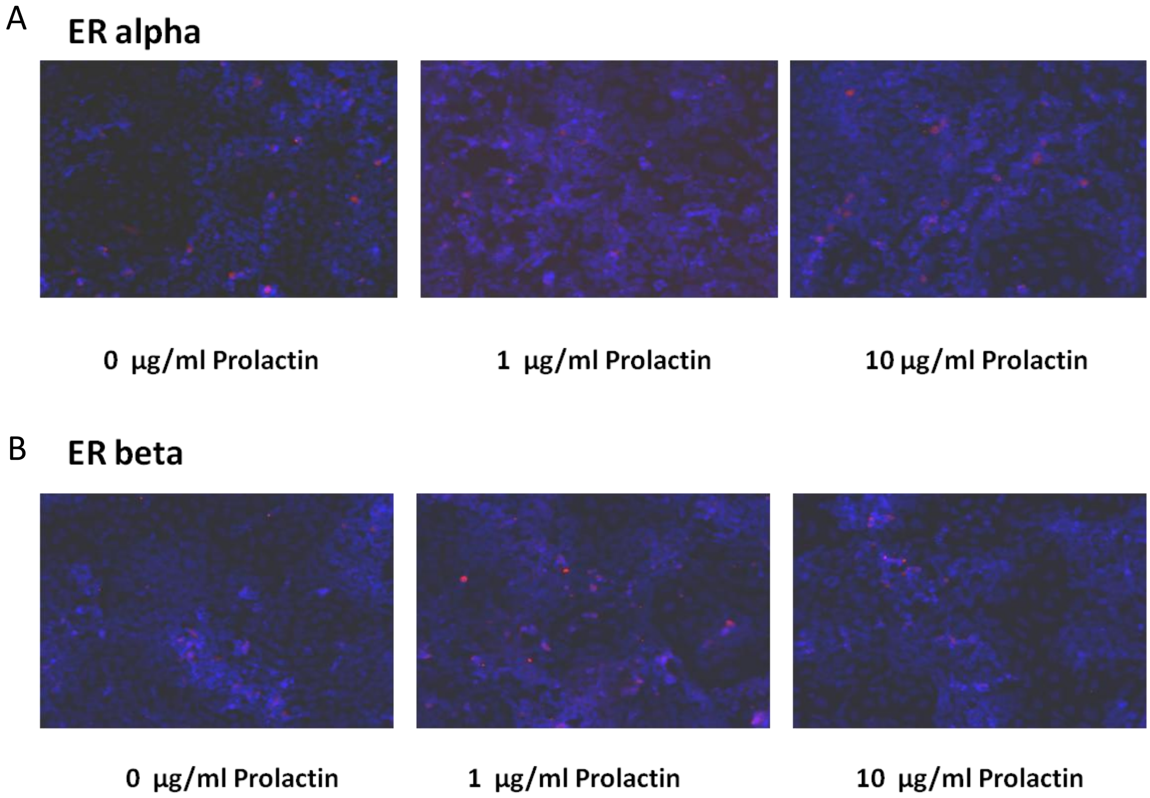


4.1.4 איור מספר 3: רמת הביטוי של הגן ER β בתאי HC11 שטופלו בריכוזים עולים של פרולקטין.

בדומה לרמת הביטוי של ER α, ניתן לראות באיור מספר 3 כי יש עליה תלוית ריכוז ברמת הביטוי של הגן ER β כשבריכוז 10 µg/ml פרולקטין רמת הביטוי היא הגבוהה ביותר , פי 3.5 מהביקורת (0 µg/ml פרולקטין). בריכוזים הנמוכים 0, 0.01, 0.1,1 µg/ml רמת הביטוי של הגן ל ER β אינה נבדלת באופן מובהק. לעומת זאת רמת הביטוי של הגן נבדלת באופן מובהק בין הריכוז הגבוה ביותר , 10µg/ml לבין הריכוזים הנמוכים 0, 0.01, 0.1 µg/ml. הניתוח הסטטיסטי נערך באמצעות מבחן שונות חד גורמי לגורם הפרולקטין כגורם קבוע . גורם הפרולקטין נבדל באופן מובהק P=0.0035.

4.2 השפעת פרולקטין על ביטוי החלבונים לקולטנים לאסטרוגן בתאי HC11 שטופלו בריכוזים עולים של פרולקטין.

רמת הביטוי של החלבונים בניסוי זה נבדקה באמצעות אימ יונוהיסטוכימיה, רמת הביטוי של החלבונים נבדקה עבור הקולטנים לאסטרוגן . תאי HC11 גדלו בצלחות פלסטיק על גבי זכוכית מכסה במדיום הגידול . לאחר הגעה לקונפלואנטיות הוחלף המדיום למ דיום הרעבה למשך יומיים. לאחר מכן טופלו התאים במדיום התמיינות בריכוזים שונים של פרולקטין (0, 1, 10 µg/ml) למשך ארבעה ימים , המדיום הוחלף כל יומיים . בתום הניסוי עברו התאים פיקסצייה על פי המתואר בשיטות וחומרים.



4.2.1 איור מספר 4: ביטוי של החלבון לERα ו ER β

ניתן לראות באיור מספר 4 כי התאים מבטאים את שני החלבונים, ER α ו ER β, בכל ריכוזי הפרולקטין. בריכוז של 1µg/ml נראה כי ביטוי החלבון ל ER β גבוה יותר. הניסוי נערך באופן איכותי ולכן לא נערך מבחן סטטיסטי.

4.3 השפעת פרולקטין על רמת הביטוי של הגן AdipoQ והגן לארומאטז בתאים פרה אדיפוציטים, 3T3-L1 לאחר שעברו התמיינות.

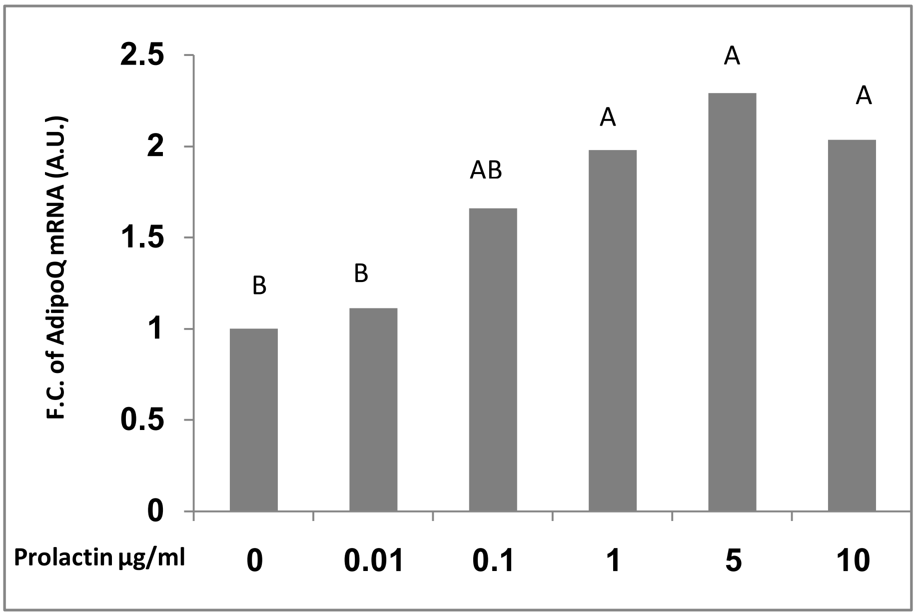
השפעת הפרולקטין על רמת הביטוי של הגן ל AdipoQ והגן לארומאטז נבחנה בתאים פרה אדיפוציטים מסוג 3T3-L1, לאחר שעברו התמיינות. התאים גודלו עד לאחר ההתמיינות 8 ימים נוספים. לאחר מכן טופלו התאים למשך 48 שעות במדיום הניסוי בריכוזים שונים של פרולקטין, 0, 0.01, 0.1, 1, 5, 10 µg/ml סה"כ שישה טיפולים . הביקורת בניסוי היו הצלחות ללא טיפול הפרולקטין . בתום הניסוי הופק RNA, ונמדדה רמת הביטוי של הגן לAdipoQ אשר מהווה מדד להתמיינות תאי שומן , ושל הגן לארומאטז שיכול להעיד על פעילות של ייצור אסטרוגן.

4.3.1 טבלה מספר 5: היחס בין רמת הביטוי של הגן AdipoQ לגן β- actin בתאי 3T3-L1 (ערכי Ct ratio).

ריכוזי פרולקטין	C_t ratio AdipoQ
0 µg/ml Prolactin	1.3918±0.0141^{A}
0.01 µg/ml Prolactin	1.3862±0.0141^{A}
0.1 µg/ml Prolactin	1.3559±0.0141^{AB}
1 µg/ml Prolactin	1.3348±0.0141^{B}
5 µg/ml Prolactin	1.3281±0.0155^{B}
10 µg/ml Prolactin	1.3348±0.0141^{B}
	P=0.0130

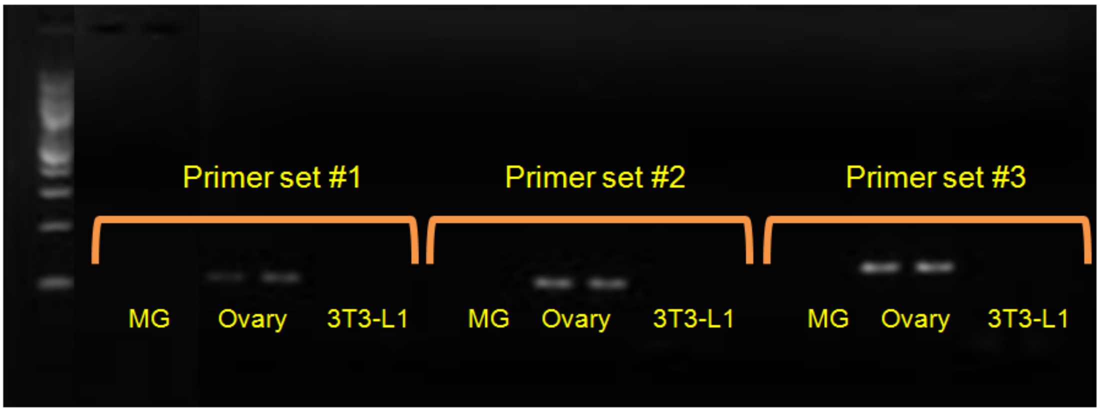
ערכים בטבלה מיצגים ממוצע ± שגיאת תקן (n=6) ערכים המסומנים באותיות שונות נבדלים בהבדל מובהק, יחס נמוך מעיד על התבטאות גבוהה יותר ולהפך. הניסוי נערך פעמים בכל ניסוי 3 חזרות.

טבלה מספר 5 מציגה את רמת הביטוי של הגן ל AdipoQ ביחס לרמת הביטוי של הגן β- actin. התוצאות הגרפיות (F.C.) עבור כל גן מוצגות באיור להלן. ניתן לראות כי רמת הביטוי של עולה ביחס לעליה בריכוזי הפרולקטין עד לריכוז של 5 µg/ml פרולקטין ובריכוז 10 µg/ml יורדת קצת. בין הריכוזים 1, 5, 10 µg/ml פרולקטין אין הבדל מובהק אך ריכוזים אלה נבדלים באופן מובהק מהריכוזים הנמוכים של פרולקטין 0, 0.01 µg/ml.



4.3.2 איור מספר 5: רמת הביטוי של הגן AdipoQ בתאי 3T3-L1 שטופלו בריכוזים עולים של פרולקטין.

ניתן לראות מאיור מספר 5 כי יש עליה תלוית ריכוז ברמת הביטוי של הגן AdipoQ כשבריכוז 5 µg/ml פרולקטין רמת הביטוי היא הגבוהה ביותר פי 3.5 מהביקורת (0 µg/ml פרולקטין), ונבדלת באופן מובהק מהריכוזים הנמוכים 0, 0.01 µg/ml. הניתוח הסטטיסטי נערך באמצעות מבחן שונות חד גורמי לגורם הפרולקטין כגורם קבוע. גורם הפרולקטין נבדל באופן מובהק P=0.0130. AdipoQ משמש כסמן לרמת ההתמיינות של תאי שומן. תוצאות אלה יכולות להעיד על מעורבותו של ההורמון פרולקטין בהתמיינות תאי שומן.



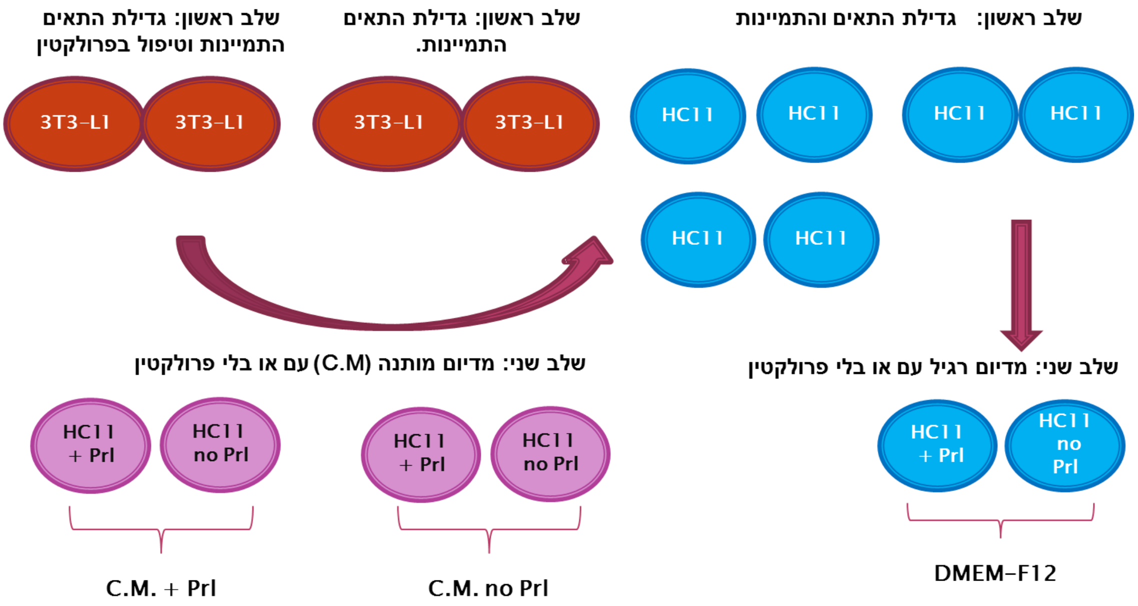
4.3.3 איור מספר 6: רמת הביטוי של הגן לארומאטז בתאי 3T3-L1, בשחלה של עכברה ובבלוטות חלב של עכברה.

רמת הביטוי של הגן לארומאטז נבדקה בPCR רגיל בעזרת פריימרים שתוכננו עבור ה Real Time PCR בתנאים שצוינו בשיטות וחומרים . בנוסף לדוגמאות שהופקו מתאי 3T3-L1, הופקו דוגמאות גם משחלה של עכברה וכן מבלוטות חלב של עכברה והורצו במקביל , הדוגמאות השונות הורצו פעמיים . נבדקו שלוש זוגות תחלים עבור הגן לארומטא ז. ניתן לראות מאיור מספר 6 כי בכל זוג תחלים מתקבל סיגנל עבור הדוגמא שהופקה מהשחלה (Ovary) וחסר סיגנל בדוגמאות שהופקו מתאי 3T3-L1 ומבלוטות החלב (MG). סמן הגודל הוא של bp 100. ניסוי זה נערך מכיוון שלא ה צלחנו לקבל ביטוי של הגן לארומטא ז באמצעות Real Time PCR.

4.4 בחינת השפעת הטיפול במדיום מותנה והטיפול בפרולקטין על רמת הביטוי של חלבון החלב β- casein ושל הקולטנים לאסטרוגן בתאי HC11 - ניסוי מקדים.

שימוש במדיום מותנה (.Conditionig Medium C.M) בעבודה זו נעשה על מנת לבחון את יחסי הגומלין בין תאי האפיתל לבין תאי השומן . בכדי לבדוק את השפעת המדיום המותנה על תאי HC11, נערך ניסוי מקדים . בניסוי זה היו שלוש קבוצות טיפול . הקבוצה הראשונה הייתה תאי HC11 שגדלו במדיום גידול רגיל , ועברו התמיינות במדיום התמי נות בתוספת של 1µg/ml פרולקטין. הקבוצה השנייה הייתה תאי HC11 שגדלו במדיום מותנה שנאסף מתאי 3T3-L1 שלא טופלו בפרולקטין. הקבוצה השלישית הייתה תאי HC11 שגדלו במדיום מותנה שנאסף מתאי 3T3-L1 שטופלו ב µg/ml 1 פרולקטין. כל קבוצה נחלקה לשניים , הראשונה בה לא הוסף פרו לקטין למדיום המותנה או הרגיל , לאחר ההתמיינות והקבוצה השנייה בה הוסף µg/ml 1 פרולקטין למדיום המותנה או הרגיל , לאחר ההתמיינות. בנוסף לפרולקטין בכל הקבוצות הוספו גם ההורמ ונים הבאים: הידרוקורטיזון בריכוז של µg/ml 1 ואינסולין בריכוז של µg/ml 5. סה"כ היו בניסוי זה שישה טיפולים עם שלוש חזרות. קבוצת הביקורת בניסוי זה הייתה קבוצת המדיום הרגיל שלא הוסף לה פרולקטין לאחר ההתמי ינות (איור מספר: מבנה הניסוי).

מדיום מותנה נאסף מתאי 3T3-L1 שגדלו על פי המתואר בניסוי הקודם (4.3) וטופלו בפרולקטין או לא טופלו בפרולקטין על פי קבוצות הניסוי.



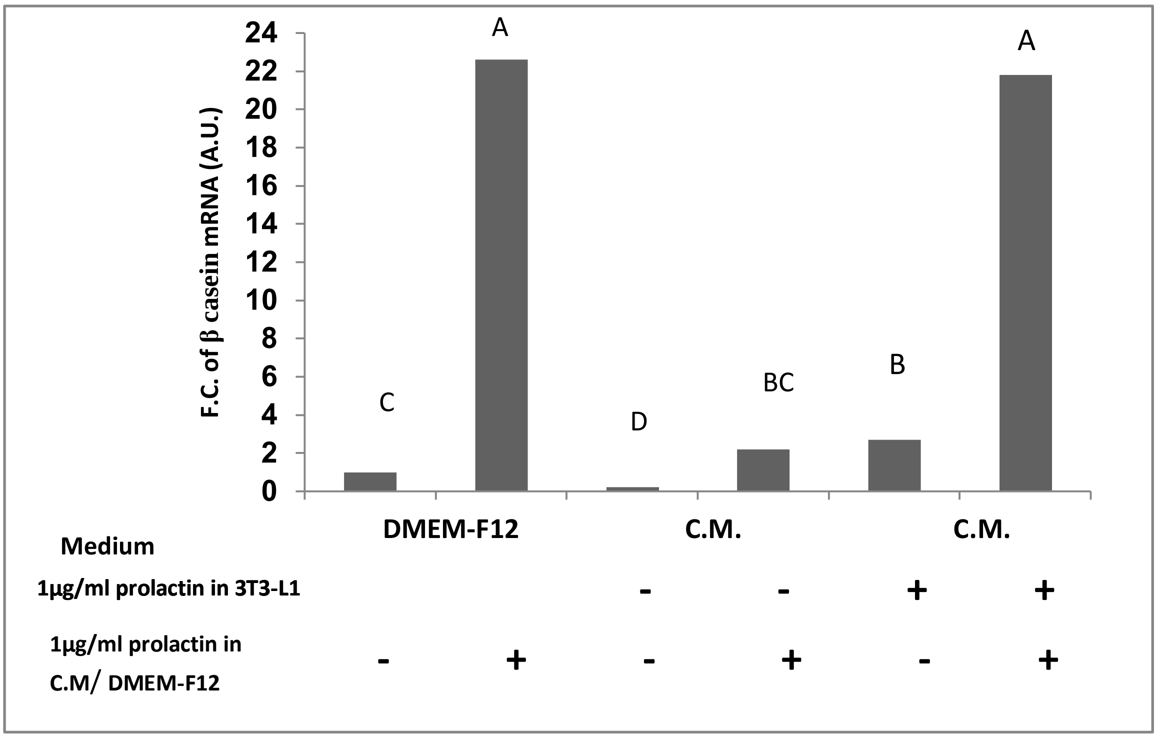
4.4.1 איור מספר 7: מבנה הניסוי המקדים במדיום המותנה.

4.4.2 טבלה מספר 6: היחס בין רמת הביטוי של הגנים לβ- casein, ER α, ER β לבין הגן β- actin בתאי HC11 (ערכי Ct ratio).

	Ct ratio β- casein	Ct ratio ER α	Ct ratio ER β
DMEM-F12 0 µg/ml Prolactin	1.3803±0.0162[B]	1.4788±0.0091[A]	1.4815±0.0149
DMEM-F12 1 µg/ml Prolactin	1.1757±0.0162[D]	1.4303±0.0091[B]	1.5008±0.0149
C.M. 0 µg/ml Prolactin 3T3-L1 no Prolactin added	1.4594±0.0162[A]	1.4239±0.0091[B]	1.4634±0.0149
C.M. 1 µg/ml Prolactin 3T3-L1 no Prolactin added	1.3103±0.0162[BC]	1.4131±0.0091[B]	1.4583±0.0149
C.M. 0 µg/ml Prolactin 3T3-L1 1 µg/ml Prolactin added	1.3026±0.0162[C]	1.4130±0.0091[B]	1.4542±0.0149
C.M. 1 µg/ml Prolactin 3T3-L1 1 µg/ml Prolactin added	1.1726±0.0162[D]	1.3591±0.0091[C]	1.4457±0.0149
	P<0.0001	P<0.0001	N.S.

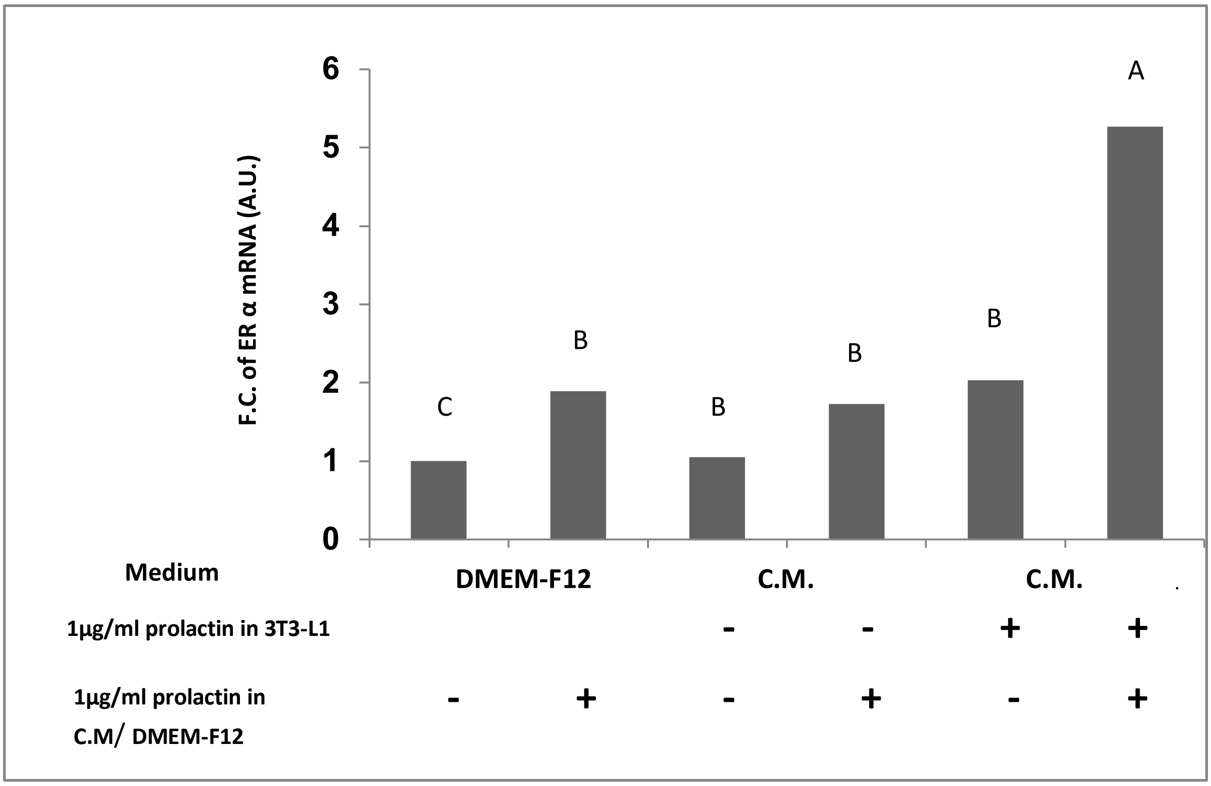
ערכים בטבלה מיצגים ממוצע ± שגיאת תקן (n=3) ערכים המסומנים באותיות שונות נבדלים בהבדל מובהק יחס נמוך מעיד על התבטאות גבוהה יותר ולהפך. הניסוי נערך פעם אחת בכל ניסוי 3 חזרות.

טבלה מספר 6 מציגה את רמת הביטוי של הגן לβ- casein, הגן ל ER α והגן ל והגן ל ER β ביחס לרמת הביטוי של הגן β-actin. התוצאות הגרפיות (F.C.) עבור כל גן מוצגות באיורים להלן. ניתן לראות כי רמת הביטוי הגבוהה ביותר של הגן β-casein תקבלה כאשר טופלו התאים במד יום רגיל בתוספת של פרולקטין ובמדיום מו תנה שנאסף מתאי 3T3-L1 שטופלו בפרולקטין ובנוסף הוסף להם פרולקטין במדיום . כאשר משווים בין טיפולי המדיום בלבד, ניתן לראות כי רמת הביטוי של הגן ל β- casein גבוהה יותר בתאים שטופלו במדיום מותנה שנאסף מתאי 3T3-L1 שגדלו בנוכחות פרולקטין. כאשר בוחנים את רמת הביטוי של ER α, ניתן לראות כי רמת הביטוי הגבוהה ביותר התקבלה כאשר התאים טופלו במדיום מותנה שנאסף מתאי 3T3-L1 שגדלו בנוכחות פרולקטין ובנוסף הוסף למדיום המותנה פרולקטין. כאשר משווים רק בין טיפולי המדיום המותנה , בדומה לרמת הביטוי של β- casein גם רמת הביטוי של ER α גבוהה יותר בתאים שטופלו במדיום מותנה שנאסף מתאי 3T3-L1 שגדלו בנוכחות פרולקטין לעומת מדיום מותנה שנאסף מתאי 3T3-L1 שגדלו ללא נוכחות פרולקטין. רמת הביטוי של ER β לא נבדלה באופן מובהק בין הטיפולים השונים.



4.4.3 איור מספר 8: רמת הביטוי של הגן β- casein בתאי HC11 שטופלו במדיום רגיל ובמדיום מותנה.

ניתן לראות מאיור מספר 8 כי רמת הביטוי הגבוהה ביותר של הגן ל β- casein התקבלה בתאי HC11 שטופלו בשילוב של המדיום הרגיל בתוספת 1 µg/ml פרולקטין, ובשילוב של מדיום מותנה שנאסף מתאי 3T3-L1 שטופלו בפרולקטין בתופסת פרולקטין במדיו ם המותנה. רמת הביטוי בשני טיפולים אלו הגיע עד יותר מפי 10 מקבוצת הביקורת. במקרה זה נראה כי רמת הביטוי של הגן ל β- casein מושפעת מתוספת הפרולקטין ולא מהשפעת המדיום המותנה . כאשר בוחנים את רמת הביטוי של הגן β- casein בטיפולי המדיום המותנה בלבד ניתן לראות כי טיפול במדיום מותנה שנאסף מתאי 3T3-L1 שטופלו בפרולקטין מעלה את רמת הביטוי של הגן . תוצאה זו יכולה להעיד על כך שפרול קטין מעלה את רמת הביטוי של חלבוני החלב גם דרך תאי השומן . הניתוח הסטטיסטי נערך באמצעות מבחן שונות חד גורמי לגורם המשולב של ריכוז הפרולקטין וסוג המדיום כגורם קבוע. גורם זה נבדל באופן מובהק $P<0.0001$.



4.4.4 איור מספר 9: רמת הביטוי של הגן ER α בתאי HC11 שטופלו במדיום רגיל ובמדיום מותנה.

ניתן לראות מאיור מספר 9 כי רמת הביטוי הגבוהה ביותר של הגן ל ER α התקבלה בתאי HC11 שטופלו בשילוב של המדיום המותנה שנאסף מתאי 3T3-L1 שטופלו בפרולקטין בתופסת פרולקטין במדיום המותנה . רמת הביטוי בטיפול זה הי יתה גבוהה פי 5 מקבוצת הביקורת ונבדלה באופן מובהק מיתר הטיפולים. בדומה לרמת הביטוי של β- casein גם כאן ניתן לראות כי בטיפולי המדיום המותנה בלבד, טיפול במדיום מותנה שנאסף מתאי 3T3-L1 שטופלו בפרולקטין מעלה את רמת הביטוי של הגן , לעומת טיפול במדיום מותנה שנאסף מתאי 3T3-L1 שלא טופלו בפרולקטין. בנוסף ניתן לראות כי קיימת מגמה של עליה ברמת הביטוי בין טיפולי המדיום המותנה למדיום הרגיל . תוצאות אלה יכולות להעיד על חשיבות תאי השומן ביחד עם הטיפול בפרולקטין על ויסות רמת הביטוי לקולטן לאסטרוגן ER α. הניתוח הסטטיסטי נערך באמצעות מבחן שונות חד גורמי לגורם המשולב של ריכוז הפרולקטין וסוג המדיום כגורם קבוע. גורם זה נבדל באופן מובהק $P<0.0001$.

רמת הביטוי של הגן ל ER β לא נבדלה באופן מובהק בין הטיפולים השונים, ולכן לא מוצגות תוצאות ברמת הגרף עבור גן זה.

4.5 השפעת פרולקטין על יחסי הגומלין בין תאי האפיתל של בלוטת חלב לבין תאי שומן על רמת הביטוי של חלבון החלב β- casein ושל הקולטנים לאסטרוגן.

השפעת הפרולקטין על יחסי הגומלין בין תאי האפיתל לתאי השומן נבחנה בניסוי שנערך במדיום מותנה (Conditionig Medium C.M.). תאי 3T3-L1 גודלו על פי המתואר בניסוי הקודם (4.3), וטופלו בריכוזים שונים של פרולקטין 0, 1, 5, 10 µg/ml. עבור כל טיפול היו 3 חזרות מלבד הטיפול ללא פרולקטין ממנו היו 6 חזרות. בתום הניסוי נאסף המדיום מכל 3 צלחות שטופלו באותו הטיפול למבחנה אחת. לאחר איסוף המדיום המותנה כמתואר בשיטות וחומרים הוספו למדיום המותנה ההורמונים הבאים הידרוקורטיזון בריכוז 1 µg/ml, אינסולין בריכוז 5 µg/ml, ופרולקטין בריכוז 1 µg/ml.

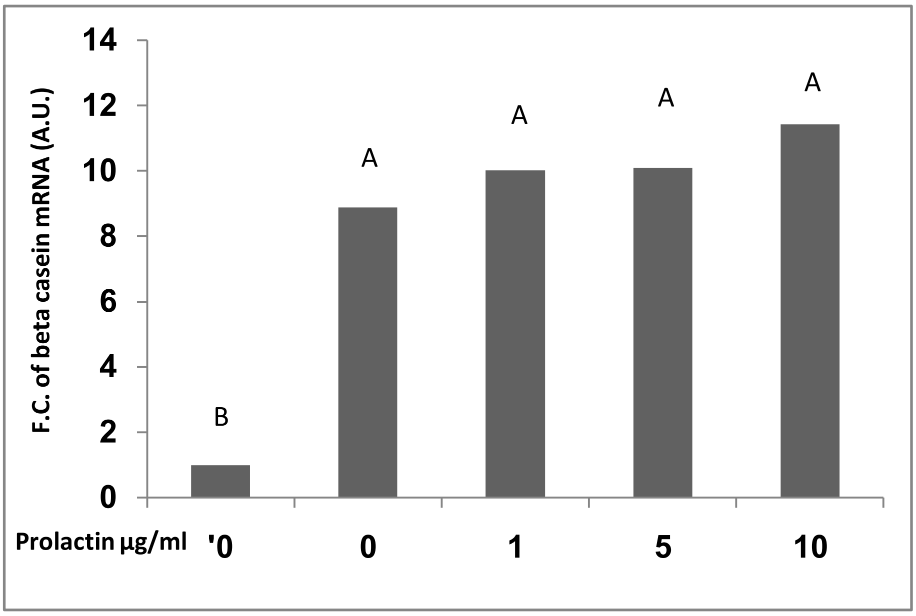
בניסוי זה, ריכוזי הפרולקטין מייצגים את ריכוז הפרולקטין בו גדלו תאי 3T3-L1, מהם נאסף המדיום. ריכוז '0 פרולקטין מייצג מדיום מותנה שנאסף מתאי 3T3-L1 שגדלו ללא נוכחות פרולקטין ובנוסף לא הוסף פרולקטין למדיום המותנה לאחר שנאסף, טיפול זה מהווה את קבוצת הביקורת בניסוי זה.

4.5.1 טבלה מספר 7: היחס בין רמת הביטוי של הגנים ל β- casein, ER α, ER β לבין הגן β- actin בתאי HC11 (ערכי Ct ratio).

ריכוזי פרולקטין	Ct ratio β- casein	Ct ratio ER α	Ct ratio ER β
0' µg/ml prolactin	1.4168±0.0037^A	1.3875±0.0066	1.4472±0.0099
0 µg/ml prolactin	1.2827±0.0037^B	1.3902±0.0066	1.4779±0.0099
1 µg/ml prolactin	1.2751±0.0037^B	1.3946±0.0066	1.4579±0.0099
5 µg/ml prolactin	1.2752±0.0037^B	1.4000±0.0066	1.4761±0.0099
10 µg/ml prolactin	1.2669±0.0037^B	1.3904±0.0066	1.4774±0.0099
	P<0.0001	N.S.	N.S.

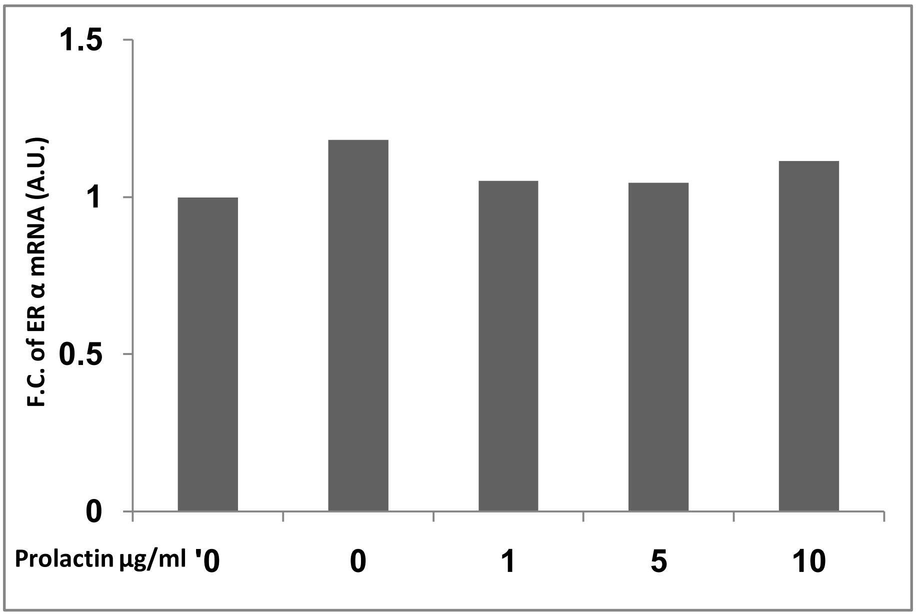
ערכים בטבלה מיצגים ממוצע ± שגיאת תקן (n=6) ערכים המסומנים באותיות שונות נבדלים בהבדל מובהק יחס נמוך מעיד על התבטאות גבוהה יותר ולהפך. הניסוי נערך פעמים בכל ניסוי 3 חזרות.

טבלה מספר 7 מציגה את רמת הביטוי של הגן לβ- casein, הגן ל ER α והגן ל והגן ל ER β ביחס לרמת הביטוי של הגן β-actin. התוצאות הגרפיות (F.C.) עבור כל גן מוצגות באיורים להלן. הבדל מובהק ברמת הביטוי של הגנים, בין טיפולי המדיום המותנה התקבל רק בגן לβ-casein. ניתן לראות כי רמת הביטוי של הגן הי יתה גבוהה יותר מהביקורת בכל טיפולי המדיום המותנה שטופל בפרולקטין. בין טיפולי הפרולקטין ניתן לראות מגמה של עליה תלוית ריכוז אך לא התקבל הבדל מובהק. רמת הביטוי של הגן לER α ולגן לER β לא נבדלה באופן מובהק בין הטיפולים השונים בניסוי זה.



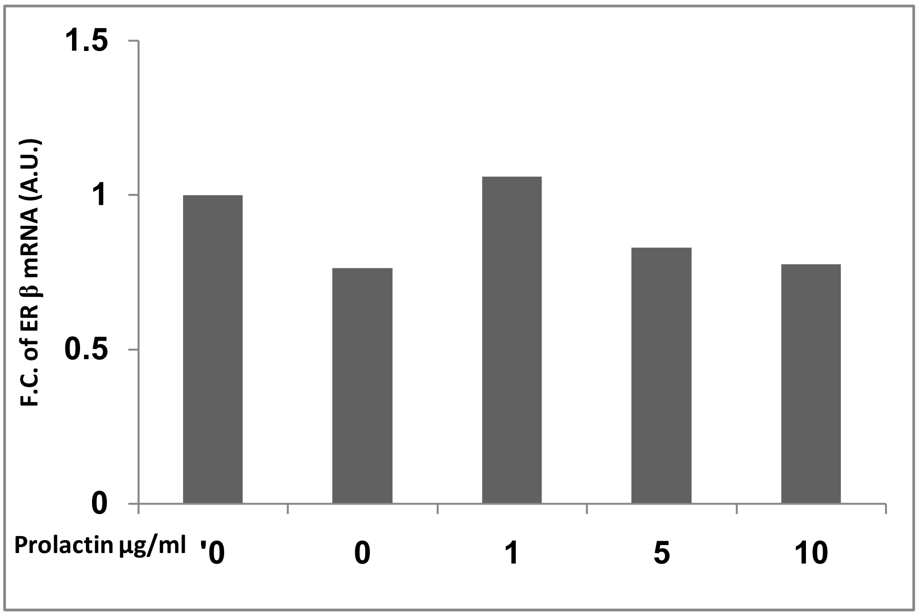
4.5.2 איור מספר 10: רמת הביטוי של הגן β- casein בתאי HC11 שטופלו במדיום מותנה.

ניתן לראות מאיור מספר 10 כי טיפול במדיום מותנה שנאסף מתאים שטופלו בפרולקטין גרם לעליה ברמת הביטוי של הגן ל β-casein. הבדל מובהק התקבל רק בין הטיפולים בהם הוסף פרולקטין למדיום המותנה לבין הטיפול בו לא הוסף פרולקטין למדיום המותנה ('0 פרולקטין). בין טיפולי הפרולקטין השונים לא נמצא הבדל מובהק , אך ניתן לראות כי קיימת מגמה של עליה ברמת הביטוי של הגן ל β-casein עד פי 1.5 בין ריכוז µg/ml 0 ל 10 µg/ml. הניתוח הסטטיסטי נערך באמצעות מבחן ניתוח שונות חד גורמי לגורם המדיום המותנה כגורם קבוע. גורם המדיום המותנה נבדל באופן מובהק P=0.001.



4.5.3 איור מספר 11: רמת הביטוי של הגן ER α בתאי HC11 שטופלו במדיום מותנה.

ניתן לראות מאיור מספר 11 כי רמת הביטוי של הגן ל ER α, לא נבדלה באופן מובהק בין הטיפולים השונים. הניתוח הסטטיסטי נערך באמצעות מבחן ניתוח שונות חד גורמי לגורם המדיום המותנה כגורם קבוע. לא נמצא הבדל מובהק בגורם המדיום המותנה בי ן הטיפולים השונים.



4.5.4 איור מספר 12: רמת הביטוי של הגן ER β בתאי HC11 שטופלו במדיום מותנה.

ניתן לראות מאיור מספר 12 כי רמת הביטוי של הגן ל ER β, לא נבדלה באופן מובהק בין הטיפולים השונים. נערך הניתוח הסטטיסטי נערך באמצעות מבחן ניתוח שונות חד גו רמי לגורם המדיום המותנה כגורם קבוע . לא נמצא הבדל מובהק בגורם המדיום המותנה בין הטיפולים השונים.

4.6 השפעת ההורמונים אסטרוגן ופרולקטין על רמת הביטוי של הגן לחלבון החלב β-casein והגנים לקולטנים של אסטרוגן.

נבחנה ההשפעה של שילוב שני ההורמונים אסטרוגן ופרולקטין על תאי HC11. תאי HC11 גודלו עד קונפלואנטיות. לאחר יומיים במדיום הרעבה הוחלף המדיום למדיום ניסוי בתוספת של 1 µg/ml פרולקטין, לצורך התמיינות למשך 48 שעות. לאחר מכן חולקו הצלחות לשתי קבוצות לצורך הניסוי. בכל קבוצה טופלו התאים במדיום הניסוי בתוספת ריכוזים שונים של אסטרוגן 0, 1, 10,100 ng/ml. קבוצה אחת גדלה בנוכחות 1 µg/ml פרולקטין והקבוצה השנייה ללא נוכחות פרולקטין. לאחר 48 שעות במדיום הניסוי הופק RNA.

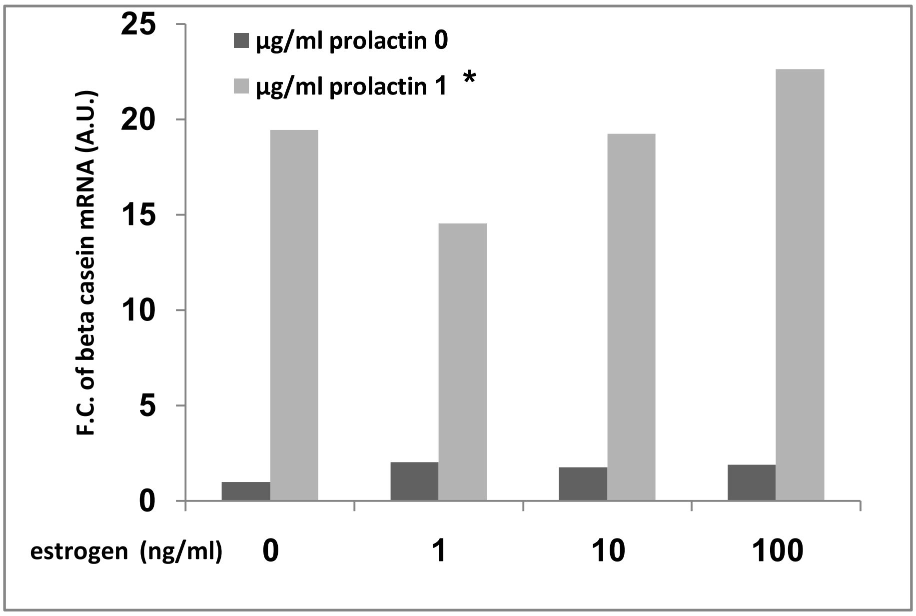
לצורך הפקת חלבון התאים גדלו בנוכחות ההורמונים למשך 96 שעות כאשר המדיום הוחלף אחרי יומיים.

4.6.1 טבלה מספר 8: היחס בין רמת הביטוי של הגן ל β-casein לבין הגן β-actin בתאי HC11 (ערכי Ct ratio).

1 µg/ml Prolactin	0 µg/ml Prolactin *	ריכוזי אסטרוגן וריכוזי פרולקטין
1.2951±0.0173	1.5208±0.0173	0 ng/ml estrogen
1.3183±0.0173	1.4590±0.0173	1 ng/ml estrogen
1.3082±0.0173	1.4676±0.0173	10 ng/ml estrogen
1.2916±0.0173	1.4674±0.0173	100 ng/ml estrogen
N.S.	N.S.	

ערכים בטבלה מיצגים ממוצע ± שגיאת תקן (n=6) ערכים המסומנים באותיות שונות נבדלים בהבדל מובהק יחס נמוך מעיד על התבטאות גבוהה יותר ולהפך. הניסוי נערך פעמים בכל ניסוי 3 חזרות.

טבלה מספר 8 מציגה את רמת הביטוי של הגן לβ- casein, ביחס לרמת הביטוי של הגן β-actin. התוצאות הגרפיות (F.C.) עבור כל גן מוצגות באיור להלן.



4.6.2 איור מספר 13: רמת הביטוי של הגן β-casein בתאי HC11 שטופלו בריכוזים עולים של אסטרוגן עם או בלי פרולקטין.

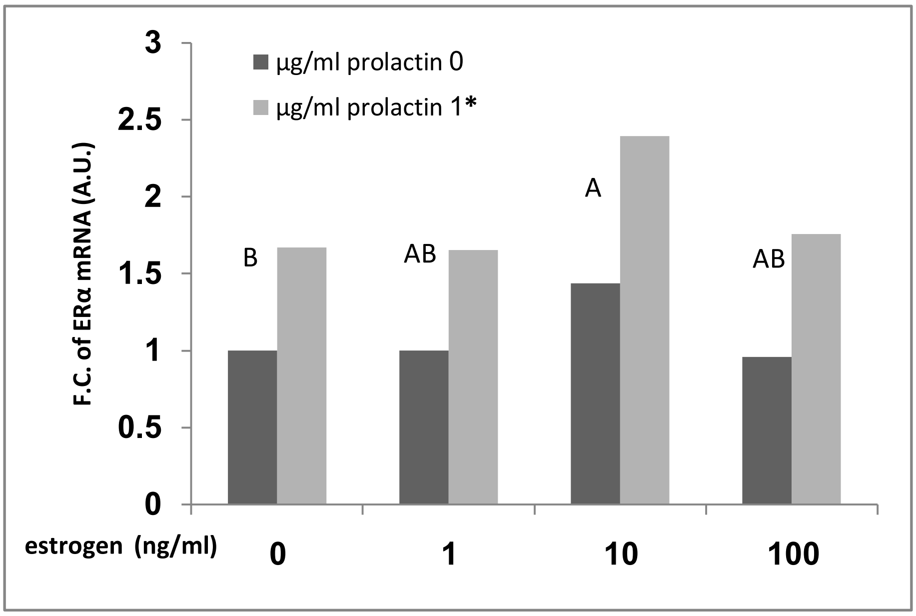
ניתן לראות מאיור מספר 13 כי רמת הביטוי של הגן ל β- casein, בטיפול של 1 μg/ml פרולקטין הייתה גבוהה באופן מובהק מהטיפול ללא פרולקטין בכל טיפולי האסטרוגן . בשני טיפולי הפרולקטין (0,1 μg/ml) רמת הביטוי של הגן β- casein לא נבדלה באופן מובהק בין טיפולי האסטרוגן. ללא פרולקטין, ניתן לראות כי רמת הביטוי של הגן β-casein עולה בין 0 ng/ml אסטרוגן לבין שאר טיפולי האסטרוגן (1,10,100 ng/ml). כאשר הוסף פרולקטין למדיום, ניתן לראות מגמה של עליה ברמת הביטוי של הג ן β-casein בין הריכוזים 1-100 ng/ml. בין 0 ng/ml לבין 1 ng/ml נצפתה מגמה של ירידה ברמת הביטוי של הגן β-casein. הניתוח הסטטיסטי נערך באמצעות מבחן ניתוח שונות דו גורמי לגורם הפרולקטין וגורם האסטרוגן כגורמים קבועים . לא נמצאה השפעת גומלין בין שני הגורמים . גורם הפרולקטין נבדל באופן מובהק $P<0.001$. מכיוון שלא נמצאה השפעת גומלין בין גורם האסטרוגן לפרולקטין נערך מבחן ניתוח שונות חד גורמי בין טיפולי האסטרוגן בכל טיפול של פרולקטין בנפרד.

4.6.3 טבלה מספר 9: היחס בין רמת הביטוי של הגן ל ER α לבין הגן β- actin בתאי HC11 (ערכי Ct ratio).

ריכוזי אסטרוגן וריכוזי פרולקטין	0 µg/ml Prolactin	1 µg/ml Prolactin*
0 ng/ml estrogen	1.5374±0.0093[A]	1.4833±0.0093
1 ng/ml estrogen	1.5211±0.0093[AB]	1.4911±0.0093
10 ng/ml estrogen	1.4973±0.0093[B]	1.4579±0.0093
100 ng/ml estrogen	1.5317±0.0093[AB]	1.4821±0.0093
	P=0.0206	N.S.

ערכים בטבלה מיצגים ממוצע ± שגיאת תקן (n=6) ערכים המסומנים באותיות שונות נבדלים בהבדל מובהק יחס נמוך מעיד על התבטאות גבוהה יותר ולהפך. הניסוי נערך פעמים בכל ניסוי 3 חזרות.

טבלה מספר 9 מציגה את רמת הביטוי של הגן ER α ביחס לרמת הביטוי של הגן β-actin. התוצאות הגרפיות (F.C.) עבור כל גן מוצגות באיור להלן.



4.6.4 איור מספר 14: רמת הביטוי של הגן ER α בתאי HC11 שטופלו בריכוזים עולים של אסטרוגן עם או בלי פרולקטין.

ניתן לראות מאיור מספר 14 כי רמת הביטוי של הגן ER α בטיפול של 1 µg/ml פרולקטין הייתה גבוהה מהטיפול ללא פרולקטין בכל טיפולי האסטרוגן פי 1.7 בקרוב בכל הטיפולים ונבדלה באופן מובהק. ללא תוספת פרולקטין במדיום (0 µg/ml) רמת הביטוי של הגן ER α נבדלת באופן מובהק *P*=0.0206. רמת הביטוי של הגן עולה עד ריכוז של 10 ng/ml אסטרוגן פי 2.5 בקרוב, בריכוז של 100 ng/ml אסטרוגן, רמת הביטוי של הגן יורדת .

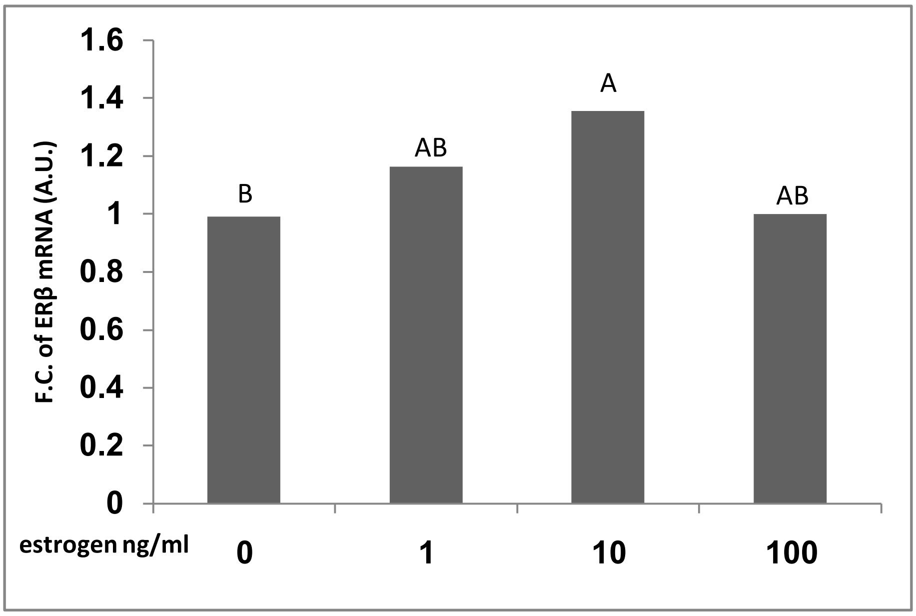
בנוכחות פרולקטין נצפתה מגמה דומה ברמת הביטוי של הגן , אך בשונה מההמקרה הקודם , לא נמצא הבדל מובהק בין טיפולי האסטרוגן . הניתוח הסטטיסטי נערך באמצעות מבחן ניתוח שונות דו גורמי לגורם הפרולקטין וגורם האסטרוגן כגורמים קבועים . לא נמצאה השפעת גומלין בין שני הגורמים. גורם הפרולקטין נבדל באופן מובהק $P<0.001$. מכיוון שלא נמצאה השפעת גומלין בין גורם האסטרוגן לפרולקטין נערך מבחן ניתוח שונות חד גורמי בין טיפולי האסטרוגן בכל טיפול של פרולקטין בנפרד.

4.6.5 טבלה מספר 10: היחס בין רמת הביטוי של הגן ל ER β לבין הגן β-actin בתאי HC11 (ערכי Ct ratio), ערכים ממוצעים של שני טיפולי הפרולקטין (0,1µg/ml).

ריכוזי אסטרוגן	Mean 0+1 µg/ml Prolactin
0 ng/ml estrogen	1.5253 ± 0.0090^{A}
1 ng/ml estrogen	1.5072 ± 0.0085^{AB}
10 ng/ml estrogen	1.4901 ± 0.0085^{B}
100 ng/ml estrogen	1.5180 ± 0.0081^{AB}
	$P=0.0389$

ערכים בטבלה מיצגים ממוצע ± שגיאת תקן (n=6) ערכים המסומנים באותיות שונות נבדלים בהבדל מובהק יחס נמוך מעיד על התבטאות גבוהה יותר ולהפך. הניסוי נערך פעמים בכל ניסוי 3 חזרות.

טבלה מספר 10 מציגה את רמת הביטוי של הגן ל ER β ביחס לרמת הביטוי של הגן β-actin. התוצאות הגרפיות (F.C.) עבור כל גן מוצגות באיור להלן.



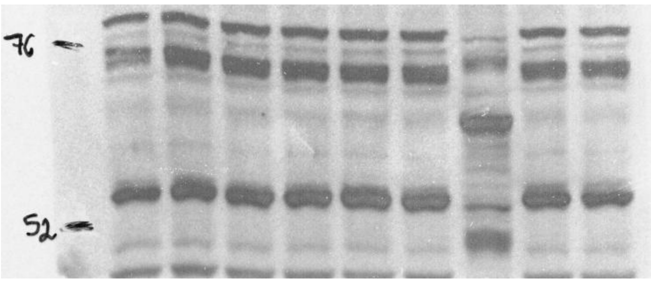
4.6.6 איור מספר 15: רמת הביטוי של הגן ER β בתאי HC11 שטופלו בריכוזים עולים של אסטרוגן עם או בלי פרולקטין, ערכים ממוצעים של שני טיפולי הפרולקטין.

ניתן לראות מאיור מספר 15 כי בדומה ל ER α נצפתה עליה ברמת הביטוי של הגן ER β בין טיפולי האסטרוגן השונים עד לריכוז של 10 ng/ml אסטרוגן פי 1.4, ובריכוז של 100 ng/ml יורדת רמת הביטוי של הגן. ריכוז של 10 ng/ml אסטרוגן נבדל באופן מובהק מריכוז של 0 ng/ml. הניתוח הסטטיסטי נערך באמצעות מבחן ניתוח שונות דו גורמי לגורם הפרולקטין וגורם האסטרוגן כגורמים קבועים . לא נמצאה השפעת גומלין בין שני הגורמים . לא נמצא הבדל מובהק בגורם הפרולקטין . מכיוון שלא נמצאה השפעת גומלין בין גורם האסטרוגן לפרולקטין ולא נמצא הבדל מובהק בין טיפולי הפרולקטין חושבו ממוצעי הפרולקטין בכל טיפול אסטרוגן ונערך מבחן ניתוח שונות חד גורמי . נמצא הבדל מובהק בין טיפולי האסטרוגן השונים P=0.0389.

4.7 תוצאות Western Blot לביטוי החלבונים ER α ו ER β

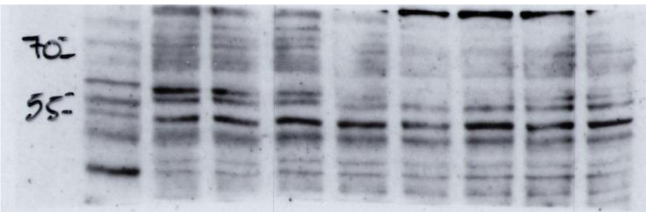
נבדקו שני סוגי נוגדנים שונים עבור כל חלבון, לא נמצא נוגדן ספציפי עבור החלבונים האלו.

A



Prl µg/ml	0	0	0	0	1	1	1	1
E ng/ml	0	1	10	100	0	1	10	100

B

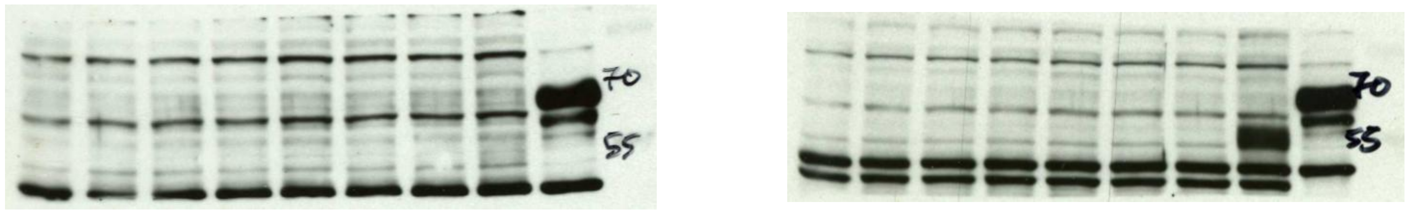


Prl µg/ml	0	0	0	0	1	1	1	1
E ng/ml	0	1	10	100	0	1	10	100

4.7.1 איור מספר 16 : ביטוי החלבון ל ER α בתאי HC11 שגודלו עם או בלי פרולקטין בריכוזים עולים של אסטרוגן.

נבדק נוגדן אחד עבור החלבון ER α משתי אצוות שונות. גודל החלבון הוא 66kDa. ניתן לראות כי בשתי האצוות השונות שנבדקו, A ו B. לא נמצאה ספציפיות של הנוגדן ולא היה ניתן להסיק לגבי הביטוי של החלבון. בנוסף לדוגמאות הורצה גם ביקורת חיובית של הפקת חלבון מתאי MCF7, בטור האחרון מימין, וגם בביקורת חיובית זו לא נמצאה ספציפיות של החלבון.

A B



A:

Prl µg/ml 0 0 0 0 1 1 1 1

E ng/ml 0 1 10 100 0 1 10 100

B:

Prl µg/ml 0 0 0 0 1 1 1 1

E ng/ml 0 1 10 100 0 1 10 100

4.7.2 איור מספר 17: ביטוי החלבון ל ERβ בתאי HC11 שגודלו עם או בלי פרולקטין בריכוזים עולים של אסטרוגן.

נבדקו שני נוגדנים שונים עבור החלבון ל ER β. גודל החלבון הוא 56kDa. ניתן לראות כי עבור שני הנוגדנים שנבדקו, A ו B, לא נמצאה ספציפיות של הנוגדן, ולא ניתן היה להסיק לגבי הביטוי של החלבון. בנוסף לדוגמאות הורצה גם ביקורת חיובית של הפקת חלבון מתאי 3T3, בטור האחרון מימין, וגם בביקורת חיובית זו לא נמצאה ספציפיות של החלבון.

5. דיון

מחקרים רבים בשנים האחרונות מתמקדים בהשפעה שיש ליחסי הגומלין בין תאי האפיתל לבין רקמת השומן בבלוטת החלב על התפתחות בלוטת החלב בשלביה השונים, במינים שונים, הן במעלי גרה והן בעכברים. היום ברור כי רקמת השומן חיונית להתפתחותה התקינה של בלוטת החלב בשלביה השונים. מחקר שנעשה לאחרונה במעבדתנו בחן את השפעת יחסי הגומלין בין שתי הרקמות האלה בתקופת הלקטציה, המחקר נעשה בתרביות רקמה מעטין פרה. מחקר זה הראה כי כאשר הוספו ההורמונים אסטרוגן, פרולקטין ולפטין למדיום בו גדלו תרביות הרקמה, רמת הביטוי של הגן לחלבון החלב β - lactoglobulin עלתה ביחס לתרביות שגדלו בנוכחות פרולקטין ולפטין בלבד. בנוסף כאשר נבחנה רמת הביטוי של הגן לארומאטז, אנזים מפתח בסינתזת האסטרוגן, בתרביות רקמה שגדלו בנוכחות תאי שומן בריכוזים עולים של פרולקטין, נמצא כי ברקמת השומן רמת הביטוי של הגן עלתה ביחס לריכוזי הפרולקטין, וכי ברקמת העטין לא השתנה רמת הביטוי של הגן ביחס לריכוזי הפרולקטין. מתוצאות מחקר זה ניתן היה להסיק כי אחד הגורמים המתווכים בין רקמת השומן לרקמת האפיתל בבלוטת החלב הוא ההורמון אסטרוגן המפורש באופן פאראקריני מתאי השומן בבלוטת החלב (Feuermann et al., 2009).

בעקבות ממצאי המחקר הקודם, המחקר הנוכחי ביקש לבדוק את מעורבותו של פרולקטין והשפעתו על יחסי הגומלין בין רקמת השומן לבין רקמת האפיתל בבלוטת החלב, דרך בחינת הפרשתו של האסטרוגן והשפעתו. השערת המחקר הייתה כי בעקבות הגירוי של הפרולקטין, הורמון מרכזי במשך תקופת הלקטציה, רקמת השומן מפרישה הורמונים שונים וביניהם אסטרוגן. האסטרוגן המופרש מרקמת השומן והפרולקטין גורמים לשינוי בביטוי של חלבוני החלב ושל הקולטנים לאסטרוגן בתאי האפיתל. השינוי בביטוי של גנים אלו יכול להשפיע בדרכים שונות על תקופת הלקטציה. מחקר זה ביקש להעמיד מודל לבחינת יחסי גומלין אלו. נלקחו שני סוגי קווית תאים עכבריים. HC11 קו תאי אפיתל מבלוטת חלב של עכברה ו-3T3-L1 קו תאים פרה- אדיפוציטים מעכברים. המחקר התחלק לשלושה חלקים עיקריים, בכל שלב נבחנה רמת הביטוי של חלבון החלב β casein ושל הקולטנים לאסטרוגן בתאי האפיתל, ורמת הביטוי של אדיפונקטין וארומאטז בתאי השומן. בשלב הראשון נבחנה ההשפעה של ההורמון פרולקטין בכל אחד מסוגי התאים בנפרד. בשלב השני נבחנה ההשפעה של פרולקטין על יחסי הגומלין בין שני סוגי התאים ובשלב השלישי נבחנה ההשפעה של ההורמונים פרולקטין ואסטרוגן על תאי האפיתל של בלוטת החלב.

5.1 השפעת הפרולקטין על תאי בלוטת החלב ותאי השומן.

ביונקים שונים קיים פרופיל הורמונאלי שונה הדרוש ליצירת לקטציה תקינה. יחד עם זאת בכל היונקים פרולקטין הוא חלק עיקרי מפרופיל הורמונאלי זה, והוא ההורמון המרכזי המביא את בלוטת החלב להפקת חלב בסוף ההיריון ובמשך תקופת הלקטציה. בעכברות רמות הפרולקטין עולות בסוף ההיריון לקראת ההמלטה ובעקבות עליה זו מתחיל שעתוק של חלבוני החלב, יחד עם זאת חלב לא מופרש עד לירידת רמות הפרוגסטרון בדם. בתהליך הלקטציה פרולקטין מעורר סינתזה של חלבוני החלב, של סוכר החלב, לקטוז ושל שומני החלב (Freeman et al., 2000; Oakes et al., 2008). במחקר זה נבחנה רמת הביטוי של חלבון החלב β-casein בתאי אפיתל של בלוטת החלב שטופלו בריכוזים עולים של פרולקטין, ואכן בדומה למידע הקיים, ניתן לראות כי רמת הביטוי של הקזאין עלתה כמעט בשני סדרי גודל עם העלייה ברמת הפרולקטין (איור מספר 1). בנוסף בכל שלבי המחקר, כאשר נבחנה רמת הביטוי של חלבון החלב β-casein בעקבות שינויים שנעשו בריכוזי הפרולקטין בניסויים השונים, ניתן לראות עליה ברמת הביטוי של הגן עם הוספת הפרולקטין (איורים 8, 10, 13). בחלק השני בשלב זה של הניסוי נבחנה ההשפעה של פרולקטין על רמת הביטוי של הקולטנים לאסטרוגן בתאי אפיתל של בלוטת החלב. שני הקולטנים לאסטרוגן ER α ו ER β מבוטאים בתאי האפיתל בבלוטת החלב בשלבי ההתפתחות השונים. השוני בביטוי הקולטנים בשלבי ההתפתחות השונים הוא בכמות של כל אחד מסוגי הקולטנים בכלל התאים בבלוטה ובמספר התאים המבטאים את שני סוגי הקולטנים. בזמן הלקטציה בעכבר רוב התאים מבטאים את שני סוגי הקולטנים (Saji et al., 2000). בדומה לממצאים כי שני הקולטנים לאסטרוגן מבוטאים בזמן הלקטציה מצאנו כי ריכוזים עולים של פרולקטין העלו את רמת הביטוי של שני הקולטנים לאסטרוגן ER α ו ER β (איור מספר 2,3). אימונוהיסטוכימיה של הקולטנים לאסטרוגן הראתה כי תאי האפיתל מבטאים את שני סוגי הקולטנים לאסטרוגן. (איור מספר 4). מחקרים שונים שבחנו את השפעת הפרולקטין על הקולטנים לאסטרוגן הראו כי פרולקטין העלה את מספר הקולטנים לאסטרוגן בבלוטת החלב (Koseki et al., 1987; Muldoon, 1981). מחקרים שבחנו את השפעת הפרולקטין בגוף הצהוב הראו כי פרולקטין מווסת את הביטוי של הקולטנים לאסטרוגן. מחקרים אלו הראו כי ל- STAT5 המופעל בעקבות מעבר הסיגנל של פרולקטין, יש אתר קשירה בפרומוטור של הגנים המקודדים לקולטני האסטרוגן. עליה של STAT5 בעקבות עליה של פרולקטין גרמה לעליה בביטוי של הקולטנים לאסטרוגן בגוף הצהוב.(Frasor and Gibori, 2003)

החלק השלישי בשלב זה של הניסוי בחן את השפעת הפרולקטין על תאי 3T3-L1, אחרי התמיינות. לאחר התמיינות התאים לתאי שומן, הוסף למדיום הגידול של התאים פרולקטין בריכוזים עולים. בבסיס הניסוי עמדה ההשערה כי פרולקטין גורם לשינויים ברקמת השומן המובילים אותה להפרשת הורמונים שונים. בשלב זה של הניסוי נבחנה ההשפעה של

הפרולקטין על רמות הביטוי של הגן לאדיפונקטין . פרולקטין יכול להשפיע על התמיינות תאי שומן, אדיפוגנזיס. מחקר שנעשה *in vitro* בתאי 3T3-L1 הראה כי פרולקטין גורם לעליה ברמת הביטוי של גורמי שיעתוק חיוניים לתהליך האדיפוגנ זה כמו CCAAT/enhancer-binding protein β ו peroxisome-proliferator-activated receptor γ (Nanbu-Wakao et al., 2000) מחקרים נוספים מראים כי פרולקטין יכול לווסת באופ ן ישיר את המטבוליזם ברקמת השומן .(Nilsson et al., 2005) במחקר הנוכחי הראנו כי פרולקטין גרם לעליה ברמת הביטוי של הגן לאדיפונקטין כתלות בריכוז הפרולקטין עד לריכוז 5 µg/ml (איור מספר 5). אדיפונקטין מתבטא בתאי שומן בוגרים והוא משמש כמדד להתמיינות תאי שומן (Schaffler et al., 2006), יחד עם זאת מחקרים שונים מראים כי דווקא בזמן שרמת הפרולקטין גבוהה, בזמן הלקטציה, רמת הביטוי של הגן לאידפונקטין יורדת . מחקר שבחן את השפעת הפרולקטין בתאי שומן אדם *in vitro* ובעכברים *in vivo* הראה, בניגוד לממצאים שלנו, כי בעקבות גירוי של פרולקטין יש ירידה ברמת הביטוי של הגן לאדיפונקטין (Nilsson et al., 2005) מחקר נוסף שבחן את רמת הביטוי של הגן לאדיפונקטין בעטין פרה הראה כי רמת הביטוי של הגן בזמן הלקטציה הייתה נמוכה באופן מובהק מרמת הביטוי של הגן בזמן הייבוש ולפני ההיריון. ניתן להסביר תופעה זו בכך שמכיוון שתהליך הלקטציה דורש אנרגיה רבה, מסת רקמת השומן בבלוטת ה חלב ובגוף בכלל יורדת ולכן יורדת רמת הביטוי הכללית של אדיפונקטין כפי שמוצג במחקרים השונים . בעבודה זו נבחנה רמת הביטוי של הגן *in vitro* ובתאי שומן שאינם ספציפיים לבלוטת החלב ולכן נצפתה עליה ברמת הביטוי של הגן לאדיפונקטין בעקבות תוספת הפרולקטין , דבר זה יכול לר מז על תפקיד שיש לפרולקטין בהתמיינות תאי השומן.

המקור העיקרי של הפרשת אסטרוגן בגוף הוא השחלה , היום ידוע כי תאי שומן ממוינים ברקמות שונות בגוף ובמינים שונים יכולים להפריש אסטרוגן . הפרשת אסטרוגן בבלוטת החלב נבחנה בעיקר באדם בהקשר של סרטן השד וכן במעלי גרה . במעלי גרה נמצא כי לקראת ההמלטה קיימת הפרשה של אסטרוגן מהעטין. בנוסף נמצא כי ברקמת השומן רמת הביטוי של הגן לארומאט ז, אנזים מפתח בייצור האסטרוגן, עולה בהשפעת פרולקטין (Feuermann et al., 2009; Janowski et al., 2002; Maule Walker et al., 1983). לעומת זאת מחקרים שנעשו בעכברות ובקווי תאים עכבריים הראו כי בזמן הלקטציה רמות האסטרוגן בפלסמה נמוכות, וכי חוסר של אסטרוגן שנובע מכריתת שחלות אינו משפיע על ייצור החלב (Hatsumi and Yamamuro, 2006). במחקר הנוכחי לא נצפתה השפעה של פרולקטין על רמת הביטוי של הגן לארומאטז בתאי השומן הממוינים . בנוסף נבדקה רמת הביטוי של הגן בדוגמאות שהופקו מבלוטת החלב של עכברה וגם שם לא נצפה ביטוי של הגן לארומאט ז (איור מספר 6). בדומה לממצאים שלנו Peaker and Taylor לא מצאו פעילות של ארומאטז בבלוטת החלב של עכברות בסוף ההיריון ובתחילת

הלקטציה (Peaker and Taylor, 1990). נראה כי הפרשת האסטרוגן מבלוטת החלב וחשיבותו לתהליך הלקטציה מתרחשת במעלי גרה אך אינה מתרחשת בכל המינים.

5.2 יחסי הגומלין בין רקמת האפיתל לרקמת השומן.

בשלב השני של המחקר נבדקה השפעת הפרולקטין על יחסי הגומלין בין תאי האפיתל של בלוטת החלב לבין תאי השומן . יחסי הגומל ין בבלוטת החלב בין רקמת השומן לרקמת האפיתל נחקרו רבות בשלבים שונים של התפתחות בלוטת החלב . היום ידוע כי התפתחות תקינה של בלוטת החלב דורשת נוכחות של רקמת שומן וכי רקמת השומן מפרישה חומרים מסיסים שונים כגון פרולקטין, IGF-1, HGF, לפטין ועוד, היכולים להשפיע באופן פארקריני על תאי האפיתל (Hovey and Aimo, 2010). במחקר הנוכחי נבחנה השפעת יחסי הגומלין בשני שלבים על ידי שימוש במדיום מותנה . בשלב הראשון נבחנה השפעת הפרולקטין והשפעת יחסי הגומלין (מדיום מותנה) ביחס למדיום רגיל. הראנו כי שילוב של מדיום מותנה שנאסף מתאי שומן שגדלו בנוכחות פרולקטין והוסף לו פרולקטין, העלה את רמת הביטוי של ER α ביחס לטיפול במדיום רגיל . כאשר המדיום המותנה נאסף מתאי שומן שגדלו ללא נוכחות פרולקטין והוסף לו פרולקטין , רמת הביטוי של ER α הייתה דומה לרמת הביטוי שהתקבלה במדיום הרגיל בתוספת פרולקטין (איור מספר 9). מניסוי זה אפשר להסיק כי פרולקטין גרם להפרשה של גורם מסוים מתאי השומן למדיום אשר העלה את רמת הביטוי של ER α. בשלב השני של הניסוי נבחנה השפעת יחסי הגומלין בעקבות גירוי של פרולקטין. בניסוי זה המדיום המותנה נאסף מתאי שומן שגדלו בריכוזים עולים של פרולקטין . רמת הביטוי של הקולטנים לאסטרוגן נבחנה בתאי אפיתל שגדלו במדיום המותנה ביחס למדיום מותנה שנאסף מתאי שומן שגדלו ללא נוכחות פרולקטין . בשלב זה לא התקבל שינוי ברמת הביטוי של הקולטנים לאסטרוגן ER α ו ER β בתאי האפיתל בי ן הטיפולים השונים (איור מספר 11,12). מחקרים שונים שבדקו את השפעת יחסי הגומלין בין רקמת השומן לרקמת האפיתל בדקו בעיקר את השפעת יחסי הגומלין על התפתחות הבלוטה מבחינה מורפולוגית ותפקודית. חלק מהמחקרים הראו כי תאי השומן גורמים לפרוליפרציה של תאי האפיתל וחלקם טוענים כי תאי השומן גורמים לה תמיינות ויצירת מבנים אלבאולרים (Darcy et al., 2000; Landskroner-Eiger et al., 2010; Levine and Stockdale, 1984; Pavlovich et al., 2010; Zangani et al., 1999). בנוסף הראו חלק מהמחקרים כי קיימים חומרים המסיסים המופרשים מרקמת השומן והם מציעים כי חומרים אלו יכולים לתווך את השפעתה של רקמת השומן על תאי האפיתל . המחקר הנוכחי יכול להצביע על כך שבעקבות גירוי פרולקטין תאי השומן מפרישים חומרים מסיסים למדיום המשפיעים על ביטוי הקולטנים לאסטרוגן, אך מחקר נוסף יידרש על מנת לבסס טענה זו באופן מוצק . כאשר נבחנה רמת הביטוי של הגן לחלבון החלב β-casein, בשלב הראשון הראנו כי ש ילוב של מדיום מותנה שנאסף מתאי שומן שגדלו בנוכחות פרולקטין והוסף לו פרולקטין העלה את רמת הביטוי של

הגן ביחס לטיפול במדיום מותנה שנאסף מתאי שומן שגדלו ללא נוכחות פרולקטין והוסף להם פרולקטין (איור מספר 8). בשלב השני ניתן לראות מגמה של עליה ברמת הביטוי של הגן התלויה בריכוזי הפרולקטין בה גדלו תאי השומן (איור מספר 12). בדומה לממצא זה הראו Zangani וחובריו כי בתאי אפיתל שגדלו בנוכחות תאי שומן נצפתה עליה משמעותית בצבירת הקזאין בתאי האפיתל וכי שינוי זה נגרם בעקבות הפרשת חומרים מסיסים מתאי השומן (Zangani et al., 1999). ניסויים אלו יכולים להצביע על כך כי גם לתאי השומן, בהשפעת פרולקטין, יש חלק בהעלאת רמת הביטוי של הגנים לחלבוני החלב.

5.3 השפעת אסטרוגן ופרולקטין על ביטוי קולטנים בתאי האפיתל.

בשלב הראשון של המחקר הראנו כי שינוי בריכוזי הפרולקטין גרם לעליה ברמת הביטוי של הקולטנים לאסטרוגן. בשלב השלישי נבדקה ההשפעה של שילוב אסטרוגן ופרולקטין על רמת הביטוי של הקולטנים לאסטרוגן. פרולקטין ואסטרוגן ידועים כשני הורמנים מרכזיים בהתפתחותה של בלוטת החלב. בהנחה כי פרולקטין יכול להעלות את ההפרשה של אסטרוגן מתאי השומן בבלוטת החלב רצינו לבדוק את ההשפעה שיש לשני הורמנים אלו על הקולטנים לאסטרוגן בתאי האפיתל. המנגנונים בהם משפיעים אסטרוגן ופרולקטין אחד על השני יכולים להתקיים ברמות שונות ולשני הכיוונים (Carver et al., 2009). במחקר הנוכחי הראנו כי רמת הביטוי של שני הקולטנים לאסטרוגן עלתה ביחס לעליה בריכוזי האסטרוגן. לעומת זאת השפעת הפרולקטין על הקולטנים לאסטרוגן נצפתה רק ב ER α, תוספת הפרולקטין העלתה את רמת הביטוי של ER α (איור מספר 14,15). Hatsumi ו Yamamuro בחנו את רמת הקולטנים לאסטרוגן בעכברות בזמן לקטציה בהשפעת תוספות של אסטרוגן חיצוני, ומצאו כי רמת הביטוי של ER α גבוהה יותר מזו של ER β. בשונה הממצאים שלנו, הם הראו כי תוספת של אסטרוגן חיצוני גרמה לירידה חדה ברמתם של שני הקולטנים (Hatsumi and Yamamuro, 2006). לעומתם Faulds וחובריו מצאו כי בתאי HC11 לאחר שעברו התמיינות (טיפול בהורמונים לקטוגנים), ביטוי שני סוגי הקולטנים לאסטרוגן עלה לאחר טיפול באסטרוגן. לעומת זאת כאשר הם בחנו את פעילות הקולטנים הם מצאו כי תאים שעברו התמיינות אינם מגיבים לאסטרוגן וכי הקולטנים לאסטרוגן אינם פעילים ולא גורמים לשיעתוק דרך ERE (Faulds et al., 2004). Bjornstrom וחובריו בחנו את ההשפעה המשותפת של אסטרוגן ופרולקטין על שיעתוק חלבון החלב β-casein בתאי HC11. הם מצאו כי תוספת של אסטרוגן ביחד עם פרולקטין העלתה שיעתוק בפרומוטור של הגן ל β- casein דרך שני הקולטנים לאסטרוגן בשיתוף עם STAT5, אך בצורה מוגברת דווקא באמצעות ER β. ללא תוספת של STAT5 רמת השיעתוק שנצפתה עלתה בנוכחות ERβ אך הייתה נמוכה. תוצאות אלה מראות כי קיים שיתוף פעולה ברור בין שני הורמנים אלו וכי הקולטנים לאסטרוגן וגורמי השיעתוק הפועלים בעקבות קשירת הפרולקטין (STAT5) פועלים יחד להגברת הביטוי של חלבון החלב (Bjornstrom et al., 2001).

לעומתם כאשר בחנו Faulds וחובריו את ההשפעה שיש לאסטרוגן ופרולקטין על הביטוי של חלבון החלב β-casein הם מצאו כי אסטרוגן מדכא את השפעת הפרולקטין על ביטוי חלבון החלב β-casein בתאי HC11 (Faulds et al., 2004). במחקר הנוכחי לא מצאנו כי יש השפעה משותפת של פרולקטין ואסטרוגן על רמת הביטוי של β-casein. כאשר נבחנה השפעתם של אסטרוגן ופרולקטין על רמת הביטוי של הגן ל β-casein לא נצפתה השפעה של אסטרוגן על רמת הביטוי של הגן. כאשר נבחן השילוב של אסטרוגן ופרולקטין יחד, תוספת הפרולקטין העלתה את רמת הביטוי של הגן אך גם כאן לאסטרוגן לא הייתה השפעה על רמת הביטוי של הגן (איור מספר 13). נראה כי אכן בזמן לקטציה תאי בלוטת חלב בעכבר אינם מגיבים לא סטרוגן. הקולטנים לאסטרוגן המבוטאים שניהם בזמן הלקטציה כנראה חשובים לתיווך פעילות הפרולקטין ולא לתיווך פעילות האסטרוגן. על ידי שיתוף פעולה עם גורם השיעתוק העולה בעקבות פעילות הפרולקטין, STAT5, הם מגבירים את הביטוי של חלבון החלב β-casein.

מחקר זה הראה כי פרולקטין משפיע על רמת הביטוי של הקולטנים לאסטרוגן בתאי בלוטת החלב וכי הוא עשוי להיות גורם בהתמיינותם של תאי שומן. תאי השומן בהם השתמשנו במודל המחקרי אינם תאי שומן מבלוטת החלב, ויכול להיות כי גורם זה השפיע על התוצאות שהתקבלו. הראנו כי המדיום המותנה, אשר שימש מודל לבחינת יחסי הגומלין בין התאים, השפיע במידה מסויימת על תאי האפיתל אך יש לחקור עוד רבות כדי להגיע למסקנה ברורה מהם הגורמים המופרשים מתאי השומן למדיום המותנה המשפיעים על תאי האפיתל ומה הם הגורמים המשפיעים על תאי השומן להפריש חומרים אלה. השערת הניסוי ה ייתה כי אסטרוגן מופרש מתאי שומן בעקבות השפעת פרולקטין. כנראה שבתאי בלוטת חלב של עכברה השערה זו אינה נכונה אך יחד עם זאת הראנו כי כאשר הוסף אסטרוגן באופן חיצוני הוא גרם לעליה ברמת הביטוי של הקולטנים לאסטרוגן ורק ER α הושפע גם מפרולקטין. הפעילות המשותפת של אסטרוגן ופרולקטין בתאי אפיתל של בלוטת החלב נחקרת רבות בהקשרים שונים ועוד צריכים לה יערך מחקרים רבים על מנת לברר בוודאות את השפעת המשותפת על ביטוי חלבוני החלב והקולטנים לאסטרוגן.

6. רשימת ספרות

Arendt, L.M., T.L. Grafwallner-Huseth, and L.A. Schuler. 2009. Prolactin-growth factor crosstalk reduces mammary estrogen responsiveness despite elevated ERalpha expression. *The American journal of pathology*. 174:1065-1074.

Ben-Jonathan, N., E.R. Hugo, T.D. Brandebourg, and C.R. LaPensee. 2006. Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocrinol Metab*. 17:110-116.

Bjornstrom, L., E. Kilic, M. Norman, M.G. Parker, and M. Sjoberg. 2001. Cross-talk between Stat5b and estrogen receptor-alpha and -beta in mammary epithelial cells. *J Mol Endocrinol*. 27:93-106.

Brandebourg, T., E. Hugo, and N. Ben-Jonathan. 2007. Adipocyte prolactin: regulation of release and putative functions. *Diabetes, obesity & metabolism*. 9:464-476.

Brisken, C., S. Kaur, T.E. Chavarria, N. Binart, R.L. Sutherland, R.A. Weinberg, P.A. Kelly, and C.J. Ormandy. 1999. Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Dev Biol*. 210:96-106.

Brisken, C., and R.D. Rajaram. 2006. Alveolar and lactogenic differentiation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 11:239-248.

Carver, K.C., L.M. Arendt, and L.A. Schuler. 2009. Complex prolactin crosstalk in breast cancer: new therapeutic implications. *Molecular and cellular endocrinology*. 307:1-7.

Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 162:156-159.

Darcy, K.M., D. Zangani, W. Shea-Eaton, S.F. Shoemaker, P.P. Lee, L.H. Mead, A. Mudipalli, R. Megan, and M.M. Ip. 2000. Mammary fibroblasts stimulate growth, alveolar morphogenesis, and functional differentiation of normal rat mammary epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 36:578-592.

Faulds, M.H., H. Olsen, L.A. Helguero, J.A. Gustafsson, and L.A. Haldosen. 2004. Estrogen receptor functional activity changes during differentiation of mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol*. 18:412-421.

Feuermann, Y., S.J. Mabjeesh, L. Niv-Spector, D. Levin, and A. Shamay. 2006. Prolactin affects leptin action in the bovine mammary gland via the mammary fat pad. *J Endocrinol*. 191:407-413.

Feuermann, Y., S.J. Mabjeesh, and A. Shamay. 2009. Mammary Fat Can Adjust Prolactin Effect on Mammary Epithelial Cells via Leptin and Estrogen. *International journal of endocrinology*. 2009:427260.

Forster, C., S. Makela, A. Warri, S. Kietz, D. Becker, K. Hultenby, M. Warner, and J.A. Gustafsson. 2002. Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:15578-15583.

Frasor, J., and G. Gibori. 2003. Prolactin regulation of estrogen receptor expression. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 14:118-123.

Freeman, M.E., B. Kanyicska, A. Lerant, and G. Nagy. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*. 80:1523-1631.

Hall, J.M., J.F. Couse, and K.S. Korach. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem*. 276:36869-36872.

Hatsumi, T., and Y. Yamamuro. 2006. Downregulation of estrogen receptor gene expression by exogenous 17beta-estradiol in the mammary glands of lactating mice. *Exp Biol Med (Maywood)*. 231:311-316.

Heldring, N., A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujague, A. Strom, E. Treuter, M. Warner, and J.A. Gustafsson. 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*. 87:905-931.

Hennighausen, L., and G.W. Robinson. 2005. Information networks in the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:715-725.

Hovey, R.C., and L. Aimo. 2010. Diverse and active roles for adipocytes during mammary gland growth and function. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 15:279-290.

Hovey, R.C., T.B. McFadden, and R.M. Akers. 1999. Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 4:53-68.

Hovey, R.C., J.F. Trott, and B.K. Vonderhaar. 2002. Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 7:17-38.

Janowski, T., S. Zdunczyk, J. Malecki-Tepicht, W. Baranski, and A. Ras. 2002. Mammary secretion of oestrogens in the cow. *Domest Anim Endocrinol*. 23:125-137.

Kershaw, E.E., and J.S. Flier. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 89:2548-2556.

Koseki, Y., D. Cole, A. Matsuzawa, and M.E. Costlow. 1987. Prolactin regulation of estrogen and progesterone receptors in normal and neoplastic mouse mammary tissue. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 78:1105-1111.

Lamote, I., E. Meyer, A.M. Massart-Leen, and C. Burvenich. 2004. Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. *Steroids*. 69:145-159.

Landskroner-Eiger, S., J. Park, D. Israel, J.W. Pollard, and P.E. Scherer. 2010. Morphogenesis of the developing mammary gland: stage-dependent impact of adipocytes. *Dev Biol*. 344:968-978.

Levine, J.F., and F.E. Stockdale. 1984. 3T3-L1 adipocytes promote the growth of mammary epithelium. *Exp Cell Res*. 151:112-122.

Ling, C., G. Hellgren, M. Gebre-Medhin, K. Dillner, H. Wennbo, B. Carlsson, and H. Billig. 2000. Prolactin (PRL) receptor gene expression in mouse adipose tissue: increases during lactation and in PRL-transgenic mice. *Endocrinology*. 141:3564-3572.

Mallepell, S., A. Krust, P. Chambon, and C. Brisken. 2006. Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:2196-2201.

Marino, M., P. Galluzzo, and P. Ascenzi. 2006. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics*. 7:497-508.

Maule Walker, F.M., A.J. Davis, and I.R. Fleet. 1983. Endocrine activity of the mammary gland: oestrogen and prostaglandin secretion by the cow and sheep mammary glands during lactogenesis. *Br Vet J*. 139:171-177.

Muldoon, T.G. 1981. Interplay between estradiol and prolactin in the regulation of steroid hormone receptor levels, nature, and functionality in normal mouse mammary tissue. *Endocrinology*. 109:1339-1346.

Muldoon, T.G. 1986. Steroid hormone receptor regulation by various hormonal factors during mammary development and growth in the normal mouse. *Ann N Y Acad Sci*. 464:17-36.

Nanbu-Wakao, R., Y. Fujitani, Y. Masuho, M. Muramatu, and H. Wakao. 2000. Prolactin enhances CCAAT enhancer-binding protein-beta (C/EBP beta) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) messenger RNA expression and stimulates adipogenic conversion of NIH-3T3 cells. *Mol Endocrinol*. 14:307-316.

Neville, M.C., T.B. McFadden, and I. Forsyth. 2002. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 7:49-66.

Nilsson, L., N. Binart, Y.M. Bohlooly, M. Bramnert, E. Egecioglu, J. Kindblom, P.A. Kelly, J.J. Kopchick, C.J. Ormandy, C. Ling, and H. Billig. 2005. Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 331:1120-1126.

Nilsson, S., S. Makela, E. Treuter, M. Tujague, J. Thomsen, G. Andersson, E. Enmark, K. Pettersson, M. Warner, and J.A. Gustafsson. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*. 81:1535-1565.

Oakes, S.R., R.L. Rogers, M.J. Naylor, and C.J. Ormandy. 2008. Prolactin regulation of mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 13:13-28.

Pavlovich, A.L., S. Manivannan, and C.M. Nelson. 2010. Adipose stroma induces branching morphogenesis of engineered epithelial tubules. *Tissue Eng Part A*. 16:3719-3726.

Peaker, M., and E. Taylor. 1990. Oestrogen production by the goat mammary gland: transient aromatase activity during late pregnancy. *J Endocrinol*. 125:R1-3.

Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 29:e45.

Saji, S., E.V. Jensen, S. Nilsson, T. Rylander, M. Warner, and J.A. Gustafsson. 2000. Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:337-342.

Schaffler, A., U. Muller-Ladner, J. Scholmerich, and C. Buchler. 2006. Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases. *Endocrine reviews*. 27:449-467.

Siiteri, P.K. 1987. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr*. 45:277-282.

Topper, Y.J., and C.S. Freeman. 1980. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiological reviews*. 60:1049-1106.

Weihua, Z., S. Andersson, G. Cheng, E.R. Simpson, M. Warner, and J.A. Gustafsson. 2003. Update on estrogen signaling. *FEBS letters*. 546:17-24.

Zangani, D., K.M. Darcy, S. Shoemaker, and M.M. Ip. 1999. Adipocyte-epithelial interactions regulate the in vitro development of normal mammary epithelial cells. *Exp Cell Res*. 247:399-409.

The interaction between the two types of cells was tested in this study, by using conditioning medium. This is a method where epithelial cells are cultured in medium that was collected from adipocyte cells that had undergone various treatments. When comparing the effects of the conditioning medium vs. a regular medium, we showed that the use of a conditioning medium increased the expression of ER α and of the milk protein β -casein in the epithelial cells, but did not affect the expression of ER β. In the second stage we tested the effect of the conditioning medium collected from adipocyte cells treated with increasing levels of prolactin. In this case we did not see a change in the expression of the estrogen receptors or of the β casein milk protein between the various treatments. These results show that the adipocyte cells excrete soluble substances into the medium, which can affect the epithelial cells. The involvement of prolactin in this process and its influence on the adipocyte cells is not clear.

It seems that prolactin can affect the differentiation of adipocyte cells, but estrogen is not one of the soluble substances secreted from the adipose tissue in mice following prolactin stimulation. However, prolactin does affect the expression of estrogen receptors in the epithelial cells. Several other elements that were not tested in this study affect the expression of estrogen receptors and milk proteins. Further study is required to conclusively determine the interactions between prolactin, estrogen and estrogen receptors in mammary glands, and the involvement of the epithelial cells and adipocyte cells in these interactions.

first stage examined the effect of prolactin on each separate cell line. The second stage examined the effect of prolactin on the interaction between the two types of cells; this interaction was tested using a conditioning medium. The third stage examined the effect of prolactin and estrogen on the epithelial cells. In each stage, the expression of the milk protein β-casein and the estrogen receptors was tested.

Study results show that prolactin can change the expression level of the estrogen receptors. Raising levels of prolactin increased the expression of estrogen receptors, ER α and ER β, genes. However, when examining the effect of estrogen and prolactin together on the expression of the receptors, we found that estrogen alone increases the expression of its two receptors, but the addition of prolactin increased the expression only of ER α. The expression of the milk protein β-casein was not affected by estrogen levels, even though the results showed a rise in the expression of the gene, as dependent on estrogen concentrations. On the other hand, an addition of prolactin to the medium, greatly increased the expression of this gene. It is known that the both estrogen receptors are expressed in the mammary gland of female mice during lactation, but various studies show different influences of estrogen on its receptors during this period. In addition, some studies show that the role of the receptors is not to mediate estrogen activity, but to act together with transcription factors resulting from prolactin stimulation, thus increasing the expression of milk proteins.

Increased levels of prolactin caused a rise in the expression of Adiponectin, a gene expressed in mature adipocyte cells and used as a marker for differentiation of adipocyte cells. This result can indicate the involvement of prolactin in the differentiation of adipocyte cells, including those in the mammary gland. The research theory was that adipocyte cells would secret estrogen following prolactin stimulation. This theory was tested by checking the expression levels of aromatase, a key enzyme in the production of estrogen. But, contrary to our theory, we did not find any aromatase expression in adipocyte cells. In addition, we tested the expression of this gene in the epithelial cells produced from mammary gland tissue, but found no expression of this gene also there.

Abstract

Throughout the development of the mammary glands, the epithelial tissue is found in a constant environment of adipose tissue and connective tissue. The mammary adipose tissue, once regarded as an inert matrix, is currently known as a vital tissue in the normal development of the mammary gland, and a hormone secreting tissue. The interaction between adipose tissue and the epithelial tissue has been studied in recent years in normal cells, carcinogenic cells and various stages of the development of the mammary gland. Studies examining the interaction between the two tissues during lactation have shown that the presence of adipose tissue affected the expression of milk proteins and their accumulation in the gland, and the accumulation of adipose vesicles in the epithelial cells. The influence of the adipose tissue could prove to be an important element in regulating the quantity and composition of milk. In addition, studies have shown that the adipose tissue in the mammary gland secretes substances that have a paracrine effect on the epithelial tissue.

Estrogen is produced and secreted mainly in the ovaries, however, recent studies have shown that adipose tissue of various species can produce and secrete estrogen. The function of the estrogen during lactation is not clear and varies between different species. Conclusions from a study conducted recently in our laboratory show that estrogen plays a role in regulating lactation in the mammary gland of farm animals and that the mammary gland of farm animals can locally produce estrogen after stimulation with prolactin. In light of these findings our research theory suggested that following the stimulation of prolactin, the adipose tissue secretes various hormones, including estrogen. Estrogen secreted from the adipose tissue and prolactin causes a change in the expression of milk proteins and of estrogen receptors in the epithelial cells.

The theory was tested in two mouse cell lines. Epithelial cells of the mammary glands (HC11) and pre-adipocytes cells (3T3-L1). This model was placed in order to isolate the effect of prolactin on the epithelial cells of the mammary gland and the adipocyte cells separately, and then to test the interaction between both cells. The

The Effect of Prolactin on the Interaction Between Adipocyte Cells and Epithelial Cells in the Mammary Gland

M.Sc thesis

Submitted to the Robert H. Smith Faculty
of Agriculture, Food and Environment
The Hebrew University

By:
Chagit Simon Barnett

Rehovot August, 2011