

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Sonja PRPAR MIHEVC

**IDENTIFIKACIJA IN KARAKTERIZACIJA ODRASLIH MATIČNIH
CELIC V MLEČNI ŽLEZI KOZE (*Capra hircus*)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**IDENTIFICATION AND CHARACTERISATION OF ADULT STEM
CELLS IN GOAT (*Capra hircus*) MAMMARY GLAND**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 6. 7. 2011 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja genetike. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Peter Dovč.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Peter DOVČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Miomir KNEŽEVIĆ
Biobanka d.o.o.

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Sonja Prpar Mihevc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 575:636.39(043.3)=163.6
KG	mlečna žleza/matične celice/genetika/genetski označevalci/transplantacija/koza
KK	AGRIS L10/5250
AV	PRPAR MIHEVC, Sonja, univ. dipl. mikr.
SA	DOVČ, Peter (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje genetike
LI	2014
IN	IDENTIFIKACIJA IN KARAKTERIZACIJA ODRASLIH MATIČNIH CELIC V MLEČNI ŽLEZI KOZE (<i>Capra hircus</i>)
TD	Doktorska disertacija
OP	XIII, 118 str., 10 pregl., 30 sl., 177 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Matične celice so celice z izjemnim potencialom za razvoj v različne celične tipe v telesu. Odrasle ali somatske matične celice so nediferencirane celice, ki se nahajajo v različnih tkivih in organih telesa. Njihova vloga je nadomeščanje odmirajočih celic in regeneracija poškodb. Detekcija in karakterizacija matičnih celic v kozji mlečni žlezi (MCMŽ) je pomembna za boljše razumevanje cikličnega značaja razvoja mlečne žleze. Z manipuliranjem MCMŽ bi lahko vplivali na laktacijo, predvsem na njeno trajanje. Cilj pričajočega dela je dokazati, da se v kozji mlečni žlezi nahaja populacija matičnih celic. Tkivo iz mlečnih žlez iz juvenilnih koz in koz v laktaciji smo disociirali in procesirali do posameznih celic. Z <i>in vitro</i> testom tvorjenja kolonij (CFC) smo pokazali, da iz unipotentnih prekurzorskih celic nastanejo različni tipi kolonij, ki izražajo specifične označevalce značilne za posamezne celične linije. Z uporabo dveh različnih gojišč smo dokazali, da se frekvence klonogenih prekurzorjev razlikujejo v odvisnosti od rastnih pogojev. Kozje epitelne celice smo transplantirali pod ledvično kapsulo miši NOD/SCID, kjer so tvorile organizirane strukture, oblikovane iz dveh plasti celic in lumna. Naši rezultati dokazujo, da so MCMŽ v kozji mlečni žlezi. Ti podatki predstavljajo prvi opis celične hierarhije v kozji mlečni žlezi in nakazujejo, da imajo kozje MCMŽ regenerativni potencial. Iz kozje mlečne žleze smo vzpostavili tudi primarno kulturo in jo morfološko in funkcionalno okarakterizirali. Osredotočili smo se na izražanje za celične linije specifičnih označevalcev, ki jih lahko nadalje uporabimo za študije MCMŽ. S sekvenciranjem RNA in imunofluorescentnim barvanjem smo pokazali, da so se v primarni kulturi najbolj izražali označevalci specifični za mioepitelne, luminalne in mezenhimske celice. Zaznali smo tudi označevalce, ki so povezani z matičnim/prekurzorskim značajem. Pod pogoji, ki ne omogočajo prijetja celic, so kozje epitelne celice tvorile okrogle acinom podobne strukture, ki so podobne acinom mlečne žleze v laktaciji. Na tak način je možno obogatiti matične/prekurzorske celice. Odkriti označevalci so primerni za karakterizacijo celic v mlečni žlezi koze in tudi drugih vrst sesalcev. Nekatere od njih smo uporabili za obogatitev MCMŽ s pretočno citometrijo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dd
DC	UDC 575:636.39(043.3)=163.6
CX	mammary gland /stem cells/genetics/markers/transplantation/goat
CC	AGRIS L10/5250
AU	PRPAR MIHEVC, Sonja
AA	DOVČ, Peter (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Genetics
PY	2014
TI	IDENTIFICATION AND CHARACTERISATION ADULT STEM CELLS IN GOAT (<i>Capra hircus</i>) MAMMARY GLAND
DT	Doctoral dissertation
NO	XIII, 118 p., 10 tab., 30 fig., 177 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p>Stem cells are cells with remarkable potential to develop into different cell types in the body. Adult or somatic stem cells are undifferentiated cells, found throughout the body as part of tissues and organs. Their role is replacement of dying cells and regeneration of injuries. The detection and characterization of goat mammary stem cells (gMaSCs) is an important task for a better understanding of the cyclic character of the mammary gland development which will also offer a potential for manipulation of lactation yield and persistency. The objective of the present study was to demonstrate the presence of a subpopulation of MaSCs in the goat mammary gland and to develop tools for their identification and characterisation. Mammary tissue from juvenile and lactating Saanen goats (<i>Capra hircus</i>) was dissociated and processed to a single cell suspension. Using an <i>in vitro</i> colony-forming assay we demonstrated that distinct colony types, which expressed specific lineage markers, arose from unipotent progenitors. Using two different growth media we showed that the frequencies of caprine clonogenic progenitors differed according to growth conditions. Goat epithelial cells were transplanted under the kidney capsule of non-obese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice where they formed organized bilayered structures. Our results indicate the presence of MaSCs in the caprine mammary gland. These data represent the first description of the cell hierarchy in the goat mammary gland and demonstrate the regenerative potential of goat adult mammary stem cells. In addition, primary culture derived from lactating goat mammary gland was morphological and functional characterized, focusing on distribution of lineage-specific markers, which can be used in further studies of gMaSCs. Based on RNA sequencing and immunofluorescent staining data the greatest expression in primary culture was observed for markers typical for myoepithelial cells, luminal cells and mesenchymal cells. Additionally, markers associated with stem/progenitor character were observed. Under non-adherent conditions or embedded in basement membrane matrix goat mammary cells formed spherical, acini-like structures that resembled alveoli of lactating mammary gland, which might offer the way to enrich for stem/progenitor cells. We suggest that described lineage markers are suitable for characterization of caprine mammary cells and possibly other mammalian species. Some of them have already been applied for enrichment of gMASCs using flow cytometry.</p>

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 MATIČNE CELICE.....	4
2.1.1 Embrionalne matične celice.....	5
2.1.2 Inducirane pluripotentne matične celice (iPS)	6
2.1.3 Odrasle matične celice	6
2.1.4 Rakave matične celice	11
2.1.5 Celične terapije	11
2.2 MLEČNA ŽLEZA	13
2.2.1 Citologija – anatomske razlike pri različnih vrstah.....	14
2.2.1.1 Človek in prežvekovalci.....	14
2.2.1.2 Miš.....	17
2.3 MATIČNE CELICE V MLEČNI ŽLEZI	18
2.3.1 Izolacija in karakterizacija MCMŽ.....	19
2.3.1.1 Miš.....	19
2.3.1.2 Človek in prežvekovalci.....	24
2.3.2 Regulacija MCMŽ.....	27
2.3.3 <i>In vitro</i> testi in obogatitev MCMŽ	29
3 NAMEN IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE	31
4 MATERIAL IN METODE.....	33
4.1 ŽIVALI.....	33
4.2 KOZJA MLEČNA ŽLEZA – PRIPRAVA SUSPENZIJE POSAMEZNIH CELIC ...	33
4.3 PRIMARNA KULTURA.....	34
4.3.1 Gojišča	34
4.3.1.1 RPMI1640	34
4.3.1.2 EpiCult-B	35
4.3.1.3 Sf7	35

4.3.2 Rastne podlage	35
4.3.2.1 Kolagen	35
4.3.2.2 Geltrex	36
4.4 IN VITRO DETEKCIJA PREDNIŠKIH CELIC (angl. Colony-forming cell (CFC) assay)	36
4.4.1 Inaktivacija fibroblastov 3T3 z mitomicinom C	37
4.5 TRANSPLANTACIJA EPITELNE FRAKCIJE POD LEDVIČNO KAPSULO MIŠI NOD/SCID	37
4.5.1 Inaktivacija fibroblastov 10T1/2 z mitomicinom C	38
4.5.2 Priprava kolagenskih gelčkov	38
4.6 BARVANJA	39
4.6.1 Imunohistokemija	39
4.6.2 Imunocitokemija	42
4.6.3 Barvanje s hematoksilinom in eozinom (H&E)	42
4.6.4 Oil Red O barvanje	42
4.7 KARAKTERIZACIJA IZRAŽANJA RAZVOJNO POMEMBNIH GENOV (OZNAČEVALCEV)	43
4.7.1 Western prenos	43
4.7.2 Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR)	46
4.7.3 Sekvenciranje in analiza izražanja označevalcev mRNA	48
4.8 VZPOSTAVITEV 3D IN VITRO MODELJA	49
4.8.1 Suspenzijske kulture	49
4.8.2 Vklopljene kulture	50
4.9 SORTIRANJE EPITELNE FRAKCIJE CELIC MLEČNE ŽLEZE S PRETOČNO CITOMETRIJO (FACS)	51
4.10 STATISTIČNE ANALIZE	52
5 REZULTATI	53
5.1 PRIMARNA CELIČNA KULTURA	53
5.2 KARAKTERIZACIJA IZRAŽANJA RAZVOJNO POMEMBNIH GENOV (OZNAČEVALCEV)	55
5.2.1 Western prenos	56
5.2.2 Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR)	57
5.2.3 Izražanje proteinov citoskeleta	58
5.2.4 Histologija mlečne žleze koze	61
5.2.5 Izražanje označevalcev mRNA	65
5.3 IN VITRO DOKAZ ZA PREKURZORSKE CELICE	68
5.4 SPOSOBNOST REGENERACIJE IN VIVO	71

5.5 PREKURZORSKE CELICE V REGENERIRANIH STRUKTURAH	73
5.6 3D ORGANIZACIJA V KULTURI	75
5.7 SORTIRANJE CELIC MLEČNE ŽLEZE S PRETOČNO CITOMETRIJO	80
6 RAZPRAVA IN SKLEPI	86
6.1 MLEČNA ŽLEZA	86
6.2 PRIMARNA KULTURA	88
6.3 <i>IN VITRO</i> TESTI TVORJENJA KOLONIJ (CFC)	92
6.4 REGENERACIJA <i>IN VIVO</i>	94
6.5 MAMOSFERE	94
6.6 SORTIRANJE	96
6.7 SKLEPI	98
7 POVZETEK (SUMMARY).....	99
7.1 POVZETEK	99
7.2 SUMMARY	101
8 VIRI.....	103
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Tipi odraslih matičnih celic (prirejeno po Eckfeldt in sod., 2005).....	8
Preglednica 2: Primerjava razvoja mlečne žleze pri miših, človeku in prežvekovalcih (povzeto po Rowson in sod., 2012).....	18
Preglednica 3: Najpogosteje uporabljeni označevalci za imunofenotipizacijo matičnih/prekurzorskih celic v mlečni žlezi.....	22
Preglednica 4: Objave o matičnih in prekurzorskih celicah v mlečni žlezi goveda.....	27
Preglednica 5: Seznam protiteles uporabljenih za imunohistokemijo (IHC), imunocitokemijo (ICC) in Western prenos (WB).	41
Preglednica 6: Sestava komponent potrebnih za eno reakcijo sinteze cDNA.....	46
Preglednica 7: Zaporedja začetnih oligonukleotidov uporabljenih za reverzno transkripcijo in verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR).....	47
Preglednica 8: Izražanje označevalcev, specifičnih za posamezne celične linije v primarni kulturi iz kozje mlečne žleze.....	66
Preglednica 9: Izražanje komponent zunajceličnega matriksa v primarni kulturi..	67
Preglednica 10: Frekvence klonogenih prekurzorjev epitelnih celic iz mlečne žleze koze v dveh različnih gojiščih.	70

KAZALO SLIK

str.

Slika 1: Hierarhija matičnih celic (prirejeno po Eckfeldt in sod., 2005).....	4
Slika 2: Asimetrična celična delitev (povzeto po Knoblich, 2001).....	7
Slika 3 : Diferenciacija hematopoetskih matičnih celic (prirejeno po Pina in Enver, 2007)	9
Slika 4: Primerjava morfogeneze duktov pri različnih vrstah; Hovey in sod., 2002.	15
Slika 5: Shematski prikaz prežvekovalske mlečne žleze (prirejeno po Frandson in sod., 2009).	16
Slika 6: Histologija terminalnega alveolarnega brsta (TEB) v estrusu pri 8 mesečni miši BALB/c in shema različnih celičnih tipov v TEB (povzeto po Hovey in sod., 2002).....	17
Slika 7: Oblikovanje alveoli podobne strukture iz epitelnih celic (prirejeno po Gajewska in sod., 2013).....	30
Slika 8: Morfologija primarnih celic po 8 dneh rasti v gojišču RPMI1640.....	54
Slika 9: Sinteza lipidnih kapljic v primarni celični liniji v četrti pasaži, ki je rasla 11 dni na tanki plasti matriksa basalne membrane pod laktogenimi pogoji.	54
Slika 10: Primarna celična kultura med rastjo na podlagi matriksa basalne membrane v gojišču EpiCult-B.	55
Slika 11: Analiza z metodo Western prenosa s proteini, izoliranimi iz kozje in mišje mlečne žleze in njunih primarnih kultur gojenih 3 ali 7 dni.....	56
Slika 12: Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR) za izbrane gene, ki so povezani s celičnimi linijami, ki sestavljajo mlečno žlezo.....	57

Slika 13: Imunofluorescentno barvanje primarne kulture gojene 5 dni na tanki podlagi matriksa bazalne membrane.....	59
Slika 14: Oblikovanje kopol v post konfluentni kulturi gojeni 29 dni.....	60
Slika 15: Primarna kultura po 6 dneh gojenja na tanki podlagi bazalne membrane ali kolagena v gojišču Sf7.....	61
Slika 16: Tkvne rezine kozje mlečne žleze barvane s hematoksilinom in eozinom (H&E) ..	62
Slika 17: Izražanje in lokalizacija z imunofluorescenco zaznanih označevalcev v tkivu kozje mlečne žleze v laktaciji.	64
Slika 18: Izražanje in lokalizacija z imunofluorescenco zaznanih označevalcev EpCAM, CK14 in CK18 v tkivu juvenilne kozje mlečne žleze stare 8 mesecev.....	65
Slika 19: Morfologija in izražanje označevalcev diferenciacije v kolonijah iz celic mlečne žleze koze, ki so rasle v dveh gojiščih.. ..	69
Slika 20: Odstotki različnih tipov kolonij (CFC), ki so zrasle iz sveže odmrznjenega tkiva mlečnih žlez v laktaciji in juvenilne mlečne žleze v gojiščih Sf7 in EpiCult-B. Odstotki različnih tipov kolonij (CFC), ki so zrasle iz disociiranih 4- in 6-tednov starih ksenograftov v gojišču Sf7, ki so bili nacepljeni z epitelnimi celicami 7 mesečne koze.	70
Slika 21: Morfologija in izražanje označevalcev v regeneriranih strukturah.....	72
Slika 22: Izražanje označevalcev diferenciacije CK14 in progesteronskega receptorja ter mlečnih proteinov v regeneriranih strukturah, ki so jih oblikovale epitelne celice iz 3 letne koze v laktaciji.. ..	73
Slika 23: Morfologija in izražanje označevalcev diferenciacije v testu oblikovanja kolonij, ki je bil narejen po disociaciji 4 tedenskih ksenograftov.. ..	74

Slika 24: Tri-dimenzionalna (3D) organizacija epitelnih celic iz mlečne žleze pod pogoji, ki ne omogočajo prijetja celic.....	75
Slika 25: Morfologija in izražanje za mlečno žlezo specifičnih označevalcev v kolonijah, ki so zrasle iz celic koze po disociaciji mamosfer v testu tvorjenja kolonij.	76
Slika 26: Tri dimenzionalna organizacija epitelnih celic iz mlečne žleze v laktaciji.....	79
Slika 27: Sortiranje celic iz mlečne žleze pet mesečne koze burske pasme z uporabo protiteles proti proteinu Muc1.....	81
Slika 28: Pretočna citometrija celic, iz mlečnih žlez sedem mesečne juvenilne in tri letne koze v laktaciji, z uporabo protiteles proti proteinu EpCAM.....	82
Slika 29: Pretočna citometrija celic, iz mlečnih žlez sedem mesečne juvenilne in tri letne koze v laktaciji, z uporabo protiteles proti proteinu CD49f (ITGA6).	83
Slika 30: Sortiranje celic iz mlečne žleze sedem mesečne koze, ki so bile pobarvane glede na aktivnost encima ALDH.....	84

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

- ALDH-1 encima aldehid dehidrogenaza
BM bazalna membrana
BSA (angl. *bovine serum albumin*) albumin iz govejega seruma
BrdU 5-bromo-2-deoksi-uridin
CD24 (angl. *signal transducer CD24*)
CD29 integrin beta 1
CD49f integrin alfa 6
CFC (angl. *colony forming cell assay*) test tvorjenja kolonij
CK citokeratin
E estrogen
EMC embrionalne matične celice
EHS Engelbreht-Holm-Swarm
EpCAM (angl. *epithelial cell adhesion molecule*) epitelijska adhezivna celična molekula
ER estrogenski receptor
FACS (angl. *fluorescence activated cell sorting*) pretočna citometrija z ločevalnikom fluorescenčno označenih celic
FBS fetalni goveji serum
HMC hematopoetske matične celice
iPS (angl. *induced pluripotent stem cells*) inducirane pluripotentne matične celice
MCMŽ matične celice v mlečni žlezi
MFP (angl. *mammary fat pad*) maščobna blazinica
MMC mezenhimske matične celice
Muc1 mucin 1
NOD/SCID (angl. *nonobese diabetic/severe combined immunodeficient*) nedebele diabetične miši z okvarjenim imunskim sistemom
OMC odrasle matične celice
P progesteron
PR progesteronski receptor
PRL prolaktin
RANKL (angl. *ligand of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*)
RH rastni hormon

RMC rakave matične celice

SLC (angl. *small light cells*) majhne svetle celice

SMA (angl. *smooth muscle actin*) aktin gladkih mišic

SP (angl. *side population*) Hoechst negativna populacija; stranska populacija

TDLU (angl. *terminal ductal lobular unit*) terminalne kanalčkaste lobularne enote

TEB (angl. *terminal end bud*) terminalni alveolarni brst

ULLC (angl. *undifferentiated large light staining cells*)

ZCM (angl. *extracellular matrix, ECM*) zunajcelični matriks

ŽMC živčne matične celice

1 UVOD

Proučevanje matičnih celic različnega izvora je ena od osrednjih tem temeljnih bioloških raziskav, prav tako pa je vse več kliničnih in biotehnoških aplikacij, ki temeljijo na uporabi matičnih celic. Za učinkovito prevajanje temeljnega znanja v uporabne raziskave in aplikacije je potrebno temeljito poznavanje biologije matičnih celic kot tudi tehnična ekspertiza za delo z njimi.

Matične celice so celice z izjemnim potencialom za razvoj v različne celične tipe v telesu. Pri sesalcih sta prisotna dva tipa matičnih celic. To so embrionalne matične celice, ki jih lahko izoliramo iz notranjosti blastociste in matične celice pri odraslih, ki se nahajajo v tkivih in organih. Embrionalne matične celice (EMC) imajo velik diferencijski potencial in se lahko razvijejo v vsak celični tip v organizmu, so pluripotentne. Odrasle matične celice (OMC) predstavljajo majhen odstotek celic, prisotnih v odraslih tkivih in organih, iz njih nastanejo specifični celični tipi, npr. koža, mlečna žleza, črevesje, osrednji živčni sistem. OMC so multipotentne, dolgo živeče, večinoma mirujoče celice, iz katerih nastanejo nove matične celice in tako vzdržujejo zalogo matičnih celic. Poleg OMC so v tkivih/organih prisotne še bolj usmerjene/diferencirane celice prednice, prekurzorske celice, ki so odgovorne za vzdrževanje organa kot odziv na poškodbo ali v regeneraciji (Reya in sod., 2001). Primitivna populacija matičnih celic se vzdržuje s signali, ki so prisotni v lokalnem mikro okolju (niši) (Woodward in sod., 2005).

Mlečna žleza ima ciklični razvoj, fazi rasti sledi diferenciacija in regresija. Med nosečnostjo in laktacijo preidejo epitelne celice skozi več razvojnih sprememb, to so proliferacija, diferenciacija, sekrecija in apoptoza. Mlečno žlezo sestavljajo trije epitelni celični tipi, to so duktalne, alveolarne in mioepitelne celice. Matične celice mlečne žlez (MCMŽ) se diferencirajo v različne prekurzorske celice, ki se nato progresivno diferencirajo v luminalne in mioepitelne celice (Siegel in Muller, 2010). Normalen razvoj mlečne žlez usmerjajo signali, spodbujeni s strani rastnih faktorjev, hormonov in stromalnih celic. Porušitev te signalizacije lahko vodi do hiperplazij epitelnih celic in končno do tumorigeneze. Nedavni rezultati nakazujejo, da obstaja povezava med normalno

in kancerogeno matično celico, zato je razumevanje procesov normalnega razvoja in diferenciacije celic mlečne žleze pomemben korak k boljšemu razumevanju deregulacije procesov, ki vodijo do maligne transformacije (Lim in sod., 2010). Tumorigeni potencial MCMŽ še ni dokončno raziskan, obstaja pa večje število dokazov, da določeni tipi raka dojke izhajajo iz matičnih celic oziroma iz prekurzorskih celic (Lim in sod., 2009).

Razvoj mlečnih žlez prežvekovalcev je slabše raziskan v primerjavi s človeškimi in mišjimi. Z razvojem metod, kot so imunomagnetno ločevanje celic, ločevanje fluorescenčno označenih celic s pretočno citometrijo (FACS), in z *in vitro* in *in vivo* funkcionalnimi testi, lahko študiramo MCMŽ. Matičnih celic v mlečni žlezi koze do sedaj še niso proučevali. Z manipulacijo matičnih celic v mlečnih žlezah prežvekovalcev bi lahko vplivali na povečano prirejo mleka, vzdrževanje laktacije in skrajšanje obdobja presušitve, kar ima velik ekonomski pomen. Poznavanje razvojnih in regulatornih procesov v mlečnih žlezah prežvekovalcev bi pomembno doprineslo k uravnavanju razvoja in delovanja mlečne žleze in njeno zdravstveno zaščito pred okužbami. Hkrati predstavlja nizka pojavnost raka mlečne žleze pri prežvekovalcih izziv za proučevanje razlogov za povečano pojavnost teh obolenj pri nekaterih drugih vrstah (človek, pes, mačka, miš). Koza je pomembna vrsta za biotehnologijo, saj transgene koze služijo kot bioreaktorji za sintezo biološko aktivnih spojin za farmacevtsko industrijo. Transgene koze se uporabljam za produkcijo rekombinantnih protiteles, lizocima in drugih spojin, ki se izločajo v mleko, od koder jih je lahko osamiti. Izolirane matične celice so tudi primerna populacija za primerjalne študije s človeškimi matičnimi celicami, katerih posledica bi bil lahko razvoj novih tarč pri zdravljenju raka na dojki, saj je pojavnost tumorjev v mlečnih žlezah prežvekovalcev zelo redka. Trenutno pri nobeni vrsti niso definirani specifični označevalci za matične celice v mlečni žlezi do te mere, da bi lahko osamili čiste populacije matičnih celic, ampak so raziskovalci zmožni le izolacije z matičnimi celicami obogatenih populacij. Če bi odkrili označevalce, ki bi jasno opredelili populacijo matičnih celic mlečne žleze, bi le-te lahko osamili in z usmerjeno rekombinacijo vplivali na genski zapis v mutirani matični celici, ki je bila povzročiteljica raka na dojki, ali pa zdrave matične celice transplantirali v maščobno tkivo dojke po mastektomiji in na ta način rekonstituirali lastni epitelij. Čeprav se zgoraj opisano trenutno sliši kot znanstvena fantastika pa bo vse to mogoče, ko bomo točno vedeli katere celice gradijo mlečno žlezo. To je tudi vodilo

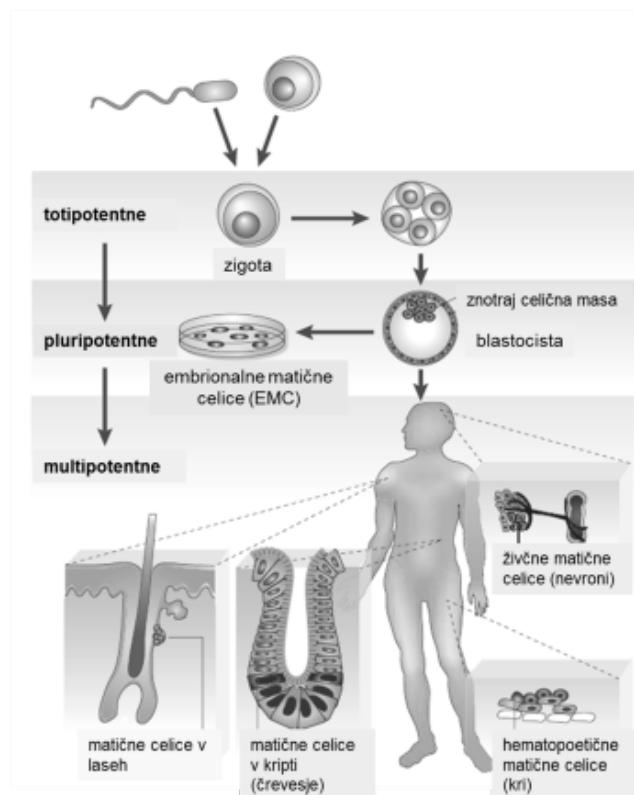
doktorske disertacije, saj želimo s čim boljšo karakterizacijo celičnih tipov v kozji mlečni žlezi omogočiti uporabo teh tehnik za študije mlečne žleze pri drugih vrstah (krava, ovca, kobila) in njihovo primerjavo s človeško mlečno žlezo.

Namen doktorske disertacije je bila identifikacija in karakterizacija celic s proliferativnim in regenerativnim potencialom iz mlečne žleze koze, z uporabo funkcionalnih *in vitro* in *in vivo* testov. Hkrati smo žeeli poiskati markerje/označevalce posameznih celičnih populacij v mlečni žlezi koze in v primarnih kulturah ter s transplantacijami in *in vitro* testi dokazati, da v kozji mlečni žlezi obstajajo matične celice in njihove potomke, ki imajo multipotenten značaj. Poleg tega smo hoteli matične celice obogatiti v neadherentni suspenzijski kulturi. Z uporabo pretočne citometrije smo poskusili osamiti populacijo celic, obogateno z matičnimi celicami. Raziskava je odskočna deska za primerjalne študije s celicami iz mlečnih žlez drugih vrst.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MATIČNE CELICE

Celičnih tipov, ki jim pripisujemo matični značaj, je veliko. Mednje sodijo embrionalne, odrasle/somatske, umetno reprogramirane in rakaste matične celice (Eckfeldt in sod., 2005). Matične celice so zelo majhne celice, ki fenotipsko niso podobne nobeni celici, ki gradi odrasel organ, so pa zmožne "*de novo*" diferenciacije v katerokoli celico. Poznani so štirje tipi matičnih celic: v telesu fiziološko prisotne embrionalne matične celice in odrasle matične celice, umetno pridobljene oz. reprogramirane inducirane pluripotentne celice (iPS) in patološke celice, ki so vir rakavih obolenj (Alvarez in sod., 2012). Glavne funkcionalne lastnosti matičnih celic vključujejo izražanje označevalcev pluri/multipotentnosti, aktivacijo kaskad signalnih poti, ki vzdržujejo matičnost (angl. *stemness*), proliferativno stanje, kako se celice obnašajo *in vitro* in kako po ponovnem vnosu v telo (*in vivo*).



Slika 1: Hierarhija matičnih celic (prirejeno po Eckfeldt in sod., 2005).

Figure 1: The stem-cell hierarchy (adapted from Eckfeldt et al., 2005).

2.1.1 Embrionalne matične celice

Embrionalne matične celice gradijo notranjo celično maso blastociste pred njenou implantacijo, na molekularni ravni na tej stopnji razvoja še ni zaznana nobena specializacija celic v posamezne zarodne plasti, te celice niso zmožne diferenciacije v trofoblaste, zato so pluripotentne. Zmožne so diferenciacije v več kot 220 celičnih tipov, ki so prisotni v človeškem in živalskem telesu. EMC *in vivo* obstajajo zelo kratek čas, preden izgubijo svojo pluripotentno naravo. Celične linije, ki izvirajo iz EMC, lahko pridobimo z encimatsko razgradnjo znotraj celične mase blastociste. Leta 1981 so izolirali mišje EMC linije (Evans in Kaufman, 1981), šele v poznih devetdesetih pa človeške (Thomson, 1998). Te celične linije so sposobne neskončnega samo obnavljanja (angl. *self-renewal*), rastejo kot okrogle kompaktne kolonije majhnih celic na hranični plasti fibroblastov (angl. *feeder layer*) in izražajo za pluripotentnost tipične genske označevalce (OCT4, SOX2, KLF4, NANOG). Nobeden od omenjenih transkripcijskih faktorjev ne sme biti preveč izražen v primerjavi z ostalimi, da ima celica res matični fenotip in je pluripotentna. Diferenciacija je posledica porušitve ravnotežja med transkripcijskimi faktorji, na primer močno izražanje OCT4 in/ali represija NANOG inducira diferenciacijo v endoderm in mezoderm, diferenciacija v ektoderm ni več mogoča, močno izražanje SOX2 pa inducira diferenciacijo v neuroektoderm (Alvarez in sod., 2012). EMC po injiciranju v miši tvorijo teratome. Z uporabo različnih medijev in rastnih podlag jih je možno diferencirati v različne somatske celične tipe *in vitro*, zaradi teratogenosti pa je njihova uporaba v medicini še zelo omejena. Deregulirano izražanje faktorjev pluripotentnosti v odraslih matičnih celicah je bilo povezano z nastankom različnih rakavih obolenj, ko t.i. rakave matične celice (RMC) pridobijo lastnosti matičnih celic, ne odmrejo, ampak se nekontrolirano delijo in se izognejo kontroli imunskega sistema (Leis in sod., 2012; Matsuoka in sod., 2012; Noh in sod., 2012).

2.1.2 Inducirane pluripotentne matične celice (iPS)

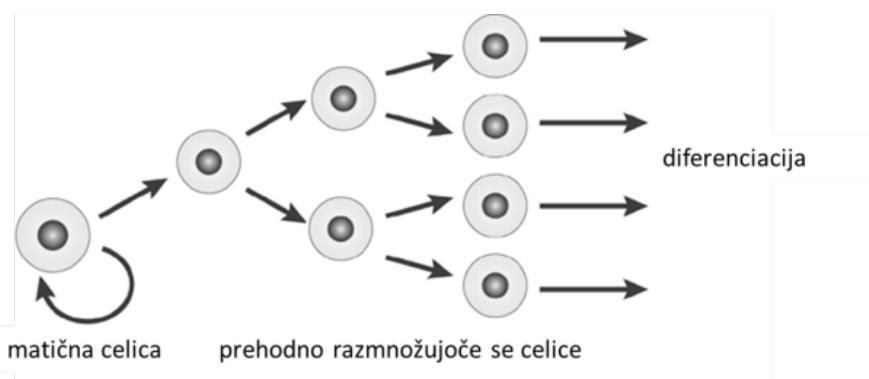
Fibroblaste, pridobljene iz mišje kože, so uspešno reprogramirali v inducirane pluripotentne matične celice s transfekcijo štirih genov (OCT4, KLF4, SOX2 in cMYC) (Takahashi in Yamanaka, 2006). Človeške iPS so reprogramirali z vnosom OCT4, KLF4, SOX2 in Lin28 (Takahashi in sod., 2007). Človeške iPS so primerjali s človeškimi EMC in ugotovili, da imajo enako gensko ekspresijo in epigenetsko strukturo kromatina, vendar pa med samim postopkom reprogramiranja lahko pride do mutacij oziroma do obdržanja določenih lastnosti somatskih celic. iPS so pridobili že iz vseh človeških tkiv, lahko jih pridobijo iz pacientov, ki že imajo neko okvaro in tako pridobijo *in vitro* model za študije bolezni in testiranje zdravil.

2.1.3 Odrasle matične celice

Odrasle oz. za tkivo specifične matične celice so multipotentne, zmožne razvoja v nekaj različnih celičnih tipov enega organa ali nekaj tkiv. Lahko jih razdelimo na ti. parenhimske, ki generirajo nova somatska nevezivna tkiva in mezenhimske (MMC), ki generirajo npr. fibroblaste, adipocite, hondrocite, osteoblaste, gladke mišične celice. MMC so močno razpršene, parenhimske matične celice pa se nahajajo v organih v nišah. Niša je okolje v katerem se nahajajo primitivne matične celice, ki so zmožne proizvesti vse celice, ki gradijo nek organ, in je najbolj pomembna za usmerjanje razvoja matičnih celic (Woodward in sod., 2005). Niša je ostala abstrakten koncept do leta 2000, ko so pri vinski mušici (*Drosophila melanogaster*) odkrili in opisali celice v niši ženskih in moških germinalnih celic (Xie in Spradling, 2000). Z razvojem metod osamitve posameznih komponent v niši, genetskih metod in tehnik slikanja, so dokaj natančno identificirali različne celične niše (Tumbar in sod., 2004; Xie in sod., 2009). Najprej so mislili, da celice in eksudati, ki sestavlajo nišo izhajajo iz drugih celičnih linij kot matične celice, na katere vplivajo. V različnih študijah so sedaj identificirali prekurzorske celice kot kritične komponente niše, ki vplivajo na obnašanje in aktivnost matičnih celic, iz katerih so se razvile. V niši, kjer se nahajajo matične celice, se nahajajo različne komponente, to so celične adhezivne molekule, ki MCMŽ omogočajo pripenjanje, ekstrinzični faktorji, ki

regulirajo njihove odzive in faktorji, ki so odgovorni za njihovo asimetrično delitev (Li in Xie, 2005).

Po definiciji morajo matične celice imeti tri lastnosti: (i) samo obnavljanje, z njim vzdržujejo in razmnožujejo zalogo matičnih celic; (ii) diferenciacijo v več linij (angl. *multi-lineage differentiation*), to je zmožnost razvoja v več celičnih tipov, ki gradijo tkivo (Slika 2) in (iii) plastičnost, to je sposobnost razvoja matičnih celic v tkiva ali organe različne od tistih iz katerega izvirajo. S simetrično delitvijo se matična celica deli v dve hčerinski matični celici in s tem vzdržuje zalogo matičnih celic ali pa z asimetrično delitvijo v matično celico in prekurzorsko celico, ki se dalje diferencira in deli v celice, ki tvorijo organ (Reya in sod., 2001). Matične celice v tkivih so večino časa v mirujoči obliki (angl. *quiescent*). Prekurzorske celice, ki se aktivno delijo, velikokrat opisujejo kot prehodno razmnožujoče (angl. *transiently amplifying*) celice (Knoblich, 2001). V svojem okolju se aktivno delijo samo določen čas, da se poveča zaloga prekurzorskih celic, ki so potrebne za diferenciacijo v celice, ki tvorijo ali regenerirajo specifično tkivo (Blanpain in sod., 2007).



Slika 2: Asimetrična celična delitev (povzeto po Knoblich, 2001)

Figure 2: Assymetric cell division (adapted from Knoblich, 2001)

OMC so našli v mnogih tkivih, kjer neprekinjeno gradijo in regenerirajo tkivo kot del normalne fiziologije ali kot odziv na poškodbe. Poznane so hematopoetske, epidermalne, celice prebavnega trakta, celice živčnega sistema, mlečne žlez in druge. Kompleksne organe, kot so ledvica in pljuča, verjetno vzdržujejo različni tipi OMC, od katerih nekateri

še niso bili identificirani. Na splošno velja, da pomanjkanje specifičnih označevalcev otežuje izolacijo za posamezno tkivo specifičnih matičnih celic. Poleg tega pa pomanjkanje zanesljivih testov za oceno funkcije mnogih somatskih matičnih celic onemogoča nadaljnje analize (npr. transkriptomiko).

Preglednica 1: Tipi odraslih matičnih celic (prirejeno po Eckfeldt in sod., 2005).

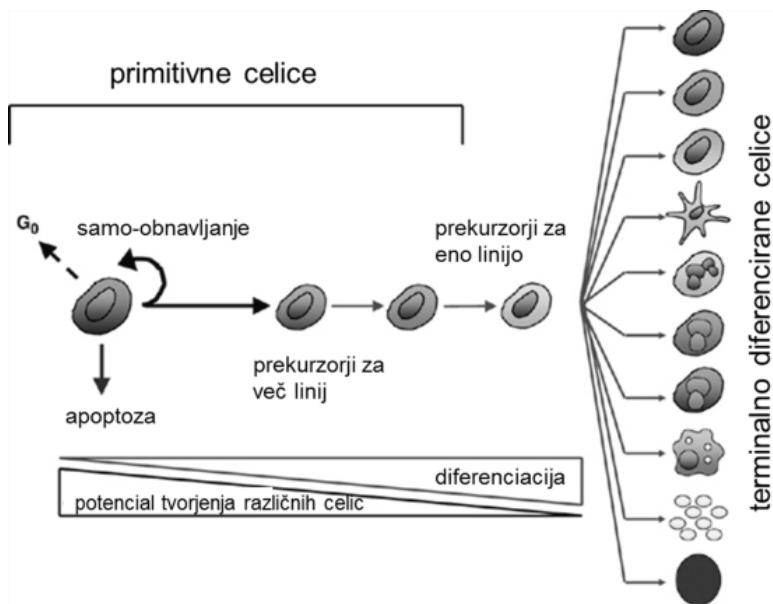
Table 1: Mammalian adult stem cells (adapted from Eckfeldt et al., 2005).

Tkivo	Tip matičnih celic	Niša	Diferencirajo v
kri	hematopoetične	kostni mozeg	vse mieloidne in limfoidne linije krvi
mezenhim	mezenhimske	kostni mozeg	kosti, hrustanec, ligamenti, mišično tkivo, maščobno tkivo
možgani	živčne matične celice/neurosfera	subventrikularna cona in hipokampus	neuroni, glialne celice, oligodendroci
črevo	celice v kriptah/črevesni epitelni prekurzorji	črevesne kripte	enterociti, enteroendokrine celice, celice goblet, panethove celice
srce	srčni prekurzorji	ND*	kardiomiociti
jetra	ovalne celice	terminalni žolčni kanali	hepatociti in kolangiociti
trebušna	multipotentni	ND	endokrine in acinarne celice
slinavka	prekurzorji		
skeletne mišice	satelitne celice	med sarkolemo in bazalno lamino	miociti/miofibrile
koža/lasje	celice lasnih mešičkov (angl. <i>bulge cells</i>)	zunanja ovojnica korenine v lasnem foliklu	epidermis, lasni folikli, žleze lojnice
moške zarodne celice	spermatogoniji (A _s)	bazalna membrana semenskih kanalčkov	sperma
mlečna žleza	MCMŽ	bazalna pozicija	luminalne in mioepitelne celice

*ND - nedefinirano

Najbolje okarakterizirane OMC so **hematopoetske matične celice** (HMC), ki se nahajajo v kostnem mozgu. HMC lahko osamimo v skoraj čisti populaciji z uporabo sortiranja s pretočno citometrijo (Osawa in sod., 1996). Skozi celotno življenje organizma iz HMC nastajajo vse krvne celice mieolidnih (monociti, makrofagi, neutrofilci, bazofilci, eozinofilci, eritrociti, trombociti in nekatere dendritične celice) in limfoidnih linij (T-celice, B-celice, celice ubijalke (NK) in nekatere dendritične celice) (Pina in Enver, 2007). HMC lahko diferencirajo tudi v druge specializirane celice npr. v adipocyte, kardiomiocite, endotelijiske celice, fibroblaste/miofibroblaste, jetrne celice, osteohondrocyte in celice trebušne slinavke. Med diferenciacijo HMC izgubijo zmožnost samo obnavljanja in postanejo vse bolj in bolj omejene v diferenciacijskem potencialu. Izražanje genov,

povezanih s samo obnavljanjem se tekom diferenciacije zniža, poveč pa se izražanje genov, značilnih za posamezno celično linijo (Slika 3). HMC so najbolj mobilne matične celice, ki lahko potujejo znotraj kostnega mozga in celo v vranico ali jetra v primerih, ko kostni mozek ni zmožen zadostne hematopoeze (Wright in sod., 2001). HMC so intenzivno proučevali zaradi njihove uporabnosti v terapijah obolenj krvi, dednih obolenj krvi in avtoimunskih bolezni.



Slika 3 : Diferenciacija hematopoetskih matičnih celic (prijejeno po Pina in Enver, 2007)

Figure 3: Differentiation of haematopoietic stem cell (adapted from Pina and Enver, 2007)

Do pred kratkim je veljalo, da **živčne matične celice** (ŽMC) ne obstajajo, oziroma, da jih je izjemno malo. Vendar so ugotovili, da se ŽMC nahajajo v subventrikularni coni lateralnih ventriklov in v regiji dentatus v hipokampusu. ŽMC se vseskozi diferencirajo in nadomestijo v procesu staranja ali zaradi nevrodegenerativnih bolezni odmrle nevrone (Gage, 2000). Nevrogenezo so povezali tudi z učenjem in spominom (Villeda in sod., 2011). Identificirali so nekaj označevalcev ŽMC, vendar za njihovo osamitev najpogosteje uporabljajo nevrosfere. Gre za heterogeno populacijo, ki vsebuje tudi ŽMC (Bez in sod., 2003).

Čeprav so epiteliji lahko sestavljeni iz ene ali več plasti in lahko nastanejo iz ektoderma, endoderma ali mezoderma, imajo skupne značilnosti na molekulski in celični ravni. Njihov razvoj se začne s plastjo celic, ki se prilepijo na bazalno membrano (BM), ki je bogata z

zunaj celičnim matriksom (ZCM) in z rastnimi dejavniki. Celice so preko integrinov povezane z ZCM ligandi, povezujejo pa se tudi med sabo in na ta način vzpostavijo celično polarizacijo (Shin in sod., 2006). Homeostazo tkiv vzdržujejo matične celice. Za popolno samo obnovitev črevesja je potrebnih približno 5 dni, da se zamenja pljučni epitelij pa kar pol leta. Nekatera tkiva konstantno krožijo med različnimi stopnjami razvoja, npr. lasje in mlečna žleza. Najbolj raziskane epiteljske matične celice se nahajajo v črevesju, epidermisu, mlečni žlezi in roženici.

Mikrovili s kriptami so osnovni gradniki preprostega epitelija v tankem črevesu. **Črevesne matične celice** in njihovi prehodno se razmnožujoči prekurzorji se nahajajo v regiji blizu baze kripte. Med migracijo izven njihove niše se prenehajo deliti in diferencirajo v različne celične linije zrelih mikrovilov. Črevesne matične celice lahko diferencirajo v štiri linije: absorbtivne enterocite, celice goblet, ki izločajo mucin, nevroendokrine celice, ki izločajo peptidne hormone in celice paneth, ki izločajo mikrobicide (Blanpain in sod., 2007).

Epidermalne matične celice so celice, ki tvorijo kožo, lasne folikle in žleze lojnice in se nahajajo v zunanjji ovojnici las in dlak v bližini mišice naježevalke (angl. *bulge cells*). Lasni folikel nastane med embriogenezo, s kondenzacijo specializiranih mezenhimskih celic v dermisu in s stimulacijo celic v epidermalni bazalni plasti. Epidermalne celice spremenijo obliko in oblikujejo plakodo lasnih prekurzorskih celic, ki se nato delijo in rastejo v epidermalno plast. Po rojstvu baza zrelega folikla vsebuje hitro deleči se matriks celic, ki diferencirajo ter tvorijo las in lasno korenino. V transplantacijskih poskusih sta iz teh celic nastala tako epidermis kot lasni folikli, *in vitro* pa so se razvile v kolonije nediferenciranih celic (Blanpain in sod., 2004). Ko se začne nov cikel izraščanja lasu, so mirujoče celice, ki so v bazi lasnega mešička, stimulirane, da migrirajo, se delijo in tako nastanejo vse celice potrebne za regeneracijo lasnega folikla in rast lasu (Blanpain in sod., 2007). Označevalec epidermalnih matičnih celic je Lgr5 (Jaks in sod., 2008). Matične celice bi lahko uporabili za zdravljenje plešavosti, saj je znanstvenikom že uspelo namnožiti in presaditi matične celice iz kože ter usmeriti njihovo rast v lasne mešičke v golih miših (Toyoshima in sod., 2012). Matične celice v mlečni žlezi bodo podrobno obravnavane kasneje.

2.1.4 Rakave matične celice

Rakave matične celice imajo funkcionalne lastnosti in označevalce podobne normalnim matičnim celicam, odkrili pa so jih pri širokem spektru rakavih obolenj. Take celice so odporne na različne terapije zaradi njihove majhnosti, počasne delitve in visokega izražanja ABC transporterjev, telomeraz in ostalih ključnih matičnih genov ter odsotnosti označevalcev diferenciacije (Alvarez in sod., 2012). Ena od hipotez predpostavlja, da so RMC matične celice, ki so se spremenile oziroma mutirale in postale rakave (Croker in Allan, 2008). Danes pod RMC uvrščajo celice, ki so pridobile lastnosti matičnih celic in imajo še znižano raven izražanja p53 ter so oblikovale lastno nišo, ki jih ščiti od preostalega okolja (Borovski in sod., 2011). Zato so RMC odporne na kemoterapijo in obsevanja, ki normalno ubijejo druge hitro deleče se tumorske celice.

2.1.5 Celične terapije

Trenutno je v bazi ameriškega nacionalnega inštituta za zdravje (National Institute of Health – Cell Therapy) registriranih več kot 4000 kliničnih študij s področja matičnih celic. Krvotvorne matične celice, matične celice iz popkovnične krvi in nekatere tkivne matične celice že uporabljajo pri zdravljenju različnih bolezni (npr. levkemij, limfomov, bolezni kostnega mozga). Pri tem ima uporaba lastnih (avtolognih) celic veliko prednosti pred uporabo tujih (alogenih) matičnih celic, saj pri njihovi presaditvi ne pride do zavrnitvene reakcije. Uspeh celične terapije ni nujno posledica regeneracije zaradi injiciranih celic, lahko je posledica reduciranja poškodb in pospešitve obnavljanja tkiva z drugimi mehanizmi npr. kontrola vnetja, imunosupresija, izločanje rastnih dejavnikov in povečano preživetje celic. Pri podganah z okvaro hrbtnice so po injiciranju matičnih celic izoliranih iz zobne pulpe opazili delno izboljšanje, ki je bilo posledica več mehanizmov (Sakai in sod., 2012). Pri modelih kapi so po injiciranju MMC opazili izboljšave, več celic se je vgradilo v okvarjeno možgansko tkivo, ko so jih injicirali v karotidno arterijo v primerjavi z intravensko aplikacijo (Gutierrez-Fernandez in sod., 2011). V kliničnih študijah uporabljajo OMC za zdravljenje kardiomiopatij, poškodb hrbtničeve in centralnega živčnega sistema. Uporabnost MMC za zdravljenje poškodb kosti in za boljše vraščanje

zobnih vsadkov je že dokazana. EMC diferencirane v pigmentne celice retine testirajo za tretiranje distrofije, celice, diferencirane v oligodendrocite pa za tretiranje lezij v hrbtenjači (Alvarez in sod., 2012).

Za terapijo z matičnimi celicami je potrebno več milijonov celic za enega pacienta. Ker je OMC težko gojiti, so bile embrionalne matične celice smatrane kot najboljši vir celic za terapije. Njihov tumorigeni potencial in način pridobivanja (iz zarodkov) pa njihovo uporabnost zelo omeji. Leta 2002 so odkrili, da so OMC imunotolerantne. Mišje srčne prekurzorske celice so injicirali v podganja srca in opazovali njihovo vključitev v miokard (Saito in sod., 2002). Mišje EMC in iPS so imunogene in po njihovem injiciraju v tkivo alogenih miši izzovejo T-celični odziv s poškodbami tkiv. Do sedaj v terapijah najbolj uporabljene MC so mezenhimske matične celice. Po injiciraju v alogene miši in po avtotransplantacijah pri ljudeh MMC delujejo protivnetno. Vnetje zmanjšajo in omejijo razmnoževanje citotoksičnih T celic, celic ubijalk in antigen predstavlajočih celic (dendritične celice in makrofagi). A do sedaj še ni bilo narejenih veliko kliničnih raziskav (Alvarez in sod., 2012). Nedavno so sicer odkrili, da so tudi MMC imunogene (Schu in sod., 2012) ob injiciraju v alogene živali. Če slednje res drži, bodo OMC edini tip matičnih celic, pridobljenih od drugih donorjev, ki bi jih lahko presajali, medtem ko bodo varne le avtologne transplantacije EMC in MMC. Različne MC, še posebej iPS, so uporabne tudi kot model za različne bolezni in za testiranje zdravil, saj lahko izvirajo iz kateregakoli tkiva in imajo tako za obolenje/tkivo specifične lastnosti.

Regenerativna medicina je uporabna tudi v veterinarski medicini (Ribitsch in sod., 2010). V mlečni žlezi bi s celičnimi terapijami lahko vplivali na funkcijo mlečne žleze z vnosom eksogenih matičnih celic ali s stimulacijo endogenih matičnih celic. Slednje bi omogočilo spremembo v rejskih pristopih, prvo pa predstavlja novo strategijo za študij delovanja mlečne žleze.

2.2 MLEČNA ŽLEZA

Mlečno žlezo ali vime prištevamo k reproduktivnemu sistemu organizma, čeprav je to dejansko kožna žleza z eksokrinim izločanjem. Popolnoma se razvije in deluje le pri ženskih organizmih. To je organ, ki v teku življenja ženskega organizma menja tako svoj anatomske obseg in obliko, kakor tudi funkcijo v skladu s cikličnimi dogajanjimi v spolnem sistemu in s potrebami novorojenega organizma (Vatovec, 1981). Razvoj mlečne žleze poteka v definiranih stopnjah, ki so povezane s spolnim razvojem in reprodukcijo. Delimo ga v embrionalni, predpubertetni in v pubertetni razvoju, nosečnosti, laktacijo in involucijo. Je edini organ katerega glavni razvoj se zgodi po rojstvu (Richert in sod., 2000; Russo in Russo, 2004). Je zelo plastičen organ, saj lahko ciklično raste, spremeni zgradbo in funkcionalno diferencira ob vsaki nosečnosti.

Pri vseh sesalcih se mlečna žleza razvije iz lokalizirane odebilitve ektoderma. Ko se epidermalna skorja, obdana z mlečnima linijama, dvigne, nastane brst. Ta način organogeneze je podoben pri glodavcih, prežekovalcih in ljudeh (Hovey in sod., 2002). Med razvojem gre skozi več stopenj: med razvojem zarodka se razvije ti. anlage (zasnova) za mlečno žlezo, sledi izometrična rast (enako hitro kot ostalo telo) pri dojenčku in v prepuberteti, v puberteti žleza raste alometrično (hitreje kot preostalo telo), kanalčki (dukti) se podaljšajo in razvejajo, ob spolni zrelosti se še bolj razvejajo, tvorijo se alveolarni brsti (Hovey in sod., 2002). V zadnji stopnji pride do funkcionalne diferenciacije med nosečnostjo, ko pride do masivnega lobuloalveolarnega razrasta epitelija, posledica je laktacija, ki ji sledi involucija. Vsi ti procesi so uravnnavani s strani hormonov. Estrogen (E), progesteron (P), prolaktin (PRL), rastni hormon (RH) in ščitnični hormoni so potrebni za podaljševanje duktov, njihovo razvejanje in tvorbo alveol. PRL, hormoni nadledvične žleze, RH, ščitnični hormoni, oksitocin in inzulin pa za popoln lobuloalveolaren razvoj in sintezo mleka. Na odziv epitelija na različne hormone in rastne dejavnike vplivajo tudi interakcije med epitelijem in stromo, ki so vrstno specifične in usmerjajo za vrsto specifično morfogenezo.

2.2.1 Citologija – anatomske razlike pri različnih vrstah

Mlečna žleza je visoko specializiran organ, sestavljen iz alveolarnih in kanalčastih struktur. Epitelno plast sestavljajo funkcionalno različne celične populacije, poleg matičnih celic še prekurzorske celice in terminalno diferencirane celice (Visvader, 2009). Glavna celična tipa v mlečni žlezi predstavljajo epitelne in mioepitelne celice, ki so odgovorne za sintezo mleka in njegovo izločanje. Epitelij je ugnezden v stromo, ki jo sestavljajo mezenhimske celice (fibroblasti, adipociti), imunske celice ter zunaj celični matriks. Histološko se mlečne žleze prežvekovalcev močno ločijo od mlečne žleze miši, pri slednji je epitelij ugnezden v stromo adipocitov, medtem, ko je zgradba človeške mlečne žleze zelo podobna mlečni žlezi goveda in koze, kjer je epitelij v direktnem kontaktu s stromalnimi celicami (Hovey in sod., 1999).

2.2.1.1 Človek in prežvekovalci

Parenhim žleze gradijo majhni sekrecijski mehurčki ali mešički, alveole. Gre za kompleksno sestavo, kjer se alveole izlivajo prek majhnih kanalčkov (duktov) v vse večje in so združene v lobule, tvorijo ti. terminalne kanalčaste lobularne enote (angl. *terminal ductal lobular units* - TDLU). Lobuli so med sabo ločeni z interlobularnim vezivnim tkivom, medtem, ko intralobularno vezivno tkivo obdaja alveole in kanalčke v posameznem lobulu (Hovey in sod., 2002; Visvader, 2009). Med alometrično rastjo epitelno tkivo napolni celotno mlečno žlezo, histomorfogeneza je podobna kot pri človeku (Hovey in sod., 1999). Večina proliferacije poteka v majhnih duktih TDLU, tu celične delitve potekajo naključno na večih mestih. Pri telicah se velikost mlečne žleze, v primerjavi z živo težo, poveča 3.5-krat od 2 do 9 meseca starosti in dalje raste izometrično med 9 in 16 mesecem (Hovey in sod., 2002). Podaljševanje duktov, tako pri človeku kot pri prežvekovalcih, je povezano s specifičnimi interakcijami med stromo in epitelijem, posledica je nastanek na rahlo povezane strome znotraj lobula, ki obdaja dukte in bolj goste interlobularne strome (Hovey in sod., 2002).

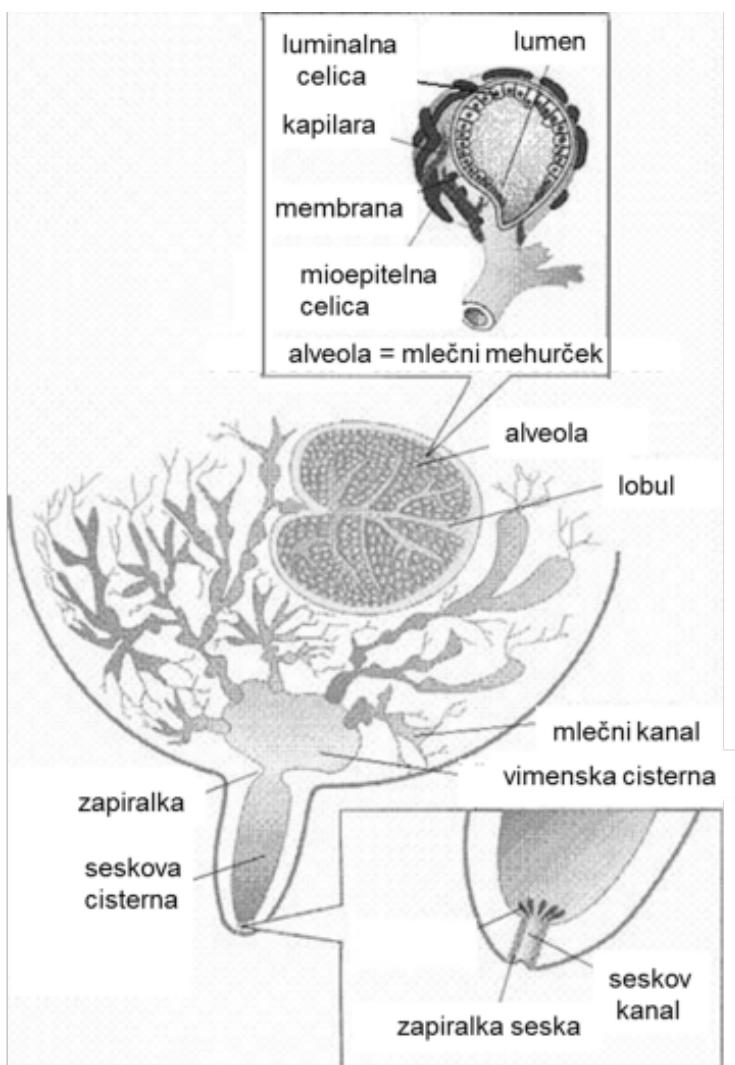
Pri kozah po alometrični rasti med brejostjo količina parenhima naraste nekje okrog 70 – 80 dneva laktacije, ko alveole nabreknejo. Povečajo se epitelne celice, njihova sekretorna aktivnost, povišana je sinteza laktoze in RNA (Rowson in sod., 2012).



Slika 4: Primerjava morfogeneze duktov pri različnih vrstah. (A) Razrast duktov v mlečni žlezi 8 mesečne peripubertetne miši BALB/c; (B) terminalna duktalno lobularna enota (TDLU) v mlečni žlezi 6 mesečne ovce pred puberteto; (C) TDLU tipa 1 v dojki 18 letne ženske, ki ni rodila otrok; Hovey in sod., 2002.

Figure 4: Species comparison of ductal morphogenesis. (A) Ductal outgrowth in the mammary gland of a peripubescent 8-week-old BALB/c mouse; (B) TDLU within the mammary gland of a prepubertal 6-week-old ewe lamb; (C) TDLU type 1 within the breast of a nulliparous 18-year-old human female; Hovey et al., 2002.

V kravjem vimenu imajo alveole, ki proizvajajo mleko premer od 0.1 – 0.25 mm (Vatovec, 1981). Iz njih vodijo mlečni kanalčki, ki se izlivajo v vse večje mlečne kanale. Kanalčki se dalje spajajo v večje odvodne kanale, ki se vlivajo v skupno votlino žleznega kompleksa, mlečno cisterno. Na ekstremnem koncu cisterne je seskov kanal, ki ga obkroža in zapira gladkomišična zapiralka (Frandsen in sod., 2009). Vzdolž začetnih kanalčkov, ki vodijo iz alveol, so podolgovate, okrog alveol pa košaraste oblike mioepitelnih celic, te se odzivajo na hormonalne signale (oksitocin) in vršijo kontrakcijo in tako iztiskanje mleka (Slika 5). Ta sistem kontraktilnih tvorb ima poseben pomen za zadrževanje, izpraznjevanje in iztiskanje žleznega sekreta. Celice, ki gradijo mlečno žlezo pri različnih vrstah imajo skoraj identično strukturo ne glede na to, da ima mleko, ki ga proizvajajo, različno sestavo. Med laktacijo se potrebe novorojenca po mleku vseskozi spreminja, temu se sekretorne celice prilagajajo s povečanjem njihovega števila, površine ali volumna celic in posameznih organelov, ko je potreba po mleku večja (Vatovec, 1981).



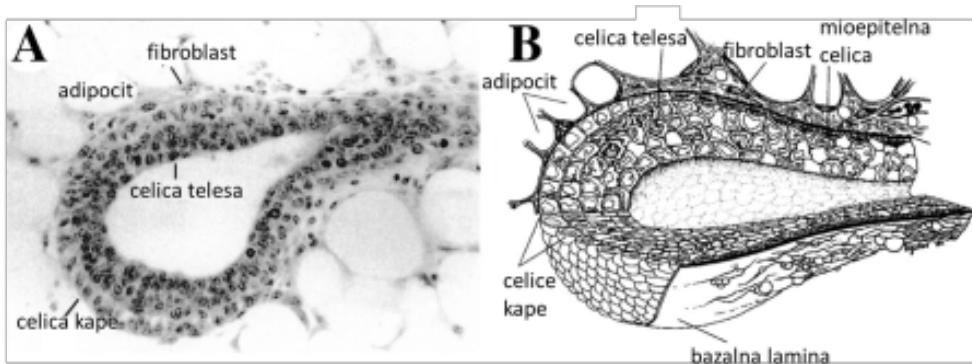
Slika 5: Shematski prikaz prežekovalske mlečne žleze (prirejeno po Frandson in sod., 2009).

Figure 5: Shematic representation of ruminant mammary gland (adapted from Frandson et al., 2006)

Po prenehanju laktacije, sledi involucija, gre za remodeliranje tkiva in regresijo epitelija. Pri kravah involucija najpogosteje traja približno 60 dni (ti. suho obdobje), sledi ji ponovna brejost, zato mlečna žleza ne preide v prvotno obliko. Pri večini sesalcev pa ni zaporednih brejosti/nosečnosti in mlečna žleza se zato vrne v obliko, ki jo ima pred gravidnostjo, vse alveole regresirajo. Pri kozah po odstavitevi mladičev v mlečni žlezi poteka masivna apoptoza in alveole propadejo (Wareski in sod., 2001).

2.2.1.2 Miš

Mišja mlečna žleza ne vsebuje TDLU, ampak terminalne alveolarne brste (angl. *terminal end buds* – TEB), ki nastanejo nekje okrog 26 dneva starosti. Terminalen brst je glavno mesto mitoze, od tod se podaljšujejo kanalčki in vdirajo v maščobno blazinico (angl. *mammary fat pad* - MFP), v katero so ugnezdeni. Njihova oblika in velikost se spreminja od 0.1 do 0.5 mm. Konec brsta gradi ena sama plast celic kape (angl. *cap cells*), ki niso polarizirane in nimajo organiziranega celičnega skeleta, ter so samo rahlo povezane med sabo (Slika 6). Med puberteto se duktus še podaljšajo, dokler ne dosežejo robov maščobne blazinice pri približno osmih tednih starosti. To je odvisno od linije miši. Med podaljševanjem se duktus tudi razvezajo in zapolnijo maščobno blazinico, a se drug drugemu nikoli ne približajo na več kot 250 µm (Faulkin in Deome, 1960), najbrž zaradi difuzije lokalnih inhibitornih signalov iz bližnjih duktov. Stroma mišje mlečne žleze vsebuje veliko adipocitov, medtem, ko je prežvekovalska/človeška bolj fibrozna. Kljub razlikam v arhitekturi pa je celična hierarhija identična (Hovey in sod., 2002; Visvader, 2009).



Slika 6: Histologija terminalnega alveolarnega brsta (TEB) v estrusu pri 8 mesečni miši BALB/c (A) in shema različnih celičnih tipov v TEB (B) (povzeto po Hovey in sod., 2002).

Figure 6: Histology of a TEB found at estrus in an 8-week-old BALB/c mouse (A) and schematic diagram of the various cell types in a typical TEB (B) (adapted from Hovey et al., 2002).

Preglednica 2: Primerjava razvoja mlečne žleze pri miših, človeku in prežvekovalcih (povzeto po Rowson in sod., 2012)

Table 2: Comparative aspects of mammary gland development in mice, humans and ruminants (adapted from Rowson et al., 2012)

Lastnost	Miš	Človek	Prežvekovalci
morfologija	dukti, TEB	TDLU	TDLU
histologija strome ^a	maščobno in vezivno tkivo	intralobularno in interlobularno vezivno tkivo, maščobno tkivo	intralobularno in interlobularno vezivno tkivo, maščobno tkivo
število galaktoforov (mlečnih vodov)	1	8-15	1
proliferacija epitelija	koncentrirana na koncu brstov in v alveolah	koncentrirana na koncu brstov ali v TDLU	periferne cone ^b TDLU
odziv na estrogen	konec brsta	epitelne celice ^c	epitelne celice ^{a, d}
odziv na progesteron	alveole	negativni odziv oziroma brez učinka	brez učinka
tumorigenost	spontano, virusi	spontano	redko, malo primerov ^e
prekurzorji tumorjev	alveolarna hiperplazija, atipična hiperplazija duktov, <i>in situ</i> karcinom duktov	atypična hiperplazija duktov, <i>in situ</i> karcinom duktov	neznano
hormonalna odvisnost tumorjev	redko	50-60 %	neznano

^a(Hovey in sod., 1999) ^b(Capuccio in sod., 2002) ^c(Laidlaw in sod., 1995) ^d(Ellis in sod., 1998) ^e(McElroy in Bassett, 2010; Ohfuchi, 2012; Povey in Osborne, 1969)

2.3 MATIČNE CELICE V MLEČNI ŽLEZI

Najnovejši rezultati potrjujejo koncept, da populacijo epitelnih celic v mlečni žlezi sestavljajo celice, ki so v hierarhičnem odnosu, njihova diferenciacija napreduje od matičnih celic preko prekurzorskih celic (angl. *progenitors*) do luminalnih in mioepitelnih celic (Siegel in Muller, 2010). MCMŽ se lahko diferencirajo v epitelne in mioepitelne celice in tako tvorijo delajočo mlečno žlezo *in vivo* (Shackleton in sod., 2006). Standardni test za detekcijo in kvantifikacijo MCMŽ pri miši je sposobnost matičnih celic mlečne žleze, da posamezna celica oziroma omejeno število celic lahko rekonstituira celotno mlečno žlezo *in vivo* (Stingl in sod., 2006). Trenutni rezultati nakazujejo, da imajo nediferencirane celice bazalno pozicijo v mlečni žlezi, njihova proliferacija je počasna, kar je tudi značilnost matičnih celic, ki izvirajo iz drugih tkiv, zato so te celice dober kandidat

za MCMŽ. *In vitro* test za detekcijo prekurzorskih celic mlečne žleze je njihova sposobnost tvorjenja kolonij na podlagi fibroblastov (ti. CFC test – angl. *colony forming assay*). Čeprav je bilo predlaganih in testiranih več različnih pristopov za detekcijo in izolacijo MCMŽ, pri nobeni vrsti še niso odkrili definitivnih označevalcev.

2.3.1 Izolacija in karakterizacija MCMŽ

Za izolacijo in opis MCMŽ so uporabili različne metode, zato je njihove rezultate včasih težko primerjati. Dokazi o prisotnosti odraslih matičnih celic v mlečni žlezi so bili pridobljeni s transplantacijami, retroviralnim označevanjem teh celic in s študijami inaktivacije genov, ki se nahajajo na kromosому X (Smalley in Ashworth, 2003). Celice so označili tudi s tehniko zadrževanja barvila BrdU (5-bromo-2-deoksi-uridin), jih sortirali s pomočjo označevalcev na celični površini (npr. CD49f, EpCAM, CD24, CD29, CD10) in z uporabo izločanja barvila Hoechst 33342 (Stingl, 2009). Večina študij je bilo narejenih na mišjih modelih in kasneje še s človeškimi celicami. V zadnjih nekaj letih so se raziskovalci začeli ukvarjati tudi z matičnimi celicami v mlečnih žlezah krav, ovc in kobil.

2.3.1.1 Miš

Mišja mlečna žleza je zelo primeren organ za **transplantacijske študije**, saj se večina razvoja žleze zgodi po rojstvu organizma, poleg tega pa je zelo dostopen organ za operacije. Pri miših je epitelij v predpubertetni mlečni žlezi omejen na zelo majhnem področju in ga je mogoče odstraniti in tako narediti ti. očiščeno maščobno blazinico, pripravljeno za vsaditev drugih celic. Deome in sodelavci so (Deome in sod., 1959) operativno odstranili dukte iz mišje mlečne žleze in vsadili košček donorskoga epitelija, to je bil prvi uspešen rekonstitucijski poskus. Metodo so razvili, da bi dokazali, da so neoplastična tkiva vir tumorjev. Variacije njihove tehnike so še danes ena izmed najbolj uporabljenih metod. Kasneje so Daniel in sodelavci (Daniel in sod., 1968) dokazali, da v mlečni žlezi obstajajo celice z regenerativnimi zmožnostmi z zaporednimi serijskimi transplantacijami, ki so trajale dve leti. Opazili so tudi, da po vsaki pasaži robustnost

epitelnih tvorb upada in da je velika variacija med posameznimi tvorbami. To je bil prvi namig o prisotnosti celične hierarhije. Sledilo je več študij, katerih zaključek je bil, da zmožnost rekonstitucije mlečne žleze ni odvisna od starosti, reproduktivne zgodovine donorja in ne od regije iz katere je bilo odvzeto tkivo (Deome in sod., 1978; Smith in Medina, 1988; Young in sod., 1971). Kasneje so začeli presajati disociirane celice in naredili poskus z redčenjem celic (angl. *limiting dilution*), da bi ugotovili, če je ena sama celica sposobna tvoriti mlečno žlezo. Zaključili so, da posamezna matična celica lahko generira 10^{12} do 10^{13} klonalnih potomcev, preden preide v senescenco (Kordon in Smith, 1998).

Potencialne matične celice so poskušali identificirati tudi s pomočjo **elektronske mikroskopije** (Chepko in Smith, 1997). Najbolj verjetni kandidati za matične celice so majhne celice poimenovane SLC (angl. *small light cells*), ki se v epiteliju nahajajo s frekvenco 1 – 3 % (Kordon in Smith, 1998). SLC imajo značilnosti multipotentnih celic: zmožne so se deliti, lahko so v mirujoči obliki, delijo se asimetrično in simetrično in imajo nediferencirano citologijo (Chepko in Smith, 1999). Pri SLC sta jedro in citoplazma značilno svetli, razmerje med jedrom in citoplazmo je visoko. Organeli so majhni in po strukturi ne kažejo, da bi imeli funkcijo. SLC so pogosto prisotne v parih, to nakazuje, da se asimetrično delijo. Pogosto niso v stiku z drugimi celicami, nahajajo pa se v bazalni poziciji. Poleg njih so identificirali še ULLC (angl. *undifferentiated large light staining cells*), ki so dva do trikrat večje od SLC in se v epiteliju nahajajo bolj proti lumnu in so včasih tudi v kontaktu z njim. Poleg elektronske mikroskopije so za sledenje prej omenjenih celičnih tipov uporabili tudi svetlobno mikroskopijo.

Metodo zadrževanja barvila BrdU (angl. *label retention*), ki je sintetični analog timidina in se vključi v DNA med sintezo v delečih se celicah, so tudi uporabili za identifikacijo MCMŽ. MCMŽ so celice, ki zadržijo barvilo, ker med mitozo DNA v hčerinski celici ne razporedijo naključno, ampak vedno obdržijo matrično DNA. Na ta način odrasle matične celice ne kopičijo mutacij, ki nastajajo med podvajanjem DNA (Woodward in sod., 2005). Sledil je razvoj tehnik, ki so vključevale **sortiranje** epitelnih celičnih populacij s pretočno citometrijo. Na začetku so za identifikacijo potencialnih MCMŽ uporabljali barvili Hoechst 33342 in Rodamine-123, ki se vežeta na DNA. Ta metodologija temelji na

dejstvu, da MCMŽ lahko izločijo barvilo, ker imajo prenašalce z ATP-vezavno domeno. Posledično je Hoechst negativna populacija (SP – angl. *side population*) obogatena z MCMŽ (Smalley in sod., 2005). Trenutno najbolj uporabljana metoda je sortiranje glede na izražene oz. odsotne specifične genetske označevalce (Sleeman in sod., 2006; Smalley in sod., 1998; Welm in sod., 2002). Uporabljenih je bilo veliko markerjev (Preglednica 3), nekateri so bili izbrani glede na predhodno uporabo pri drugih tipih matičnih celic (npr. Sca1, nestin). Do danes ni točno znano, če imajo vsi za selekcijo uporabljeni označevalci funkcionalno vlogo v biologiji MCMŽ.

Preglednica 3: Najpogosteje uporabljeni označevalci za imunofenotipizacijo matičnih/prekurzorskih celic v mlečni žlezi.

Table 3: Most commonly used cell surface markers to immunophenotype mammary gland stem/pregenitor cells.

Označevalc	Funcija	Izražanje	Človek	Vrsta Miš/podgana	Govedo
CD10/CALLA	membranski protein	mioepitelne in bazalne celice	+	±	
CD24	ligand za P-selektin	luminalne celice	+	srednje	+
CD29	integrin beta 1	visoko izražen na bazalnih celicah	+	visoko	+
CD31	označevalc endotelnih celic		-	-	-
CD44	interakcija med celicami, adhezija in migracija	visoko izražen na bazalnih celicah	visoko	+	+
CD45	regulira celično rast, diferenciacijo in onkogeno transformacijo		-	-	-
CD49f	integrin alfa 6	nizko izražen na luminalnih, visoko na bazalnih celicah	visoko	visoko	+
CD61	integrin beat 3		+	+	
EpCAM (ESA/CD326)	za epitelij specifičen antigen	visoko izražen na luminalnih in malo manj na bazalnih celicah	nizko ali +	+/-	+
Muc1 (EMA)	epiteljski membranski antigen	visoko izražen na luminalnih celicah	- ali +	- ali +	
Sca-1	stem cell antigen-1		- ali +	nizko ali +	-
Ter119 (Ly76)	veže se z mišjim glikoporinom A			-	-
ER	estrogenski receptor		-	-	- ali +
PR	progesteronski receptor		-	-	

Leta 2006 sta bili objavljeni dve pomembni študiji s katerima so prisotnost matičnih celic v mlečni žlezi dokazali z regeneracijo očiščene maščobne blazinice po vsaditvi posamezne matične celice (Shackleton in sod., 2006; Stingl in sod., 2006). Shackleton in sodelavci so izolirali $CD29^{hi}CD24^{low}$ celice, ki izražajo β -galaktozidazo (*LacZ*) in transplantirali eno samo označeno celico v očiščeno maščobno blazinico mišk divjega seva (angl. *wild type*). Ena sama celica je bila zmožna razvoja v za *lacZ* pozitivno razrast epitelija in tudi samo obnavljanja, ker je do razraščanja prišlo po več serijskih transplantacijah (Shackleton in sod., 2006). Pri miši MCMŽ najdemo v bazalni frakciji epitelnih celic, ki je definirana z označevalci $CD49f^{high}CD29^{high}CD24^{med}$, medtem ko imajo prekurzorske celice $CD49f^+CD29^{lo}CD24^{high}CD61^+$ fenotip, odrasle luminalne celice pa $CD49f^+CD29^{lo}CD24^{high}CD61^-$ fenotip (Asselin-Labat in sod., 2006; Asselin-Labat in sod., 2007; Shackleton in sod., 2006; Stingl in sod., 2006).

Še danes ni čisto jasno, kako matične in prekurzorske celice prispevajo k rasti mlečne žleze in njeni homeostazi. Poskuse sledenja celičnih linij (angl. *lineage tracing*) navadno izvajajo v miših, ki hkrati izražajo dva transgena: rekombinazo CRE, katere izražanje je uravnavano s strani promotorja, ki je specifičen za celično linijo in reporterski gen, ki se izraža samo, ko rekombinaza CRE odstrani stop kaseto, ki se nahaja pred tem genom. Ko se slednje zgodi, se reporterski transgen trajno izraža v celicah in njihovih potomcih (Van Keymeulen in Blanpain, 2012). V mlečni žlezi so z uporabo s Cre-označenih luminalnih in mioepitelnih linij ugotovili, da mlečna žleza nastane iz multipotentnih embrionalnih prekurzorjev, ki izražajo citokeratin 14. Iz slednjih nastanejo tako luminalne kot mioepitelne celice. Po rojstvu razvoj mlečne žleze med puberteto in gravidnostjo omogočata dva tipa dolgoživečih matičnih celic. Gre za unipotentne mioepitelne prekurzorje, ki izražajo citokeratina 8 in 18. Ti prekurzorji lahko diferencirajo tako v mioepitelne kot luminalne celične linije in niso vzdrževani s strani multipotentnih matičnih celic. Če v transplantacijskih poskusih, znižajo delež luminalnih unipotentnih prekurzorjev glede na mioepitelne prekurzorje, to stimulira diferenciacijo unipotentnih mioepitelnih prekurzorjev v luminalne celice (Van Keymeulen in sod., 2011). Ta odkritja nakazujejo, da so za linijo specifični prekurzorji odgovorni za rast in vzdrževanje mlečne žleze.

2.3.1.2 Človek in prežvekovalci

Zaradi omejenega dostopa do biopsij iz zdravih dojk, je o hierarhiji celic v človeški mlečni žlezi znanega manj kot pri miših (Fridriksdottir in sod., 2011). Pri človeku in prežvekovalcih gre najbrž za funkcionalno analogne populacije. V človeški mlečni žlezi je CD49f^{hi}EpCAM^{-lo} subpopulacija obogatena z MCMŽ, to so dokazali z *in vivo* transplantacijami v očiščeno maščobno blazinico (Lim in sod., 2010) ali pod ledvično kapsulo miši NOD/SCID (angl. *nonobese diabetic/severe combined immunodeficient*) (Eirew in sod. 2010; Eirew in sod., 2008). Luminalne prekurzorje in diferencirane luminalne epitelne celice, izolirane iz človeške mlečne žleze, določata CD49f^{hi}EpCAM⁺ in CD49f EpCAM⁺ fenotipa. Dontu in sodelavci so za študije humanih MCMŽ uporabili *in vitro* metodo gojenja neadherentnih kultur. Mamosfere so obogatene z MCMŽ in predniškimi celicami (Dontu in sod., 2003). Alternativni pristop za izolacijo predniških in MCMŽ populacij je spremeljanje aktivnosti encima aldehid dehidrogenaza (ALDH-1), katerega funkcija je oksidacija aromatskih in alifatskih aldehidov do ustreznih kislin. Izražanje tega encima v mlečni žlezi je lastnost, ki je skupna odraslim matičnim celicam in njihovim prekurzorjem in ni specifična za MCMŽ. Na ta način so ločili človeške in kravje epitelne frakcije (Ginestier in sod., 2007; Martignani in sod., 2010).

Ob transplantaciji človeških ali govejih epitelnih celic v očiščeno mišjo maščobno blazinico ne pride do klasičnega razrasta epitelija (Kuperwasser in sod., 2004; Rauner in sod., 2013). Alternativa tej metodi je ti. humanizirana maščobna blazinica, kjer se z vnosom obsevanih humanih fibroblastov stromo mišje mlečne žleze spremeni v okolje s signali, ki omogočajo razrast kanalčkov in alveolarnih struktur, ki izvirajo iz človeških matičnih celic (Proia in Kuperwasser, 2006). Transplantacija MCMŽ pod ledvično kapsulo miši NOD/SCID, kjer je obogatena populacija MCMŽ imobilizirana v kolagenskem gelu in vsajena pod ledvično kapsulo, je novejša metoda, ki omogoča dokaz prisotnosti MCMŽ v človeški mlečni žlezi (Eirew in sod., 2010). Metoda je bila uspešno uporabljena tudi za kravje celice (Martignani in sod., 2010). Uspešno so epitelija očistili tudi ovčjo mlečno žlezo (Hovey in sod., 2000), transplantacij vanjo pa niso naredili.

Matične celice so poskusili izolirati iz človeškega mleka. Izolirali so za označevalce nestin pozitivne celice, po izolaciji in karakterizaciji so ugotovili, da gre za multipotentne mezenhimske matične celice (Cregan in sod., 2007; Fan in sod., 2010; Patki in sod., 2010). Celice z matičnim značajem so iz človeškega mleka izolirali tudi s pomočjo označevalcev, značilnih za EMC (Hassiotou in sod., 2012). Trenutno še ni dostopnih podatkov o prisotnosti matičnih celic v mleku živali.

V Preglednici 4 so zbrane najodmevnješje objave o matičnih in prekursorjih celicah v mlečni žlezi goveda. Prvo poročilo o prisotnosti visoko proliferativnih celic v mlečni žlezi krave je bilo objavljeno leta 2002 (Ellis in Capuco, 2002). S histološkimi metodami so analizirali prisotnost z BrdU označenih celic in predlagali, da so celice, ki so svetlo obarvane potencialne matične celice. Te celice so predstavljale 10 % parenhimskih celic in 50 % celic, ki so se delile. Kasneje so Holland in sodelavci opisali SLC celice v kravji mlečni žlezi (Holland in sod., 2003). Capuco je leta 2007 predlagal, da so MCMŽ celice, ki zadržijo BrdU značko, izražajo proliferacijski označevalec Ki67 in so za estrogenski receptor negativne (Capuco, 2007). MCMŽ so poskusili tudi spodbuditi k pomnoževanju z infuzijo ksantozina v kravja vimena. Ksantozin suprimira funkcijo proteina p53, ki spodbuja asimetrično delitev. Ugotovili so, da se po infuziji ksantozina začasno poviša število celic, ki zadržujejo barvilo BrdU (Capuco in sod., 2009), to so kasneje dokazali tudi *in vitro* (Choudhary in Capuco, 2012). Poleg študija histoloških značilnosti in ultrastruktur, so opisali tudi dejansko izolacijo in karakterizacijo kravjih MCMŽ. Motyl in kolegi so izolirali stransko populacijo (SP) celic iz kravje mlečne žleze, ki je predstavljala približno 0,5 % vseh celic. Z Sca-1 markerjem so fenotipizirali matične celice, ki so se večinoma nahajale v bazальнem delu epitelija, a so z mikročipi ugotovili, da gre najbrž za hematopoetske celice (Motyl in sod., 2011). Martignani in sodelavci so uporabili CFC test za študijo klonogenega razrasta govejih MCMŽ in odkrili tri tipe kolonij (Martignani in sod., 2010; Martignani in sod., 2009). Analiza aktivnosti ALDH je pokazala, da imajo kravje epitelne ALDH^{high} celice luminalne značilnosti, medtem ko ALDH^{low} celice tvorijo kolonije z mioepitelnimi lastnostmi, kar je podobno kot pri človeku (Eirew in sod., 2012; Martignani in sod., 2010). Med posameznimi vrstami obstajajo podobnosti in razlike v izražanju celičnih označevalcev pri epitelnih frakcijah mlečne žleze. Človeška in mišja, z matičnimi celicami obogatena, populacija epitelnih celic ima povišano izražanje CD49f.

CD24 je pan-epitelijski označevalcev v mišji mlečni žlezi, ne pa v človeškem tkivu mlečne žleze, kjer specifično označuje luminalne celice (Raouf in sod., 2008; Shackleton in sod., 2006; Stingl in sod., 2006). Rauner in Barash sta s pretočno citometrijo iz kravje mlečne žleze izolirala 4 populacije celic glede na izražanje površinskih markerjev CD24 in CD49f. CD24^{med}CD49f^{pos} so potencialne matične celice, CD24^{high}CD49f^{neg} so potencialne prekurzorske celice, CD24^{neg}CD49f^{pos} so bazalne celice in CD24^{med}CD49f^{neg} luminalne celice (Rauner in Barash, 2012). Glede na rezultate CFC testov, ALDH aktivnosti, izražanje epitelnih označevalcev in označevalcev za matične celice, so predlagali celično hierarhijo, kjer so potencialne matične celice na vrhu, sledijo bipotentni ali luminalni prekurzorji. Choudhary in kolegi so proučili transkriptom potencialnih MCMŽ/prekurzorskih celic, ki so jih pridobili z lasersko mikrodisekcijo iz kravje mlečne žleze. Njihovi zaključki nakazujejo, da so bazalne celice, ki zadržijo barvilo BrdU obogatene za MCMŽ (Choudhary in sod., 2013).

Izolirali so tudi epitelne celične podtipe iz mlečne žleze konja (Spaas in sod., 2012). Matične celice so obogatili s pomočjo mamosfer. Za identifikacijo so uporabili markerje CD29, CD44, CD49f in kazeinsko kinazo 2 beta. Opazili so, da iz mlečne žleze v laktaciji izhaja več celic, ki so sposobne tvoriti mamosfere, ki so bile tudi večje v primerjavi s sferami iz mlečne žleze izven laktacije. Pri ovcah so poskusili najti MCMŽ s pomočjo označevalca Musashi1 (Msi1), a jih še niso izolirali (Colitti, 2010; Colitti in Farinacci, 2009).

Preglednica 4: Objave o matičnih in prekurzorskih celicah v mlečni žlezi goveda.

Table 4: Publications addressing aspects of bovine mammary stem or progenitor cells.

Tema	Vir
Ocena histologije epitelnih celic v prepubertetni mlečni žlezi goveda.	Ellis in Capuco, 2002
<i>In vitro</i> študija MCMŽ in prekurzorskih celic pri govedu.	Holland in sod., 2003
Identifikacija potencialnih MCMŽ in predniških celic z označevanjem DNA z BrdU.	Capuco, 2007
Namnožitev MCMŽ/prekurzorjev z infuzijo nukleozida xantozina v mlečno žlezo.	Capuco in sod., 2009
<i>In vitro</i> ocena matičnega značaja epitelnih celic iz kravje mlečne žleze.	Martignani in sod., 2009
Tvorba človeških mlečnih proteinov v ksenograftih genetsko spremenjenih govejih epitelnih celic.	Martignani in sod., 2010
Identifikacija, kvantifikacija in transkripcijski profil potencialnih matičnih celic v mlečni žlezi krave.	Motyl in sod., 2011
Celična hierarhija in tvorba celičnih linij v kravji mlečni žlezi.	Rauner in Barash, 2012
Transkriptom potencialnih MCMŽ/prekurzorskih celic, ki so jih pridobili z lasersko mikrodisekcijo.	Choudhary in sod., 2013
Razvoj kravjega epitelija v maščobni blazinici mlečne žleze imunsko oslabljenih miši.	Rauner in sod., 2013

2.3.2 Regulacija MCMŽ

Morfološki dokazi nakazujejo, da se MCMŽ nahajajo v bazalni plasti epitelija, tipično med mioepitelnimi in luminalnimi celicami, pogosto blizu za estrogenski receptor pozitivnih celic (Smith in Chepko, 2001). Mikro okolje (niša) preko signalov s strani epitelnih in stromalnih celic regulira aktivnost MCMŽ. Ko so živčne matične celice in spermatogonije vsadili v mlečno žlezo, se je njihov razvoj preusmeril in so bile zmožne repopulirati celotno očiščeno maščobno blazinico (Booth in sod., 2008; Boulanger in sod., 2007). Delecija integrina beta 1 iz bazalnih celic onemogoči regeneracijo z MCMŽ pri miših (Taddei in sod., 2008), to nakazuje na pomembnost epitelnih interakcij z zunaj celičnim matriksom.

Ovarijska hormona estrogen in progesteron usmerjata razvoj mlečne žleze in sta vpletena v razvoj raka dojke (Tanos in sod., 2012). V več kot 60 % raka na dojki gre za tumorje, ki so pozitivni za estrogenski receptor. Hormona sta vpletena v komplikirana zaporedja interakcij v mlečni žlezi od začetka pubertete pa do menopavze. Estrogen je potreben za proliferacijo epitelnih celic in razvoj duktov, progesteron pa za lobuloalveolarno

diferenciacijo med nosečnostjo in laktacijo. Pomembno je, da človeška in mišja populacija prekurzorskih celic ne izražata ER α in PR receptorjev za steroidne hormone (Asselin-Labat in sod., 2006; Lim in sod., 2009; Sleeman in sod., 2007) prav tako so za Esr-1 negativne domnevne matične celice v kravji mlečni žlezi (Capuco in sod., 2009). Število MCMŽ v mišji mlečni žlezi v odsotnosti obeh hormonov zaradi ovariekтомije ali zaradi blokade s protitelesi upade, a se po dodatu obeh hormonov spet poviša. Dessauge in sod. so odstranili jajčnike 3 mesečnim predpubertetnim kozam in ugotovili, da je mamogeneza in kontrola s strani ovarijskih hormonov pri kozah podobna kot pri predpubertetnih telicah in da so koze dober model za študij razvoja mlečne žleze pri prežvekovacih (Dessauge in sod., 2009). Posledica ovariekтомije je bila znižana proliferacija epitelnih celic in spremenjeno izražanje celično adhezivnih molekul. Stimulacija matičnih celic z estrogenom poteka preko parakrinih dejavnikov, ki jih izločajo epitelne celice, ki imajo ta receptor. RANK ligand (angl. *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; RANKL), na katerega vpliva progesteron in je vpletten v preurejanje kostnih struktur in formacijo mlečne žleze, je vpletten kot intermediat v odzivu MCMŽ na progesteron (Asselin-Labat in sod., 2010; Joshi in sod., 2010). Joshi in sodelavci so s transplantacijskimi poskusi dokazali, da se v obdobjih, ko je koncentracija progesterona visoka, količina MCMŽ poveča za 14 – krat, najverjetneje preko modulacije poti Wnt4 in RANKL (Joshi in sod., 2010). Interakcije med PR in RANKL vplivajo na celično proliferacijo v postpubertetnih miših, ta fenotip se v PR-izničenih miših lahko reši z dodatkom proteina RANKL (Beleut in sod., 2010). Podatkov na živalskih modelih ni, ker na njih rutinsko ne delajo transplantacij in ne obstajajo modeli z izničenimi geni. Na rast in razvoj mlečne žleze poleg parakrinih signalov vplivajo tudi medcelične interakcije in imunske celice. STAT6 in IL4 sta vpletena tako v razvoj celic T pomagalk kot tudi v aktivnen razvoj mlečne žleze (Watson, 2009). Pri miškah so pokazali, da nezmožnost odstranitve makrofagov, eozinofilcev ali mastocitov lahko omeji razvoj mlečne žleze in vpliva na aktivnost matičnih celic (Gyorki in sod., 2009).

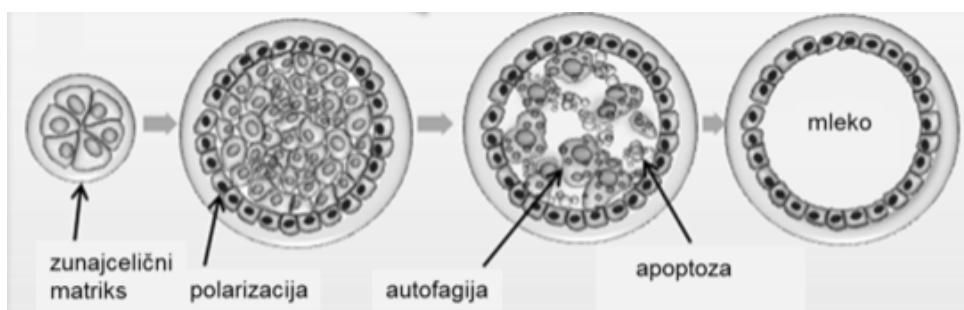
Za proliferacijo in diferenciacijo MCMŽ je odgovornih veliko genetskih poti, npr. Wnt, Notch, Hedgehog, BRCA1, p21, p63, Pten in p53 (Dontu in sod., 2003; Liu in sod., 2005; Liu in sod., 2008). Vpliv sprememb v regulatornih poteh so študirali na genetsko spremenjenih mišjih modelih. Znižanje izražanja Notch signaliziranja v MCMŽ povzroči

njihovo ekspanzijo, povišano izražanje proteinov v poti Notch pa vodi do ekspanzije luminalnih prekurzorjev (Bouras in sod., 2008). Posledica izničenje p53 supresorskega faktorja je namnožitev MCMŽ, ker se aktivira njihova simetrična delitev (Cicalese in sod., 2009).

2.3.3 *In vitro* testi in obogatitev MCMŽ

Kultivacija celic na plastični podlagi je za celice umetno in tuje okolje. Med gojenjem na plastiki ali steklu primarne epitelne celice hitro izgubijo diferenciacijske markerje in se le delno odzivajo na stimulacijo z laktogenimi hormoni. V poznih 1950ih letih so razvili metodo gojenja organov, kjer je bil košček mlečne žleze potopljen v laktogeni medij in so bile celice sposobne razrasta in diferenciacije v alveole (Juergens in sod., 1965). Kasneje so ugotovili, da so za uspešno diferenciacijo potrebne komponente matriksa in signali iz strome. Celice so gojili na plavajočih kolagenskih substratih in na podlagi, ki jo izolirajo iz Engelbreht-Holm-Swarm (EHS) tumorjev in je po sestavi najbolj podobna bazalni membrani. Streuli in sod. so 1990 ugotovili, da so za diferenciacijo pomembne interakcije med integrini, prisotnimi na epitelnih celicah, in proteini basalne membrane (Katz in Streuli, 2007). EHS matriks, komercialno poznan kot Matrigel, so uporabili tudi v 3D modelih. Koščke mlečne žleze, organoide, so vklopili v Matrigel in opazovali razrast in razvejanje duktov *in vitro* (Ewald in sod., 2008).

V procesu nastanka alveol se zunanjia plast epitelnih celic, ki je v stiku z zunaj celičnim matriksom, orientira v apikalno bazalni smeri in pridobi sekretorne lastnosti. Med alveologenezo se v centru nastajajoče alveole inducira autofagija, kot posledica odsotnosti kontakta teh celic z ZCM. Posledica je indukcija apoptoze in odstranitev celic s programirano celično smrtjo ter tvorba lumna (Gajewska in sod., 2013).



Slika 7: Oblikovanje alveoli podobne strukture iz epitelnih celic (prirejeno po Gajewska in sod., 2013)

Figure 7: Formation of alveoli-like structure by mammary epithelial cells (adapted from Gajewska et al., 2013).

Obstajajo različne izvedbe kultivacije s **3D modeli**. Celice so lahko vklopljene v napol trdni nosilec, katerega sestava je podobna bazalni membrani in vsebuje laminin in kolagen, ki sta pomembna za tvorbo struktur, podobnih alveolam v mlečni žlezi. *In vitro* nastale strukture so sestavljene iz polariziranih luminalnih celic, ki jih obkroža plast mioepitelnih celic, na sredini strukture pa je lumen (Gajewska in sod., 2013). Med *in vitro* rastjo in proliferacijo epitelnih celic mlečne žleze v nediferenciranem stanju, v pogojih suspenzijske kulture, ki ne omogoča pripenjanja celic na podlago, nastanejo sferične strukture - **mamosfere**. V takih pogojih večina celic odmre (anoikis), namnožijo pa se manj diferencirane celične populacije (matične celice in prekurzorji) (Dontu in sod., 2003). Metodo so razvili iz protokola za obogatitev in namnožitev živčnih matičnih celic v obliki nevrosfer (Reynolds in Weiss, 1996).

Ena izmed največkrat uporabljenih *in vitro* tehnik pri raziskovanju MCMŽ je **CFC test**. Uporabili so ga za detekcijo človeških, mišjih in kravjih prekurzorskih celic (Martignani in sod., 2010; Stingl, 2009). Sveže disociirane epitelne celice se v nizkih koncentracijah nacepi v gojitvene posodice na hranljivo plast fibroblastov 3T3 in po enem tednu oceni frekvenco posameznih tipov prekurzorjev v izhodnem tkivu. V testih diferenciacije, kultivirane celice imunofluorescentno barvajo z za linijo specifičnimi označevalci. Najbolj pogosti luminalni označevalci so citokeratini (CK) 8, 18, 19, EpCAM in mucin 1 (Muc1), za mioepitelne celice pa CK5 in CK14, aktin gladkih mišic (SMA) in vimentin (Stingl in sod., 2001).

3 NAMEN IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Matične celice v mlečni žlezi so opisane pri človeku in miši, pri drugih vrstah pa je delo oteženo, saj ni na voljo ustreznih protiteles, ki bi omogočala prepoznavanje specifičnih determinant na matičnih celicah. Identifikacija in izolacija matičnih celic iz mlečnih žlez prežvekovalcev je zanimiva zaradi nizke pojavnosti tumorjev pri govedu, kozi, ovci. Poleg tega je mlečna žleza prežvekovalcev morfološko zelo podobna človeški, zato predstavlja dober model za primerjalne študije. Namen doktorske disertacije je identifikacija in karakterizacija celic s proliferativnim in regenerativnim potencialom iz mlečne žleze koze, z uporabo funkcionalnih *in vitro* in *in vivo* testov. To bi omogočilo primerjave celičnih hierarhij v mlečnih žlezah različnih vrst in vodilo do razvoja orodij za oceno vpliva različnih spojin na homeostazo in samo obnavljanje matičnih celic. Slednji so ključni faktorji za kontorolo perzistence laktacije. Naša hipoteza je, da matične celice igrajo pomembno vlogo pri vzdrževanju proizvodnje mleka in da s povišanjem števila teh celic lahko vplivamo na intenzivnost in trajanje laktacije.

Ker je malo znanega o matičnih celicah pri prežvekovalcih in še posebej pri kozi, gre za zelo bazično raziskavo. Namen doktorske disertacije je poiskati markerje/označevalce posameznih celičnih populacij v mlečni žlezi koze ter s transplantacijami in *in vitro* testi dokazati, da v kozji mlečni žlezi obstajajo matične celice in njihove potomke, ki imajo multipotenten značaj. Poleg tega želimo matične celice obogatiti v neadherentni suspenzijski kulturi. Če nam bo uspelo najti ustrezne označevalce, bomo skušali izolirati populacijo celic, obogateno z matičnimi celicami. Raziskava je odskočna deska za primerjalne študije s celicami iz mlečnih žlez drugih vrst.

V okviru raziskave bomo preverili naslednje hipoteze:

1. Ker epitelna frakcija kozje mlečne žleze vsebuje odrasle matične celice, je le-ta zmožna proliferacije in oblikovanja struktur mlečne žleze po transplantaciji pod ledvično kapsulo miši NOD/SCID.
2. V 3D modelu je epitelna frakcija kozje mlečne žleze sposobna oblikovati strukture, podobne alveolam.
3. Prekurzorske celice in MCMŽ, ki so prisotne v primarni kulturi epithelialnih celic mlečne žleze koze, so v ustreznem gojišču zmožne *in vitro* proliferacije in diferenciacije v terminalno diferencirane mioepitelne in epithelne (luminalne) celice.

4 MATERIAL IN METODE

4.1 ŽIVALI

Miši NOD/SCID smo gojili na Veterinarski fakulteti Univerze v Torinu po postopkih, ki jih je odobrilo italijansko Ministrstvo za zdravje. Na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete, smo miši NOD/SCID kupili in jih vzdrževali v IVC kletkah pod kontroliranimi pogoji. V poskusih uporabljene miši so bile stare med 8 in 14 tedni. Miši FVB smo na Oddelku za zootehniko gojili v mišji koloniji. Kozje mlečne žleze smo dobili v klavnicih in od rejcev takoj po zakolu. Koze so bile različnih starosti (od 5 mesecev do 8 let), dveh pasem (sanska in burska) ter v različnih fazah razvoja (puberteta, laktacija). Zakol in odvzem vzorcev na Biotehniški fakulteti je potekal pod nadzorom veterinarjev iz Uprave za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin Ministrstva za kmetijstvo in okolje.

4.2 MLEČNA ŽLEZA KOZE – PRIPRAVA SUSPENZIJE POSAMEZNIH CELIC

Mlečne žleze smo pridobili iz sanskih in burskih koz (*Capra hircus*) in jih odstranili takoj po zakolu. Čim bolj aseptično smo izrezali del tkiva (10 – 15 gramov) ter ga razrezali na karseda majhne koščke. Sledila je disociacijā v disociacijski mešanici (gojišče DMEM/F12 z dodatki: 2 % (w/v) albumina iz govejega seruma (BSA), 300 U/ml kolagenaze, 100 U/ml hialuronidaze, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml streptomicina (vsi Sigma-Aldrich)) pri 37°C, s stresanjem 16 do 20 ur. Z epitelijem bogat pelet (organoidi) smo pridobili s centrifugiranjem pri 80 g, 30 sekund, sledilo je trikratno spiranje z gojiščem DMEM/F12. Organoide smo shranili v gojitvenem mediju s 6 % DMSO in 50 % FBS v tekočem dušiku. Suspenzijo posameznih celic smo pripravili iz alikvota organoidov. Najprej smo pelet tretirali 3 – 4 minute z ogretim tripsinom (0,5 mg/ml), ki je imel dodan EDTA (0,2 mg/ml) (oba Sigma-Aldrich). Sledilo je spiranje s HBSS z dodatkom 2 % FBS. Pelet smo dalje inkubirali z mešanico dispaze (5 mg/ml, STEMCELL Technologies) in DNaseI (100 µg/ml, Sigma-Aldrich) in celice filtrirali skozi 40 µm celično sito (BD Biosciences) ter tako odstranili preostale celične aggregate.

4.3 PRIMARNA KULTURA

Celične suspenzije, pripravljene kot predhodno opisano, smo nacepili v različna gojišča v primarni kulturi, v testih formiranja kolonij in v različnih 3D modelih. Primarno kulturo smo gojili v treh medijih: RPMI 1640, EpiCult-B (STEMCELL Technologies) in Sf7. Primarne celice smo gojili na plastiki, tanki plasti kolagena in na tanki plasti Geltreksa (Invitrogen, Gibco). Fibroblaste smo odstranili z odlitjem nepripelih celic po eno urni inkubaciji nasajene celične suspenzije. Ker se fibroblasti pripnejo hitreje, so odlite celice predstavljale epitelni del. Epitelne celice smo dalje obogatili z diferencialno tripsinizacijo, ker se fibroblasti med delovanjem tripsina hitreje odlepijo. Celice smo gojili v inkubatorju na 37°C, s 5 % CO₂ in v nasičeni zračni vlagi. Gojišče smo menjavali na 2 – 3 dni.

4.3.1 Gojišča

4.3.1.1 RPMI1640

Gojišču smo dodali naslednje sestavine v 1 liter (vsi Sigma-Aldrich):

- 0,1 mM L-metionin
- 0,4 mM L-lizin
- NaHCO₃ (2 g/l)
- 0,01 mM Na piruvat
- 10 ml 200mM glutamin

V manjše količine gojišča smo tik pred uporabo dodali (vsi Sigma-Aldrich):

- FBS (5 %)
- prolaktin (5 µg/ml)
- hidrikortizon (1µg/ml)
- inzulin (1µg/ml)
- 100 U/ml penicilin
- 100 U/ml streptomycin

4.3.1.2 EpiCult-B

V 100 ml EpiCult-B (humani, Stem Cell Technologies) smo dodali 1 ml suplementa, ki je pred uporabo shranjen na – 20°C ter 1 ml raztopine penicilina in streptomicina (končna koncentracija 100 U/ml). Pripravili smo svež kompletен medij, ko smo ga potrebovali. Za 10 ml smo dodali še 100 µl 200 mM glutamina in hidrokortizona, da je bila njegova končna koncentracija 0,36 mg/ml. Če je potrebno, smo dodali še FBS (5 %).

4.3.1.3 Sf7

DMEM/F12 s pufrom HEPES z dodatki (vsi Sigma-Aldrich):

- 2 mM glutamin
- 0.1% w/v BSA
- 10 ng/ml EGF
- 10 ng/ml kolera toksin
- 1 µg/ml inzulin
- 0.5 µg/ml hidrokortizon
- 100 U/ml penicilin
- 100 µg/ml streptomicin

4.3.2 Rastne podlage

4.3.2.1 Kolagen

240 µl raztopine kolagena tipa I (collagene type I solution, BD Bioscience) smo raztopili v 40 ml fosfatnega pufra (PBS, 1x) in porazdelili po 60mm ploščah, da so bile prekrite z raztopino (približno 2 ml na ploščo). Inkubirali smo jih na 37°C, 1 uro. Sledilo je trikratno spiranje s PBS po 3 minute. Plošče smo nato uporabili ali pa še dvakrat sprali z destilirano vodo in shranili na 4°C.

4.3.2.2 Geltrex

Geltrex reduced growth factor basement membrane matrix (Invitrogen, Gibco) je topna oblika bazalne membrane, ki so jo izolirali iz mišjega Engelbreht-Holm-Swarm tumorja. Ekstrakt se strdi pri 37°C in tvori rekonstituirano bazalno membrano. Glavne komponente so laminin, kolagen IV, entaktin in heparin sulfat proteoglikan. Matriks bazalne membrane lahko uporabimo za vzpostavitev in vzdrževanje diferenciranega fenotipa pri različnih celičnih tipih, tudi primarnih in matičnih. Uporabili so ga v testih angiogeneze, razrasta nevritov in invazivnosti tumorjev. Drugo komercialno ime za Geltrex je Matrigel (BD Bioscience). Obstajajo različni protokoli za pripravo.

Pri našem delu smo uporabili metodo tankega sloja in ga pripravili po sledečem protokolu:

1. Geltrex odtalimo na ledu pri 2 – 8°C preko noči.
2. Premešamo s počasnim pipetiranjem, ne naredimo mehurčkov.
3. Razredčimo do 0,1 mg/ml v ohljenem gojišču brez dodanega seruma.
4. Z raztopino prekrijemo celotno rastno površino.
5. V inkubatorju na 37°C pustimo vsaj 60 minut oziroma, da se površina posuši.
6. Nacepimo celice v želeni koncentraciji.

4.4 IN VITRO DETEKCIJA PREDNIŠKIH CELIC (angl. Colony-forming cell (CFC) assay)

60 mm petrijevke smo prekrili z podganjim kolagenom tipa 1 (BD Bioscience) razredčenem v fosfatnem pufru (PBS, 1x) in jih eno uro inkubirali na 37 °C. Celice, izolirane iz kozje mlečne žleze, smo zmešali z 2×10^5 mišjih fibroblastov 3T3, ki smo jih predhodno, 2 uri, tretirali z 10 µg/ml mitomicina C (Sigma-Aldrich). Za kultivacijo smo uporabili medij EpiCult-B (STEMCELL Technologies) z dodatki in Sf7 (glej prejšnje poglavje). Prvih 24 ur smo celice inkubirali z gojiščem, ki je vsebovalo 5 % FBS, nato pa smo ga zamenjali na medij brez seruma in celice gojili še dodatnih 6 – 8 dni, v inkubatorju

(37°C, 5 % CO₂). Po pojavu kolonij, smo kulture na hitro (30 s) fiksirali v mešanici acetona in metanola (1:1) in jih obarvali s kristal violetom (50 mg kristal violeta v vodni raztopini z 20% metanola) ali jih imunofluorescentno pobarvali (glej 4.6).

4.4.1 Inaktivacija fibroblastov 3T3 z mitomicinom C

Fibroblaste smo inaktivirali po sledečem protokolu:

1. Odtajamo vialo s fibroblasti 3T3 in jih nacepimo v medij DMEM z 10 % FBS, 100 U/ml raztopine penicilina in streptomicina in 200 mM glutaminom.
2. Namnožimo do konfluence.
3. Odstranimo del medija, da ga ostane 5 ml in dodamo mitomicin, da je končna koncentracija 10 µg/ml.
4. Inkubiramo na 37°C, 2 uri.
5. Odstranimo gojišče in dvakrat speremo s PBS (1x).
6. Tripsiniziramo.
7. Določimo število celic in zamrznemo alikvote 2 milijonov celic v tekočem dušiku.
8. Odtajamo, ko potrebujemo za teste CFC in preštejemo.

4.5 TRANSPLANTACIJA EPITELNE FRAKCIJE POD LEDVIČNO KAPSULO MIŠI NOD/SCID

Koncentrirani kolagen smo pripravili iz podganjega repa (Richards in sod., 1983). Za pripravo kolagenskih gelčkov smo pripravili raztopino s 450 µl koncentriranega kolagena, 50 µl gojišča DMEM (10x) in med 0,2 – 0,4 % 10 M NaOH, slednji je nevtraliziral pH. V vsakem gelčku je bilo približno $1,6 \times 10^5$ fibroblastov 10T1/2, ki smo jih predhodno tretirali z mitomicinom C in $7,5 \times 10^4$ kozjih epitelnih celic. Fibroblasti 10T1/2 so bolj občutljivi kot fibroblasti 3T3, zato jih moramo vedno sveže namnožiti.

4.5.1 Inaktivacija fibroblastov 10T1/2 z mitomicinom C

Fibroblaste smo inaktivirali po sledečem protokolu:

1. Odtajamo vialo s fibroblasti 10T1/in jih nacepimo v gojišče DMEM z 10 % FBS, 100 U/ml raztopine penicilina in streptomicina in 200 mM glutaminom.
2. Namnožimo do konfluence.
3. Odstranimo del medija, da ga ostane 5 ml in dodamo mitomicin, da je končna koncentracija 2 µg/ml.
4. Inkubiramo na 37°C, 16 ur.
5. Odstranimo medij in dvakrat speremo s PBS (1x).
6. Tripsiniziramo.
7. Določimo število celic in uporabimo pri pripravi kolagenskih gelčkov za ksenotransplantacije.

4.5.2 Priprava kolagenskih gelčkov

1. Prenesemo 750 000 kozjih epitelnih celic in 2 milijona inaktiviranih fibroblastov 10T1/2 v epico (dovolj za 10 gelov) in centrifugiramo ter odstranimo supernatant.
2. V epici zmešamo 450 µl kolagena izoliranega iz podganjega repa in 50 µl skoncentriranega gojišča DMEM (10x) in prenesemo na led.
3. K mešanici kolagena in DMEM dodamo 1,4 µl koncentriranega NaOH (10 M). 250 µl mešanice prenesemo na pelet celic in fibroblastov in dobro premešamo.
4. Razpipetiremo po 25 µl suspenzije v plošče s 24-luknjicami in inkubiramo na 37°C, 15 minut v pokončnem položaju, da so se gelčki strdijo.
5. Dodamo gojišče (Sf7) in gelčke s pomočjo pipetnega nastavka odlepimo od podlage ter inkubiramo 1 uro na 37°C.
6. Plošče prenesemo na led, geli so pripravljeni za transplantacije.

Za transplantacijo smo uporabili miši NOD/SCID stare 8 – 14 tednov. Anestezirane miši (100 mg/kg ketamina in 10 mg/kg ksilazina, apliciramo intraperitonealna) smo obrili po hrbtnu in očistili s 70 % etanolom. Na oči smo jim nanesli umetne solze (Rucugel, Bausch&Lomb), da se v laminariju ne bi preveč izsušile. Najprej smo naredili 2 cm zarezo po sredini hrbita, sledila je manjša zareza v steno telesa direktno nad ledvičko. Ledvičko smo preko zareze nežno potisnili iz trebušne votline, sledila je majhna zareza v ledvično kapsulo in razrahljanje le-te. Kolagenske gelčke smo vsadili pod ledvično kapsulo s pomočjo ukrivljene pasteurjeve pipete, običajno dva gela na ledvico. Po zaščitju telesne stene smo postopek ponovili še na drugi ledvički. Pred zaščitjem zareze na hrbtnu smo miški pod kožo vstavili silikonski pelet (MED-4011, NuSil Technology), ki je vseboval 2 mg β -estradiola in 4 mg progesterona (oba Sigma-Aldrich). Gelčke smo odstranili po 4 – 6 tednih in jih fiksirali v paraformaldehidu (2 %) ali formalinu (4 %) in nato vklopili v parafin ali pa smo jih razgradili v raztopini kolagenaze (300 U/ml v mediju Sf7, na 37°C, ~4ure) in nacepili v CFC test. Imunofluorescentno in H&E barvanje v parafin vklopljenih rezin je potekalo kot bo opisano v naslednjem odstavku.

4.6 BARVANJA

4.6.1 Imunohistokemija

Koščke tkiv iz mlečnih žlez različno starih koz smo fiksirali v fiksativih Carnoys (6 delov 100 % etanola, 3 deli kloroforma, 1 del ocetne kisline), 4 % paraformaldehidu ali v 4 % formalinu (za 100 ml: 10,8 ml 37% formaldehida in 1x PBS). Sledila je postopna dehidracija v etanolu in vklopitev v parafin. Pet do 7 μm debelim rezinam v parafin vklopljenega tkiva mlečne žleze smo odstranili parafin (namakamo dvakrat po 3 minute v ksilenu) in dalje namakali v etanolu (100, 70, 50%), vsakič po eno minuto. Sledila je izpostavitev antigenov v ti. *antigen retrieval solution* (Dako, 1x) s kuhanjem v vreli vodi, 30 minut. S pisalom za imunohistokemijo (BioOptica) smo naredili krog okrog področja, ki smo ga želeli pobarvati. Vsi nadaljnji koraki, do vklapljanja, so bili narejeni v ti. mokri komori, da smo preprečili izsušitev preparatov. Sledilo je blokiranje v pufru Tris (0,1 M

Tris HCl, 0,14 M NaCl, 0,05 % Tween, pH 7,6) z dodatkom 10 % kozjega seruma, 1 uro na sobni temperaturi. Nato eno urna inkubacija s primarnim/a protitelesom/a (Preglednica 5) in spiranje ter inkubacija s sekundarnima protitelesoma – z AlexaFluor 488 označeno kozje IgG usmerjeno proti kunčjemu primarnemu protitelesu (Invitrogen, A11008) in z AlexaFluor 594 označeno kozje protitelo usmerjeno proti mišjemu primarnemu protitelesu (Invitrogen, A11005). Sledilo je spiranje in vklapljanje (angl. *mounting*) tkiva s ProLong Gold anti fade reagentom z DAPIjem (Invitrogen) preko noči. Imunofluorescentno označene rezine smo opazovali s fluorescentnim mikroskopom (Leica ali Nikon). Pri negativnih kontrolah smo primarno protitelo zamenjali z ustreznim izotipom (normalni mišji IgG, sc-2025 ali normalni kunčji IgG, sc- 2027, oba Santa Cruz Biotechnology).

Preglednica 5: Seznam protiteles uporabljenih za imunohistokemijo (IHC), imunocitokemijo (ICC) in Western prenos (WB).

Table 5: List of antibodies used for immunohistochemistry (IHC), immunocytochemistry (ICC), and Western blot (WB).

Označevalec	Protitelo	Redčitev	Uporaba
CK14	AF-64, Covance	1:500	ICC, IHC*
CK18	KS-B17.2, Sigma-Aldrich	1:200	ICC,IHC*
CK18	C-04: sc-51582, Santa Cruz Biotechnology	1:200	WB,ICC,IHC
CK18	KS18.04, 61028, Progen	1:200	ICC,IHC*
p63	4A4, Thermo Fisher Scientific	1:200	IHC*
SMA - α -smooth muscle actin	A5228, Sigma-Aldrich	1:200	WB,ICC,IHC
SMA - α -smooth muscle actin	0.N.5, sc-58669, Santa Cruz Biotechnology	1:200	WB,ICC,IHC
CD29; β 1-integrin	cat. no.: 610467, BD Bioscience	1:200	ICC
EpCAM - epithelial cell adhesion molecule	E144, Abcam	1:200	WB, IHC
PR - progesterone receptor	hPRa2, Thermo Fisher Scientific	1:70	IHC*
milk proteins	RAM/TM, Nordic Immunology	1:500	IHC*
CK5	H-40, sc-66856, Santa Cruz Biotechnology	1:200	WB, ICC,IHC
CD49f; α 6 integrin	H-87, sc-10730, Santa Cruz Biotechnology	1:20	IHC
vimentin	2Q1035, sc-73262, Santa Cruz Biotechnology	1:200 – 1:100	WB, ICC,IHC
ER α , estrogen receptor	H-184, sc-7207, Santa Cruz Biotechnology	1:200	WB
Muc1	ab37435, Abcam	1:200	IHC
β -casein	#250558, Abbiotec	1:200	ICC*

*nì bilo testirano v WB

4.6.2 Imunocitokemija

Celice, ki so zrasle v primarni kulturi ali CFC testu, smo na hitro (30 s) fiksirali v mešanici acetona in metanola (1:1). Sledila je blokada v 10 % kozjem serumu, 1 uro. Vsi nadaljnji koraki so opisani v prejšnji točki, le da v pufer Tris nismo dodali Tween. Po inkubacij s sekundarnima protitelesoma je sledilo spiranje in 5-10 minutna inkubacija z raztopino DAPIja (4',6-diamino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich, 5 μ g/ml). Po končnem spiranju smo dodali pufer Tris in kolonije opazovali s fluorescentnim mikroskopom (Leica ali Nikon).

4.6.3 Barvanje s hematoksilinom in eozinom (H&E)

Pet do 7 μ m debelim rezinam v parafin vklopljenega tkiva mlečne žleze smo odstranili parafin (namakamo dvakrat po 3 minute v ksilenu) in dalje namakali v etanolu (100, 70, 50%), vsakič po eno minuto. Sledilo je namakanje v destilirani vodi (par minut), nato 2 min v hematoksilinu, spiranje pod tekočo vodo (5 min), namakanje v eozinu (5 min) in destilirani vodi (par minut). Nato postopno po 1 min v 50, 70 in 100 % etanolu, in dvakrat 3 min v ksilenu. Nato dodamo raztopino za vklapljanje (angl. *mounting fluid*, Leica), odstranimo mehurčke, ki so nastali med stekelcema in pustimo da se strdi (nekaj ur – preko noči). Preparate pogledamo pod svetlobnim mikroskopom.

4.6.4 Oil Red O barvanje

Primarni kulturi smo odstranili medij in jo fiksirali v 4 % paraformaldehidu, 15 minut. Oil Red O (Sigma-Aldrich) založno raztopino smo naredili iz s 0,5 g praška v 50 ml izopropanola in jo razredčili z destilirano vodo (3:2), pustili 10 minut in jo prefiltrirali skozi 20 μ m filter. Nato smo celice na hitro sprali z izopropanolom (60 %) in inkubirali z raztopino Oil red O 15 minut na sobni temperaturi. Celice smo nato sprali z izopropanolom in nato pod tekočo vodo. Nastanek maščobnih kapljic smo opazovali pod svetlobnim mikroskopom.

4.7 KARAKTERIZACIJA IZRAŽANJA RAZVOJNO POMEMBNIH GENOV (OZNAČEVALCEV)

Označevalce, ki opredeljujejo matični oziroma terminalno diferencirani značaj celic smo zaznali v tkivu, celični suspenziji, primarni kulturi in v transplantatih z metodami reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR), Western prenosom, RNA sekvenciranjem ter s standardnimi metodami imunofluorescentnega označevanja.

4.7.1 Western prenos

Pridobili smo tri različne proteinske izolate: (i) iz tkiva mlečne žleze, (ii) iz primarne celične linije po treh dneh kultivacije, (iii) iz primarne celične linije po sedmih dneh kultivacije. Celokupne protein in RNA smo izolirali s pomočjo kompleta reagentov miRNeasy mini kit (Qiagen) po sledečem protokolu:

1. Homogeniziramo tkivo v reagentu TRI (Ambion).
2. Primarno linijo dobro speremo z 1x PBS in prekrijemo z reagentom TRI ter postrgamo s površine gojitvene posodice.
3. Epico s homogenatom pustimo na sobni temperaturi 5 min, da se sprostijo nukleoproteinski kompleksi.
4. Dodamo 140 µl kloroform in dobro stresamo 15 s.
5. Inkubiramo na sobni temperaturi 2-3 minute.
6. Centrifugiramo 15 min pri 12000 obratih na 4°C.
7. Prenesemo zgornjo vodno fazo v novo epico (RNA) in spodnjo obarvano organsko fazo v novo epico (proteini).
8. Zgornji vodni fazi dodamo 1,5 volumna 100 % etanola in temeljito premešamo s pipetiranjem. Ne centrifugiramo!
9. Prenesemo do 700 µl vzorca na kolono RNeasy Mini spin, ki je v 2 ml zbirni epici. Zapremo pokrov in centrifugiramo na približno 8000 obratih, 15 s, na sobni temperaturi. Odstranimo kar je priteklo skozi kolono.
10. Dodamo preostanek vzorca v kolono uporabljeno v prejšnjem koraku in ponovimo centrifugiranje. Odstranimo tekočino.

11. Dodamo 700 µl pufra RWT RNeasy Mini spin in centrifugiramo pri 8000 obratih, 15 s, na sobni temperaturi, da smo sprali kolono. Odstranimo tekočino.
12. Dodamo 500 µl pufra RPE in centrifugiramo 15 s pri 8000 obratih, da speremo membrano. Odstranimo tekočino.
13. Dodamo dodatnih 500 µl pufra RPE in centrifugiramo 2 minuti pri 8000 obratih, da se membrane osuši. Odstranimo tekočino.
14. Kolono prenesemo v novo 1,5 ml epico in nanjo odpipetiramo 30-50 µl vode brez RNaz. Centrifugiramo 1 minuto pri 8000 obratih, da se sprosti RNA.

Proteine smo izolirali iz organske faze po sledečem protokolu:

1. Nadaljujemo od točke 7 zgoraj s supernatantom fenola in etanola (obarvana organska faza).
2. Oborimo protein z dodatkom 800 µl izopropanola na 1 ml organske faze. Shranimo za 10 minut na sobni temperaturi.
3. Proteine sedimentiramo s centrifugiranjem pri 12000 obratih, 10 minut na 4°C.
4. Odstranimo supernatant in pelet proteinov trikrat operemo z raztopino gvanidinijevega hidroklorida (0,3 M v 95 % etanolu). Med vsakim pranjem inkubiramo v pralni raztopini 20 minut na sobni temperaturi in nato centrifugiramo pri 7500 obratih, 5 min na 4°C.
5. Proteinski pelet posušimo v vakuumu (približno 5-10 minut).
6. Proteine raztopimo v vodni raztopini 9,5M uree z 2% CHAPS (pH 9,1), lahko v raztopili v 1 % SDS.
7. Proteine uporabimo za Western prenos ali shranimo na -20°C.

Proteine smo ločili z geli NuPAGE 4-12% Bis-Tris gels (Invitrogen) v XCell *SureLock™* Mini-Cell (Invitrogen), vsi reagenti so bili komercialno dostopni (Invitrogen). Proteine smo ločili po sledečem postopku:

1. Proteinski vzorec zmešamo z pufrom LDS in reducirajočim reagentom in denaturiramo na 70°C, 10 minut.
2. Napolnimo banjico z 1x pufrom (NuPAGE MOPS SDS running buffer).
3. Vzorce naložimo na gel. Dodaj še 5 µl markerja (PageRuler plus Prestained protein Ladder, Fermentas).

4. Elektroforetska ločba je trajala približno 40 – 50 minut pri konstantni napetosti 200V (~ 175 mA).

Proteine smo nato prenesli na membrano PVDF (poliviniliden difluorid) s pomočjo X Cell II Blot Module (30 V, 1 ura). Membrano smo predhodno aktivirali v metanolu (30 s), nato sprali v destilirani vodi in dalj časa namakali v pufru za prenos (NuPAGE Transfer buffer). Imunodetekcijo smo naredili s pomočjo protokola, ki je opisan s kromogenim substratom (Novex HRP Chromogenic Substrate (Invitrogen)):

1. Po prenosu proteinov na membrano dobro operemo v destilirani vodi (2-krat 5 minut, s stresanjem).
2. Membrano prenesemo v pufer za blokiranje (5 % mleka v prahu (Pomurske mlekarne) v pufru Tris (0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,1 % Tween, pH 7,5) in stresamo na sobni temperaturi 30-60 minut ali inkubiramo preko noči na 4°C brez stresanja.
3. Dodamo primarno protitelo ustrezne redčitve (pripravimo v pufru za blokiranje, Preglednica 5). Inkubiramo 30 – 60 minut, s stresanjem.
4. Operemo s pralnim pufrom (1 min). Ponovimo trikrat po 5 min.
5. Membrano inkubiramo s sekundarnim protitelesom (pripravimo v pufru za blokiranje), ki je bilo konjugirano s hrenovo peroksidazo (HRP), 30 min.
5. Operemo z veliko količino pralnega pufra (1 min, s stresanjem). Ponovimo trikrat po 5 min.
5. Hitro speri z vodo.
6. Membrano inkubiramo s kromogenim substratom (Novex HRP Chromogenic Substrate, Invitrogen) do pojava modro obarvanih fragmentov.

Uporabljeni sekundarni protitelesi sta bili s HRP označeno kozje protitelo usmerjeno proti mišjemu primarnemu protitelesu (Sigma A9917; redčitev 1:3000) in s HRP označeno kozje protitelo usmerjeno proti kunčjemu primarnemu protitelesu (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology; redčitev 1:5000).

4.7.2 Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR)

RNA smo izolirali kot opisano v odstavku 4.7.1. Po izolaciji smo RNA vzorce obdelali z DNAAzo (DnaseI, Rnase-free, Ferementas, 50 U/ μ l). Za 1-2 μ g RNA smo naredili sledečo reakcijsko mešanico: 1 μ l rekacijskega pufra (10x), 0,04 μ l DNaseI (1-2U), DEPC voda do 9 μ l. Mešanico smo inkubirali na 37°C, 30 minut. Nato smo dodali še 1 μ l 2,5 mM EDTA in inkubirali na 65°C, 10 min. Koncentracije in kakovost izolirane RNA smo izmerili na spektrofotometru NanoVue (GE Healhtcare).

Sledila je sinteza cDNA s kompletom reagentov High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems).

Sestava komponent, potrebnih za eno reakcijo, je podana v Preglednici 6:

Preglednica 6: Sestava komponent potrebnih za eno reakcijo sinteze cDNA.

Table 6: Components used for one cDNA synthesis reaction.

Komponenta	za 1 reakcijo (μ l)
10x RT pufer	4
25x dNTP mešanica (100mM)	1,6
10x RT naključni začetni oligonukleotidi	4
MultiScribe Reverse Transcriptase	2
inhibitor RNaz	2
voda brez nukleaz	6,4
končni volumen	20

Za sintezo cDNA smo odpipetirali 20 μ l založne raztopine (angl. *master mix*) in 20 μ l vzorca z RNA, na hitro premešali in centrifugirali. Sinteza cDNA je tekla po sledečem programu: 25°C, 10 min; 37°C, 120 min; 85°C, 5 min; 4°C, ∞ . S sintetizirano cDNA smo naredili verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov je podan v Preglednici 7. Začetne oligonukleotide smo oblikovali glede na dostopne mRNA sekvence za kravo (*Bos taurus*) in jih naročili pri Jenna Bioscience. Za kontrolo izražanja smo uporabili gen za beta aktin (angl. *actin beta*, *ACTB*). Uporabili smo sledečo reakcijsko mešanico: pufer (2 μ l), dNTP (1,2 μ l, 1x), MgCl₂ (0,6 μ l, 50 mM), smiselni začetni oligonukleotid (0,5 μ l; 50 pmol/ μ L), protismiselni začetni oligonukleotid (0,5 μ l; 50 pmol/ μ L), polimeraza DNA (0,1 μ l, Biotoools), destilirana voda do 20 μ l.

Pomnoževanje je potekalo po programu: 95°C, 1 min; (95°C, 15 s; 55-57°C, 5 min; 72°C, 30 s) x30; 72°C, 7 min; 4°C, ∞. Produkte PCR reakcije smo ločili na 1,5 % agaroznem gelu (SeaKem LE agarose, Cambrex), ki je vseboval etidijev bromid (20 µl/l), v 0,5-kratnem TBE pufru (0,5 M Tris, 0,5 M borova kislina, 10 mM EDTA).

Preglednica 7: Zaporedja začetnih oligonukleotidov uporabljenih za reverzno transkripcijo in verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR).

Table 7: Sequences of oligonucleotide primers used for reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Gen	Identifikacijska številka gena (GenBank)	Smiselni oligonukleotid (5'>3')	začetni protismiselni oligonukleotid (5'>3')	začetni protismiselni oligonukleotid (5'>3')	Dolžina pomnožka (bp)
ACTB	28628620	CCAACCGTGAGAACGATGACC	CGCTCCGTGAGAACATCTTCAT		247
CK5 (KRT5)	56710316	CCAAGCTGGCCCTGGACGTG	GCTGCTACTGCCGCCTCCAC		254
CK14 (KRT14)	262118300	GAGCTGGTGCAGAGCGCAA	CAAGTGCTTGGGGAGGCAGG		552
CK18 (KRT18)	194667060	TGGCCATGCCAGTCTGTG	GACAGTGCCTCAGCTCCG		395
CK19 (KRT19)	284055298	TCCTTCGGGGTATGGCGG	CGCCAGTGTGCCTTCCAGGG		933
SMA (ACTA2)	78045237	CCGCTGCCCTGAGACCTGT	GATGGATGCCCGGCTTCGT		343
CD24	73586562	GAATGGCTGTGAAACAGAT	AAGCCCCAGAGGAAAAGTTC		250
EpCAM	78369401	ACGCACTCGGTCACTGCCAG	GTGCCGTTGCACTGCTTGGC		217
Muc1	41386777	GGCCGAGTGGTGAAGGCAC	GGCTGTGAGCAGCCCACCTG		550
CD49f (ITGA6)	158341671	CTGTGGGCGCCTAGTGGGA	CTCGCCTCCAGTGCTTGGC		326
CD29 (ITGB1)	31342195	GCAACGAGGGACGTGTCGGG	AACAGTCACAGGCCTGCCG		306
p21 (WAF1/CIP1)	149643100	CCCGAGACGACCTGGAGGG	GGGGAGCGAGTCACGAGGGT		118
CD 10 (MME)	194663643	AGAGCAGAGGCGGGAACCT	TTTGCGCAGCGCCTCCAAGT		790
vimentin	110347569	GCCAGTCCGTGCTACCCGAG	TGCTGCTCCAGGAAGCCAC		430

4.7.3 Sekvenciranje in analiza izražanja označevalcev mRNA

RNA vzpostavljene primarne kulture smo posekvencirali kot del večjega poskusa, v katerem smo primarno kulturo okužili s pozročiteljico mastitisa, bakterijo *Mycoplasma agalactiae*, ki je podrobno opisan v doktorski disertaciji dr. Jerneja Ogorevca (Ogorevc, 2011). Celokupno RNA smo izolirali iz treh gojitvenih posodic z nacepljeno primarno kulturo z uporabo reagenta Tri (Ambion) in kompleta reagentov miRNeasy kit (Qiagen). Genomsko DNA smo odstranili s tretiranjem z DNAAzo I (Fermentas). S sekvenciranjem na napravi Illumina Gene analyzer IIx smo določili transkriptom primarne kulture. Iz vsakega vzorca smo uporabili približno 10 µg celokupne RNA, iz katere smo pripravili indeksirano mRNA knjižnico za sekvenciranje. Za pripravo knjižnice smo uporabili kompletni reagentov "mRNA-Seq Sample Prep" (Illumina) in kompletni reagentov "Multiplexing Sample Preparation Oligonucleotide" (Illumina). Če povzamemo, najprej smo vezali mRNA, ki je imela poli(A) repke, jo prepisali v cDNA in sintetizirali komplementarno verigo cDNA. Kratki cDNA konci so bili popravljeni na koncih (angl. *end-repaired*) z adenilacijo. Sledila je ligacija adaptorjev iz kompletnih reagentov Multiplexing Sample Preparation Oligonucleotide Kit in čiščenje produktov (velikosti okrog 200 bp) ligacijskih reakcij na agaroznem gelu. S pomočjo 18 ciklov PCR smo namnožili in označili matrično cDNA z uporabo začetnih oligonukleotidov iz kompletnih reagentov Multiplexing Sample Preparation Oligonucleotide Kit. Koncentracije RNA v pripravljenih knjižnicah smo določili s fluorometrom Qubit (Invitrogen), velikost in čistost pa z napravo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) in s kompletnim reagentom Agilent DNA 1000 Kit (Agilent Technologies). Iz vsake od pripravljenih in označenih cDNA knjižnic smo odvzeli uravnovežene molarne količine vzorca in ga razredčili v EB pufru na koncentracijo 10 nM, denaturirali z 2 N NaOH do končne koncentracije DNA 1,0 nM ter ga nadalje raztopili v ohlajenem hibridizacijskem pufru (Illumina) in naložili na proge pretočne celice. Vzorce smo sekvencirali v treh različnih pretočnih celicah, skupno na petih progah. Podrobni postopki so opisani v doktorski disertaciji dr. Ogorevca (Ogorevc, 2011). Za kartiranje pridobljenih 50 bp dolgih sekvenc na referenčni transkriptom goveda (Btau RefSeq, 24.5.2010) (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/refseq/B_taurus/) smo uporabili program Burrows-Wheeler Aligner (BWA) verzija 0.5.7. (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). Podatke smo

analizirali s poganjanjem skript v programu R (<http://www.R-project.org>). Fastq zaporedja in obdelani podatki so na voljo na spletni strani Gene Expression Omnibus (GEO:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=dhshpeagoymemdg&acc=GS E30379>).

4.8 VZPOSTAVITEV 3D *IN VITRO* MODELJA

Za vzpostavitev 3D modela z epitelno frakcijo kozje mlečne žleze sta bili uporabljeni dve različni metodi kultivacije. Pri uporabi suspenzijske metode, smo celice nasadili v gojišče z dodatkom Geltrex-a (substrat, ki je po sestavi podoben sestavi bazalne membrane, ki pokriva sloj mioepitelnih celic v mlečni žlezi) in v drugem gojišču, ki tudi spodbuja nastanek mamosfer. Pri vklopljeni metodi smo celice nasadili znotraj matriksa bazalne membrane (angl. *embedded*). Cilj je oblikovanje polariziranih, alveolam podobnih struktur, ki so sestavljene iz zunanje plasti mioepitelnih celic in notranje plasti luminalnih celic, v sredini pa se oblikuje lumen, kamor se lahko izločajo mlečni proteini. Dobljene 3D strukture smo opazovali in dokumentirali pod svetlobnim mikroskopom ter jih imunofluorescentno pobarvali v raztopini ali na parafinskih rezinah debeline 5 µm, po fiksaciji s 4 % paraformaldehidom in vklapljanju v parafin. Protokoli za barvanja so opisani v prejšnjih poglavjih.

4.8.1 Suspenzijske kulture

Mamosfere smo gojili na ploščah, ki onemogočajo prilepljanje celic (angl. *low-attachment*, Nunc, Sigma-Aldrich) v gojišču MS (DMEM/F12 z dodatki: EGF (20 ng/ml), bFGF (20 ng/ml), heparin (4 µg/ml), kolera toksin (10 ng/ml), hidrokortizon (0,5 µg/ml), vsi Sigma-Aldrich in s suplementom B27 (2 %, Invitrogen)). Po disociaciji organoidov smo nacepili 80000 celic na luknjico plošče s 6 luknjicami. Mamosfere smo večkrat slikali, izmerili ter izračunali njihovo povprečno velikost.

V kulturi z dodanim matriksom bazalne membrane (Geltrex) smo epitelne celice gojili v gojišču EpiCult-B z dodatki: Geltrex (5 %), FBS (5 %), EGF (10 ng/ml), bFGF (20 ng/ml) in heparin (4 mg/ml) (vsi Sigma-Aldrich). V vsako luknjico smo nacepili 50000 celic. Preskusili smo tudi dinamično kulturo, pri kateri smo plošče ves čas inkubacije stresali pri 40 – 50 obratih/minuto. Sedem do 14 dni po nacepitvi smo ocenili povprečno velikost nastalih sfer. Rastno površino luknjic v plošči s 24-luknjicami smo prekrili s 50 - 70 µl Matrigela in ga pustili v inkubatorju, da se strdi (37°C, 15 min). Dodali smo 10000 ali 2000 celic v mediju Sf7 s 5 % FBS in po 5-10 minutah v inkubatorju, ko se celice pripnejo, dodali še 400 µl medija Sf7 z 2 % matriksa bazalne membrane.

Pri tretji metodi gojenja 3D struktur v suspenziji smo luknjice plošče s 24 luknjicami prekrili s 70 µl matriksa bazalne membrane in pustili, da se je strdila v inkubatorju na 37°C. Celice v koncentraciji 50000 ali 10000 celic na luknjico smo nacepili v gojišču Sf7 z dodatkom matriksa bazalne membrane (2 %).

4.8.2 Vklopljene kulture

Na plošče s 96-luknjicami smo nacepil z mitomicinom C inaktivirane fibroblaste 3T3 v mediju DMEM z 10 % FBS in jih inkubirali na 37°C, 15 minut, da so se prilepili na rastno podlogo. Pripravili smo raztopino posameznih epitelnih celic iz mlečne žleze in iz primarne kulture. Zmešali smo 10000, 2000, 5000, 1000 ali 500 celic s 50 µl Geltrexa in jih nacepili v luknjice plošče s 96-luknjicami, ki so imele hranljivo plast fibroblastov ali pa so bile brez njih. Postavili smo jih v inkubator na 37°C, da so nastali geli (~ 10 min) in nato dodali 200 µl gojišča Sf7 s 5 % FBS. Gojišče smo zamenjali vsake tri dni. Prazne luknjice smo napolnili s sterilnim PBS, da smo preprečili izhlapevanje medija.

4.9 SORTIRANJE EPITELNE FRAKCIJE CELIC MLEČNE ŽLEZE S PRETOČNO CITOMETRIJO (FACS)

V testih na pretočnem citometru smo uporabili označevalce, za katere smo našli delajoča protitelesa proti kozjim epitopom (glej poglavja 4.2, 4.6 in 4.7), oziroma smo celice sortirali s pomočjo barvila Aldefluor.

Protitelesa smo testirali po sledečem protokolu, primera za EpCAM in ALDH:

1. Naredimo suspenzijo posameznih celic iz organoidov (tripsin – 3 min, dispaza+DNAzaI – 3 min) in filtriramo skozi 40 µm filter.

2. Preštejemo celice in prenesemo 1 milijon celic v sterilno 50 ml falkonko.

Celice centrifugiramo in jih resuspendiramo v 1ml pufra Aldefluor (Stem Cell Technologies) s 5 µl aktiviranega substrata. Hitro premešamo in prenesemo 500 µl v novo 50 ml falkonko z inhibitorjem DEAB (5 µl).

3. Inkubiramo 30 min na 37°C.

4. Centrifugiramo in resuspendiramo v 500 µl pufra Aldefluor.

5. 1 milijon preostalih celic prenesemo v novo 50 ml falkonko za barvanje s protitelesom proti EpCAM, preostale celice pa označimo kot neobarvane – neobarvana kontrola.

6. Celice, ki se bodo barvale s protitelesom proti EpCAM centrifugiramo in razredčimo v 200 µl pufra HF (HBSS brez Ca²⁺, Mg²⁺ z 2 % FBS).

7. Dodamo 1 µl protitelesa proti EpCAM (redčitev 1:200) in inkubiramo na ledu 10 minut.

8. Centrifugiramo in dodamo 200 µl raztopine sekundarnega protitelesa (anti-rabbit IgG Alexa 488, redčitev 1:500).

9. Inkubiramo na ledu 10 minut in speremo v pufru HF.

10. V vse falkonke dodamo 1 µg/ml of propidijevega jodida in 10 % DNAzeI (raztopina 1mg/ml v destilirani vodi). Inkubiramo na ledu 10 minut.

Namesto PI lahko uporabimo 7-AAD (BD Pharmingen). Dodamo 4 µl 7-AAD na 10⁶ celic in 10 % DNAzeI v vsako tubico 10 minut pred sortiranjem. Za ločevanje med mrtvimi in živimi celicami lahko uporabimo tudi DAPI.

11. Če je potrebno, še enkrat precedimo čez 40 µm filter.

12. Takoj pred analizo prenesemo v tubice za FACS.

4.10 STATISTIČNE ANALIZE

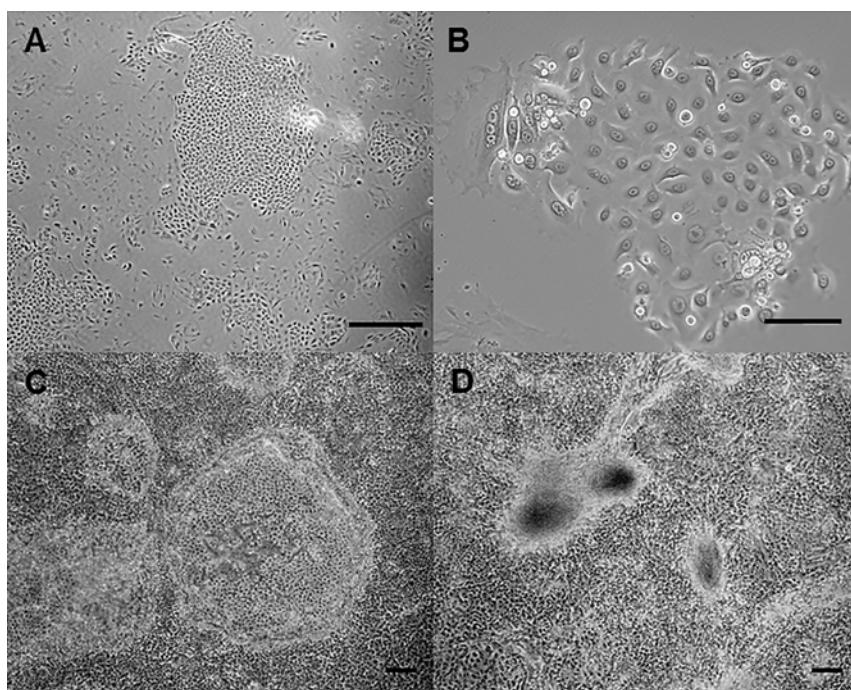
Rezultati so izraženi kot aritmetična sredina ± standardna deviacija. Statistično značilnost frekvenc kolonij v CFC testu smo določili z neparametričnim testom po Friedmanu. Število podatkov za vsak vzorec (n) je podano v Preglednici 10. P vrednosti manjše od 0,05 so statistično značilne. Statistična značilnost odstotkov različnih tipov CFC v štiri in šest tedenskih ksenotransplantatih smo izračunali z Wilcoxonovim testom rangiranja vsot. P vrednosti manjše od 0,05 so statistično značilne.

5 REZULTATI

Ker je bilo do sedaj malo znanega o celični sestavi kozje mlečne žleze, še manj pa smo vedeli o izražanju za posamezne celične linije specifičnih označevalcev, smo že leli najprej testirati in najti čim več delujočih protiteles, usmerjenih proti epitopom na epitelnih celicah koze in drugih celičnih tipih, ki sestavljal mlečno žlezo. To nam je omogočilo sledenje specifičnih celičnih linij tako v kozji kot v kravji mlečni žlezi. Protitelesa smo testirali na histoloških rezinah, na primarni kulturi in na proteiniskih izolatih iz primarne kulture in mlečne žleze.

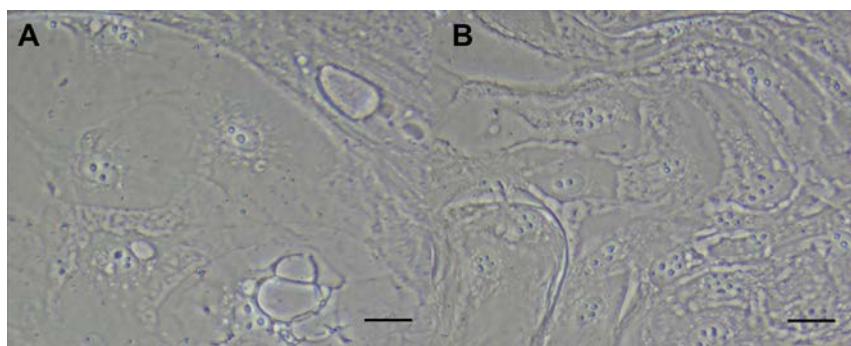
5.1 PRIMARNA CELIČNA KULTURA

Mlečno žlezo smo razgradili v raztopini kolagenaze in hialuronidaze do posameznih celic in jih nacepili v gojišče, ki omogoča razrast epitelnih celic. Uporabljali smo različna gojišča, ki imajo za osnovo RPMI1640, DMEM/F12 ali pa komercialno dostopno gojišče EpiCult-B. Primarna celična kultura je bila sestavljena iz heterogene populacije epitelnih in fibroblastom podobnih celic. Ko so celice rasle do nizke gostote na tanki plasti matriksa bazalne membrane (Geltrex), so oblikovale tipične otočke s celicami podobnimi tlakovcem (Slika 8 A in B). Celice v otočkih so bile tesno skupaj, imele so majhno citoplazmo, okrog teh otokov so se nahajale celice, ki so rasle v naključnih vzorčkih in so bile podobne fibroblastom (Slika 8A). Celice so po presajanju rasle še več pasaž, njihova morfologija in karakteristike rasti pa se niso spremenile. Kupolam podobne strukture so nastale zaradi s kontaktom inducirane diferenciacije (Slika 8C), ko smo celice gojili dalj časa pri visoki gostoti. Pod takimi pogoji so nastali tudi sferam podobni agregati (Slika 8D). Ko so celice zrasle do post konfluentnega stanja in oblikovale kupole, so sintetizirale maščobne kapljice, to smo zaznali z barvanjem z barvilm oil red O (Slika 9).



Slika 8: Morfologija primarnih celic po 8 dneh rasti v gojišču RPMI1640 (A) z reprezentativno sliko epitelnega otočka (B). Kupolam podobne strukture (C) in agregati (D) v 15 dnevni post konfluentni kulturi, ki je rasla na tanki podlagi bazalne membrane v gojišču RPMI 1640. Merila so 50, 100, 200 in 200 μm .

Figure 8: Morphology of caprine primary cells observed after 8 days in culture in RPMI1640 medium (A) with close up of island of densely packed epithelial cells (B). Dome-like structures (C) and aggregates (D) in 15 day old post-confluent culture grown on a thin layer of basement membrane matrix in RPMI1640 medium. Scale bars are 50, 100, 200, and 200 μm .



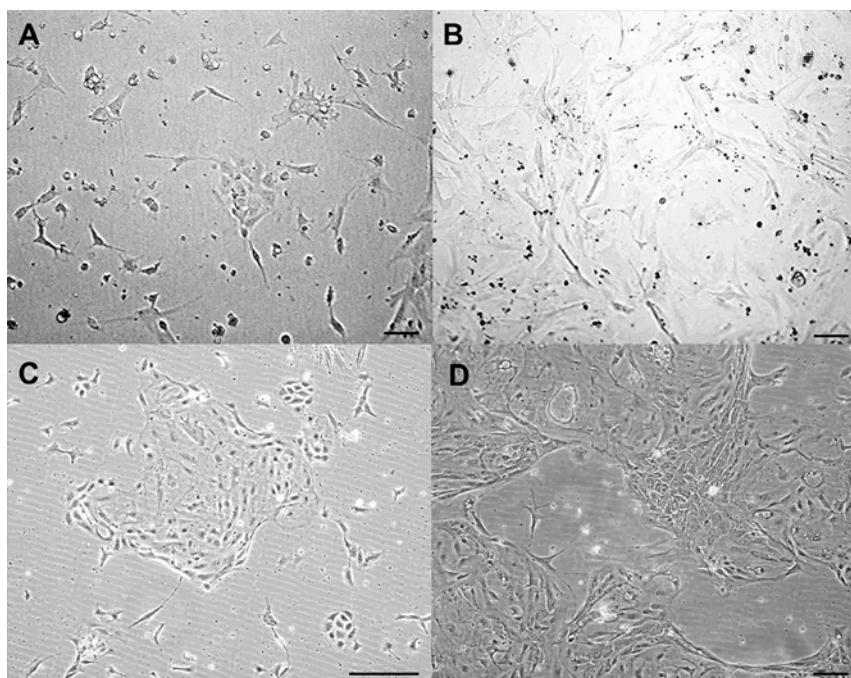
Slika 9: Sinteza lipidnih kapljic v primarni celični liniji v četrti pasaži, ki je rasla 11 dni na tanki plasti matriksa bazalne membrane pod laktogenimi pogoji. Sliki celic, posneti s svetlobno mikroskopijo, po barvanju z barvilkom oil red O. Rozasto obarvane maščobne kapljice vidne v citoplazmi. Merilo je 20 μm .

Figure 9: Synthesis of lipid drops in primary mammary line in fourth passage cultured for 11 days on a thin layer of basement membrane matrix under lactogenic conditions. Bright field images of cells stained with oil red O depicting cells containing fat drops (pink coloration). Scale bar = 20 μm .

Ker nismo poznali delajočih protiteles pri kozi in je bilo v literaturi o tem malo napisanega, smo se odločili, da bomo protitelesa najprej testirali z Western prenosom na proteinskih izolatih iz tkiva in iz primarnih kultur, gojenih 3 ali 7 dni, ki izvirajo iz mlečnih žlez juvenilne koze sanske pasme stare 7 mesecev in iz 9 tednov starih miši FVN, ki niso bile v laktaciji.

5.2 KARAKTERIZACIJA IZRAŽANJA RAZVOJNO POMEMBNIH GENOV (OZNAČEVALCEV)

Primarne kulture smo gojili v gojišču EpiCult-B, ki omogoča rast epitelnih celic. Po 3 dneh rasti so prevladale epitelne celice, s prej opisano morfologijo tlakovcev, tako pri kozjih kot pri mišjih celicah (Slika 10 A in C). Po 7 dneh rasti so se kozje celice namnožile, a ohranile epitelno morfologijo (10D), medtem ko so se mišje celice podaljšale in imele vretenasto obliko, podobno fibroblastom (10B).

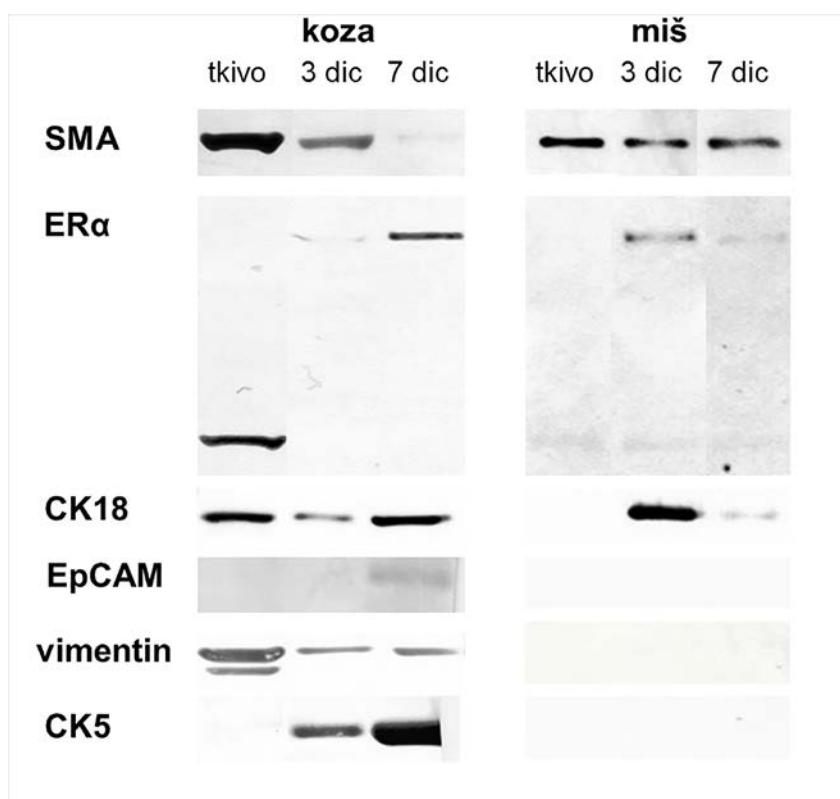


Slika 10: Primarna celična kultura med rastjo na podlagi matriksa bazalne membrane v gojišču EpiCult-B. A) Miš FVB. 3 dnevna kultivacija. B) Miš FVB. 7 dnevna kultivacija. C) Koza sanske pasme. 3 dnevna kultivacija. D) Koza sanske pasme. 7 dnevna kultivacija. Merilo je 100 μm .

Figure 10: Primary mammary cell culture growing on a thin layer of basement membrane matrix in EpiCult-B medium. A) FVB mouse. 3 days in culture. B) FVB mouse. 7 days in culture. C) Saanen goat. 3 days in culture. D) Saanen goat. 7 days in culture. Scale bar = 100 µm.

5.2.1 Western prenos

Da bi videli, če se izražanje označevalcev spreminja med rastjo celic v primarni kulturi, smo izolirali proteine in RNA iz primarnih kultur, za primerjavo pa še iz tkiva. Po testiranju več kot 20 protiteles z Western prenosom, smo našli 6 delujočih protiteles (Slika 11, Preglednica 5). Protitelesa so bila usmerjena proti aktinu gladkih mišic (SMA), estrogenškemu receptorju α (ER α), citokeratinu 18 (CK18), epitelijski celični adhezivni molekuli (EpCAM), vimentinu in citokeratinu 5 (CK5) (Slika 11).



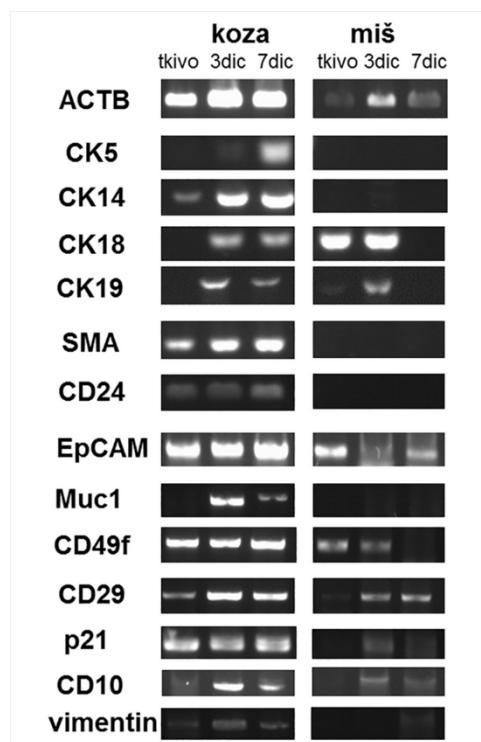
Slika 11: Analiza z metodo Western prenosa s proteini, izoliranimi iz kozje in mišje mlečne žleze in njunih primarnih kultur gojenih 3 ali 7 dni (dic). SMA – aktin gladkih mišic; ER α – estrogenski receptor α ; CK18 – citokeratin 18; EpCAM – epitelialna celična adhezivna molekula; vimentin; CK5 – citokeratin 5.

Figure 11: Western blot analysis with proteins isolated from goat and mouse tissue and primary cultures growing for 3 or 7 days (dic). SMA – smooth muscle actin; ER α – estrogen receptor α ; CK18 – cytokeratin 18; EpCAM - epithelial cell adhesion molecule; vimentin; CK5 – cytokeratin 5.

Ker je postopek za Western prenosa relativno dolgotrajen in zahteva optimizacijo, in ker smo s to metodo našli samo 6 delajočih protiteles, smo se odločili, da reaktivnost protiteles testiramo direktno na primarni kulturi in na v parafin vklopljenem tkivu mlečne žleze koze.

5.2.2 Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR)

Z metodo RT-PCR smo preverili, če se določeni označevalci sploh izražajo v tkivu oziroma primarni kulturi. Da bi preverili, če so mRNA za nabor označevalcev prisotne v naših vzorcih, smo uporabili začetne oligonukleotide, ki so podani v Preglednici 7. Vse zaznane mRNA so predstavljene na Sliki 12. Ker smo videli, da so pomembni označevalci prisotni, smo protitelesa dalje testirali na primarni kulturi in dobili pozitivne rezultate (Slika 13).

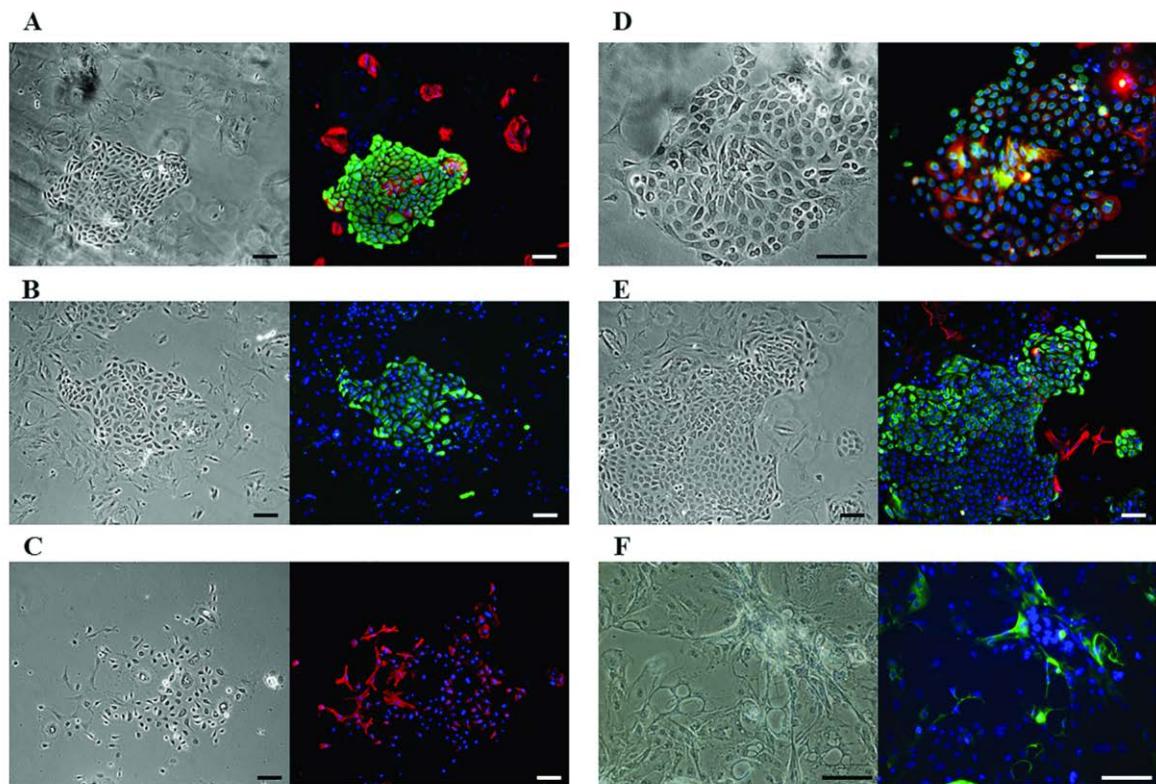


Slika 12: Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR) za izbrane gene, ki so povezani s celičnimi linijami, ki sestavljajo mlečno žlezo. Slike agaroznih gelov po elektroforezi s pomnožki za β -actin (ACTB), citokeratine (CK) 5, 14, 18, 19, aktin gladkih mišic (SMA), CD24, epitelijsko celično adezijsko molekulo (EpCAM), mucin 1 (Muc1), CD49f, CD29, p21, CD10 in vimentin.

Figure 12: Reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCR) for selected genes associated with mammary lineages. Representative photographs following agarose gel electrophoresis of products from RT-PCR for β -actin (ACTB), cytokeratins (CK) 5, 14, 18, 19, smooth muscle actin (SMA), CD24, epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), mucin 1 (Muc1), CD49f, CD29, p21, CD10, and vimentin.

5.2.3 Izražanje proteinov citoskeleta

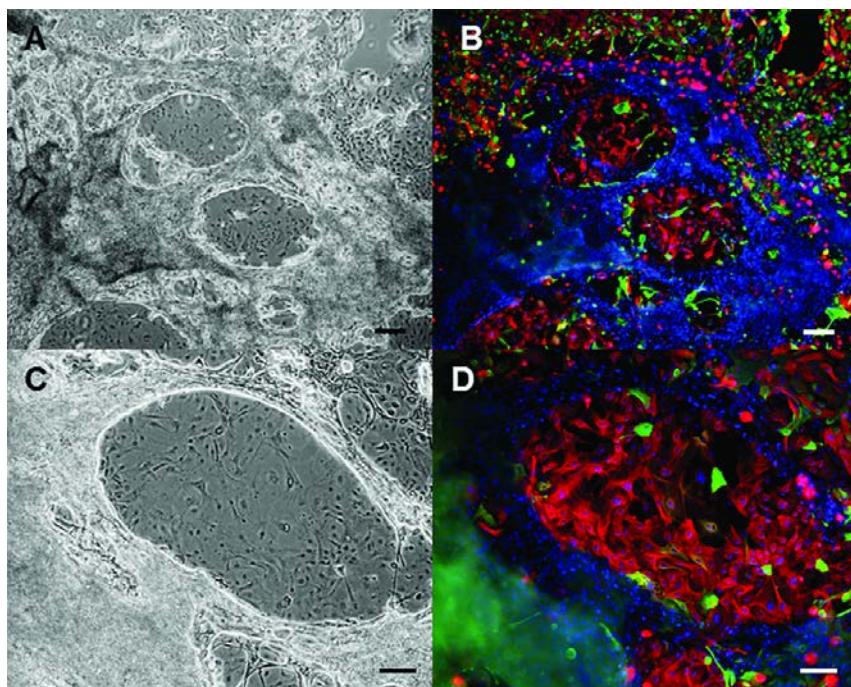
Celice v primarni kulturi smo barvali s protitelesi, specifičnimi za različne celične tipe. Mioepitelne celice so bile pozitivne za citokeratin (CK) 14 (zeleno obarvanje na sliki 13A), CK 5 (zeleno obarvanje, Slika 13E) in za bazalni označevalec CD49f (Slika 13B). Luminalne celice so se obarvale s protitelesi proti CK18 (rdeče obarvanje Slika 13 A in D), ER (zelena jedra, Slika 13D) in kazeinu beta (Slika 13F). Celice so izražale tudi mezenhimski intermediatni filamentozni protein vimentin (Slika 13C). Manjši delež celic je bil označen s protitelesom proti aktinu gladkih mišic (Slika 13E).



Slika 13: Imunofluorescentno barvanje primarne kulture gojene 5 dni na tanki podlagi matriksa bazalne membrane. Slike celic, posnete s svetlobno in fluorescentno mikroskopijo, inkubiranih s protitelesi proti citokeratinu 14 (A; zeleno obarvanje) in citokeratinu 18 (A in D; rdeče), CD49f (B), vimentinu (C), estrogenskemu receptorju (D; zeleno), aktinu gladkih mišic in citokeratinu 5 (E; rdeče in zeleno). Sinteza kazeina beta v primarni liniji v četrti pasaži po 11 dneh gojenja pod laktogenimi pogoji. Jedra smo obarvali z barvilkom DAPI (modro). Merilo je 100 µm.

Figure 13: Immunofluorescent staining of primary mammary culture cultured for 5 days on a thin layer of basement membrane matrix. Bright field and fluorescence images of cells incubated with antibodies against cytokeratin 14 (A; green staining) and cytokeratin 18 (A and D; red), CD49f (B), vimentin (C), estrogen receptor (D; green), and smooth muscle actin and cytokeratin 5 (E; red and green). Synthesis of beta casein of primary mammary line in fourth passage cultured for 11 days on a thin layer of basement membrane matrix under lactogenic conditions (F). Nuclei have been counterstained with DAPI (blue). Scale bars are 100 µm.

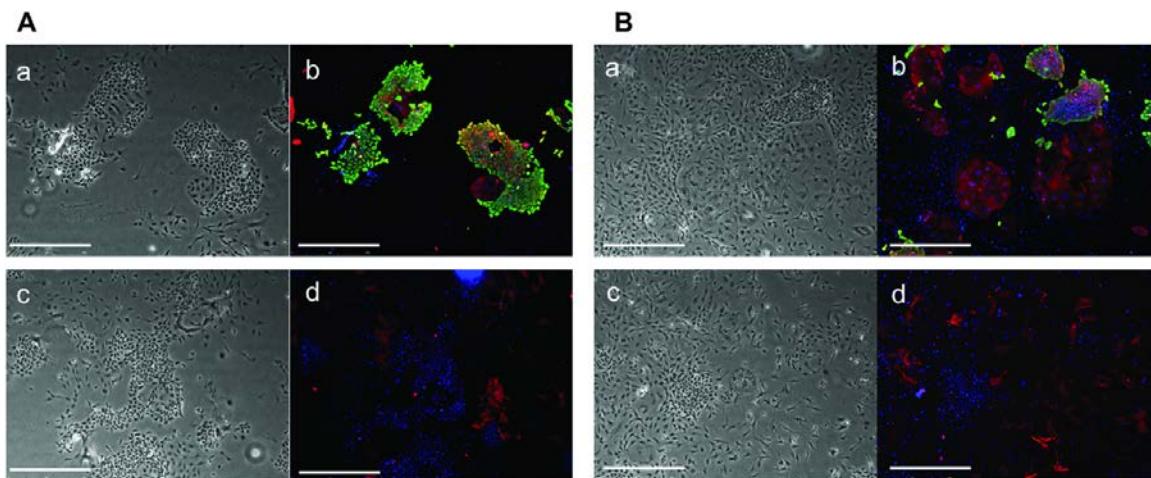
Kupole so sestavljele večinoma luminalne celice, ki so izražale citokeratin 18 (Slika 14, rdeče obarvanje). Manjši delež celic, ki so oblikovale kupole, so predstavljale za CK14 pozitivne mioepitelne celice (Slika 14, zeleno). Okoli kupol je zrasla debela "stena" celic, ki niso izražale epitelnih označevalcev in so bile po vsej verjetnosti stromalne celice (fibroblasti).



Slika 14: Oblikovanje kupol v post konfluentni kulturi gojeni 29 dni. Slike so posnete s svetlobno in fluorescentno mikroskopijo celic, inkubiranih s protitelesi proti citokeratinu 14 (zeleno obarvanje) in citokeratinu 18 (rdeče obarvanje). Jedra smo obarvali z barvilkom DAPI (modro). Merila so 200 µm (A, B) in 100 µm (C, D).

Figure 14: Dome formation in over confluent culture cultured for 29 days. Bright field and immunofluorescence images of cells incubated with antibodies against cytokeratin 14 (green staining) and cytokeratin 18 (red staining). Nuclei have been counterstained with DAPI (blue). Scale bars are 200 µm (A, B) and 100 µm (C, D).

Opazili smo, da je rast posameznih celičnih tipov močno odvisna od rastne podlage. Med rastjo na tanki plasti kolagena je v primarni kulturi prisotnih več fibroblastov (Slika 15B) kot med rastjo na tanki plasti matriksa bazalne membrane (Slika 15A). Del fibroblastov je bil pozitivnih za SMA, preostali pa se niso obarvali.

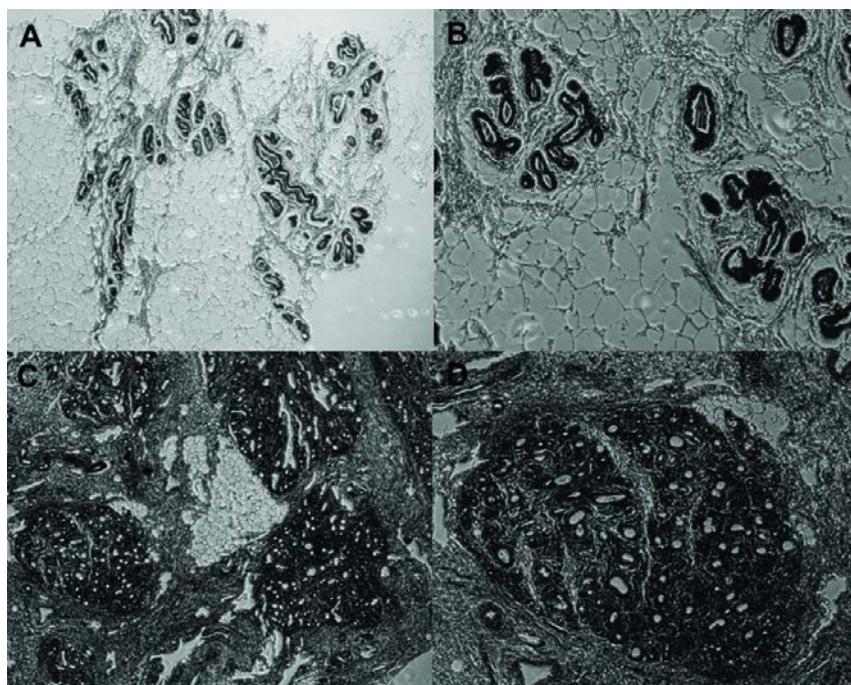


Slika 15: Primarna kultura po 6 dneh gojenja na tanki podlagi bazalne membrane (A) ali kolagena (B) v gojišču Sf7. Slike celic, posnete s svetlobno in fluorescentno mikroskopijo, inkubiranih s protitelesi proti citokeratinu 14 (Ab in Bb; zeleno obarvanje) in citokeratinu 18 (Ab in Bb; rdeče) ter aktinu gladkih mišic (Ad in Bd). Jedra smo obarvali z barvilo DAPI (Ab, Ad, Bb, Bd; modro). Merilo je 500 µm.

Figure 15: Primary mammary culture grown for 6 days on a thin layer of basement membrane matrix (A) or collagen (B) in Sf7 medium. Bright field and fluorescence images of cells incubated with antibodies against cytokeratin 14 (Ab and Bb; green staining) and cytokeratin 18 (Ab and Bb; red) Nuclei have been counterstained with DAPI (blue). Scale bars are 500 µm.

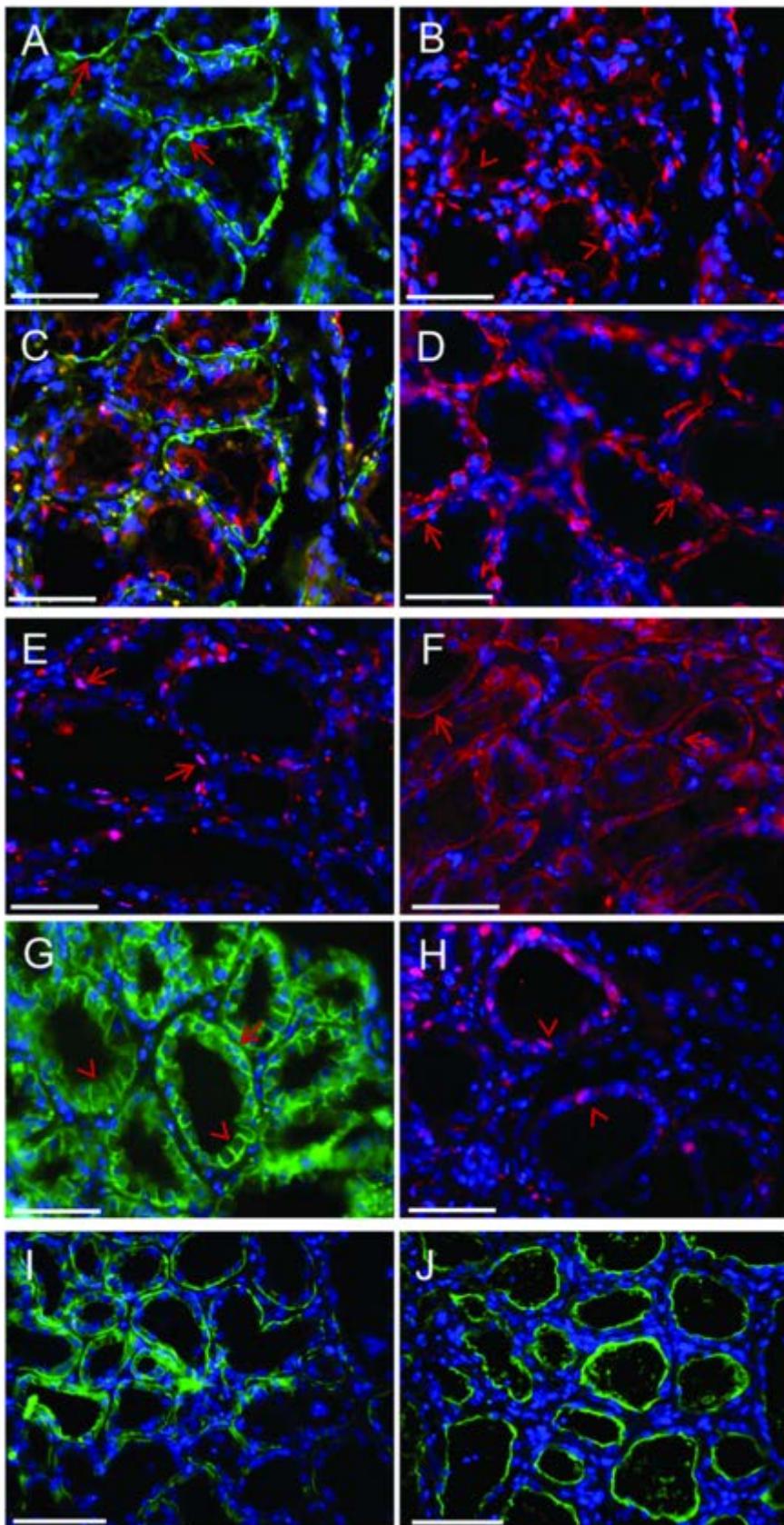
5.2.4 Histologija mlečne žleze koze

Hoteli smo tudi preveriti kako so označevalci razporejeni v tkivu mlečne žleze, zato smo pobarvali tkivne rezine v parafin vklopljenega tkiva. V mlečni žlezi v laktaciji je mlečna žleza napolnjena z alveolami, vidnega pa je malo vezivnega tkiva (Slika 16 C in D), medtem ko je v juvenilni mlečni žlezi vidno malo epitelija, poleg fibroblastov so pogost celični tip adipociti (Slika 16 A, B).



Slika 16: Tkivne rezine kozje mlečne žleze barvane s hematoksilinom in eozinom (H&E). Juvenilna mlečna žleza 5 mesečne koze (A, B) in mlečna žleza 8 letne koze v laktaciji (C, D). Merilo na slikah A in C je 50 μm ter na B in D 100 μm .

Figure 16: Hematoxylin and eosin staining of goat mammary gland tissue sections. Juvenile mammary gland of 5 month old Boer goat (A,B) and mammary gland of 8 year old goat in lactation (C,D). Scale bars are 50 μm (A,C) and 100 μm (B,D).

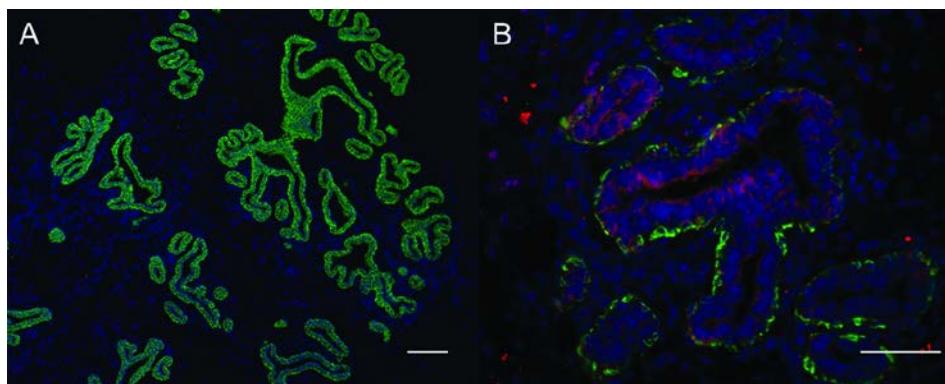


Slika 17: Izražanje in lokalizacija z imunofluorescenco zaznanih označevalcev v tkivu kozje mlečne žleze v laktaciji. Izražanje CK14 (A; zeleno) in CK18 (B; rdeče) in prekrivanje slik A in B, ki prikazuje lokalizacijo izražanja obeh označevalcev (C), SMA (D), P63 (E), ITGB1 (F), EPCAM (G), PGR (H), ITGA6 (I) in MUC1 (J). Puščice kažejo na mioepitelne celice (A in D–G) glave puščic pa luminalne celice (B, G in H). Puščice na sliki E in glave puščic na sliki H kažejo barvanje v jedru. Jedra smo pobarvali z barvilkom DAPI (modro). Merilo je 50 µm.

Figure 17: Expression and spatial localization of immunofluorescently detected markers in lactating caprine mammary tissue. Expression of CK14 (A; green staining) and CK18 (B; red) is shown. Overlay of A and B shows spatial localization of CK14 and CK18 (C), SMA (D), TP63 (E), ITGB1 (F), EPCAM (G), PGR (H), ITGA6 (I), and MUC1 (J). Arrows indicate myoepithelial cells (A and D–G), and arrowheads indicate luminal cells (B, G, and H). Arrows in E and arrowheads in H depict nuclear staining. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Bar = 50 µm.

Na Sliki 17 so predstavljeni primeri imunohistoloških barvanj v alveolah mlečne žleze v laktaciji. Mioepitelne celice so se pozitivno pobarvale za citokeratin 14 (A in C), aktin gladkih mišic (D), CD29 (ITGB1, F) in CD49f (ITGA6, I), jedra so bila označena s protitelesi proti proteinu p63 (E). Luminalne celice so bile označene s protitelesi proti citokeratinu 18 (B in C), mucinu 1 (J) in progesteronskemu receptorju (H), slednji se nahaja v jedru. EpCAM se je nahajal v luminalnih celicah, opazili smo tudi posamezne mioepitelne celice, ki so bile zanj pozitivne (G).

Na Sliki 18 sta dva primera imunohistoloških barvanj na v parafin vklopljenem tkivu, ki je izviralo iz juvenilne mlečne žleze 8 mesečne koze burske pasme. Parenhima je očitno manj kot pri mlečni žlezi v laktaciji. Razporeditev za mioepitelne celice specifičnega CK14 in za luminalne celice specifičnega CK18 je identična kot na prejšnji sliki. Prav tako je EpCAM večinoma prisoten v luminalnih celicah.



Slika 18: Izražanje in lokalizacija z imunofluorescenco zaznanih označevalcev EpCAM (A), CK14 in CK18 (B, zeleno in rdeče obarvanje) v tkivu juvenilne kozje mlečne žleze stare 8 mesecev. Jedra smo pobarvali z barvilom DAPI (modro). Merilo je 50 µm.

Figure 18: Expression and spatial localization of immunofluorescently detected markers EpCAM (A) and CK14 and CK18 (B; green and red staining) in 8 month old juvenile caprine mammary tissue. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Bar = 50 µm.

Tako smo odkrili 15 delijočih protiteles, ki prepoznavajo kozje proteine. Izražanje za posamezne celične linije specifičnih označevalcev v mlečni žlezi smo preverili tudi na transkriptomu primarne celične kulture.

5.2.5 Izražanje označevalcev mRNA

Set transkriptomskih profilov smo generirali iz treh vzorcev primarne kulture mlečne žleze kozje. Dobili smo približno 15 milijonov odčitkov zaporedij. V osnutku približno dvajset tisoč govejih identifikatorjev RefSeq (to so geni ali predvideni geni), smo iskali pri različnih vrstah v literaturi predhodno opisane označevalce celic v mlečni žlezi (Preglednica 8).

Preglednica 8: Izražanje označevalcev, specifičnih za posamezne celične linije v primarni kulturi iz kozje mlečne žleze. Podatki so predstavljeni kot aritmetične sredine \pm SD (n = 3).

Table 8: Expression of markers of specific mammary cell lineages in primary goat mammary epithelial cell culture. Data are means \pm SD (n = 3).

Simbol	Opis	Povprečje \pm SD	Linija ¹	Vrsta ²	Reference
CK5	keratin 5	185598 \pm 11855	m	č, m	Kendrick in sod., 2008
CK17	keratin 17	123918 \pm 6664	m	č	Villadsen in sod., 2007
CK 14	keratin 14	91369 \pm 6753	m	č, m, k	Villadsen in sod., 2007, Eirew in sod., 2008, Prpar in sod., 2013, Shackleton in sod., 2006
CK 6A	keratin 6A	67913 \pm 2317	l	č, m	Villadsen in sod., 2007, Shackleton in sod., 2006
ITGA6	integrin alfa 6	6647 \pm 648	b	č, m	Koukoulis in sod., 1991, Stingl in sod., 2001, Stingl in sod., 2006
CK 8	keratin 8	4044 \pm 246	l	č	Villadsen in sod., 2007, Dontu in sod., 2003
MYL6	miozin, lahka veriga 6	3975 \pm 99	m	m	Sleeman in sod., 2007
ITGB1	integrin beta 1	3823 \pm 502	b	m,k	Prpar in sod., 2013, Taddei in sod., 2008
SPARC	angl. secreted protein, acidic, cysteine-rich	1275 \pm 56	m	č, m	Kendrick in sod., 2008, Raouf et al., 2008
Ki-67	Antigen KI-67	913 \pm 26	označ. proliferacije	č, m	Gerdes, 1990, Stingl, 2009
CD44	CD44 antigen	879 \pm 42		č	Stingl in sod., 2001
CNN3	calponin 3	873 \pm 131	m	m	Kendrick in sod., 2008
EPCAM	epitelijksa celično adhezivna molekula	680 \pm 50	l	č, m, k	Prpar in sod., 2013, Stingl in sod., 2006, Stingl in sod., 2005
ACTA2	aktin gladkih mišic, alfa 2	300 \pm 13	m	č, m, k	Eirew in sod., 2008, Prpar in sod., 2013, Stingl in sod., 2006, Stingl in sod., 2005
CK19	keratin 19	257 \pm 51	l	č	Villadsen in sod., 2007
PML	protein promielocitne levkemije	254 \pm 44	l	m	Li in sod., 2009
CK18	keratin 18	196 \pm 34	l	č, m, k	Prpar in sod., 2013, Shackleton in sod., 2006, Stingl in sod., 2006
STAT5A	angl. signal transducer and activator of transcription 5A	165 \pm 22	ucr, l	m	Yamaji in sod., 2009
GATA3	GATA vezavni protein 3	145 \pm 13	ucr, l	m	Asselin-Labat in sod., 2007, Kourous-Mehr in sod., 2006
BRCA1	angl. breast cancer 1	132 \pm 29	ucr, l	č	Ginestier in sod., 2007, Liu in sod., 2008
PYGO2	homolog pygopus 2	129 \pm 8	ucr	m	Gu in sod., 2009
VIM	vimentin	112 \pm 14	mez, m	č, m, k, kr	Stingl in sod., 2006, Mani in sod., 2008, Pantschenko in sod., 2000a, Zavizion in sod., 1996

²m – mioepitelna, l – luminalna, b – bazalna, ucr – usmeritev celičnega razvoja (angl. *cell fate*), me – mezenhimska

¹č – človek, m – miš, kr – krava, k – koza

Frekvence transkriptov, ki nosijo zapise za različne označevalce lahko uporabimo za karakterizacijo primarnih kultur iz mlečne žleze in določitev posameznih celičnih tipov. Najvišjo raven izražanja smo opazili za označevalce, tipične za mioepitelne celice, npr. CK 5, 17 in 14. Drugi zaznani transkripti, ki so jih povezali z mioepitelnimi celicami, so bili Myl6 (miozin gladkih mišic), SPARC. Visoko izraženi luminalni markerji so bili CK6A, EpCAM, CK18 in CK19. Zaznali smo tudi visoko količino mRNA za integrin beta 1 (CD29) in bazalni označevalec integrin alfa 6 (CD49f). Drugi izraženi označevalci so bili protein promielocitne levkemije (angl. *promyelocytic leukemia protein, PML*), STAT5A, GATA3, BRCA1 in PYGO2. Zaznali smo tudi označevalce povezane z mezenhimom (SMA, vimentin, katenin-beta 1, SPARC, fibronektin 1, NOV, TGFBR2, ADAM, metaloproteinaze matriksa (MMP)). Izražal se je tudi marker proliferacije Ki67 in komponente zunajceličnega matriksa, večinoma kolageni in laminini (Preglednica 9).

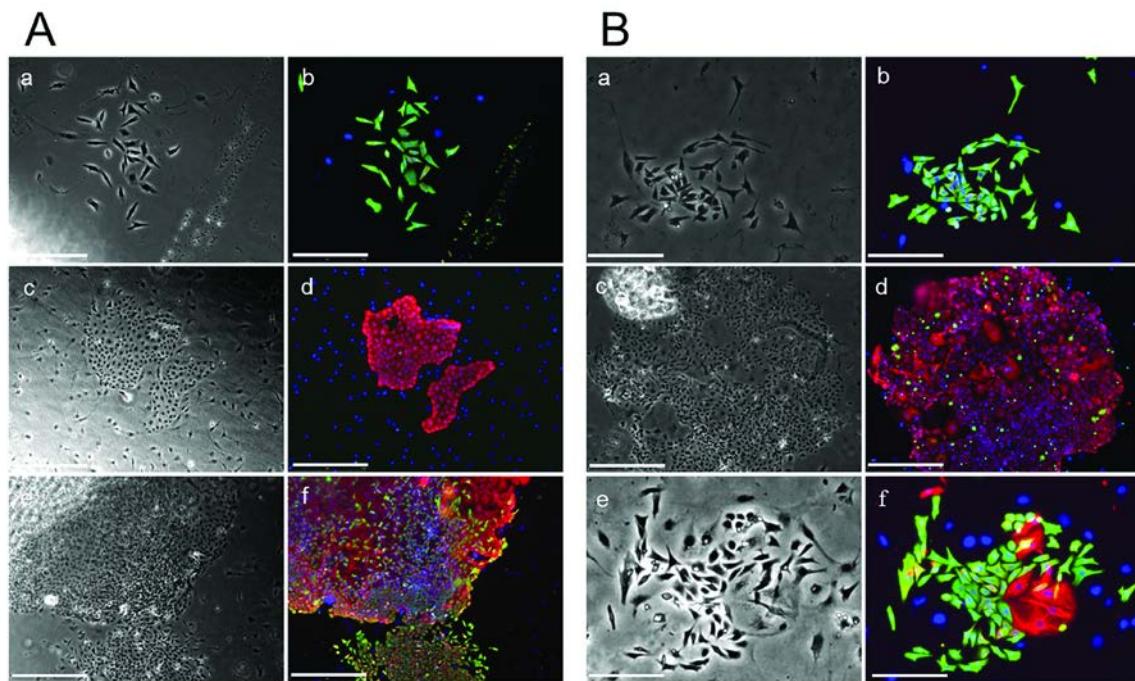
Preglednica 9: Izražanje komponent zunajceličnega matriksa v primarni kulturi. Podatki so predstavljeni kot aritmetične sredine \pm SD (n = 3).

Table 9: Components of extracellular matrix (ECM) expressed in primary culture. Data are means \pm SD (n = 3).

Simbol	Opis	Povprečje \pm SD
COL17A1	collagen, type XVII, alpha 1	13879 \pm 511
LAMC2	laminin 5, gamma 2 subunit	2896 \pm 196
LAMA5	laminin, alpha 5	1424 \pm 191
LAMA3	alpha3A chain laminin	1404 \pm 82
LAMC1	Laminin subunit gamma-1 precursor	1241 \pm 95
COL18A1	collagen, type XVIII, alpha 1	1218 \pm 107
LAMB3	laminin, beta 3	1011 \pm 115
COL8A1	collagen, type VIII, alpha 1	971 \pm 55
COL12A1	collagen type XII, alpha 1, transcript variant 1	770 \pm 45
LAMA3	laminin alpha 3 subunit	579 \pm 28
COL4A1	collagen, type IV, alpha 1	510 \pm 32
COL3A1	collagen, type III, alpha 1	448 \pm 34
COL4A6	Collagen alpha-6(IV) chain	295 \pm 24
LAMB2	laminin, beta 2	254 \pm 25

5.3 IN VITRO DOKAZ ZA PREKURZORSKE CELICE

Po 6 – 8 dneh gojenja celic, ki so bile nasajene v ustrezeni redčitvi, da je iz ene celice nastala ena kolonija (angl. *clonal density*), so nastale različno velike kolonije (Slika 19). Kolonije so rasle na hranični podlagi fibroblastov, da so imele optimalne pogoje za rast v mediju brez dodanega FBS. Kolonije so bile oblikovane iz celic, ki so izražale označevalce, tipične za mioepitelne (CK14) in luminalne celice (CK18). Glede na morfologijo in imunsko barvanje smo določili, da so prisotni vsaj trije tipi kolonij, ki jih gradijo: (i) manjše celice, ki rastejo naključno ali solzicam podobne celice, ki so relativno skupaj in so pozitivne za CK14 (A: a in b; B: a in b), (ii) večje okrogle celice, z večjo citoplazmo, ki so tesno skupaj in izražajo CK18 (A: c in d; B: c in d) in (iii) mešanica celic, opisana v prvih dveh tipih kolonij (A: e in f; B: e in f). Pod *in vitro* pogoji iz bipotentnih prekurzorjev nastanejo mešane kolonije, ki vsebuje tako luminalne kot bazalne celice. Iz mioepitelnih prekurzorjev nastanejo kolonije, sestavljene izključno iz bazalnim celicam podobnih celic, ki jih definira njihov za CK14-pozitiven fenotip. Luminalni prekurzorji tvorijo luminalne kolonije, ki jih gradijo le za CK18⁺ celice. V mešanih kolonijah so se CK18⁺ celice pogosto nahajale v sredici kolonij, CK14⁺ celice pa so se razraščale na robovih.



Slika 19: Morfologija in izražanje označevalcev diferenciacije v kolonijah iz celic mlečne žleze koze, ki so rasle v dveh gojiščih. Izražanje za linijo specifičnih citokeratinov (CK14, zeleno; CK18, rdeče) v kolonijah, ki so rasle v gojišču Sf7 (A) ali v gojišču EpiCult-B (B). Slike svetlobne in fluorescentne mikroskopije mioepitelne kolonije (A, a in b), luminalne kolonije (A, c in d) in mešane kolonije (A, e in f) v gojišču Sf7 in mioepitelne kolonije (B, a in B), luminalne kolonije (B, c and d) in mešane kolonije (B, e and f) v gojišču EpiCult-B. Jedra smo obarvali z barvilom DAPI (modro). Merila so 250 µm (A, e in f) in 500 µm na ostalih slikah.

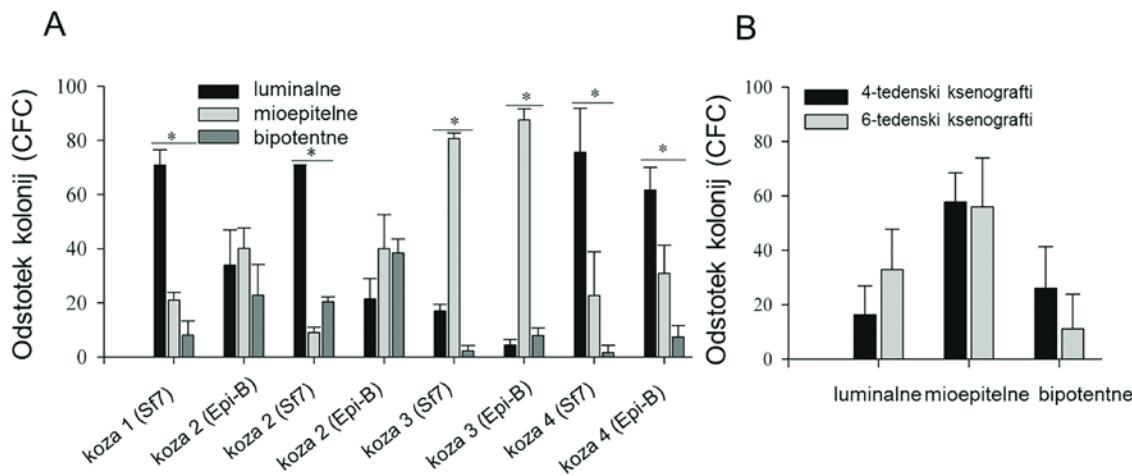
Figure 19: Morphology and expression of differentiation markers in caprine mammary colonies grown in two different media. Expression of lineage restricted cytokeratins (KRT14, green; KRT18, red) in colonies grown in either Sf7 medium (A) or EpiCult-B medium (B) is shown. Representative brightfield and immunofluorescence images of a myoepithelial-like colony (A, a and b), a luminal-like colony (A, c and d), and a mixed colony (A, e and f) grown in Sf7 medium as well as a myoepithelial-like colony (B, a and b), a luminal-like colony (B, c and d), and a mixed colony (B, e and f) grown in EpiCult-B medium are also shown. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Bars are 250 µm (A, e and f) and 500 µm (all other images).

In vitro test za odkrivanje zmožnosti tvorjenja kolonij iz celic iz mlečne žleze (CFC) je pokazal, da kolonije nastanejo s frekvencami od 1 do 8 % glede na vse nasajene celice. Trije morfološko različni tipi kolonij so nastali z različnimi frekvencami, te so bile odvisne od tipa uporabljenega gojišča in testiranega vzorca (Preglednica 10).

Preglednica 10: Frekvence klonogenih prekurzorjev epitelnih celic iz mlečne žleze koze v dveh različnih gojiščih. Podatki so izraženi kot aritmetična sredina \pm standardna deviacija. n predstavlja število gojitvenih posodic preštetih za vsak vzorec, statistično značilni podatki imajo $p<0.05$.

Table 10: Comparison of the frequencies of clonogenic progenitors of caprine mammary cells in two different media. Data are expressed as the arithmetic mean \pm s.e.m.. n depicts number of dishes counted for each sample, statistically significant data has $p<0.05$.

Vzorec	Gojišče	CK14+ kolonije	CK18+ kolonije	Mešane kolonije	Skupaj	n	p-vrednost
koza 1	Sf7	1.45 \pm 0.31	4.98 \pm 1.47	0.51 \pm 0.26	6.93 \pm 1.52	4	0.018
	EpiCult-B	0.44 \pm 0.09	0.34 \pm 0.16	0.26 \pm 0.20	1.04 \pm 0.26	5	0.317
koza 2	Sf7	0.62 \pm 0.04	4.99 \pm 1.07	1.46 \pm 0.43	7.07 \pm 1.48	4	0.046
	EpiCult-B	0.56 \pm 0.41	0.37 \pm 0.15	0.68 \pm 0.21	1.83 \pm 0.67	5	0.655
koza 3	Sf7	3.55 \pm 0.13	0.75 \pm 0.13	0.10 \pm 0.08	4.40 \pm 0.14	4	0.018
	EpiCult-B	6.40 \pm 0.53	0.33 \pm 0.15	0.58 \pm 0.19	7.30 \pm 0.35	4	0.046
koza 4	Sf7	0.26 \pm 0.20	0.86 \pm 0.20	0.02 \pm 0.03	1.15 \pm 0.12	6	0.025
	EpiCult-B	0.76 \pm 0.32	1.52 \pm 0.40	0.18 \pm 0.13	2.46 \pm 0.44	6	0.004



Slika 20: A) Odstotki različnih tipov kolonij (CFC), ki so zrasle iz sveže odmrznjenega tkiva mlečnih žlez v laktaciji (koza 1–3) in juvenilne mlečne žleze (koza 4) v gojiščih Sf7 in EpiCult-B. Podatki so predstavljeni kot aritmetična sredina \pm SD števila kolonij specifičnega tipa glede na celokupno število kolonij, ki so zrasle v gojitveni posodici. Zvezdice označujejo statistično značilne razlike med frekvencami luminalnih, mioepitelnih in bipotentnih kolonij izračunane s testom po Friedmanu ($P<0.05$). B) Odstotki različnih tipov kolonij (CFC), ki so zrasle iz disociiranih 4- in 6-tednov starih ksenograftov ($n=3$ in 5) v gojišču Sf7, ki so bili nacepljeni z epitelnimi celicami 7 mesečne koze (koza 4). Podatki so predstavljeni kot aritmetična sredina \pm SD števila kolonij specifičnega tipa glede na celokupno število kolonij, ki so zrasle v gojitveni

posodici. Razlike v frekvencah kolonij niso bile statistično značilne ($P>0.05$), glede na izračune z Wilcoxonovim testom rangiranja vsot.

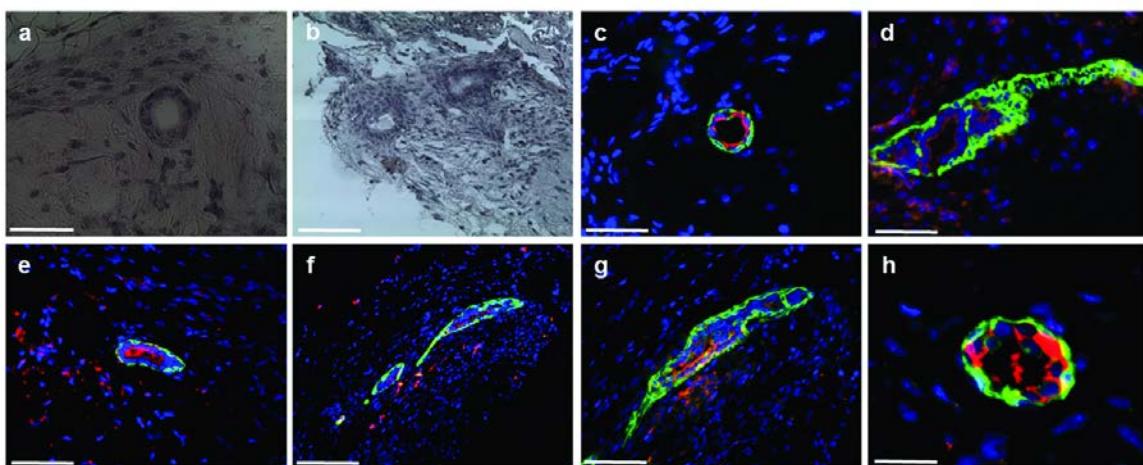
Figure 20: Percentages of different types of CFCs in freshly thawed lactating (goats 1–3) and juvenile caprine mammary tissue (goat 4) in Sf7 and EpiCult-B medium. Data are expressed as the arithmetic mean \pm SEM of the number of colonies of specific type over total number of colonies per dish. An asterisk indicates a statistically significant difference among luminal, myoepithelial, and bipotent colony frequencies as calculated with a Friedman test ($P<0.05$). B) Percentages of different types of CFCs in 4- and 6-wk-old xenografts ($n=3$ and 5, respectively) in Sf7 medium generated with epithelial fraction from a 7-mo-old goat (goat 4). Data are expressed as the arithmetic mean \pm SEM of the number of colonies of specific type over total number of colonies per dish. Differences in colony frequencies were not statistically significant ($P>0.05$) as calculated with a Wilcoxon rank sum test.

Luminalnih prekurzorjev je bilo največ v vzorcih iz mlečnih žlez v laktaciji (koza 1 in 2) in v puberteti (koza 4). Frekvence luminalnih kolonij gojenih v gojišču Sf7 so bile okrog 80 %, v gojišču EpiCult-B pa od 30 do 70 %. Odstotek zaznanih mioepitelnih prekurzorjev je bil najvišji v vzorcu "koza 3" in je znašal okrog 80 % v obeh testiranih gojiščih. V preostalih vzorcih jih je bilo 10 do 40 %, vedno več v mediju EpiCult-B. Variacijo v odstotku specifičnih prekurzorjev v istem vzorcu a v različnih medijih lahko pripisemo različnim sestavam medijev. Izbira gojišča, ki ga uporabimo v testu CFC, je potrebno dobro premisliti, ker različna gojišča različno spodbujajo razrast posameznih, za linijo specifičnih, prekurzorjev.

5.4 SPOSOBNOST REGENERACIJE *IN VIVO*

V kolagenske gelčke smo vklopili epitelne celice iz mlečnih žlez sedem mesečne juvenilne in tri letne koze v laktaciji in fibroblaste 10T1/2, tretirane z mitomicinom C. Začetno število epitelnih celic na posamezen gel je bilo okrog 7.5×10^4 . Gelčke smo vsadili pod ledvično kapsulo miši NOD/SCID, ki smo jih tretirali s hormonoma, ki smo ju zmešali v silikonski pelet (2 mg β -estradiola in 4 mg progesterona). Gelčke smo odstranili po 4 – 6 tednih. Del gelčkov smo vklopili v parafin za barvanje s hematoksilinom in eozinom (H&E) in za imunološka barvanja, del pa smo jih disociirali in nacepili v teste CFC. H&E barvanje je pokazalo, da so v gelčkih nastale okrogle (Slika 21 a) in podaljšane (Slika 21 b)

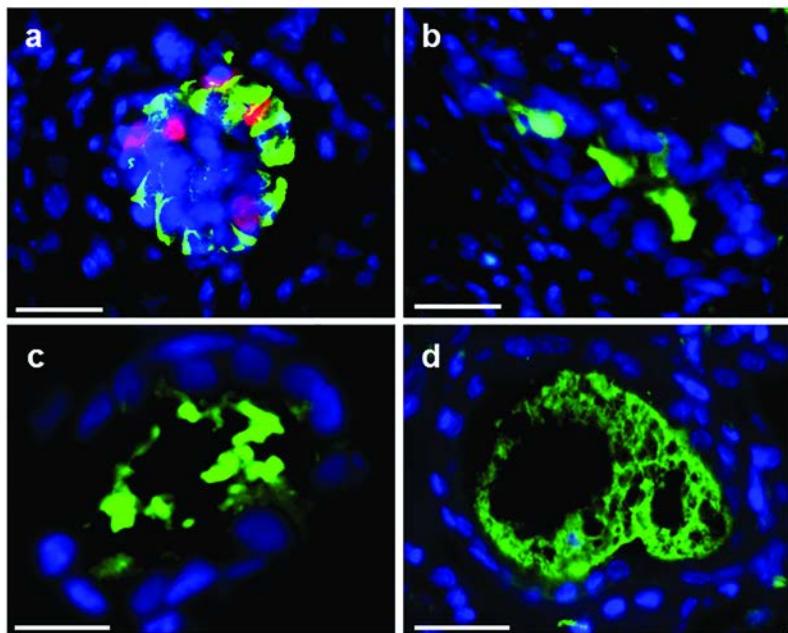
strukture. V imunsko barvanih rezinah gelčkov (Slika 21 c – h) je distribucija CK14 in CK18 podobna kot v mlečni žlezi (Slika 17C).



Slika 21: Morfologija in izražanje označevalcev v regeneriranih strukturah. Barvanje s hemtoksilinom in eozinom in izražanje CK14 in CK18 v ksenografiyah, ki so nastali iz celic, ki so izvirale iz 7 mesečne koze (a-d) in CK14 in CK18 izražanje v ksenografiyah, ki so zrasli iz celic iz 3 letne koze, ki je bila v laktaciji (e-h). CK14 označuje mioepitelne celice, CK18 pa luminalne celice. Transplantirane gelče smo odstranili po 5 (a) ali 6 tednih (preostale slike). Jedra smo obarvali z barvilom DAPI (modro). Merila so 50 µm (b, c, e in g), 100 µm (a in f), 62 µm (d), 20 µm (h).

Figure 21: Expression and spatial localization of immunofluorescently detected markers in regenerated structures. Hematoxylin and eosin staining and CK14 and CK18 expression in xenografts formed by cells originating from 7 month old goat (a-d) and CK14 and CK18 expression in xenografts formed by cells originating from 3-yr-old lactating goat (e-h). KRT14 marks myoepithelial cells, whereas KRT18 marks luminal cells. Transplanted gels were removed after 5 weeks (a) or 6 weeks (all other images). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Bar = 50 µm (b, c, e, and g), 100 µm (a and f), 62 µm (d), 20 µm (h).

Celice so se organizirale v polariziran epitelij, sestavljenem iz dvosloja. Strukture so oblikovale tudi lumen. Da celice, ki oblikujejo strukture, res izvirajo iz mlečne žleze smo dokazali z barvanjem za progesteronski receptor (Slika 22 a) in s prisotnostjo mlečnih proteinov v lumnu (Slika 22 b in c). Slednji barvanji tudi dokazujeta, da so se celice, ki oblikujejo regenerirane strukture, funkcionalno diferencirale in so bile sposobne funkcionirati kot prave alveole (mlečni mehurčki).



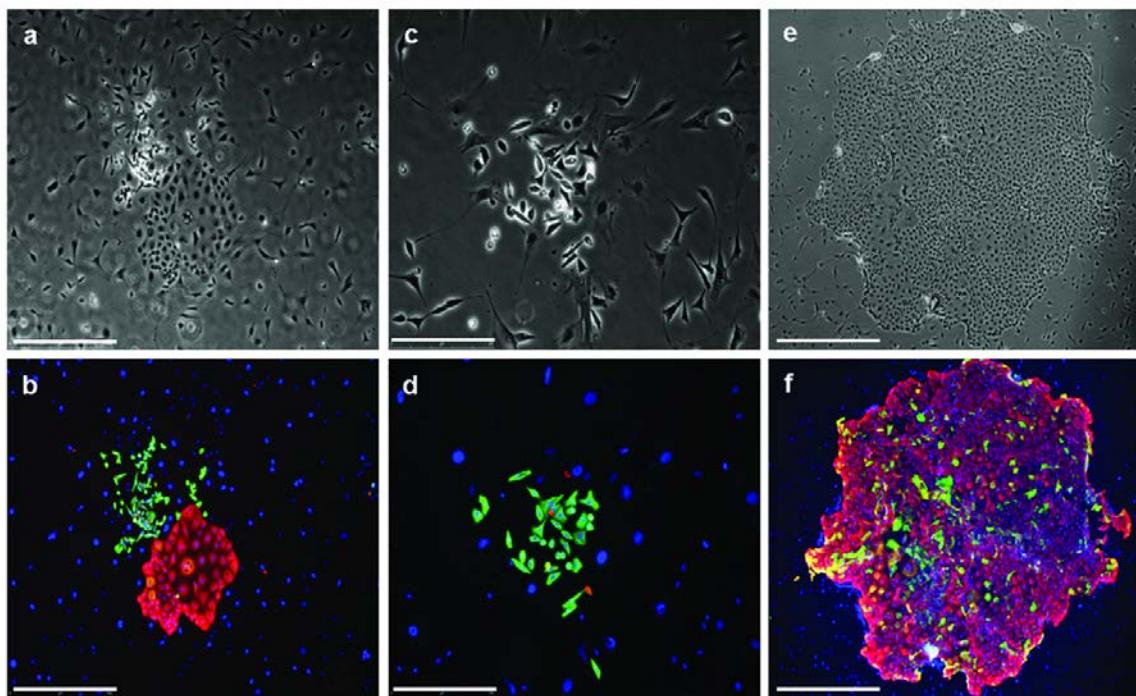
Slika 22: Izražanje označevalcev diferenciacije CK14 in progesteronskega receptorja (PR) (a, zeleno in rdeče obarvanje) ter mlečnih proteinov (b in c, zeleno obarvanje) v regeneriranih strukturah, ki so jih oblikovali epitelne celice iz 3 letne koze v laktaciji. Za kontrolo je tvorba mlečnih proteinov v mlečni žlezi v laktaciji (d). Gelčke smo odstranili po 6 tednih. Jedra smo obarvali z barvilkom DAPI (modro). Merila so 20 µm (a), 15 µm (b), 9 µm (c) in 18 µm (d).

Figure 22: Expression of markers of differentiation CK14 and PR (a; green and red) and milk proteins (b and c; green) in regenerated structures formed with epithelial cells of 3 year old lactating goat and milk protein expression in lactating mammary tissue (d). The gels were removed after 6 weeks. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Bar = 20 µm (a), 15 µm (b), 9 µm (c), and 18 µm (d).

5.5 PREKURZORSKE CELICE V REGENERIRANIH STRUKTURAH

Domnevo, da so v regeneriranih strukturah prisotne prekurzorske/matične celice, smo testirali s testom CFC. Iz odstranjenih gelčkov smo pripravili celične suspenzije in jih nacepili v test CFC (Slika 23). Ker smo v preliminarnih testih CFC, narejenimi s primarnimi epitelnimi celicami, ugotovili, da so frekvence kolonij višje v mediju Sf7, smo uporabili slednjega. Morfologija kolonij, ki so zrasle iz celic, ki oblikujejo regenerirane strukture, je bila podobna morfologiji kolonij, ki so zrasle iz suspenzije primarnih celic (Slika 19). Po 6 do 7 dnevnom gojenju so nastale kolonije vseh treh morfoloških tipov, te so luminalne (CK18 pozitivna kolonija na sliki 23: a, b), mioepitelne (CK14 pozitivne

kolonije na sliki 23: a, b, in c, d) in mešane (Slika 23: e, f). Število kolonij na gojitveno posodico, ki so zrasle iz posameznega gela, je bilo od 2 do 331. Po nacepitvi celic iz ksenograftov, ki so izvirali iz epitelnih celic "koze 4", je zraslo več mioepitelnih kolonij v primerjavi s kolonijami, ki so nastale iz sveže disociiranega tkiva in so bile pretežno luminalnega tipa (Slika 20 A in B).



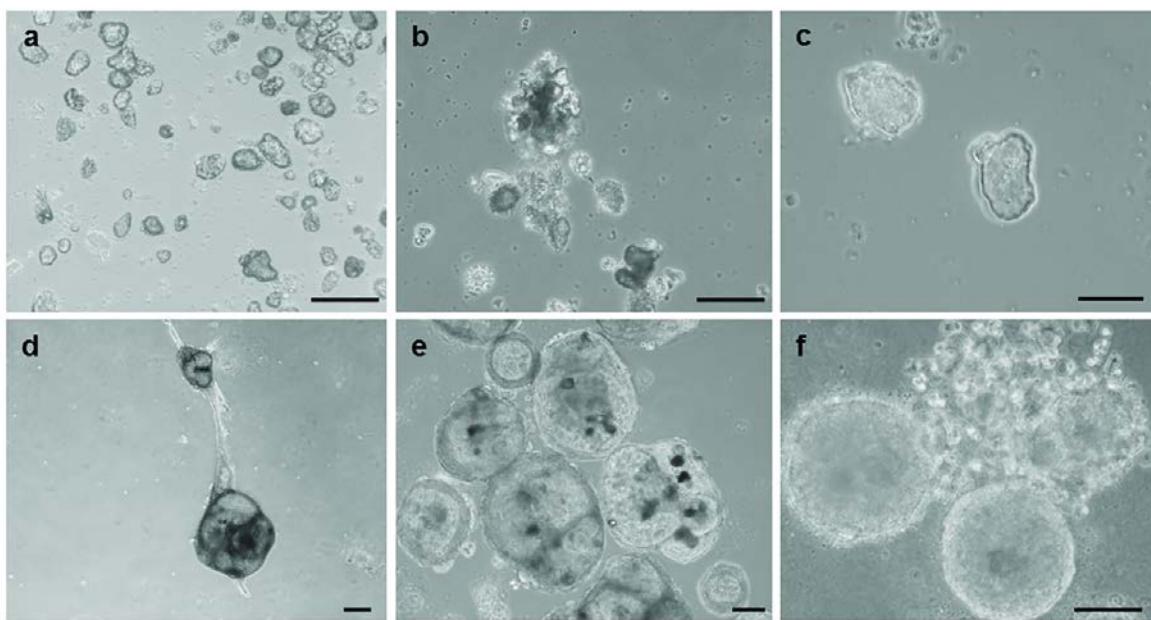
Slika 23: Morfologija in izražanje označevalcev diferenciacije v testu oblikovanja kolonij, ki je bil narejen po disociaciji 4 tedenskih ksenograftov. Slike svetlobne in fluorescentne mikroskopije luminalne kolonije (a in b), mioepitelne kolonije (a-d) in mešane kolonije (a in f), ki so zrasle v gojišču Sf7. Jedra smo obravali z barvilom DAPI (modro). Merilo je 500 µm.

Figure 23: A) Morphology and differentiation marker expression in colony-forming assays performed on cells from 4 week old xenografts. Representative bright-field and immunofluorescence images of a luminal colony (a and b), myoepithelial colonies (a-d), and a mixed colony (e and f) grown in Sf7 medium are shown. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Bar = 500 µm.

Povprečno so bili tipi sekundarnih kolonij, ki so izvirale iz 4- do 6-tedenskih ksenograftov zastopani podobno kot v primarnih kolonijah (58±11 in 56±18 % čiste CK14-počitivne mioepitelne kolonije; 16±11 in 33±15 % čiste CK18-počitivne luminalne kolonije ter 26±15 in 11±13 % mešane kolonije; Slika 20A).

5.6 3D ORGANIZACIJA V KULTURI

Morfološko diferenciacijo epitelnih celic smo ocenili, ko so celice rasle v suspenziji ali pa vklapljene v matriks basalne membrane v 3D modelih. Pod pogoji, ki ne omogočajo pripetja celic, v gojišču z dodatkom B27, so nastale mamosfere, vidne kot nepravilno oblikovani skupki celic, ki so plavali v gojišču (Slika 24 a – c). Po petih dneh gojenja so bile velike $53,02 \pm 17,13 \mu\text{m}$ ($n = 33$). Po 13 dneh je njihova povprečna velikost dosegla $65,14 \pm 17,14 \mu\text{m}$ ($n = 19$).

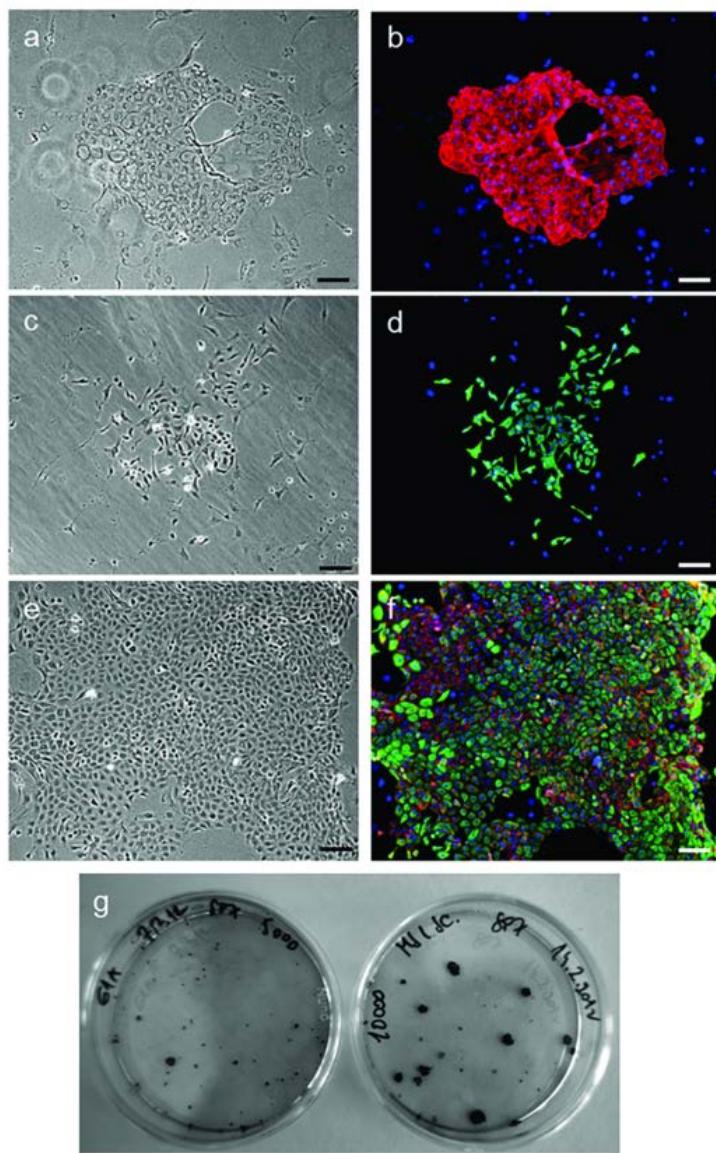


Slika 24: Tri-dimenzionalna (3D) organizacija epitelnih celic iz mlečne žleze pod pogoji, ki ne omogočajo pripetja celic. Primarne mamosfere po 5, 13 in 14 dneh gojenja (a – c). Mamosfere po 13 (d,e) in 14 (f) dneh gojenja z gojiščem, ki je vsebovalo matriks basalne membrane. Merila so 100 μm (a,b,e,f), 50 μm (c) in 200 μm (d).

Figure 24: Three dimensional (3D) organization of mammary epithelial cells under low-attachment conditions. Primary mammospheres after 5, 13, and 14 days in culture (a – c). Mammospheres after 13 (d,e) and 14 (f) days in culture with medium containing basement membrane matrix (B). Scale bars are 100 μm (a,b,e,f), 50 μm (c) in 200 μm (d).

Primarne mamosfere, ki so verjetno nastale iz kozjih prekurzorskih/matičnih celic, smo disociirali in nacepili v test CFC. Nastale so mešane, luminalne kolonije in nekaj mioepitelnih kolonij z naslednjimi frekvencami: $0,17 \pm 0,59$; $0,50 \pm 0,41$; $0,07 \pm 0,14$ (Slika

25 a – f). Kolonije, ki so nastale iz celic, ki so tvorile mamosfere, so bile večje, v primerjavi s kolonijami, ki so izvirale iz tkiva (Slika 25g). Če primerjamo primarne in sekundarne CFC, se je delež luminalnih kolonij rahlo povečal, še vedno pa so bili v mamosferah zastopani vsi tipi predniških celic.

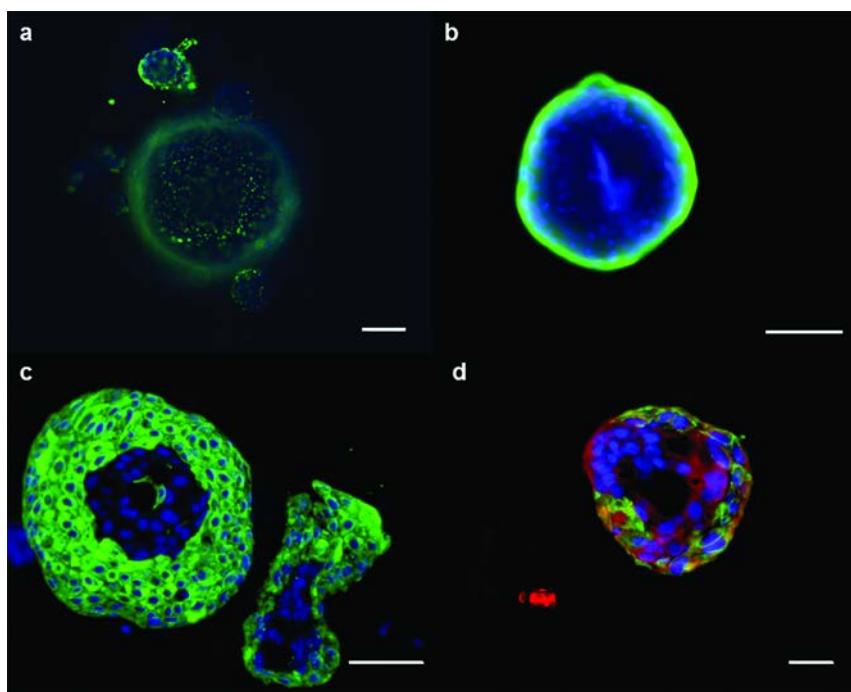


Slika 25: Morfologija in izražanje za mlečno žlezo specifičnih označevalcev v kolonijah, ki so zrasle iz celic koze po disocijaciji mamosfer v testu tvorjenja kolonij. Slike kolonij, posnete s svetlobno in fluorescentno mikroskopijo, ki so obarvane za CK18 (a,b; luminalna kolonija), CK14 (c,d; mioepitelna kolonija) in oba označevalca hkrati (e,f; mešana kolonija). Jedra smo obarvali z barvilm DAPI (modro). Merilo je 100 µm. Gojitvene posodice s kolonijami, ki so zrasle iz celic, izoliranih iz mlečne žlez ali iz primarnih mamosfer (g, levo in desno).

Figure 25: Morphology and expression of mammary-specific markers in caprine mammary colonies which arose after mammosphere dissociation and were plated in CFC test. Bright field and immunofluorescence images of cytokeratin (CK) 18-positive luminal colony (a,b), CK-14 positive myoepithelial colony (c,d), and mixed colony (e,f). Nuclei have been counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 100 µm. Dishes with colony forming cells derived from mammary tissue and primary mammospheres (g, left and right).

Mamosfere, ki so zrasle v gojišču z dodatkom matriksa bazalne membrane, so bile večje in večinoma okrogle (Slika 25 e in f), nekatere so se povezovale s strukturami, ki so bile podobne kanalčkom (25d) ali pa so bile organizirane v velike skupke sestavljene iz posameznih celic (25f). Te mamosfere so bile večje kot mamosfere gojene v mediju z dodatkom B27, velike $102,74 \pm 33,38$ µm (n = 10) po 7 dneh gojenja in $92,08 \pm 46,17$ µm (n = 30) po 13 dneh gojenja.

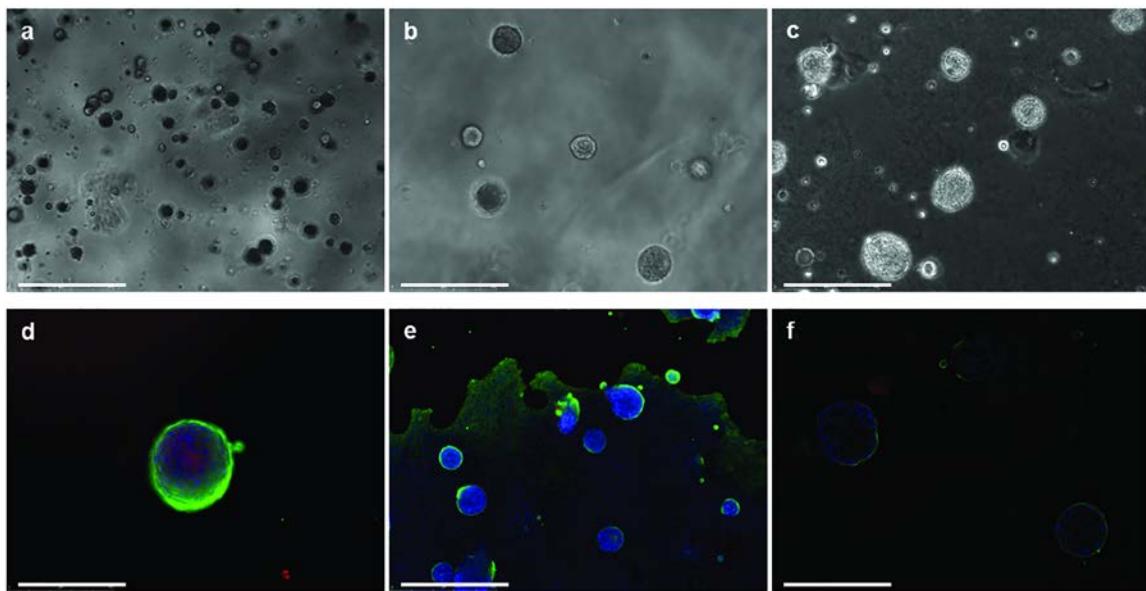
Ko smo mamosfere v suspenziji imunofluorescentno barvali, se je izražal mioepitelni označevalcev CK14 (Slika 26 A in B). 3D strukture smo vklopili v parafin in barvali rezine, tu je bilo jasno vidno, da strukture vsebujejo lumen (Slika 26 C in D) in več zaporednih plasti mioepitelnih celic. Izražanje luminalnega označevalca CK18 smo opazili v manjših strukturah, ki so imele manj plasti mioepitelnih celic (Slika 26D).



Slika 26: Izražanje citokeratinov 14 (zeleno obarvanje) in 18 (rdeče) v mamosferah, ki so nastale iz celic iz kozjih mlečnih žlez v laktaciji (a) ali juvenilnih (b-d) pod pogoji, ki ne omogočajo pripetja. Mamosfere na slikah a in b smo pobrali v suspenziji, na slikah c in d pa smo jih predhodno vklopili v parafin in pobrali rezine debeline 5 µm. Jedra smo obarvali z barvilo DAPI (modro). Merilo je 100 µm (a-c) in 20 µm (d).

Figure 26: Expression of cytokeratin 14 (green) and 18 (red) in mammospheres formed under non-adherent conditions with cells from lactating (a) and juvenile (b-d) goat mammary glands. Mammospheres in images a and b were stained in suspension and in images c and d were embedded in parafin and 5 µm sections were stained. Nuclei have been counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 100 µm (a-c) and 20 µm (d).

Ko smo epitelne celice vklopili v matriks bazalne membrane, so tudi oblikovale sferične strukture (Slika 27 a,b). Prav tako so acinom podobne strukture nastale, ko smo rastno podlago najprej prevlekli z Geltrex-om in nato nanj nasadili epitelne celice v gojišču z dodatkom matriksa bazalne membrane (Slika 27 c – f).



Slika 26: Tri dimenzionalna organizacija epitelnih celic iz mlečne žleze v laktaciji. Acinom podobne strukture med rastjo v matriksu basalne membrane (a,b) ali na matriksu basalne membrane v suspenziji (c – f). Za boljšo rast smo predhodno nacepili hranljivo podlago fibroblastov 3T3 (a,b). Izražanje označevalcev mioepitelnih celic (CK14, zeleno obarvanje) in luminalnih celic (CK18, rdeče obarvanje). Jedra smo obarvali z barvilom DAPI (modro). Merila so 500 µm (a,b,e,f) in 250 µm (c).

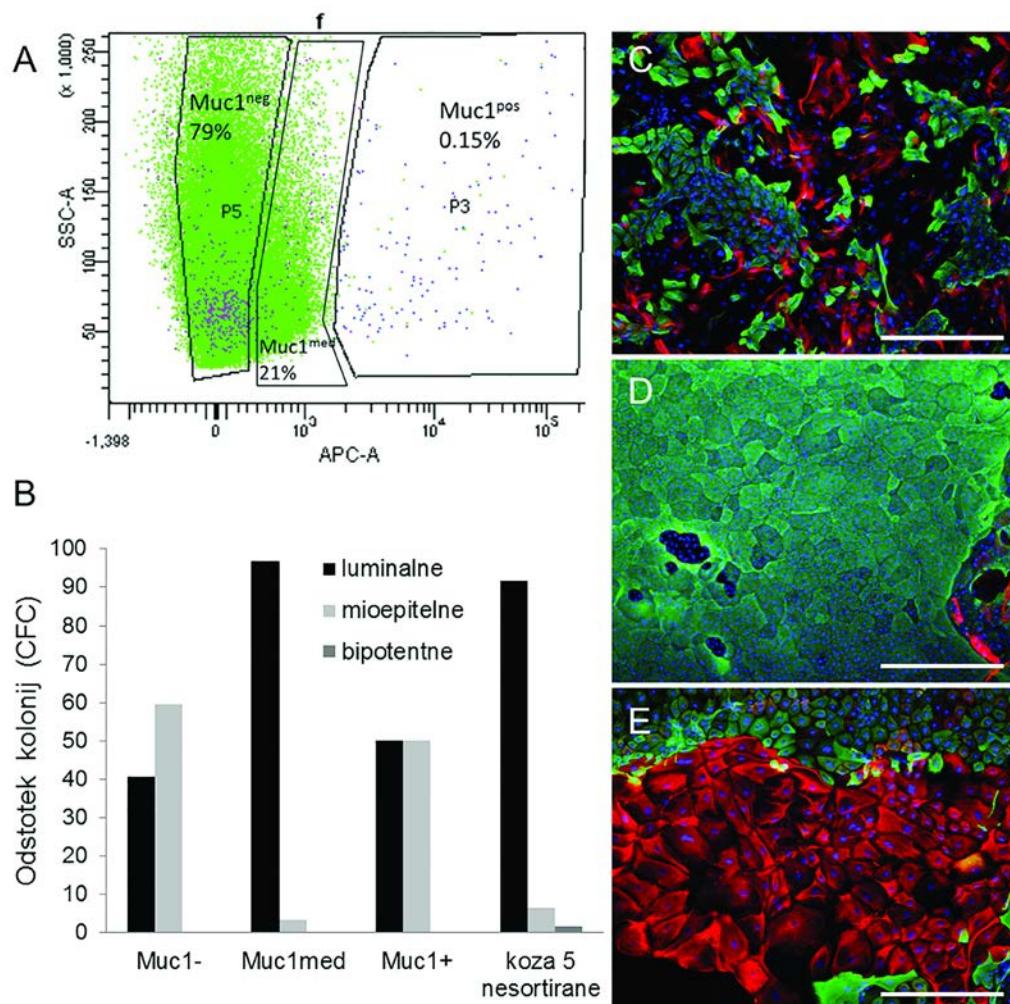
Figure 27: Three dimensional organization of mammary epithelial cells from lactating mammary gland. Acini-like structures during growth in the basal membrane matrix (a,b) and on the basal membrane matrix in suspension (c – f). Expression of markers of myoepithelial (CK14, green staining) and luminal cells (CK18, red staining). Nuclei have been counterstained with DAPI (blue). Scale bars are 500 µm (a,b,e,f) and 250 µm (c).

Pod takimi pogoji so bile celice polarizirane, v zunanji plasti so mamosfere gradile za CK14 pozitivne celice, sledile so CK18 pozitivne celice, na sredini je bila odprtina – lumen (Slika 27 d – f). Hranljiva plast fibroblastov ni imela vpliva na rast struktur, saj so podobno rastle tudi, ko fibroblastov nismo nasadili.

5.7 SORTIRANJE CELIC MLEČNE ŽLEZE S PRETOČNO CITOMETRIJO

Ker smo našli kar nekaj delajočih protiteles proti označevalcem, ki so bili predhodno uporabljeni za sortiranje posameznih celičnih populacij iz človeških in mišjih mlečnih žlez, smo slednje populacije skušali izolirati pri kozi. Hoteli smo odkriti, če lahko celice, ki *in vitro* lahko tvorijo klonogene kolonije in imajo *in vivo* sposobnost regeneracije, lahko obogatimo tako, da jih ločimo v posamezne populacije. Za sortiranje smo testirali veliko protiteles, usmerjenih proti proteinom Muc1, EpCAM, CD49f, CD24, CD29, CD10, p-kadherin. Protitelesa usmerjena proti Muc1, EpCAM in CD49f so se izkazala kot uporabna.

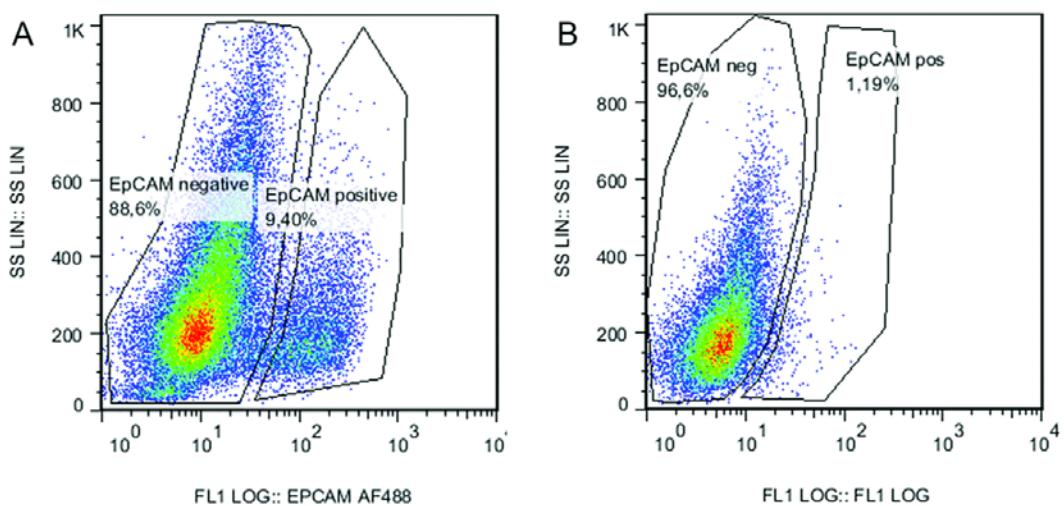
Mucin 1 je označevalec luminalnih celic (Slika 17J). Celično suspenzijo smo sortirali v tri populacije (Slika 28A). Gre za Mucin 1 negativne celice (79 %), celice, ki so bile na meji med pozitivnimi in negativnimi (21 %) in za Mucin 1 pozitivne celice (0,15 %). Po sortiranju smo delež teh celic uporabili v testu tvorjenja kolonij (Slika 28 B). V primerjavi z nesortiranimi celicami, so Muc1^{med} populacijo sestavljali večinoma luminalni prekurzorji, Muc1⁻ in Muc1⁺ populaciji pa sta imeli približno polovico luminalnih in mioepitelnih prekurzorjev, bipotentne prekurzorje smo zasledili samo pri nesortiranih celicah. Sortirane celice smo nacepili še v primarni kulturi. Nesortirane celice so se imunofluorescentno pobarvale kot mešanica mioepitelnih in luminalnih celic (CK14 in CK18 pozitivne), medtem, ko so večji delež Muc1⁻ celic predstavljale mioepitelne celice, Muc1^{med} celice pa so imele večinoma luminalni fenotip.



Slika 27: Sortiranje celic iz mlečne žleze pet mesečne koze burske pasme z uporabo protiteles proti proteinu Muc1. A) Strategija sortiranja. B) Odstotek posameznih kolonij, ki so zrasle v testu tvorjenja kolonij, ki smo jih nacepili s sortiranimi in nesortiranimi celicami. Izražanje luminalnih (CK18, rdeče obarvanje) in mioepitelnih (CK14, zeleno) označevalcev pri nesortiranih celicah (C), Muc1⁻ celicah (D) in Muc1^{med} celicah (E). Jedra smo obarvali z barvilom DAPI (modro). Merilo je 250 µm.

Figure 28: FACS sorting of mammary cells from mammary gland of juvenile 5 month old boar goat using antibodies against mucin 1 protein. A) Sorting strategy. B) Percentage of colonies that arose in CFC tests seeded with sorted and unsorted cells. Expression of luminal (CK18, red) and myoepithelial (CK14) markers in unsorted cells (C), Muc1⁻ cells (D) and Muc1^{med} cells (E). Nuclei have been counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 250 µm.

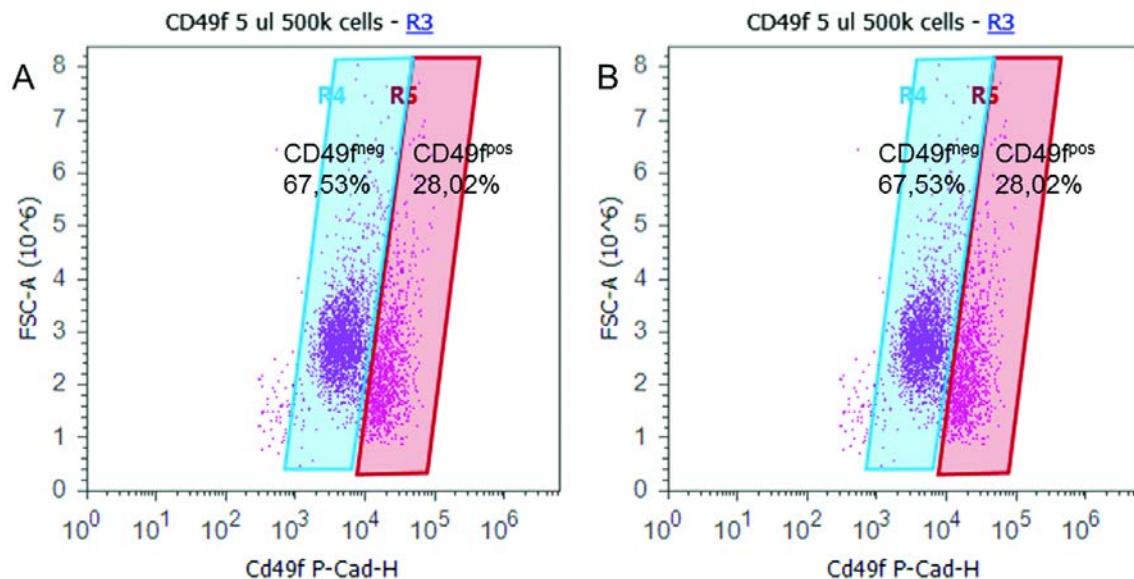
Na več vzorcih smo testirali tudi protitelesi proti proteinoma EpCAM in CD49f, ki ju rutinsko uporabljajo za obogatitev matičnih celic iz človeške mlečne žleze (Eirew in sod., 2008). Tako v juvenilni kot v mlečni žlezi v laktaciji smo zaznali populacije, ki so izražale ta dva proteina (Slike 29 in 30).



Slika 28: Pretočna citometrija celic, iz mlečnih žlez sedem mesečne juvenilne in tri letne koze v laktaciji, z uporabo protiteles proti proteinu EpCAM.

Figure 29: Flow cytometry of mammary cells from mammary glands of juvenile 7 month-old and 3 year-old lactating goats using antibodies against EpCAM protein.

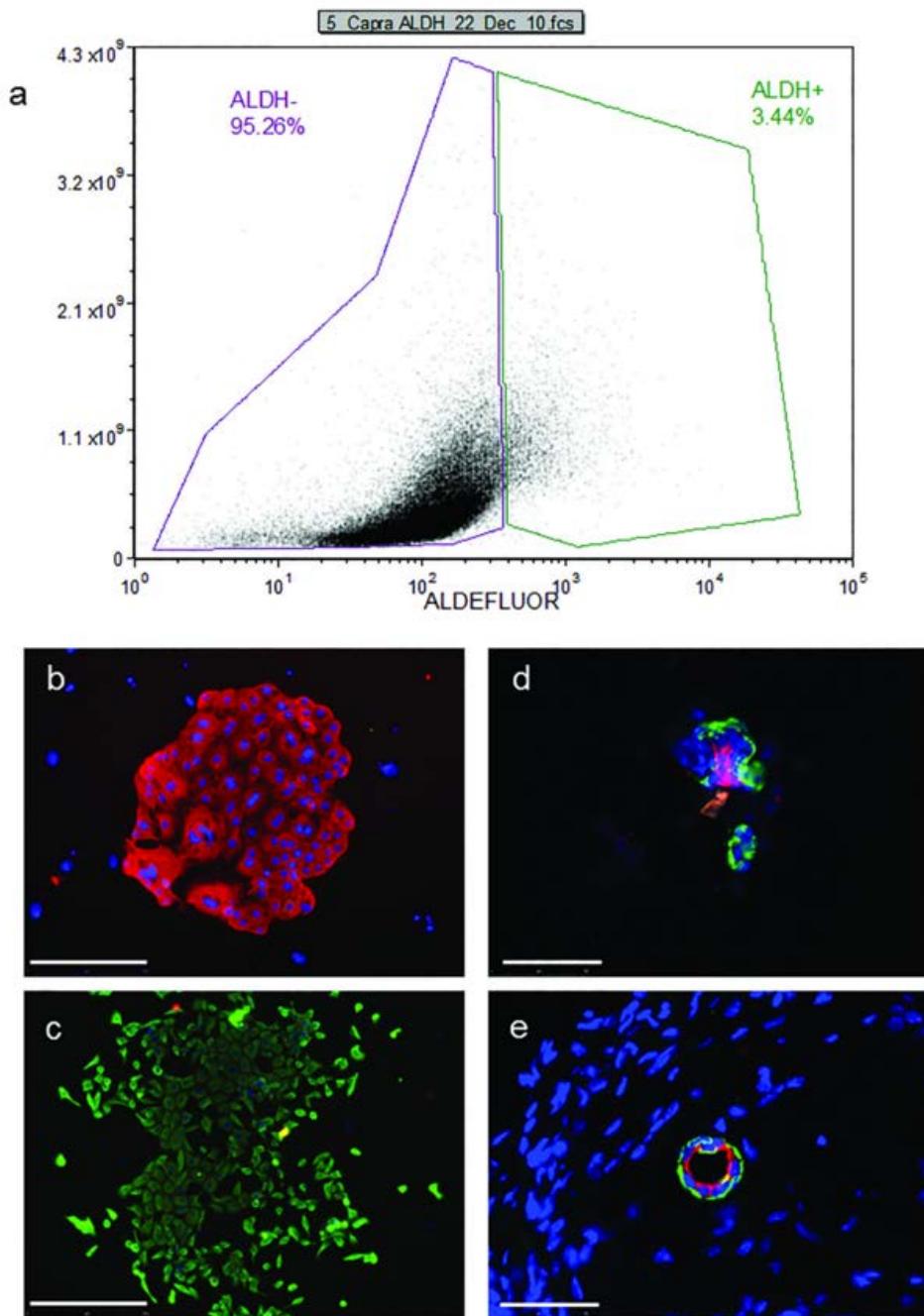
Za CD49f smo testirali štiri nekonjugirana protitelesa in dve protitelesi, ki imata kovalentno vezan fluorofor FITC. Šele slednji dve sta se izkazali za uporabni za pretočno citometrijo. Dvojnega sortiranja s CD49f in EpCAM nam žal še ni uspelo optimizirati.



Slika 29: Pretočna citometrija celic, iz mlečnih žlez sedem mesečne juvenilne in tri letne koze v laktaciji, z uporabo protiteles proti proteinu CD49f (ITGA6).

Figure 29: Flow cytometry of mammary cells from mammary glands of juvenile 7 month-old and 3 year-old lactating goats using antibodies against CD49f (ITGA6) protein.

Preizkusili smo tudi alternativni pristop za obogatitev matičnih celic, pri katerem ne potrebujemo protiteles. Celice smo ločili glede na aktivnost encima aldehyd dehidrogenaza (ALDH) z uporabo reagenta, ki ni omejen na vrsto organizma. Na Sliki 31a je predstavljena distribucija populacij glede na aktivnost ALDH.



Slika 30: Sortiranje celic iz mlečne žleze sedem mesečne koze, ki so bile pobarvane glede na aktivnost encima ALDH. Strategija sortiranja (a). Luminalne (b) in mioepitelne (c) kolonije so nastale iz Aldh+ celic v testu tvorjenja kolonij (CFC). Strukture, ki so nastale v ksenogelih po 5 tednih po transplantaciji Aldh- (d) in Aldh+ populacije (e). Jedra smo obarvali z barvilom DAPI (modro). Merila so $250 \mu\text{m}$ (b,c) in $50 \mu\text{m}$ (d,e).

Figure 30: FACS of mammary cells from mammary gland of 7 month-old goat stained for ALDH activity. Sorting strategy (a). Luminal (b) and myoepithelial (c) colonies arose out of Aldh+ cells in CFC test. Structures formed after 5 weeks in xenotransplanted gels with Aldh- (d) and Aldh+ population (e). Nuclei have been counterstained with DAPI (blue). Scale bars are $250 \mu\text{m}$ (b,c) and $50 \mu\text{m}$ (d,e).

Ločili smo dve populaciji: Aldh⁻ in Aldh⁺ celice, slednje so predstavljale 3,5 % celic. Ocenili smo tudi prisotnost prekurzorskih/matičnih celic v sortiranih populacijah z *in vitro* testom formiranja kolonij in s transplantacijami pod ledvično kapsulo. Kolonije so nastale samo iz Aldh⁺ celic. Več kot 80 % je bilo luminalnih kolonij s frekvenco $1,96 \pm 0,27$, preostale pa so bile mioepitelne kolonije s frekvenco $0,42 \pm 0,23$ (Slika 31 b,c). Transplantirane gelčke smo odstranili po petih tednih in dokazali prisotnost regeneriranih struktur, ki so nastale iz obeh sortiranih populacij (Slika 31 d,e).

6 RAZPRAVA IN SKLEPI

Z MCMŽ obogatene populacije so karakterizirane pri človeku in miši, pri drugih vrstah pa je delo oteženo, saj ni na voljo ustreznih protiteles, ki bi omogočala prepoznavanje za matične celice specifičnih determinant. Izolacija in identifikacija MCMŽ iz mlečnih žlez prežvekovalcev je zanimiva zaradi nizke pojavnosti tumorjev pri govedu, kozi, ovci. Morfološko so mlečne žleze prežvekovalcev zelo podobne človeški, zato so dober model za primerjalne študije razvoja rakavih obolenj. MCMŽ nudijo gradnike za rast, obnavljanje in regeneracijo epitelnih celic in so zato potencialne tarče pri izboljšavah produktivnosti. Ustrezna regulacija MCMŽ lahko pozitivno vpliva na količino mleka, persistenco laktacije, kontrolo dolžine presušitve in na obnavljanje tkiva ter tako omogoča ekonomske izboljšave pri reji.

6.1 MLEČNA ŽLEZA

Mlečna žleza je sestavljena cevkasto-mešičkasta žleza, ki proizvaja mleko, slednje je edini vir hrane za novorojene sesalce. Organ tekom razvoja osebka doživi prelomne spremembe kot so: razvoj žleze (mamogeneza), diferenciacija (laktogeneza), ekspresija sekretornih produktov (galaktopoieza), remodeliranje žleze po prenehanju laktacije (involucija) (Hennighausen in Robinson, 2001). Parenhim žleze gradijo majhni sekrecijski mehurčki ali mešički, alveole. Te so oblikovane iz epitelnih celic, katerih funkcija je sekrecija mleka, nad njimi pa so podolgovate mioepitelne celice, ki s kontrakcijo omogočajo izločanje žleznega sekreta. Plast mioepitelnih celic je prekrita z bazalno membrano (Pitelka in sod., 2009). *In vitro* in *in vivo* študije nakazujejo, da je diferenciacija epitelnih celic mlečne žleze hierarhičen proces, ki se začne z matično celico, ki je zmožna samo obnavljanja.

Mlečno žlezo koze gradita dva tipa epitelnih celic, to so luminalne epitelne celice, ki se nahajajo v kanalčkih in alveolah, in mioepitelne celice. Kanalčkaste strukture in terminalne enote kanalčkov (TDLU) so podobne kot v človeški mlečni žlezi, ne pa strukturam, brstom, ki se oblikujejo v mlečnih žlezah glodavcev. Pri glodavcih je epitelij v direktnem kontaktu z adipociti, medtem ko v človeških in prežvekovalskih mlečnih žlezah maščobne

celice niso v kontaktu z epitelijem, slednji je obdan z vezivnim tkivom (Hovey in sod., 1999). Tkivo iz kozje mlečne žleze so uporabili za študije laktacije, interakcij med gostiteljem in patogenom in za vzpostavitev epitelnih celičnih linij (Pantschenko in sod., 2000b). Raziskav o matičnih celicah v mlečni žlezi koze, pred našimi poskusi še ni bilo. Izražanje citokeratinov v kozji mlečni žlezi naj bi variiralo glede na razvojno stopnjo živali (Li in sod., 1999), ni pa bilo veliko predstavljenih podatkov o uporabnih protitelesih in lokalizaciji specifičnih označevalcev, ki jih slednja prepoznavajo. Distribucija označevalcev diferenciacije, ki smo jih predstavili v našem delu, je podobna kot pri človeku in miši (Rudland in Hughes, 1989; Shackleton in sod., 2006). CK14 se nahaja v bazalnem delu alveol in duktov, medtem ko CK18 označuje sekretorne epitelne celice, ki so v direktnem kontaktu z lumnom alveole.

Prekurzorske in diferencirane mioepitelne celice se v mlečni žlezi nahajajo v bazalni lokaciji, to je nad luminalnimi celicami, označujejo jih protitelesa proti aktinu gladkih mišic, CD29 in jedrnemu antigenu p63. CD29 so najprej opisali kot označevalec matičnih celic v koži in v mišji mlečni žlezi, kjer so večje količine tega proteina zaznali v regiji kape v terminalnem brstu, kjer gre za območje najbrž bogato z matičnimi celicami (Shackleton in sod., 2006). Posledica delecije integrina beta 1 (CD29) iz bazalne plasti epitelija v mlečni žlezi je bila spremenjena orientacija delitvenega vretena v bazalnih epitelnih celicah pri miškah in nezmožnost regeneracije mlečne žleze ob transplantaciji le-teh (Taddei in sod., 2008). P63 je homolog p53, ki se izraža v jedrih mioepitelnih celic v človeški mlečni žlezi in je pomemben transkripcijski faktor za vzdrževanje funkcije matičnih celic in za stabilnost epitelnih populacij (Yalcin-Ozuysal in sod., 2010).

V človeški mlečni žlezi približno tretjina luminalnih celic izraža jedrne receptorje za hormona estrogen in progesteron (Clarke in sod., 1997). V mlečni žlezi koze smo izražanje progesteronskega receptorja tudi zaznali v luminalnih celicah. Apikalna membrana luminalnih celic je bogata z mucinom 1, celotna citoplazma pa se je obarvala za EpCAM. *In vivo* je izražanje EpCAM povezano s povišano proliferacijo epitelnih celic in negativno korelirana z diferenciacijo. Njegovo povišano izražanje je bilo povezano z večino človeških epitelnih neoplazij (Balzar in sod., 1999). V kozji mlečni žlezi v laktaciji EpCAM označuje luminalne celice in se mogoče nahaja tudi na plazemski membrani

nekaterih bazalnih epitelnih celic. Tak vzorec izražanja je močno podoben vzorcu v človeškem tkivu (Stingl in sod. 2001).

6.2 PRIMARNA KULTURA

Kultivacija celic na plastični podlagi celicam predstavlja umetno in tuje okolje. Med gojenjem na plastiki ali steklu primarne epitelne celice hitro prenehajo izražati diferenciacijske markerje in se le delno odzivajo na stimulacijo z laktogenimi hormoni. V naši študiji smo okarakterizirali morfologijo, diferenciacijski potencial in še posebej izražanje za posamezne linije specifičnih označevalcev v primarni kulturi mlečne žleze koze. Posledica rasti primarnih celic na plastični podlagi je velikokrat izguba za tkivo specifičnih značilnosti (Huynh in sod., 1991). Ker so predhodno dokazali, da rast epitelnih celic na v naprej pripravljenih ekstracelularnih podlagah omogoča celično diferenciacijo in sintezo mleka (Rose in sod., 2002) in *in vitro* polarizacijo celic (Barcellos-Hoff in sod., 1989), smo primarno kulturo gojili na tanki podlagi matriksa basalne membrane. Disociirane celice mlečne žleze so *in vitro* rasle kot posamezne celice ali pa so tvorile otoke epitelnih celic, morfološko podobne tlakovcem. Med rastjo celične linije v nadaljnjih pasažah smo velikokrat opazili celice z več jedri. V post konfluentnih kulturah, ki so rasle pod laktogenimi pogoji, so spontano nastale kupole, to na nek način spominja na 3D organizacijo celic v tkivu. Pickett in sodelavci so pokazali, da je tvorba kupol povezana s tekočino pod epitelnimi celicami (Pickett in sod., 1975). Funkcionalne in strukturne spremembe med tvorbo kupol, so mogoče podobne kot v celicah *in vivo* med razvojem kanalčkov in alveol v mlečni žlezi med nosečnostjo (Zucchi in Dulbecco, 2002). Kupole so bile sestavljene iz večinoma luminalnih celic, ki so bile detektirane z označevalcem CK18. Nastanek acinusom podobnih agregatov, ki so morfološko podobni tistim, opisanim pri trajnih epitelnih celičnih linijah (German in Barash, 2002; Rose in sod., 2002), smo opazili, ko smo celice gojili dalj časa na podlagi basalne membrane.

V preteklih letih so vzpostavili več primarnih kultur iz kravjih in kozjih mlečnih žlez. Za pripravo so uporabili disociacijo z encimi, celice pa so večinoma nacepili direktno v gojitvene posodice ali pa na s kolagenom prevlečeno podlago (Hu in sod., 2009;

Jedrzejczak in Szatkowska, 2013; Keys in sod., 1997; Pantschenko in sod., 2000b; Sorg in sod., 2012; Tong in sod., 2012). Nemogoče je primerjati rastne pogoje, ki so jih uporabili v predhodnih kultivacijah primarnih kultur iz mlečnih žlez, ker so uporabili različno sestavljena gojišča. Za osnovo so tako uporabili medije RPMI1640, DMEM, DMEM/F12 in jim dodali različne rastne faktorje. Primarne kulture so pripravili tudi z nacepitvijo kočka tkiva (angl. *explant culture*) (Liu in sod., 2012) in jih transficirali, da so tvorile EGFP (Zheng in sod., 2010). Primarne kulture so tudi inficirali z malimi prežvekovalskimi lentivirusi (Lerondelle in sod., 1999; Milhau in sod., 2005), uporabili za raziskovanje funkcije PPAR γ (Shi in sod., 2013), za kloniranje koz (Yuan in sod., 2009) in za študije glikozilacije rekombinantnega človeškega eritropoietina (Sanchez in sod., 2007). Raziskave so bile večinoma usmerjene na celično morfologijo, hitrost rasti in kariotip, ne pa na izražanje specifičnih označevalcev.

Izražanje citokeratinov smo študirali na celični kulturi z uporabo protiteles, ki so monospecifična za posamezen citokeratin. Uporabili smo tudi protiteesa, usmerjena proti drugim označevalcem mioepitelnih, luminalnih celic in celic strome. Poleg tega smo z RNA sekvenciranjem pridobili transkriptom primarne kulture in še tako ocenili izražanje označevalcev, ki smo jih izbrali glede študije, narejene večinoma na mišjih in človeških kulturah. V predhodnih študijah s primarnimi celičnimi kulturami iz kozjih mlečnih žlez so kot markerja epitelnih celic večinoma uporabili CK18 in pan-citokeratin (Lerondelle in sod., 1999; Liu in sod., 2012; Milhau in sod., 2005; Sorg in sod., 2012; Zheng in sod., 2010). Glede na izražanje za linijo specifičnih označevalcev sta se v naši primarni kulturi nahajala dva glavna tipa celic, to so mioepitelne celice, ki so se obarvale pozitivno za CK14 in luminalne celice, ki so bile pozitivne za CK18. Podobno so pri človeku in miših z imunocitokemijo študirali razvoj celičnih fenotipov v mlečni žlezi in identificirali epitelne in mioepitelne celice (Smalley in sod., 1999). Pri mišjih epitelnih celicah, gojenih na plastiki, so opazili nespecifično izražanje citokeratinov 14 in 18 (Smalley in sod., 1998). Ko pa so enake celice gojili na bazalni membrani (Matrigel), so le-te ohranile mioepitelne markerje, medtem ko je bilo izražanje luminalnih markerjev odvisno od celičnih interakcij (Smalley in sod., 1999). Ko smo kozjo primarno kulturo gojili na bazalni membrani, so luminalne celice izražale CK18 in mioepitelne CK14, dvojno pozitivnih celic nismo opazili. Pri nižjih celični gostoti so specifični celični tipi tvorili otoke, medtem ko so v post

konfluentnih pogojih luminalne in mioepitelne celice rasle pomešano, a še vedno ostale v skupinah specifičnih celičnih linij tudi pred oblikovanjem kupol.

Podatki RNA sekvenciranja in RT-PCR so potrdili prej omenjene rezultate, ker smo zaznali najbolj izražene označevalce mioepitelnih celic (CK 5, 17 in 14). Ostali transkripti povezani z mioepitelnimi celicami so bili integrin alfa 6, integrinski protein poimenovan tudi CD49f, ki je pogost označevalec človeških in mišjih MCMŽ, ki ga izražajo bazalno locirane celice (Koukoulis in sod., 1991; Shackleton in sod., 2006; Stingl in sod., 2001; Stingl in sod., 2006); Myl6, miozin gladkih mišic, vpleten v aktivnost aktinskih in miozinskih vlaken (Sleeman in sod., 2007); SPARC, ekstracelularni protein, ki ga sintetizirajo mioepitelne celice (Kendrick in sod., 2008; Raouf in sod., 2008). Poleg CK18 so bili močno zastopani tudi luminalni markerji CK6A, EpCAM in CK19. Tretji tip celic v primarni kulturi so vretenasto oblikovane celice, ki so podobne fibroblastom, ki so naključno razpršeno rasle okoli otokov epitelnih celic. Nekatere med njimi so se pozitivno pobarvale za aktin gladkih mišic, ki je bil viden kot filament v celični citoplazmi. Kot smo že prej pokazali SMA *in vivo* označuje mioepitelne celice, v primarni kulturi pa najbrž označuje del fibroblastov, ker se slednji ne barvajo s protitelesi za citokeratine in imajo tipično morfologijo fibroblastov. Podobno so zaključili za človeške kulture, saj *in vitro* mioepitelne celice pogosto ne izražajo SMA (Stingl in sod., 2005). V primarni kulturi smo zaznali tudi izražanje vimentina, ki je protein intermediatnega filimenta, pogosto izražen v celicah mezenhimskega izvora in je bil opisan kot *in vitro* označevalec mioepitelnih celic (Pantschenko in sod., 2000a; Zavizion in sod., 1996). Čeprav so vimentin opisovali kot označevalec mioepitelnih celic, so pred kratkim ugotovili, da je izražanje vimentina lahko posledica prehoda iz epitelne v mezenhimsko linijo (angl. *epithelial to mesenchymal transition; EMT*), ki je pogosta med *in vitro* kultivacijo mišjih in človeških epitelnih celic (Mani in sod., 2008; Stingl in sod., 2006). Ta proces se je najbrž zgodil tudi v primarni kozji kulturi. Najbolj pogosti stromalni za fibroblaste specifični označevalci, ki smo jih zaznali z RNAseq, so katenin beta 1, SPARC, fibronektin 1, NOV, TGFBR2, ADAM, MMP in SFRP1. Podoben nabor izraženih genov so Casey in kolegi odkrili v stromalni frakciji mlečnih žlez telic (Casey in sod., 2011).

Čeprav je bilo izražanje CK18 relativno nizko v primerjavi s CK5, CK17 in CK14 smo pri imunofluorescentnem barvanju dokazali, da velik delež celic izraža ta protein. Podobno velja za vimentin. Izgleda, da je absolutno izražanje CK5, CK17 in CK14 v mioepitelnih celicah više kot izražanje CK18 v luminalnih celicah in da pogostost teh markerjev ne odraža deleža posameznih celičnih linij, prisotnih v heterogeni celični kulturi. Podobno smo izražanje estrogenskega receptorja zaznali z imunocitokemijo, pri sekvenciranju pa nismo zaznali njegovih transkriptov.

Zaznali smo tudi visoke količine mRNA za integrin beta 1 (CD29), ki so ga uporabili za obogatitev mišjih MCMŽ, ki se nahajajo v CD29^{hi}CD24⁺ populaciji (Shackleton et al., 2006). CD29 ima osnovno vlogo pri razvoju alveol in diferenciaciji. Posledica delecije gena za integrin beta 1 je nezmožnost tvorjenja alveol in s prolaktinom inducirane diferenciacije epitelnih celic (Naylor in sod., 2005). Epitelne celice mlečne žleze uporabljajo integrine za pripenjanje na bazalno membrano in tako ohranjajo lokacijo v niši. Čeprav smo primarno kulturo nacepili na tanko plast matriksa bazalne membrane, ki jo sestavljajo laminin, kolagen IV in entaktin, so celice sintetizirale tudi lastno mRNA, ki nosi zapis za proteine zunajceličnega matriksa. Drugi izraženi označevalci povezani s predniškimi/matičnimi celicami so bili protein PML, ki regulira pogostost posameznih predniških populacij, ki prispevajo k rasti in razrastu epitelija in ima vlogo vzdrževanja niše za mirujoče matične celice (Li in sod., 2009) in različni transkripcijski faktorji, npr. STAT5A, GATA3, BRCA1 in PYGO2, ki so vpleteni v usmerjanje razvoja celic (Asselin-Labat, 2007; Gu in sod., 2009; Kourou-Mehr in sod., 2006; Liu in sod., 2008; Yamaji in sod., 2009). Prisotni so bili tudi transkripti za Ki67, ki je prisoten v vseh delečih se celicah v aktivnem delu celičnega cikla (Gerdes, 1990), kar nakazuje, da so bile v kulturi prisotne tudi deleče se celice, čeprav je bila blizu konfluence. Transkriptov za kazein beta ni bilo, ker celice najbrž še niso bile konfluentne. Rosen in sodelavci so študirali prepisovanje beta kazeina in predlagali, da je njegovo izražanje inducirano sinergistično s strani laktogenih hormonov, lokalnih rastnih dejavnikov in interakcij med celicami in med celicami in okoljem (Rosen in sod., 2009). Interakcije med celicami so bile najbrž odsotne, saj se je beta kazein izražal, ko smo celično linijo, ki je izvirala iz iste koze, gojili do postkonfluentnega stanja. V isti liniji so nastale tudi maščobne kapljice, kar smo pokazali z barvanjem z oil red O. To dokazuje, da so bile celice *in vitro* zmožne vzdrževati funkcijo

laktacije. Med transkripti primarne kulture smo zaznali označevalce laktogene diferenciacije B4GALT1 (beta-1,4-galactozil transferaza 1), SOCS2 (supresor citokinske signalizacije 2) in ACACA (acetil-CoA karboksilaza alfa), ki so ključni faktorji za sintezo laktoze in druge člane poti JAK-STAT, npr. STAT5A in STAT5B, ki sta potrebna za izražanje lakto proteinov. To najbrž nakazuje, da so se celice pripravljale na sintezo mlečnih proteinov.

Glede na izražanje označevalcev lahko zaključimo, da je primarno kulturo sestavljal več celičnih linij. Prevladovale so epitelne celice pa tudi stromalni celični tipi. Najbolj izraženi za epitelij specifični označevalci so bili različni citokeratini in integrini, podobno so dokazali tudi za celične linije pri miših (Kendrick in sod., 2008). Naši rezultati so tudi podobni rezultatom poskusov s človeškimi celicami mlečne žleze, ki dokazujejo, da se v primarni kulturi, pod pogoji, ki omogočajo diferenciacijo, izražajo adhezijske molekule, proteine tesnih stikov in metaloproteaze (Dontu in sod., 2003). Poleg slednjih smo zasledili tudi izražanje proteinov zunajceličnega matriksa, npr. lamininov in različnih tipov kolagenov. To nakazuje, da so bile epitelne celice *in vitro* zmožne tvoriti komponente zunajceličnega matriksa. Testirani označevalci dokazujejo, da so v primarni kulturi prisotne epitelne in stromalne celice pa tudi celice s proliferativnim potencialom.

6.3 IN VITRO TESTI TVORJENJA KOLONIJ (CFC)

Z *in vitro* testi (CFC) smo za kozji model dokazali, da se v kulturi pomnožujejo luminalni, bipotentni in mioepitelni prekurzorji. Kolonije, ki so nastale iz kozjih epitelnih klonogenih prekurzorjev, so bile morfološko podobne kolonijam, ki so nastale iz človeških prekurzorjev (Eirew in sod., 2008; Stingl in sod., 2001; Villadsen in sod., 2007). V njih smo potrdili izražanje luminalnih in mioepitelnih označevalcev diferenciacije CK18 in CK14. Gojišče EpiCult-B so razvili iz gojišča Sf7, da bi bolje omogočalo rast epitelnih celic iz mlečne žleze. Ker ne poznamo točne sestave medija EpiCult-B, je nemogoče utemeljiti katere komponente vodijo do različnih frekvenc kolonij, ki smo jih zaznali v testih CFC. Gojišče, ki so ga raziskovalci uporabili v poskusih s človeškimi celicami, ki so izvirale iz dojk žensk pred menopavzo, je bilo podobno gojišču Sf7, ki smo ga uporabljali

v naših poskusih (Stingl in sod., 2001). Skupna frekvenca kolonij, v prej omenjenem poskusu, je bila podobna našim rezultatom. Pri kozjih vzorcih je bila samo skupna frekvenca kolonij pri vzorcu, ki izvira iz juvenilne mlečne žleze nižja, to je 1.15 ± 0.12 . Celokupne frekvence kolonij v gojišču EpiCult-B so bile med 1 in 7. Stingl in kolegi so na primer pokazali, da ena med vsakimi 63 mišjimi epitelnimi celicami, ki zrastejo v gojišču EpiCult-B, zraste v kolonijo v testu CFC (Stingl in sod., 2006). To se sklada z našimi rezultati s kozjimi vzorci, kjer je 1 na vsakih 14 do 1 na vsakih 95 celic prekurzorska/matična celica. Čeprav so čiste mioepitelne kolonije redko opazili v testih CFC s primarnim človeškim tkivom (Eirew in sod., 2008), so te nastale, ko smo nacepili primarno kozje tkivo. Odstotek mioepitelnih celic je bil najvišji v gojišču EpiCult-B, to je okrog 40 % za vzorce 1, 2, 4 in 90 % za vzorec 3 in kolonije, ki so zrasle iz disociiranih ksenogelov, ki smo jih gojili v gojišču Sf7 (50 – 60 %). Frekvenca mioepitelnih celic, ki so izvirale iz tretje mlečne žleze v laktaciji (koza 3), je znašala 3.55 ± 0.13 od celokupne 4.40 ± 0.14 (to je 80 %).

Ena razлага za tak premik v razvoju celičnih linij, ko primerjamo vse štiri testirane vzorce, je, da sta bili prvi dve mlečni žlezi na višku laktacije, ko je potreba po sekretornih luminalnih celicah najvišja in se je zato razvoj prekurzorjev usmeril v luminalno linijo. Nasprotno pa je bila tretja mlečna žleza mogoče že na začetku involucije, ko sekretorne celice niso več potrebne, in posledično to tudi lahko razloži višje število zaznanih mioepitelnih prekurzorjev. Podobno so bili tudi v ksenograftih najbolj zastopani mioepitelni prekurzorji. To nakazuje na to, da se MCMŽ v umetnem okolju v kolagenskih gelih razvijejo v smer bipotentnih in mioepitelnih prekurzorjev in da manj diferencirajo v luminalne prekurzorje oziroma še bolj verjetno je, da je mioepitelni prekurzor bolj zrel prekurzor, ki nastane direktno iz bipotentnega prekurzorja. Višji odstotek luminalnih prekurzorjev v vzorcu 4, ki je izviral iz sedem mesečne koze, je najbrž posledica razraščanja epitelija med puberteto. Tako smo pokazali, da je velika razlika med frekvencami posameznih kolonij, ki izvirajo iz klonogenih prekurzorjev iz različnih koz in tudi, če so gojeni v različnih medijih. Kozje celice imajo mogoče drugačne potrebe po rastnih faktorjih kot človeške celice, za katere sta bili uporabljeni gojišči razviti, vendar so bile kljub temu frekvence primerljive s podatki, dobljenimi za človeške in mišje vzorce.

6.4 REGENERACIJA *IN VIVO*

Multipotentni značaj odraslih matičnih celic je definiran z zmožnostjo ene same celice, izolirane iz organa, da regenerira celoten organ. Populacije, obogatene z matičnimi celicami, so izolirali iz odrasle mišje mlečne žleze s pomočjo površinskih markerjev CD24, CD29 (integrin beta 1) in CD49f (integrina alfa 6) (Shackleton in sod., 2006; Stingl in sod., 2006). MCMŽ v človeški mlečni žlezi naj bi se nahajale v bazalni plasti epitelija in jih definira EpCAM^{low}CD49f^{high} fenotip. Poleg naštetega so zmožne še regeneracije *in vivo* (Eirew in sod., 2008). Matični oziroma prekurzorski potencial kozjih mlečnih celičnih populacij smo ocenili z *in vivo* presaditvijo pod ledvično kapsulo miši NOD/SCID. S histološko detekcijo smo odkrili regenerirane strukture, sestavljene iz dvosloja celic, ki so se razvile v 4 do 6 tednih. Strukture so vsebovale tako zrele luminalne celice, ki so izražale CK18 in za CK14-pozitivne celice. Prostorska razporeditev označevalcev diferenciacije je bila podobna kot v alveolah mlečnih žlez. *In vitro* testi, narejeni iz suspenzij posameznih celic, narejenih iz gelčkov, ki so vsebovali regenerirane strukture, so pokazali, da so prednike/matične celice nastajale in se vzdrževale med *in vivo* testom. Zrasli so vsi tipi kolonij, njihova morfologija je bila enaka, kot pri kolonijah iz primarnega tkiva. Dokazali smo tudi, da so v regeneriranih strukturah nastajali mlečni proteini, kar razloži, da so se celice terminalno diferencirale v funkcionalne alveole. Celice so bile tudi zmožne odziva na hormone, to nakazuje izražanje progesteronskega receptorja v jedrih luminalnih celic.

6.5 MAMOSFERE

Z namenom obogatitve matičnih/prekurzorskih celic, smo vzpostavili 3D *in vitro* modele z epitelno frakcijo celic kozje mlečne žleze. Uporabili smo dve metodi gojenja epitelnih celic. Pri uporabi suspenzijske metode, smo celice nasadili v gojišču z dodatkom matriksa bazalne membrane, v drugem primeru pa smo celice nasadili vklopljene v matriks. Pod pogoji, ko se celice ne morejo pripeti na podlago, diferencirane celice doživijo programirano celično smrt, anoikis. Nasprotno pa nediferencirane matične/prekurzorske celice lahko preživijo in tvorijo sferične strukture (mamosfere) (Dontu in sod., 2003). Do danes so mamosfere opisali pri govedu (Rauner in Barash, 2012) ne pa pri kozi.

Pomembno je poudariti, da so različne strukture poimenovali mamosfere, v našem delu pa govorimo o strukturah, ki nastanejo pod pogojih suspenzjske kulture ali vklopljene v matriks bazalne membrane. V gojišču z dodanim matriksom bazalne membrane so epitelne celice oblikovale velike okrogle strukture, ki so imele lumen. Ko smo celice nacepili v gojišče z dodatkom B27, so zrasle mamosfere nepravilnih oblik, ki so podobne prej opisanim nesferičnim plavajočim kolonijam (angl. *non-spherical floating colonies*), ki so jih opisali pri govedu (Rauner in Barash, 2012). Polariziranim acinom podobne strukture, ki tako nastanejo, naj bi bile podobne alveolam v tkivu mlečne žleze. Njihov nastanek najbrž inducira bazalna membrana, saj spodbuja medcelične interakcije (Petersen in sod., 1992). Riley in sodelavci so z mikromrežami sledili ekspresijo genov med tvorbo mamosfer s kravjimi epitelnimi celicami na basalni membrani in dokazali, da so bili molekularni in celični procesi podobni kot med tvorbo alveol v mlečni žlezi (Riley in sod., 2010).

Multipotentne prekurzorje oziroma matične celice smo obogatili s pomočjo mamosfer, to dokazuje pojav kolonij po nacepitvi celic iz disociiranih primarnih mamosfer v test tvorjenja kolonij (CFC). Več kot 80 % disociiranih ne-terminalno diferenciranih celic je izviralo iz luminalnih prekurzorjev, okrog 15 % pa iz bipotentnih. V našem poskusu so iz primarnih mamosfer po disociaciji nastale tudi sekundarne mamosfere, kar dokazuje, da so bile celice zmožne samo obnovitve. Opazili smo, da so imele večje mamosfere več plasti mioepitelnih celic in so bile včasih brez lumna, medtem ko so manjše mamosfere sestavlje mioepitelne in luminalne celice. Manjše strukture so verjetno nastale iz prekurzorskih/matičnih celic, medtem ko so večje nastale zaradi celične agregacije. Pred kratkim je oživila razprava, ali mamosfere res nastanejo iz matičnih in predniških celic ali so le posledica celične agregacije. Dong in sodelavci so predlagali, da če celice nasadimo dovolj redčene, se tako izognemo agregaciji in so mamosfere dober vir predniških celic (Dong in sod., 2013). Mamosfere so tudi dober model za študije laktacije, ker so pokazali, da se v njih izražajo geni, vpleteni v sintezo mleka in maščob (Riley in sod., 2010). Z imunocitokemičnim barvanjem parafinskih rezin 3D struktur smo sledili ekspresiji za epitelij značilnih označevalcev CK14 in CK18. Dokazali smo polariziranost, formacijo lumna in v posameznih primerih izražanje prej omenjenih označevalcev. Zaključimo lahko, da so epitelne celice iz mlečne žleze zmožne tvoriti 3D strukture, njihova celična

organizacija pa je odvisna od vira celic (starost, fiziološko stanje), načina gojenja in sestave gojišča.

6.6 SORTIRANJE

Ker so MCMŽ možen vir rakavih obolenj, številne raziskave težijo k temu, da bi osamili čisto populacijo teh celic. Popolna karakterizacija MCMŽ je bila omejena prav zaradi njihove redkosti. Obogatitev MCMŽ je možna z uporabo površinskih označevalcev. Pri miših so eno matično celico izolirali na vsakih 64 celic, ki se nahajajo v populaciji CD24⁺CD29^{hi} (Shackleton in sod., 2006). To je dovolj celic za testiranje njihove zmožnosti repopulacije očiščene maščobne blazinice in do neke mere tumorigeneze. Je pa populacija pre malo čista, da bi lahko vršili kompleksne molekulske analize, ki bi definirale MCMŽ in njihove lastnosti. Predlagali so celo, da matične celice predstavljajo manj kot 5 % bazalne populacije (Stingl in sod., 2006). Ekspresijski profil celic, ki sestavljajo obogateno bazalno populacijo, med katerimi so tudi matične celice, je bolj podoben profilu mioepitelnih celic kot pa luminalnih celic. V z MCMŽ obogateni frakciji mišjih celic so zasledili tudi povišano izražanje komponent signalne poti Wnt/katenin-beta, to je pogosto tudi pri drugih odraslih matičnih celicah (dos Santos in sod., 2013; Molofsky in sod., 2004).

V človeški mlečni žlezi je CD49f^{hi}EpCAM^{-lo} subpopulacija obogatena z matičnimi celicami, medtem ko je za Mucin 1 pozitivna populacija bogata z luminalnimi prekurzorji (Eirew in sod., 2008). Disociirane celice iz mlečne žleze krave so z multiparametričnim sortiranjem (FACS) osamili v štiri populacije, CD24^{med}CD49f^{pos} populacija naj bi vsebovala matične celice (Rauner in Barash, 2012). V kozji mlečni žlezi smo dokazali, da lahko osamimo za EpCAM in CD49f pozitivne in negativne populacije, žal pa nam dvojnega sortiranja ni uspelo narediti. Problem je bil najbrž v protitelesih, ki niso bila narejena za pretočno citometrijo. Ko smo celice sortirali glede na površinski označevalec mucin 1, je Muc1^{med} populacija predstavljala luminalne prekurzorje, to dokazujejo tudi testi *in vitro* tvorjenja kolonij (CFC).

Populacije hematopoetskih celic, ki izražajo ALDH so bogate z matičnimi/prekurzorskimi celicami. ALDH je tudi označevalec, katerega prekomerno izražanje nakazuje na prisotnost rakavih obolenj, tudi raka dojke (Alison in sod., 2010). Izražanje tega encima v mlečni žlezi je lastnost, ki je skupna odraslim matičnim celicam in njihovim prekurzorjem (Martignani in sod., 2010). Pred kratkim so dokazali, da imajo najbolj primitivne človeške matične celice in bipotentni prekurzorji, prisotni v mlečni žlezi, nizko aktivnost encima ALDH. Aktivnost se prehodno zelo poviša, ko celice diferencirajo v luminalno linijo (Eirew in sod., 2012). Slednje nakazuje na možnost, da celice, iniciatorke tumorjev dojke, dejansko izvirajo iz luminalnih prekurzorjev (Lim in sod., 2009). Podobno smo zaključili tudi pri mlečni žlezi koze, kjer $Aldh^+$ populacija vsebuje več kot 80 % luminalnih prekurzorjev. Poleg tega so celice iz $Aldh^+$ in $Aldh^-$ populacij po transplantaciji pod ledvično kapsulo imunsko oslabljenih miši oblikovale polarizirane strukture, kot so prisotne v mlečni žlezi. Aldefluor tako predstavlja alternativni način za osamitev matičnih celic.

6.7 SKLEPI

Potrdili smo vse postavljene hipoteze in postavili naslednje sklepe:

1. Po presaditvi epitelne frakcije kozje mlečne žleze pod ledvično kapsulo miši NOD/SCID so celice zmožne proliferacije in oblikovanja struktur, ki so enake kot v tkivu mlečne žleze. V strukturah se izražajo označevalci terminalne diferenciacije (citokeratini 14 in 18), celice se odzivajo na hormonalne vplive (izražajo progesteronski receptor) in so sposobne tvoriti mlečne proteine.
2. Po nacepitvi celičnih suspenzij, ki izvirajo iz mlečne žleze koze, pod pogoji, ki ne omogočajo pripetja celic oziroma vklopljene v matriks bazalne membrane, celice oblikujejo sferične strukture, ki so podobne alveolam in imajo lumen.
3. Prekurzorske celice in MCMŽ, ki so prisotne v primarni kulturi epitelnih celic mlečne žleze koze, se v gojiščih Sf7 in EpiCult-B delijo (*in vitro* proliferacija) in diferencirajo v terminalno diferencirane mioepitelne in luminalne celice. Prekurzorske celice iz katerih nastanejo terminalno diferencirane celice so bipotentne, luminalne ali mioepitelne. Slednja dva celična tipa verjetno nastaneta iz bipotentnega prekurzorja, ki je manj diferenciran.
4. Označevalci, specifični za posamezne celične linije, ki gradijo mlečno žlezo, se izražajo v primarni kulturi. Specifični označevalci za mioepitelne celice so citokeratin (CK) 14, CK5, CK17, za luminalne celice CK6A, CK18, CK19, Muc1. Pomembna markerja sta tudi receptorja za steroidne hormone ER in PR. Matični značaj karakterizirajo CD24, CD29, CD49f in EpCAM. V primarni kulturi so prisotne tudi celice strome (fibroblasti), označujejo jih specifični označevalci aktin gladkih mišic, vimentin, katenin beta 1, SPARC, fibronektin 1, NOV, TGFBR2, ADAM, MMP in SFRP1. Epitelne celice v primarni kulturi tvorijo tudi komponente zunajceličnega matriksa, laminine in kolagene.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Mlečna žleza je ključnega pomena za preživetje sesalcev, mleko udomačenih prežvekovalcev pa služi kot pomemben vir hrani dostopnih človeku. Za razumevanje funkcionalne vloge MCMŽ pri normalnem razvoju mlečne žleze, so pogosto uporabili mišji model očiščene maščobne blazinice (Bruno in Smith, 2012; Visvader in Smith, 2011). Ta *in vivo* model omogoča presaditev in rast MCMŽ v za njih anatomsko normalni lokaciji pod vplivom fiziološko normalnega okolja (Bruno in Smith, 2011; Molofsky in sod., 2004; Visvader in Smith, 2011). Maščobna blazinica, ki je očiščena lastnega epitelija, je z uporabo transgenih miši, ki prekomerno izražajo onkogene, živalski model, ki se uporablja za raziskave raka dojk (Cardiff, 2002; Deng in Brodie, 2001). V študijah raka dojk so mišji modeli nepogrešljivi, miši bodo še nadalje nepogrešljiv vir za raziskave te bolezni. Študije patofizioloških mehanizmov v takih modelih so včasih omejene, ker je odsotna variabilnost v imbridiranih linijah, poleg tega pa je tumorigeneza pri miškah drugačna kot pri človeku. Nastanek tumorjev v mlečni žlezi miši večinoma inducirajo z virusi ali s kemikalijami, slednje ne drži za naravno pojavnost raka na dojki (Munson in Moresco, 2007). Čeprav pri človeku in vseh drugih sesalcih razvoj mlečne žleze poteka v zaporednih ciklih razvoja, laktacije in dediferenciacije, pogostost rakavih obolenj močno variira med posameznimi vrstami. Tumorji mlečne žleze so pogosti pri človeku in mesojedih živalih, medtem ko krave, konji, ovce, prašiči in koze zelo redko razvijejo neoplazije (Munson in Moresco 2007). Razlike v pojavnosti tumorjev so pripisali različnim faktorjem, npr. genetskim, hormonalnim, vplivu prehrane in geografskih faktorjev, za nobenega pa niso našli konkretnega dokaza, da bi res vplival (Munson and Moresco 2007). Pomemben faktor, ki lahko vpliva na predisponiranost za razvoj tumorjev mlečne žleze, so razlike v funkcionalnem obnašanju in regulaciji MCMŽ, ki igrajo osrednjo vlogo pri regulaciji mamogeneze. Zato je ključno, da MCMŽ študiramo pri različnih vrstah. Primerjalne študije več celičnih populacij iz mlečnih žlez različnih vrst lahko vodijo k odkritju novih terapevtskih sredstev in k zmanjšanju tveganja za razvoj raka.

V pričujočem delu smo uporabili kozo kot model za študije MCMŽ, ker je reprezentativen model za študije matičnih celic pri prežvekovalcih in ker so v preteklosti dosti študij fiziologije mlečne žleze naredili na kozjih mlečnih žlezah. Namen doktorske naloge je bila osamitev matičnih celic iz kozje mlečne žleze, katerih obstoj je bil do sedaj le teoretično dokazan. Uporabili smo metode celične biologije in funkcijalne genomike, ki so že bile uspešno uporabljeni pri karakterizaciji človeških in mišjih MCMŽ. Izražanje razvojno pomembnih genov (markerjev), ki opredeljujejo matični ozira terminalno diferencirani značaj celic smo raziskali z metodami RT-PCR, Western prenos in s standardnimi imunohistokemičnimi metodami na rezinah v parafin vklopljenega tkiva kozje mlečne žleze, transplantatov in v primarni kulturi. Specifični označevalci za mioepitelne celice so citokeratin (CK) 14, CK5, CK17, p63, za luminalne celice pa CK6A, CK18, CK19, Muc1, CSN2. Pomembna markerja sta tudi receptorja za steroidne hormone ER in PR. Matični značaj karakterizirajo CD24, CD29, CD49f in EpCAM. Celice strome (fibroblaste) v primarni kulturi definirajo označevalci aktin gladkih mišic, vimentin, katenin beta 1, SPARC, fibronektin 1, NOV, TGFBR2, ADAM, MMP in SFRP1. Epitelne celice v primarni kulturi tvorijo tudi komponente zunajceličnega matriksa, laminine in kolagene. Z uporabo *in vivo* transplantacij smo pokazali, da ima določen delež kozjih epitelnih celic regenerativni potencial. Z *in vitro* testi smo potrdili, da se v mlečni žlezi nahajajo različni tipi prekurzorskih populacij, ki se lahko klonogeno delijo. Zaključimo lahko, da so epitelne celice v mlečni žlezi koze organizirane hierarhično in da razvoj kozjih matičnih celic preko diferenciacije poteka tako kot v prej opisanih modelih. Ti rezultati so osnova za nadaljnje študije pri prežvekovalcih, ki bodo omogočile boljšo karakterizacijo MCMŽ in bodo vključevale tudi obogatitev matičnih celic s sortiranjem. S temeljitim poznavanjem celičnih komponent in mehanizmov, ki kontrolirajo rast in razvoj tkiva, bomo lahko vplivali na funkcijo matičnih/prekurzorskih celic v mlečni žlezi in jo v prihodnosti izkoristili.

7.2 SUMMARY

Mammary gland has a key role for survival of the newborn, in addition, milk of domesticated ruminants serves as an important source of nutrients available to the human. For understanding the functional role of MaSCs in normal mammary gland development, the cleared fat pad mouse model has been frequently used (Bruno and Smith, 2012; Visvader and Smith, 2011). This *in vivo* model allows the transplantation and growth of MaSCs into their normal anatomical site and under the influence of a normal physiological environment (Bruno and Smith, 2011; Molofsky at al., 2004; Visvader and Smith, 2011). Murine mammary gland-free fat pad transplantation system, together with transgenic mice overexpressing oncogenes, is the animal model of choice for human breast cancer research (Cardiff, 2002; Deng and Brodie, 2001). Mice models have crucial role in the study of breast cancer and this animal species will keep on being a major research resource in understanding this disease. However, by studying pathophysiological mechanisms in such models, some key insights might be lost due to the absence of variation in the mouse model and due to important interspecies differences between murine and human mammary tumorigenesis. Most mammary gland tumors in mice are induced by viruses or toxins, which is in contrast to the natural occurrence of breast cancer in women (Munson and Moresco, 2007). Although both in humans and all other mammals, the mammary gland undergoes repeated cycles of development, function, and dedifferentiation, mammary cancer prevalence varies greatly among these species. Mammary cancer is common in humans and carnivores (Munson and Moresco, 2007), but cows, horses, sheep, pigs and goats only rarely develop mammary tumors. Several influences, for instance genetic, hormonal, dietary, and geographic factors, have been proposed to account for this difference in prevalence, but to date, no definite proof for this has been found (Munson and Moresco, 2007). Another factor that might be involved in the susceptibility to develop mammary tumors could be differences in the functional behavior and regulation of MaSCs, the driving force behind mammogenesis. Therefore it is pivotal to study the MaSCs in different species. Translational studies of several cellular populations from mammary glands of different species may lead to discoveries of new drugs and reduce risk of cancer development.

In our work, goat was used as a model to study MaSCs, since it is a representative model to study MaSCs in ruminants and since several studies of physiology have been done previously using its organ. The objective of the thesis was isolation of stem cells, whose existence has only been theoretically proven so far. For this purpose methods of cell biology and functional genomics have been employed, which have successfully been used for characterisation of MaSCs in mice and human. Expression of markers defining stem or terminally differentiated nature of the cells was assessed by using RT-PCR, Western blot and via standard imunohistochemical methods on paraffin embedded sections of tissue, regenerated structures and on primary culture. Specific markers of myoepithelial cells are citokeratins 14, 5 and 19, p63; luminal markers are CK6A, CK18, CK19, Muc1, CSN2. Important nuclear luminal markers are also steroid hormone receptors ER and PR. Stem cell character is characterised by CD24, CD29, CD49f and EpCAM. Stromal cells (fibroblasts) in primary culture are defined by markers smooth muscle actin, vimentin, batenin beta 1, fibronectin 1, NOV, TGFBR2, ADAM, MMP, and SFRP1. Epithelial cells in primary culture are also able to form laminins and collagens, which are components of extracellular matrix. Using *in vivo* transplantation, we showed that a subset of goat epithelial cells have regenerative potential. Our *in vitro* assay confirmed that different progenitor populations exist in the mammary tissue, which are able of clonogenic proliferation. On the basis of our findings, we conclude that a hierarchy in the organization of epithelial cells exists and that the lineage development of gMaSCs through differentiation follows previously described models. These results lay the basis for future studies in ruminants, leading to better characterization of MaSCs, and will include enrichment of stem cells by sorting strategies. By a thorough understanding of the cellular components and mechanisms that control tissue growth and development, the enhancement of the stem/progenitor cell function can be achieved and exploited in the future.

8 VIRI

Alison M. R., Guppy N. J., Lim S. M., Nicholson L. J. 2010. Finding cancer stem cells: are aldehyde dehydrogenases fit for purpose? *The Journal of Pathology*, 222: 335-344

Alvarez C. V., Garcia-Lavandeira M., Garcia-Rendueles M. E., Diaz-Rodriguez E., Garcia-Rendueles A. R., Perez-Romero S., Vila T. V., Rodrigues J. S., Lear P. V., Bravo S. B. 2012. Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, 49: 89-111

Asselin-Labat M.-L., Vaillant F., Sheridan J. M., Pal B., Wu D., Simpson E. R., Yasuda H., Smyth G. K., Martin T. J., Lindeman G. J., Visvader J. E. 2010. Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature*, 465: 798-802

Asselin-Labat M. 2007. Mammary stem and progenitor cells: critical role of the transcription factor Gata-3. *Médecine sciences*, 23: 1077-1080

Asselin-Labat M. L., Shackleton M., Stingl J., Vaillant F., Forrest N. C., Eaves C. J., Visvader J. E., Lindeman G. J. 2006. Steroid hormone receptor status of mouse mammary stem cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 98: 1011-1014

Asselin-Labat M. L., Sutherland K. D., Barker H., Thomas R., Shackleton M., Forrest N. C., Hartley L., Robb L., Grosveld F. G., van der Wees J., Lindeman G. J., Visvader J. E. 2007. Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nature Cell Biology*, 9: 201-209

Balzar M., Winter M. J., de Boer C. J., Litvinov S. V. 1999. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *Journal of Molecular Medicine*, 77: 699-712

Barcellos-hoff M. H., Aggeler J., Ram T. G., Bissell M. J. 1989. Functional-Differentiation and Alveolar Morphogenesis of Primary Mammary Cultures on Reconstituted Basement-Membrane. *Development*, 105: 223-235

Beleut M., Rajaram R. D., Caikovski M., Ayyanan A., Germano D., Choi Y., Schneider P., Briskin C. 2010. Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 2989-2994

Bez A., Corsini E., Curti D., Biggiogera M., Colombo A., Nicosia R. F., Pagano S. F., Parati E. A. 2003. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Research*, 993: 18-29

Blanpain C., Horsley V., Fuchs E. 2007. Epithelial stem cells: Turning over new leaves. *Cell*, 128: 445-458

Blanpain C., Lowry W. E., Geoghegan A., Polak L., Fuchs E. 2004. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*, 118: 635-648

Booth B. W., Mack D. L., Androutsellis-Theotokis A., McKay R. D. G., Boulanger C. A., Smith G. H. 2008. The mammary microenvironment alters the differentiation repertoire of neural stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 14891-14896

Borovski T., Melo F. D. E., Vermeulen L., Medema J. P. 2011. Cancer Stem Cell Niche: The Place to Be. *Cancer Research*, 71: 634-639

Boulanger C. A., Mack D. L., Booth B. W., Smith G. H. 2007. Interaction with the mammary microenvironment redirects spermatogenic cell fate in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 3871-3876

Bouras T., Pal B., Vaillant F., Harburg G., Asselin-Labat M., Oakes S. 2008. Notch Signaling Regulates Mammary Stem Cell Function and Luminal Cell-Fate Commitment. *Cell Stem Cell*, 3: 429-441

Bruno R. D., Smith G. H. 2011. Functional Characterization of Stem Cell Activity in the Mouse Mammary Gland. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7: 238-247

Capuco A. V. 2007. Identification of putative bovine mammary epithelial stem cells by their retention of labeled DNA strands. *Experimental Biology and Medicine*, 232: 1381-1390

Capuco A. V., Ellis S., Wood D. L., Akers R. M., Garrett W. 2002. Postnatal mammary ductal growth: three-dimensional imaging of cell proliferation, effects of estrogen treatment, and expression of steroid receptors in prepubertal calves. *Tissue & Cell*, 34: 143-154

Capuco A. V., Evock-Clover C. M., Minuti A., Wood D. L. 2009. In vivo expansion of the mammary stem/ progenitor cell population by xanthosine infusion. *Experimental Biology and Medicine*, 234: 475-482

Cardiff R. D. 2002. Contributions of mouse biology to breast cancer research. *Comparative Medicine*, 52: 12-31

- Casey T., Dover H., Liesman J., DeVries L., Kiupel M., VandeHaar M., Plaut K. 2011. Transcriptome Analysis of Epithelial and Stromal Contributions to Mammogenesis in Three Week Prepartum Cows. *Plos One*, 6. doi: 10.1371/journal.pone.0022541: 13 str.
- Chepko G., Smith G. H. 1997. Three division-competent, structurally-distinct cell populations contribute to murine mammary epithelial renewal. *Tissue & Cell*, 29: 239-253
- Chepko G., Smith G. H. 1999. Mammary epithelial stem cells: our current understanding. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 4: 35-52
- Choudhary R. K., Capuco A. V. 2012. In vitro expansion of the mammary stem/progenitor cell population by xanthosine treatment. *BMC Cell Biology*, 13: 14
- Choudhary R. K., Li R. W., Erock-Clover C. M., Capuco A. V. 2013. Comparison of the transcriptomes of long-term label retaining-cells and control cells microdissected from mammary epithelium: an initial study to characterize potential stem/progenitor cells. *Frontiers in Oncology*, 3: 21
- Cicalese A., Bonizzi G., Pasi C. E., Faretta M., Ronzoni S., Giulini B., Brisken C., Minucci S., Di Fiore P. P., Pelicci P. G. 2009. The Tumor Suppressor p53 Regulates Polarity of Self-Renewing Divisions in Mammary Stem Cells. *Cell*, 138: 1083-1095
- Clarke R. B., Howell A., Potten C. S., Anderson E. 1997. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Research*, 57: 4987-4991
- Colitti M. 2010. Expression of Putative Stem Cell Markers Related to Developmental Stage of Sheep Mammary Glands. *Anatomia Histologia Embryologia*, 39: 555-562
- Colitti M., Farinacci M. 2009. Expression of a putative stem cell marker, Musashi 1, in mammary glands of ewes. *Journal of Molecular Histology*, 40: 139-149
- Cregan M. D., Fan Y., Appelbee A., Brown M. L., Klopcic B., Koppen J., Mitoulas L. R., Piper K. M., Choolani M. A., Chong Y. S., Hartmann P. E. 2007. Identification of nestin-positive putative mammary stem cells in human breastmilk. *Cell and Tissue Research*, 329: 129-136
- Croker A. K., Allan A. L. 2008. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12: 374-390

- Daniel C. W., De Ome K. B., Young J. T., Blair P. B., Faulkin L. J., Jr. 1968. The in vivo life span of normal and preneoplastic mouse mammary glands: a serial transplantation study. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 61: 53-60
- Deng C. X., Brodie S. G. 2001. Knockout mouse models and mammary tumorigenesis. Seminars in Cancer Biology, 11: 387-394
- Deome K. B., Faulkin L. J., Jr., Bern H. A., Blair P. B. 1959. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. Cancer Research, 19: 515-520
- Deome K. B., Miyamoto M. J., Osborn R. C., Guzman R. C., Lum K. 1978. Detection of inapparent nodule-transformed cells in the mammary gland tissues of virgin female BALB/cfC3H mice. Cancer Research, 38: 2103-2111
- Dessauge F., Finot L., Wiart S., Aubry J. M., Ellis S. E. 2009. Effects of Ovariectomy in Prepubertal Goats. Journal of Physiology and Pharmacology, 60: 127-133
- Dong Q. X., Wang D. H., Bandyopadhyay A., Gao H., Gorena K. M., Hildreth K., Rebel V. I., Walter C. A., Huang C. J., Sun L. Z. 2013. Mammospheres from murine mammary stem cell-enriched basal cells: Clonal characteristics and repopulating potential. Stem Cell Research, 10: 396-404
- Dontu G., Abdallah W. M., Foley J. M., Jackson K. W., Clarke M. F., Kawamura M. J., Wicha M. S. 2003. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. Genes & Development, 17: 1253-1270
- dos Santos C. O., Rebbeck C., Rozhkova E., Valentine A., Samuels A., Kadiri L. R., Osten P., Harris E. Y., Uren P. J., Smith A. D., Hannon G. J. 2013. Molecular hierarchy of mammary differentiation yields refined markers of mammary stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110: 7123-7130
- Eckfeldt C. E., Mendenhall E. M., Verfaillie C. M. 2005. The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6: 726-737
- Eirew P., Kannan N., Knapp D. J. H. F., Vaillant F., Emerman J. T., Lindeman G. J., Visvader J. E., Eaves C. J. 2012. Aldehyde Dehydrogenase Activity Is a Biomarker of Primitive Normal Human Mammary Luminal Cells. Stem Cells, 30: 344-348
- Eirew P., Stingl J., Eaves C. J. 2010. Quantitation of human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative properties using a subrenal capsule xenotransplantation assay. Nature Protocols, 5: 1945-1956

- Eirew P., Stingl J., Raouf A., Turashvili G., Aparicio S., Emerman J. T., Eaves C. J. 2008.
A method for quantifying normal human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative ability. *Nature Medicine*, 14: 1384-1389
- Ellis S., Capuco A. V. 2002. Cell proliferation in bovine mammary epithelium: identification of the primary proliferative cell population. *Tissue Cell*, 34: 155-163
- Ellis S., McFadden T. B., Akers R. M. 1998. Prepuberal ovine mammary development is unaffected by ovariectomy. *Domestic Animal Endocrinology*, 15: 217-225
- Evans M. J., Kaufman M. H. 1981. Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos. *Nature*, 292: 154-156
- Ewald A. J., Brenot A., Duong M., Chan B. S., Werb Z. 2008. Collective epithelial migration and cell rearrangements drive mammary branching morphogenesis. *Developmental Cell*, 14: 570-581
- Fan Y. P., Chong Y. S., Choolani M. A., Cregan M. D., Chan J. K. Y. 2010. Unravelling the Mystery of Stem/Progenitor Cells in Human Breast Milk. *Plos One*, 5. doi: 10.1371/journal.pone.001442: 11 str.
- Faulkin L. J., Jr., Deome K. B. 1960. Regulation of growth and spacing of gland elements in the mammary fat pad of the C3H mouse. *Journal of the National Cancer Institute*, 24: 953-969
- Frandsen R., Wilke L. W., Falis A. D. 2009. Anatomy and Physiology of the Mammary Gland. V: Anatomy and physiology of Farm Animals. 7th edition. Iowa, Wiley-Blackwell: 451 str.
- Fridriksdottir A. J., Petersen O. W., Ronnov-Jessen L. 2011. Mammary gland stem cells: current status and future challenges. *International Journal of Developmental Biology*, 55: 719-729
- Gage F. H. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science*, 287: 1433-1438
- Gajewska M., Zielniok K., Motyl T. 2013. Autophagy in Development and Remodelling of Mammary Gland. V: Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death? InTech, 443-464 str. doi: 10.5772/54558: 21 str.
- Gerdes J. 1990. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Seminars in Cancer Biology*, 1: 199-206

- German T., Barash I. 2002. Characterization of an epithelial cell line from bovine mammary gland. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 38: 282-292
- Ginestier C., Hur M. H., Charafe-Jauffret E., Monville F., Dutcher J., Brown M., Jacquemier J., Viens P., Kleer C. G., Liu S., Schott A., Hayes D., Birnbaum D., Wicha M. S., Dontu G. 2007. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. Cell Stem Cell, 1: 555-567
- Gu B., Sun P., Yuan Y., Moraes R. C., Li A., Teng A., Agrawal A., Rheaume C., Bilanchone V., Veltmaat J. M., Takemaru K., Millar S., Lee E. Y., Lewis M. T., Li B., Dai X. 2009. Pygo2 expands mammary progenitor cells by facilitating histone H3 K4 methylation. The Journal of Cell Biology, 185: 811-826
- Gutierrez-Fernandez M., Rodriguez-Frutos B., Alvarez-Grech J., Vallejo-Cremades M. T., Exposito-Alcaide M., Merino J., Roda J. M., Diez-Tejedor E. 2011. Functional recovery after hematic administration of allogenic mesenchymal stem cells in acute ischemic stroke in rats. Neuroscience, 175: 394-405
- Gyorki D. E., Asselin-Labat M. L., van Rooijen N., Lindeman G. J., Visvader J. E. 2009. Resident macrophages influence stem cell activity in the mammary gland. Breast Cancer Research, 11:1-6
- Hassiotou F., Beltran A., Chetwynd E., Stuebe A. M., Twigger A. J., Metzger P., Trengove N., Lai C. T., Filgueira L., Blancafort P., Hartmann P. E. 2012. Breastmilk Is a Novel Source of Stem Cells with Multilineage Differentiation Potential. Stem Cells, 30: 2164-2174
- Hennighausen L., Robinson G. W. 2001. Signaling pathways in mammary gland development. Developmental Cell, 1: 467-475
- Holland M. S., Tai M. H., Trosko J. E., Griffin L. D., Stasko J. A., Cheville N. C., Holland R. E. 2003. Isolation and differentiation of bovine mammary gland progenitor cell populations. American Journal of Veterinary Research, 64: 396-403
- Hovey R. C., Auldist D. E., Mackenzie D. D., McFadden T. B. 2000. Preparation of an epithelium-free mammary fat pad and subsequent mammogenesis in ewes. Journal of Animal Science, 78: 2177-2185
- Hovey R. C., McFadden T. B., Akers R. M. 1999. Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 4: 53-68

- Hovey R. C., Trott J. F., Vonderhaar B. K. 2002. Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7: 17-38
- Hu H., Wang J. Q., Bu D. P., Wei H. Y., Zhou L. Y., Li F. D., Loor J. J. 2009. In Vitro Culture and Characterization of a Mammary Epithelial Cell Line from Chinese Holstein Dairy Cow. *Plos One*, 4. doi: 10.1371/journal.pone.0007636: 8 str.
- Huynh H. T., Robitaille G., Turner J. D. 1991. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation. *Experimental Cell Research*, 197: 191-199
- Jaks V., Barker N., Kasper M., Van Es J. H., Snippert H. J., Clevers H., Toftgard R. 2008. Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nature Genetics*, 40: 1291-1299
- Jedrzejczak M., Szatkowska I. 2013. Bovine mammary epithelial cell cultures for the study of mammary gland functions. In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* (v tisku)
- Joshi P. A., Jackson H. W., Beristain A. G., Di Grappa M. A., Mote P. A., Clarke C. L., Stingl J., Waterhouse P. D., Khokha R. 2010. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature*, 465: 803-807
- Juergens W. G., Stockdal.Fe, Topper Y. J., Elias J. J. 1965. Hormone-Dependent Differentiation of Mammary Gland in Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54: 629-634
- Katz E., Streuli C. H. 2007. The extracellular matrix as an adhesion checkpoint for mammary epithelial function. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 715-726
- Kendrick H., Regan J. L., Magnay F. A., Grigoriadis A., Mitsopoulos C., Zvelebil M., Smalley M. J. 2008. Transcriptome analysis of mammary epithelial subpopulations identifies novel determinants of lineage commitment and cell fate. *BMC Genomics*, 9: 591
- Keys J. E., Cifrian E., Guidry A. J., Farrell H. M. 1997. Bovine mammary explant versus primary cell cultures: effect of bovine somatotropin and insulin-like growth factor-I on DNA content and protein synthesis. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 33: 206-211
- Knoblich J. A. 2001. Asymmetric cell division during animal development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2: 11-20

Kordon E. C., Smith G. H. 1998. An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development*, 125: 1921-1930

Koukoulis G. K., Virtanen I., Korhonen M., Laitinen L., Quaranta V., Gould V. E. 1991. Immunohistochemical localization of integrins in the normal, hyperplastic, and neoplastic breast. Correlations with their functions as receptors and cell adhesion molecules. *The American Journal of Pathology*, 139: 787-799

Kouros-Mehr H., Slorach E. M., Sternlicht M. D., Werb Z. 2006. GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell*, 127: 1041-1055

Kuperwasser C., Chavarria T., Wu M., Magrane G., Gray J. W., Carey L., Richardson A., Weinberg R. A. 2004. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 4966-4971

Laidlaw I. J., Clarke R. B., Howell A., Owen A. W. M. C., Potten C. S., Anderson E. 1995. The Proliferation of Normal Human Breast-Tissue Implanted into Athymic Nude-Mice Is Stimulated by Estrogen but Not Progesterone. *Endocrinology*, 136: 164-171

Leis O., Eguiara A., Lopez-Arribillaga E., Alberdi M. J., Hernandez-Garcia S., Elorriaga K., Pandiella A., Rezola R., Martin A. G. 2012. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene*, 31: 1354-1365

Lerondelle C., Godet M., Mornex J. F. 1999. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. *Veterinary Research*, 30: 467-474

Li L. H., Xie T. 2005. Stem cell niche: Structure and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21: 605-631

Li P., Wilde C. J., Finch L. M., Fernig D. G., Rudland P. S. 1999. Identification of cell types in the developing goat mammary gland. *The Histochemical Journal*, 31: 379-393

Li W., Ferguson B. J., Khaled W. T., Tevendale M., Stingl J., Poli V., Rich T., Salomoni P., Watson C. J. 2009. PML depletion disrupts normal mammary gland development and skews the composition of the mammary luminal cell progenitor pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 4725-4730

- Lim E., Vaillant F., Wu D., Forrest N. C., Pal B., Hart A. H., Asselin-Labat M. L., Gyorki D. E., Ward T., Partanen A., Feleppa F., Huschtscha L. I., Thorne H. J., Fox S. B., Yan M., French J. D., Brown M. A., Smyth G. K., Visvader J. E., Lindeman G. J. 2009. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature Medicine*, 15: 907-913
- Lim E., Wu D., Pal B., Bouras T., Asselin-Labat M. L., Vaillant F., Yagita H., Lindeman G. J., Smyth G. K., Visvader J. E. 2010. Transcriptome analyses of mouse and human mammary cell subpopulations reveal multiple conserved genes and pathways. *Breast Cancer Research*, 12: 1-14
- Liu S., Dontu G., Wicha M. S. 2005. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Research*, 7: 86-95
- Liu S., Ginestier C., Charafe-Jauffret E., Foco H., Kleer C. G., Merajver S. D., Dontu G., Wicha M. S. 2008. BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 1680-1685
- Liu X. Q., Yang H., Peng J. Y., Chen Q. J., Cao B. Y. 2012. Establishment and Evaluation of a New Method Tissue Re-Shift for Isolation of Goat Mammary Epithelial Cells. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11: 2403-2408
- Mani S. A., Guo W., Liao M. J., Eaton E. N., Ayyanan A., Zhou A. Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C. C., Shipitsin M., Campbell L. L., Polyak K., Brisken C., Yang J., Weinberg R. A. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133: 704-715
- Martignani E., Eirew P., Accornero P., Eaves C. J., Baratta M. 2010. Human Milk Protein Production in Xenografts of Genetically Engineered Bovine Mammary Epithelial Stem Cells. *Plos One*, 5. doi: 10.1371/journal.pone.0013372: 8 str.
- Martignani E., Eirew P., Eaves C., Baratta M. 2009. Functional identification of bovine mammary epithelial stem/progenitor cells. *Veterinary Research Communications*, 33: S101-S103
- Matsuoka J., Yashiro M., Sakurai K., Kubo N., Tanaka H., Muguruma K., Sawada T., Ohira M., Hirakawa K. 2012. Role of the stemness factors sox2, oct3/4, and nanog in gastric carcinoma. *The Journal of Surgical Research*, 174: 130-135
- McElroy M. C., Bassett H. F. 2010. Mammary carcinoma in a ewe. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22: 1006-1007

Milhau N., Renson P., Dreesen I., Greenland T., Bellaton C., Guiguen F., Mornex J. F., Le Jan C. 2005. Viral expression and leukocyte adhesion after in vitro infection of goat mammary gland cells with caprine arthritis-encephalitis virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 103: 93-99

Molofsky A. V., Pardal R., Morrison S. J. 2004. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Current Opinion in Cell Biology*, 16: 700-707

Motyl T., Bierla J. B., Kozlowski M., Gajewska M., Gajkowska B., Koronkiewicz M. 2011. Identification, quantification and transcriptional profile of potential stem cells in bovine mammary gland. *Livestock Science*, 136: 136-149

Munson L., Moresco A. 2007. Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals. *Breast Disease*, 28: 7-21

Naylor M. J., Li N., Cheung J., Lowe E. T., Lambert E., Marlow R., Wang P. B., Schatzmann F., Wintermantel T., Schuetz G., Clarke A. R., Mueller U., Hynes N. E., Streuli C. H. 2005. Ablation of beta 1 integrin in mammary epithelium reveals a key role for integrin in glandular morphogenesis and differentiation. *Journal of Cell Biology*, 171: 717-728

Noh K. H., Kim B. W., Song K. H., Cho H., Lee Y. H., Kim J. H., Chung J. Y., Hewitt S. M., Seong S. Y., Mao C. P., Wu T. C., Kim T. W. 2012. Nanog signaling in cancer promotes stem-like phenotype and immune evasion. *The Journal of Clinical Investigation*, 122: 4077-4093

Ogorevc J. 2011. Odkrivanje kandidatnih genov za odpornost proti mastitisu z uporabo bioinformatike in transkriptomike. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 151 str.

Ohfuki S. 2012. Secretory carcinoma of the mammary gland in an 8-year-old Holstein-Friesian dairy cow. *The Veterinary quarterly*, 32: 113-115

Osawa M., Hanada K., Hamada H., Nakauchi H. 1996. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 273: 242-245

Pantschenko A. G., Barber M. R., Woodcock-Mitchell J., Bushmich S. L., Yang T. J. 2000a. Establishment and characterization of a caprine mammary myoepithelial cell line (CMMMyEC). In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 36: 351-356

Pantschenko A. G., Woodcock-Mitchell J., Bushmich S. L., Yang T. J. 2000b. Establishment and characterization of a caprine mammary epithelial cell line (CMEC). In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 36: 26-37

Patki S., Kadam S., Chandra V., Bhonde R. 2010. Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Human Cell*, 23: 35-40

Petersen O. W., Ronnov-Jessen L., Howlett A. R., Bissell M. J. 1992. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 9064-9068

Pickett P. B., Pitelka D. R., Hamamoto S. T., Misfeldt D. S. 1975. Occluding junctions and cell behavior in primary cultures of normal and neoplastic mammary gland cells. *The Journal of Cell Biology*, 66: 316-332

Pina C., Enver T. 2007. Differential contributions of haematopoietic stem cells to foetal and adult haematopoiesis: insights from functional analysis of transcriptional regulators. *Oncogene*, 26: 6750-6765

Pitelka D. R., Hamamoto S. T., Duafala J. G., Nemanic M. K. 2009. Cell contacts in the mouse mammary gland: i. Normal gland in postnatal development and the secretory cycle. 1973. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 14: 295-316

Povey R. C., Osborne A. D. 1969. Mammary gland neoplasia in the cow. A review of the literature and report of a fibrosarcoma. *Veterinary Pathology*, 6: 502-512

Proia D. A., Kuperwasser C. 2006. Reconstruction of human mammary tissues in a mouse model. *Nature Protocols*, 1: 206-214

Raouf A., Zhao Y., To K., Stingl J., Delaney A., Barbara M., Iscove N., Jones S., McKinney S., Emerman J., Aparicio S., Marra M., Eaves C. 2008. Transcriptome analysis of the normal human mammary cell commitment and differentiation process. *Cell Stem Cell*, 3: 109-118

Rauner G., Barash I. 2012. Cell Hierarchy and Lineage Commitment in the Bovine Mammary Gland. *Plos One*, 7. doi: 10.1371/journal.pone.0030113: 16 str.

Rauner G., Leviav A., Mavor E., Barash I. 2013. Development of Foreign Mammary Epithelial Morphology in the Stroma of Immunodeficient Mice. *Plos One*, 8. doi: 10.1371/journal.pone.0068637: 18 str.

Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414: 105-111

Reynolds B. A., Weiss S. 1996. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Developmental Biology*, 175: 1-13

Ribitsch I., Burk J., Delling U., Geissler C., Gittel C., Julke H., Brehm W. 2010. Basic Science and Clinical Application of Stem Cells in Veterinary Medicine. Bioreactor Systems for Tissue Engineering II: Strategies for the Expansion and Directed Differentiation of Stem Cells, 123: 219-263

Richards J., Pasco D., Yang J., Guzman R., Nandi S. 1983. Comparison of the growth of normal and neoplastic mouse mammary cells on plastic, on collagen gels and in collagen gels. Experimental Cell Research, 146: 1-14

Richert M. M., Schwertfeger K. L., Ryder J. W., Anderson S. M. 2000. An atlas of mouse mammary gland development. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 5: 227-241

Riley L. G., Gardiner-Garden M., Thomson P. C., Wynn P. C., Williamson P., Raadsma H. W., Sheehy P. A. 2010. The influence of extracellular matrix and prolactin on global gene expression profiles of primary bovine mammary epithelial cells in vitro. Animal Genetics, 41: 55-63

Rose M. T., Aso H., Yonekura S., Komatsu T., Hagino A., Ozutsumi K., Obara Y. 2002. In vitro differentiation of a cloned bovine mammary epithelial cell. Journal of Dairy Research, 69: 345-355

Rosen J. M., Kabotyanski E. B., Rijnkels M., Freeman-Zadrowski C., Buser A. C., Edwards D. P. 2009. Lactogenic Hormonal Induction of Long Distance Interactions between beta-Casein Gene Regulatory Elements. Journal of Biological Chemistry, 284: 22815-22824

Rowson A. R., Daniels K. M., Ellis S. E., Hovey R. C. 2012. Growth and development of the mammary glands of livestock: A veritable barnyard of opportunities. Seminars in Cell & Developmental Biology, 23: 557-566

Rudland P. S., Hughes C. M. 1989. Immunocytochemical identification of cell types in human mammary gland: variations in cellular markers are dependent on glandular topography and differentiation. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 37: 1087-1100

Russo J., Russo I. H. 2004. Development of the human breast. Maturitas, 49: 2-15

Saito T., Kuang J. Q., Bittira B., Al-Khaldi A., Chiu R. C. J. 2002. Xenotransplant cardiac chimera: Immune tolerance of adult stem cells. Annals of Thoracic Surgery, 74: 19-24

Sakai K., Yamamoto A., Matsubara K., Nakamura S., Naruse M., Yamagata M., Sakamoto K., Tauchi R., Wakao N., Imagama S., Hibi H., Kadomatsu K., Ishiguro N., Ueda M. 2012. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *The Journal of Clinical Investigation*, 122: 80-90

Sanchez O., Montesino R., Toledo J. R., Rodriguez E., Diaz D., Royle L., Rudd P. M., Dwek R. A., Gerwig G. J., Kamerling J. P., Harvey D. J., Cremata J. A. 2007. The goat mammary glandular epithelial (GMGE) cell line promotes polyfucosylation and N,N'-diacetyllactosidaminylation of N-glycans linked to recombinant human erythropoietin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 464: 322-334

Schu S., Nosov M., O'Flynn L., Shaw G., Treacy O., Barry F., Murphy M., O'Brien T., Ritter T. 2012. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16: 2094-2103

Shackleton M., Vaillant F., Simpson K. J., Stingl J., Smyth G. K., Asselin-Labat M. L., Wu L., Lindeman G. J., Visvader J. E. 2006. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, 439: 84-88

Shi H., Luo J., Zhu J., Li J., Sun Y., Lin X., Zhang L., Yao D., Shi H. 2013. PPAR γ Regulates Genes Involved in Triacylglycerol Synthesis and Secretion in Mammary Gland Epithelial Cells of Dairy Goats. *PPAR Research*, 2013: 10

Shin K., Fogg V. C., Margolis B. 2006. Tight junctions and cell polarity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22: 207-235

Siegel P. M., Muller W. J. 2010. Transcription factor regulatory networks in mammary epithelial development and tumorigenesis. *Oncogene*, 29: 2753-2759

Sleeman K. E., Kendrick H., Ashworth A., Isacke C. M., Smalley M. J. 2006. CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Research*, 8: 1-6

Sleeman K. E., Kendrick H., Robertson D., Isacke C. M., Ashworth A., Smalley M. J. 2007. Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. *Journal of Cell Biology*, 176: 19-26

Smalley M., Ashworth A. 2003. Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nature Reviews Cancer*, 3: 832-844

Smalley M. J., Titley I., Ashworth A. 2005. An improved definition of mouse mammary epithelial side population cells. *Cytotherapy*, 7: 497-508

Smalley M. J., Titley J., O'Hare M. J. 1998. Clonal characterization of mouse mammary luminal epithelial and myoepithelial cells separated by fluorescence-activated cell sorting. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 34: 711-721

Smalley M. J., Titley J., Paterson H., Perusinghe N., Clarke C., O'Hare M. J. 1999. Differentiation of separated mouse mammary luminal epithelial and myoepithelial cells cultured on EHS matrix analyzed by indirect immunofluorescence of cytoskeletal antigens. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 47: 1513-1524

Smith G. H., Chepko G. 2001. Mammary epithelial stem cells. Microscopy Research and Technique, 52: 190-203

Smith G. H., Medina D. 1988. A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland. Journal of Cell Science, 90, 1: 173-183

Sorg D., Potzel A., Beck M., Meyer H. H. D., Viturro E., Kliem H. 2012. Effects of cell culture techniques on gene expression and cholesterol efflux in primary bovine mammary epithelial cells derived from milk and tissue. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 48: 550-553

Spaas J. H., Chiers K., Bussche L., Burvenich C., Van de Walle G. R. 2012. Stem/Progenitor Cells in Non-Lactating Versus Lactating Equine Mammary Gland. Stem Cells and Development, 21: 3055-3067

Stingl J. 2009. Detection and analysis of mammary gland stem cells. The Journal of Pathology, 217: 229-241

Stingl J., Eaves C. J., Zandieh I., Emerman J. T. 2001. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. Breast Cancer Research and Treatment, 67: 93-109

Stingl J., Eirew P., Ricketson I., Shackleton M., Vaillant F., Choi D., Li H. I., Eaves C. J. 2006. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. Nature, 439: 993-997

Taddei I., Deugnier M. A., Faraldo M. M., Petit V., Bouvard D., Medina D., Fassler R., Thiery J. P., Glukhova M. A. 2008. Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. Nature Cell Biology, 10: 716-722

Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, 131: 861-872

Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676

Tanos T., Rojo L. J., Echeverria P., Brisken C. 2012. ER and PR signaling nodes during mammary gland development. *Breast Cancer Research*, 14: 210

Thomson J. A. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1827-1827

Tong H. L., Li Q. Z., Gao X. J., Yin D. Y. 2012. Establishment and characterization of a lactating dairy goat mammary gland epithelial cell line. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 48: 149-155

Toyoshima K., Asakawa K., Ishibashi N., Toki H., Ogawa M., Hasegawa T., Irie T., Tachikawa T., Sato A., Takeda A., Tsuji T. 2012. Fully functional hair follicle regeneration through the rearrangement of stem cells and their niches. *Nature Communication*, 3. doi:10.1038/ncomms1784: 12 str.

Tumbar T., Guasch G., Greco V., Blanpain C., Lowry W. E., Rendl M., Fuchs E. 2004. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science*, 303: 359-363

Van Keymeulen A., Blanpain C. 2012. Tracing epithelial stem cells during development, homeostasis, and repair. *Journal of Cell Biology*, 197: 575-584

Van Keymeulen A., Rocha A. S., Ousset M., Beck B., Bouvencourt G., Rock J., Sharma N., Dekoninck S., Blanpain C. 2011. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature*, 479: 189-195

Vatovec S. 1981. Mlečna žleza in njen izloček. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 56 str.

Villadsen R., Fridriksdottir A. J., Rønnow-Jessen L., Gudjonsson T., Rank F., LaBarge M. A., Bissell M. J., Petersen O. W. 2007. Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *The Journal of Cell Biology*, 177: 87-101

Villeda S. A., Luo J., Mosher K. I., Zou B. D., Britschgi M., Bieri G., Stan T. M., Fainberg N., Ding Z. Q., Eggel A., Lucin K. M., Czirr E., Park J. S., Couillard-Despres S., Aigner L., Li G., Peskind E. R., Kaye J. A., Quinn J. F., Galasko D. R., Xie X. M. S., Rando T. A., Wyss-Coray T. 2011. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*, 477: 90-94

Visvader J. E. 2009. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes&Development*, 23: 2563-2577

- Visvader J. E., Smith G. H. 2011. Murine Mammary Epithelial Stem Cells: Discovery, Function, and Current Status. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3. 10.1101/cshperspect.a004879: 14 str.
- Wareski P., Motyl T., Ryniewicz Z., Orzechowski A., Gajkowska B., Wojewodzka U., Ploszaj T. 2001. Expression of apoptosis-related proteins in mammary gland of goat. *Small Ruminant Research*, 40: 279-289
- Watson C. J. 2009. Immune cell regulators in mouse mammary development and involution. *Journal of Animal Science*, 87: 35-42
- Welm B. E., Tepera S. B., Venezia T., Graubert T. A., Rosen J. M., Goodell M. A. 2002. Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Developmental Biology*, 245: 42-56
- Woodward W. A., Chen M. S., Behbod F., Rosen J. M. 2005. On mammary stem cells. *Journal of Cell Science*, 118: 3585-3594
- Wright D. E., Wagers A. J., Gulati A. P., Johnson F. L., Weissman I. L. 2001. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science*, 294: 1933-1936
- Xie T., Spradling A. C. 2000. A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science*, 290: 328-330
- Xie Y. C., Yin T., Wiegraebe W., He X. C., Miller D., Stark D., Perko K., Alexander R., Schwartz J., Grindley J. C., Park J., Haug J. S., Wunderlich J. P., Li H., Zhang S., Johnson T., Feldman R. A., Li L. H. 2009. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature*, 457: 97-U102
- Yalcin-Ozuysal O., Fiche M., Guitierrez M., Wagner K. U., Raffoul W., Brisken C. 2010. Antagonistic roles of Notch and p63 in controlling mammary epithelial cell fates. *Cell Death & Differentiation*, 17: 1600-1612
- Yamaji D., Na R. S., Feuermann Y., Pechhold S., Chen W. P., Robinson G. W., Hennighausen L. 2009. Development of mammary luminal progenitor cells is controlled by the transcription factor STAT5A. *Genes & Development*, 23: 2382-2387
- Young L. J., Medina D., DeOme K. B., Daniel C. W. 1971. The influence of host and tissue age on life span and growth rate of serially transplanted mouse mammary gland. *Experimental Gerontology*, 6: 49-56

Yuan Y. G., Cheng Y., Guo L., Ding G. L., Bai Y. J., Miao M. X., An L. Y., Zhao J. H., Cao Y. J. 2009. Cloned kids derived from caprine mammary gland epithelial cells. Theriogenology, 72: 500-505

Zavizion B., van Duffelen M., Schaeffer W., Politis I. 1996. Establishment and characterization of a bovine mammary epithelial cell line with unique properties. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 32: 138-148

Zheng Y. M., He X. Y., Zhang Y. 2010. Characteristics and EGFP expression of goat mammary gland epithelial cells. Reproduction in Domestic Animals, 45: e323-331

Zucchi I., Dulbecco R. 2002. Proteomic dissection of dome formation in a mammary cell line. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 7: 373-384

ZAHVALA

Hvala vsem, ki ste gradili mozaik, ki se je zložil v mojo doktorsko disertacijo. Še posebej se zahvaljujem moji družini; prof. dr. Petru Dovču; prof. dr. Mojci Narat; doc. dr. Miomiru Kneževiću; sodelavcem s Katedre za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, še posebej Jerneju in Vesni; Eugeniu, Mariu, Paolu, Silvii in Cristini z Veterinarske fakultete v Torinu; Vesni z referata za podiplomski študij in vsem mojim prijateljem.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Sonja PRPAR MIHEVC

**IDENTIFIKACIJA IN KARAKTERIZACIJA ODRASLIH
MATIČNIH CELIC V MLEČNI ŽLEZI KOZE (*Capra hircus*)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014