

**משרד החקלאות - דו"ח לתוכניות מחקר  
לקרן המדען הראשי**

<b>קוד זיהוי</b>	<b>א. נושא המחקר (בעברית)</b>
820 - 0279 - 12	<b>שימוש במולקולות RNA מעכבות ככלי לבקרת פעילות רבייתית בפרות חלב</b>

<b>ג. כללי</b>	
מוסד מחקר של החוקר הראשי	
הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית	
<b>סוג הדו"ח</b>	<b>תאריכים</b>
סופישנתי	<b>תקופת המחקר</b>
	<b>עבודה מוגש הדו"ח</b>
	<b>התחלה</b>
<b>תאריך משלוח הדו"ח למקורות המימון</b>	<b>סיומ</b>
שנה חודש	שנה חודש
11 / 2013	05 / 2013
	שנה חודש
	06 / 2012

<b>ב. צוות החוקרים</b>		
<b>שם פרטי</b>	<b>שם משפחה</b>	<b>חוקר ראשי</b>
רינה	מידן	
<b>חוקרים משניים</b>		
1	מועלם	עוזי
2		
3		
4		
5		
6		
7		

<b>ד. מקורות מימון עבור מיועד הדו"ח</b>		
<b>שם מקור המימון</b>	<b>קוד מקור מימון</b>	<b>סכום שאושר למחקר בשנת תיקצוב הדו"ח בשקלים</b>
קרן מדען ראשי- בע"ח		170000

**ה. תקציר** שים לב - על התקציר להיכתב בעברית לפי סעיף ה' שבהנחיות לכתיבת דיווחים בהצעת מחקר זו אנחנו מבקשים לבחון את היתכנות השימוש במולקולות RNA מעכבות להתערבות מוקרת במערכת הרבייה בפרות חלב. החדרת טכנולוגיות חדשות לתחום זה אשר לא נוסו עד כה, עשויה לסייע בפענוח ותיקון כשלים במערכת הרבייה. תהליך העיכוב ע"י מולקולות RNA קטנות התגלה לפני פחות מעשור, והיא נחשבת כשיטה מבטיחה לבקרת התבטאות ספציפית של גנים או post-transcriptional gene silencing בעיקר בבע"ח יצריים, בהם טכניקת ה-knockout אינה ישימה. מטרתנו להוכיח בשלב ראשון היתכנות של שימוש בטכנולוגיה זו, ולאחר מכן לנסות ולהשתמש בה לתיקון ושיפור פעילות רבייתית וע"י כך להביא להעלאת שיעורי ההתעברות. בחרנו את האנזים Cyclooxygenase 2 (COX-2) כמולקולת מודל, מאחר ואנזים זה משמש אנזים קובע מהירות ביצירת פרוסטגלנדינים. השנה הראשונה הוקדשה ללימוד והתנסות במערכות in-vivo וin-vitro. במהלך השנה השנייה נבחנו התבטאות הגן ל-COX-2 בתאי גרנולוזה בתגובה ל-hCG או FRS. שני הגורמים (FRS ו-hCG) השרו התבטאות הגן COX-2 מתאי גרנולוזה באופן משמעותי, עם יתרון ל-FRS (פי 12) לעומת hCG (פי 8). החלטנו לעשות שימוש ב-FRS ובכך להימנע בתלות התגובה בהמצאות רצפטורים על התאים. באופן דומה נבחנו התבטאות הגן ל-COX-2 בתאי אנדומטריום בהשפעת TPA הידוע כמשרה הפרשת COX-2 בתאים אלה. בשלב הבא בחנו את התבטאות הגן ל-COX-2 ע"י תאי גרנולוזה בתגובה ל-FRS בפרקי זמן שונים לאחר האינדוקציה, ונתקבלה תגובה טובה רק לאחר 12 שעות מתחילת האינדוקציה, עם יציבות יחסית עד ל-24 שעות ורמות מקסימאליות ב-48 שעות. במקביל, נעשו 2 ניסויים בהם נבחנו הזרקת מעכב COX-2 NS-398 לזקיקים פרהאובולטוריים in-vivo. בניסוי ראשון נמצא עיכוב במועד הופעת הביץ כתוצאה מהזרקת המעכב, אבל ללא ביטול הביץ. בניסוי השני נבחנו סינתזת PGE<sub>2</sub> לאחר הזרקת המעכב ואכן נמצאו רמות נמוכות של ההורמון אצל פרות להן הזרקת המעכב. בהמשך בחנו את השפעת המעכב siRNA על התבטאות הגן ל-COX-2 ועל הפרשת PGE<sub>2</sub>. המעכב אכן היה אפקטיבי, ורמת COX-2 mRNA הייתה רק 31% מרמתו ללא המעכב. כמו כן ריכוזי ההורמון PGE<sub>2</sub> במדיום ירדו בהשפעת המעכב והם היו רק כשליש מרמתו ללא המעכב. בנוסף נעשה ניסוי in-vivo ובו נוסה פרוטוקול סכרון שונה של הפרות. אכן נמצא שיפור בתגובה לסינרון ושיפור בטכניקת השאיבה, אבל לא נמצא ריכוז נמוך יותר של PGE<sub>2</sub> בזקיקים שנשאבו לאחר הזרקת המעכב NS-398. השנה השלישית הוקדשה לבחינת יכולת ההשתקה של המעכב siRNA על התבטאות הגן ל-COX-2 וריכוז PGE<sub>2</sub> בתאי גרנולוזה ותאי אנדומטריום ללא שימוש בריאגנט טרנספקציה. בשלב זה בחנו כולטרוול כנשא של המעכב Chol.COX-2 siRNA. בתאי גרנולוזה שהוגדרו עם מעכב זה נמצא כי רוב התאים מתו, ואילו תגובה טובה נמצאה בתאי אנדומטריום בנוכחות ריאגנט וגם ללא ריאגנט. כאשר ביצענו אינדוקציה של תאי גרנולוזה ל-4 שעות בלבד קבלנו תגובה טובה אבל רק בנוכחות ריאגנט טרנספקציה. בגלל תמותת תאי גרנולוזה בנוכחות המעכב עם נשא הכולטרוול Chol.COX-2 siRNA, והחשש להזרקת מעכב עם ריאגנט טרנספקציה לבעל החיים בגלל האפשרויות לטוקסיות של החומר, לא ביצענו הזרקת in-vivo לתוך זקיקי השחלה. היות ותופעה דומה לא נתקבלה בתאי אנדומטריום, שקלנו לבצע הזרקת Chol.COX-2 siRNA ללא הריאגנט לתוך הרחם ובדיקת ההשפעות הפיזיולוגיות שלו – כגון הארכת המחזור המיני. אבל מפאת חוסר תקציב המחקר נעצר בשלב זה.

**ו. אישורים**

הנני מאשר שקראתי את ההנחיות להגשת דיווחים לקרן המדען הראשי והדו"ח המצ"ב מוגש לפיהן

חוקר ראשי	מנהל המחלקה	מנהל המכון (פקולטה)	אמרכלות (רשות המחקר)	רשות המחקר	תאריך (שנה) (חודש) (יום)
-----------	-------------	---------------------	----------------------	------------	--------------------------

**שימוש במולקולות RNA מעכבות ככלי לבקרת פעילות רבייתית בפרות חלב**

**Controlling reproductive activity in dairy cows by RNA interference**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ע"י

**פרופ' רינה מידן** – המחלקה למדעי בעלי חיים הפקולטה לחקלאות מזון וסביבה של האוניברסיטה  
העברית.

**ד"ר עוזי מועלם** – המחלקה לבקר וצאן, המכון לבע"ח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן.

Prof. Rina Meidan, Department of Animal Science, the Robert H. Smith Faculty of  
Agriculture, Food and Environmental Quality Sciences, the Hebrew University of  
Jerusalem, Rehovot, 76100. E-mail: [rina@agri.huji.ac.il](mailto:rina@agri.huji.ac.il)

Dr. Uzi Moallem Department of Dairy Cattle, Institute of Animal Sciences, Volcani  
Center, P.O. Box 6, Bet-Dagan, 50250. E-mail: [uzim@volcani.agri.gov.il](mailto:uzim@volcani.agri.gov.il)

**תקציר**

.....  
**הצהרת החוקר הראש י:**  
**הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.**  
**הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא (מחק את המיותר)**  
**\*במידה וכן, על החוקר להמציא פרטים על הגוף שבאמצעותו מופץ הידע ( כמו: שה "**  
**ם)**  
**חתימת החוקר \_\_\_\_\_ תאריך \_\_\_\_\_ :**

בהצעת מחקר זו אנחנו מבקשים לבחון את היתכנות השימוש במולקולות RNA מעכבות להתערבות מבוקרת במערכת הרבייה בפרות חלב. החדרת טכנולוגיות חדשות לתחום זה אשר לא נוסו עד כה, עשויה לסייע בפענוח ותיקון כשלים במערכת הרבייה. תהליך העיכוב ע"י מולקולות RNA קטנות התגלה לפני פחות מעשור, והיא נחשבת כשיטה מבטיחה לבקרת התבטאות ספציפית של גנים או post-transcriptional gene silencing בעיקר בבע"ח יצרניים, בהם טכניקת ה- knockout אינה ישימה. מטרתנו להוכיח בשלב ראשון היתכנות של שימוש בטכנולוגיה זו, ולאחר מכן לנסות ולהשתמש בה לתיקון ושיפור פעילות רבייתית וע"י כך להביא להעלאת שיעורי ההתעברות. בחרנו את האנזים Cyclooxygenase 2 (COX-2) כמולקולת מודל, מאחר ואנזים זה משמש אנזים קובע מהירות ביצירת פרוסטגלנדינים. השנה הראשונה הוקדשה ללימוד והתנסות במערכות in-vitro ו-in-vivo. במהלך השנה השנייה נבחנה התבטאות הגן ל- COX-2 בתאי גרנולוזה בתגובה ל- hCG או FRS. שני הגורמים (hCG ו- FRS) השרו התבטאות הגן COX-2 מתאי גרנולוזה באופן משמעותי, עם יתרון ל- FRS (פי 12) לעומת hCG (פי 8). החלטנו לעשות שימוש ב- FRS ובכך להימנע בתלות התגובה בהימצאות רצפטורים על התאים. באופן דומה נבחנה התבטאות הגן ל- COX-2 בתאי אנדומטריום בהשפעת TPA הידוע כמשרה הפרשת COX-2 בתאים אלה. בשלב הבא בחנו את התבטאות הגן ל- COX-2 ע"י תאי גרנולוזה בתגובה ל- FRS בפרקי זמן שונים לאחר האינדוקציה, ונתקבלה תגובה טובה רק לאחר 12 שעות מתחילת האינקובציה, עם יציבות יחסית עד ל- 24 שעות ורמות מקסימאליות ב- 48 שעות. במקביל, נעשו 2 ניסויים בהם נבחנה הזרקת מעכב COX-2- NS-398 לזקיקים פרהאובולטוריים *in-vivo*. בניסוי ראשון נמצא עיכוב במועד הופעת הביץ כתוצאה מהזרקת המעכב, אבל ללא ביטול הביץ. בניסוי השני נבחנה סינתיזת PGE<sub>2</sub> לאחר הזרקת המעכב ואכן נמצאו רמות נמוכות של ההורמון אצל פרות להן הוזרק במעכב. בהמשך בחנו את השפעת המעכב siRNA על התבטאות הגן ל- COX-2 ועל הפרשת PGE<sub>2</sub>. המעכב אכן היה אפקטיבי, ורמת COX-2 mRNA הייתה רק 31% מרמתו ללא המעכב. כמו כן ריכוזי ההורמון PGE<sub>2</sub> במדיום ירדו בהשפעת המעכב והם היו רק כשליש מרמתו ללא המעכב. בנוסף נעשה ניסוי *in-vivo* ובו נוסה פרוטוקול סנכרון שונה של הפרות. אכן נמצא שיפור בתגובה לסינכרון ושיפור בטכניקת השאיבה, אבל לא נמצא ריכוז נמוך יותר של PGE<sub>2</sub> בזקיקים שנשאבו לאחר הזרקת המעכב NS-398. השנה השלישית הוקדשה לבחינת יכולת ההשתקה של המעכב siRNA על התבטאות הגן ל- COX-2 וריכוז PGE<sub>2</sub> בתאי גרנולוזה ותאי אנדומטריום ללא שימוש בריאגנט טרנספקציה. בשלב זה בחנו כולסטרוול כנשא של המעכב Chol.COX-2 siRNA. בתאי גרנולוזה שהוגדרו עם מעכב זה נמצא כי רוב התאים מתו, ואילו תגובה טובה נמצאה בתאי אנדומטריום בנוכחות ריאגנט וגם ללא ריאגנט. כאשר ביצענו אינקובציה של תאי גרנולוזה ל- 4 שעות בלבד קבלנו תגובה טובה אבל רק בנוכחות ריאגנט טרנספקציה. בגלל תמותת תאי גרנולוזה בנוכחות המעכב עם נשא הכולסטרוול Chol.COX-2 siRNA, והחשש להזרקת מעכב עם ריאגנט טרנספקציה לבעל החיים בגלל האפשריות לטוקסיות של

החומר, לא ביצענו הזרקה in-vivo לתוך זקיקי השחלה. היות ותופעה דומה לא נתקבלה בתאי האנדומטריום, שקלנו לבצע הזרקה של Chol.COX-2 siRNA ללא הריאגנט לתוך הרחם ובדיקת ההשפעות הפיזיולוגיות שלו – כגון הארכת המחזור המיני. אבל מפאת חוסר תקציב המחקר נעצר בשלב הזה.

### מבוא ותיאור הבעיה

שיטות קלאסיות לטיפול גנטי של בע"ח ושיטות ממשק מודרניות הביאו את ענף הבקר לחלב להישגים רבים. ואולם תנובות החלב הגבוהות בעדר החלב הישראלי ובעולם מלווה בירידה בשיעורי ההתעברות. הירידה בשיעורי ההתעברות עם העלייה בתנובות החלב נובעת מסיבות רבות וביניהן: דחייה בחידוש מחזוריות לאחר ההמלטה, עומס מטבולי ומאזן אנרגיה שלילי (Butler and Smith, 1989), עומס חום (Jordan, 2003) ועוד. עבודות מחקר רבות נעשו על מנת לקבוע את הסיבות הפיזיולוגיות לירידה בפוריות, וחלקן אכן מצאו פגיעה בהפרשה ההורמונאלית עקב מצבי עקה תזונתיים וסביבתיים. ירידה נוספת בשיעורי הפוריות נגרמת עקב כשלים במערכת הרבייה כגון: חוסר תאנה, ציטוט וסינדרום "פרות קשות-התעברות" (Repeat breeder cows). בעבודת מחקר זו נבחנו את השימוש במולקולות RNA מעכבות ככלי מחקרי לפענוח מנגנונים הגורמים לכשלים פיזיולוגיים במערכת הרבייה של בקר לחלב.

במסגרת עבודת מחקר זו ננסה לבחון מודל המדמה מצב של ציסטה פוליקולרית. תופעת הציסטות נפוצה מאוד בבקר לחלב, ולפי סקירה של Garverick (1997) שיעור הפרות המפתחות ציטוט בעדרי בקר לחלב הוא בין 5.6% ל-18%. כמו כן, מס' עבודות מצאו קשר בין תנובת חלב גבוהה לריבוי הופעת ציטוט, בעוד אחרים לא מצאו קשר כזה (Garverick, 1997). ככלל קיימים 3 מצבים של פעילות בשחלה: (1) חוסר פעילות (2) מצב תקין בו יש זקיקים מביצים במחזוריות תקינה (3) מצב בו יש התפתחות פוליקולרית בשחלה ללא הגעה לכדי ביוץ. הופעת ציטוט משתייכת למצב השלישי בו קיימת התפתחות נורמלית של זקיקים בשחלה ולרוב עד כדי הגעתם לשלב פרה-אובולטורי, אבל ללא הופעת ביוץ. לעתים קרובות קוטר הציטה יהיה גדול יותר מקוטרו הממוצע של זקיק מביץ. ציסטה יכולה להתקיים לפרק זמן לא מוגדר, לסגת ולהתחלף בציטה חדשה, או בזקיק נורמלי המביץ באופן תקין. הוצעו מס' השערות להיעדר ביוץ אצל פרות אלה, ואחת מהן היא היעדר שיא LH הנחוץ לתהליך הביוץ וללוטיאיניזציה של הזקיק (Wiltbank et al., 2002). כפי שיוסבר להלן, בעבודת מחקר זו נעשה שימוש במולקולות RNA מעכבות של האנזים COX-2; cyclooxygenase 2 (2) הנחוץ לתהליך הביוץ. מצב זה של היעדר ביוץ כתוצאה מעיכוב פעילותו של COX-2 יכול לשמש כמודל לבחינת המנגנון המוביל להופעת ציטוט.

תופעה נוספת הקשורה ככל הנראה בכשל פיזיולוגי היא תופעת סינדרום "פרות קשות-התעברות". פרות אלה מתקשות להתעבר גם לאחר 3 הזרעות רצופות ויותר. פרות אלה מראות מחזורי ייחום תקינים, ולרוב ללא ממצאים קליניים במערכת המין. אחת ההשערות היא כי סינדרום זה קשור גם בביוץ דחוי או חוסר ביוץ, ולכן ההתנהגות הייחומית הנראית לעין כרוכה בכשל פיזיולוגי, ובחוסר

תיזמון ייחום-ביוץ-הזרעה. סינדרום זה כרוך בהפסדים כלכליים בגין הזרעות חוזרות ונשנות, טיפולים ווטרנריים, דחייה במועד ההתעברות, ירידה במספר הוולדות, ויציאת פרות בעלות ערך טיפוחי גבוה. בעבודת מחקר זו לא נעסוק בתופעה זו, ואולם השימוש במולקולות RNA מעכבות יכול להוות בהמשך כלי מחקרי שימושי בקביעת המנגנון המוביל לתופעה זו.

פגיעה נוספת בפוריות נגרמת בשל פעילות בלתי תקינה של הגופיף הצהוב. הגופיף הצהוב המתפתח לאחר שיא LH מן הזקיק אחראי ליצירת פרוגסטרון הנחוץ לתמיכה בהריון (Rathbone et al., 2009; Siqueira et al., 1998). בנוסף לתמיכה בהריון, ערכי פרוגסטרון חשובים לדינמיקה של התפתחות הזקיקים, וערכי פרוגסטרון נמוכים למשל מאטים את קצב החלפת הזקיקים (Sheldon et al., 1993; Stock et al., 1993; Savio et al., 2002). כמו כן נמצאה קורלציה גבוהה בין רמות פרוגסטרון במחזור שלפני ההזרעה ואחוזי ההתעברות (Folman et al., 1973), לכן לרמות פרוגסטרון חשיבות ממשקית רבה במשק החלב. בנוסף ל-LH פקטורים מקומיים משפיעים על התפתחות אופטימלית של גופיף צהוב, ביניהם גורמי גדילה וצטוקינים. לאחרונה נמצא כי לאנדוטלין 2 תפקיד חשוב בשלב המעבר זקיק-גופיף צהוב, במינים שונים נמצא כי הפפטיד מיוצר בתאי גרנולוזה של הזקיק וכי הוא מתבטא בחלון זמן צר לפני הביוץ או מיד אחריו (KO et al., 2006; Klipper et al., 2010). במכרסמים עיכוב פעילותו מוריד את מספר הביוצים ובעכברי knockout לאנדוטלין 2 לא נוצרו כלל גופים צהובים. גם בפרות, בעבודה שפרסמנו לאחרונה מצאנו שאנדוטלין 2 הגביר בתאי גרנולוזה מאפיינים של גופיף צהוב כגון עליה במספר תאים ועליה בבטוי של VEGF וכן COX-2 (Klipper et al., 2010). שימוש במולקולות RNA מעכבות לאנזים היוצר אנדוטלין 2 (EDN-converting enzyme-1) עיכבה את המאפיינים הלוטאליים בתאי גרנולוזה. בעקבות מתן LH, מספר שעות לפני שיא הביטוי של אנדוטלין 2 מתבטאת מולקולת Yao et al., 2010; Carletti et al., 2010) Mir 21 (al., 2009). נמצא כי מולקולה זו מעכבת אפופטוסיס בתאי גרנולוזה בדומה לאנדוטלין 2. יש לציין כאן כי עיכוב תמותת תאי גרנולוזה הכרחית למעבר והתפתחות תקינים בין הזקיק לגופיף הצהוב. בקרת הביטוי הדומה ע"י LH, הסמיכות בזמני הביטוי והדמיון בפעילות הביולוגית עשויים להצביע על מעורבות Mir 21 בבקרת הביטוי של אנדוטלין 2. ובכל מקרה ברור כי הן ל-Mir 21 והן לאנדוטלין 2 תפקיד חשוב ביצירת הגופיף הצהוב.

בהצעת מחקר זו אנו מציעים לבחון שימוש בטכנולוגיה של מולקולות RNA מעכבות (RNA interference) בתחום המחקר של רבייה בבקר לחלב. הטכניקה של השימוש במולקולות RNA מעכבות התגלתה לפני פחות מעשור (Hannon, 2002; Tuschl, 2001) ונחשבת לשיטה מבטיחה לבקרת התבטאות ספציפית של גנים או post-transcriptional gene silencing בעיקר במינים שאינם מכרסמים, בהם טכניקת ה-knockout אינה ישימה או נתקלת בקשיים רבים. היכולת של מולקולות RNA מעכבות קטנות (small interfering) RNA –siRNA אקסוגניות או המולקולות האנדוגניות (miRNA) micro RNA לזוּסַת התבטאות גנים באופן יעיל וספציפי פותחת אפשרויות חדשות ומגוונות לטיפול. מולקולות אילו מאקטבות מערכת אנזימתית שמורה אבולוציונית, הגורמת לפירוק ה-mRNA הקומפלמנטרי ומדכאת את יצור החלבון אליו מקודדת המולקולה. מולקולות

miRNA מעורבות במגוון תהליכים ביולוגיים ביניהם התמיינות חלוקה ותמותה תאית. מולקולות ה-RNAs הם RNA קטנים, לא מקודדים האחראים על השתקת ביטוי גני באמצעות RNA interference. מדובר בקבוצת מולקולות RNA באורך של 17-27 נוקלאוטידים המשתתפות בבקרה שלאחר תעתוק, ע"י הפרעה לתירגום של mRNAs המכילים רצף משלים באופן חלקי את ה-miRNAs או משרות את פירוקם של mRNAs אם הרצף משלים באופן מלא (Ambros 2004). הביוגנזה של miRNAs היא תהליך מסובך המתחיל בתעתוק של miRNA ראשוני מוקדם-pri (miRNA באורך כמה מאות או אלפי נוקליאוטידים ולאחריו שני תהליכים עוקבים המתווכים ע"י נוקלאזאז גרעינית Droscha ליצירת pre-miRNA, ונוקלאזאז ציטופלסמתי Dicer, ליצירת התעתיק הבשל. השלב הבא הוא הטענת התעתיק הבשל על קומפלקס חלבונים פעיל המכיל חלבון argonaute (AGO) בליבה שלו (Kim, 2005). ע"י הטענה סלקטיבית של סיב אחד על גבי חלבון AGO, נוצר הקומפלקס miRISC (miRNA containing RNA induced silencing complex), שאליו מגויס mRNA המטרה ואחראי לפירוקו. בבע"ח, miRNAs נקשרים ל-RNA המטרה דרך היברידיזציה לרצפים משלימים חלקית הנמצאים בד"כ באיזורי ה-3' הלא מתורגמים, ומובילים לדיכוי בתירגום או לדגרדציה של התעתיק (Ha 2008). סלוק של *Dicer1* (אנזים חיוני ליצירת מולקולות אלו) בתאי גרנולוזה הראה כי למולקולות miRNA תפקיד שחלתי חשוב, עכברות *Dicer1* cKO בייצו פחות, הייתה בהם תמותה מוגברת של תאי גרנולוזה והן היו לא פוריות (Hong et al., 2008).

יכולתן של מולקולות RNA קטנות לבקר בעיקרון כל גן יוצרת כמובן עניין מדעי רב הן לצורך הבנה בסיסית של תהליכים ביולוגיים והן למגוון שמושים ברפואה ובחקלאות. אכן שני ניסויים קליניים גדולים שנערכו ב-2005 וב-2006 הראו מולקולות RNA מעכבות נסבלות היטב בבני אדם ויש להן תכונות פרמקו-קינטיות ההופכות אותן לקבוצה חדשה ומבטיחה של תרופות (Tiemann K, Rossi 2009; Manjunath & Dykxhoorn, 2010).

אולם למרות הפוטנציאל העצום הטמון במולקולות אילו, אופן מתן החומר *in vivo* (delivery) נותר חסם בפני שימוש רוטיני בשל קשיים במחצית חיים והכוונה לרקמת היעד. אמצעים רבים מושקעים ברחבי בעולם במטרה לפתור בעיה זו ע"י מודיפיקציות במולקולות הגורמות לייצוב המולקולות בזרם הדם וכן ביותר לרקמת היעד. יוצאים מן הכלל הם אותם מקרים בהם ישנה גישה לאברי היעד. כך למשל נעשה שימוש תרופתי ב-siRNA הניתנות כטיפות עיניים למגוון מחלות או בתרסיס נשאף שמטרתו טפול אנטי ויראלי במחלות הנגרמות ע"י וירוסים במערכת הנשימה (Tiemann K, Rossi 2009; Manjunath & Dykxhoorn, 2010). השחלה והרחם הם שתי רקמות יעד נוספות לטפול מקומי במולקולות RNA קטנות שעדין לא נוסו. שתי הרקמות נגישות או להזרקה ישירה (רחם) או להזרקה בעזרת מערכת אולטראסונד (ultrasound guided injection).

## מטרות המחקר

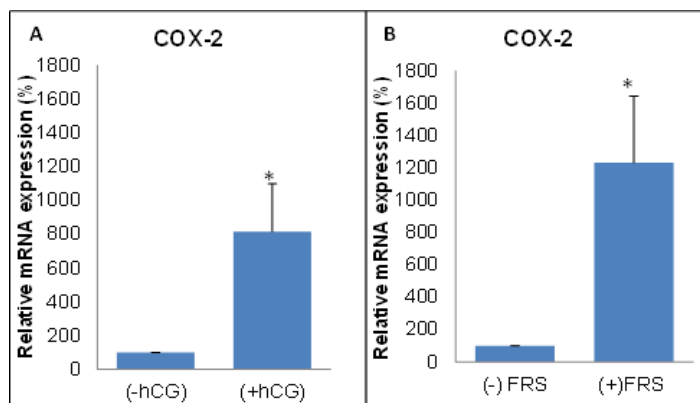
בעבודה זו אנחנו מבקשים לבחון את היתכנות השימוש במולקולות RNA קטנות מעכבות להתערבות מבוקרת במערכת הרבייה בפרות חלב.

**1** לבחון את השפעת עיכוב האנזים COX-2 בזקיק הטרום ביוצי על ביוץ והתפתחות ציסטות.  
**2** לבדוק את ההשפעה של מולקולת Mir 21 על הביוץ והתפתחות הגופיף הצהוב.  
אנו מציעים לבחון את השפעת מולקולות ה-RNA בשחלה ואם יתאפשר גם ברחם מאחר ואילו רקמות נגישות ומתאימות לבחינת שימוש מקומי מבוקר במולקולות RNA מעכבות שאינו דורש טכניקות הכוונה או התבייתות מיוחדות. הזקיק מתאים למטרה זו בשל גודלו, הימצאות החלל המכיל את נוזל הזקיק, וכן השימוש הרוטיני במערכת US וגינאלי לצורך שאיבת ביציות והזרקה תוך זקיקית, שיטה הנתמכת ע"י פיתוח טכנולוגי מתמשך של מכשיר ה-US והגששים (probes). טכניקה זו מקובלת ונמצאת בשימוש זה מספר שנים בעולם וגם בישראל שבה דר' מועלם היה אחד מחלוצי השימוש בה. עובדה זו תסייע לנו בהוצאה לפועל של הניסויים המתוכננים. הזרקה חומר נוזלי לרחם נעשית גם היא באופן רוטיני בהזרעות ובטיפולים קליניים שגרתיים.

### ניסויים שבוצעו בשנת המחקר השנייה

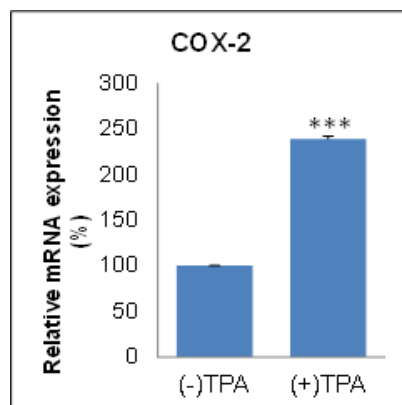
במעבדה של פרופ' רינה מידן נבחנה יכולת ההשתקה של הגן COX-2 ע"י מולוקולות siRNA. בשלב הראשון השתמשנו במודל של תאי אנדותל בהם ניתן להשרות את החלבון ע"י מתן TPA. התוצאות שהתקבלו הדגימו איכות השתקה טובה אם כי רמת האנזים הייתה נמוכה מלכתחילה. בתאי גרנולוזה שטופלו עם פורסקולין הייתה עלייה ברמת האנזים שעוכבה משמעותית ע"י המולוקולות המעכבות.  
במעבדה של ד"ר עוזי מועלם השנה הראשונה הוקדשה ללימוד והתנסות בטכניקה של הזרקה תוך זקיקית *in-vivo* של מעכבי COX-2. נעשו 2 ניסויים בהם נבחנה הזרקה מעכב COX-2 NS-398 לזקיקים פרהאובולטוריים *in-vivo*. בניסוי ראשון נמצא עיכוב במועד הופעת הביוץ כתוצאה מהזרקה המעכב, אבל ללא ביטול הביוץ. בניסוי השני נבחנה סינתיזת PGE<sub>2</sub> לאחר הזרקה המעכב ואכן נמצאו רמות נמוכות של ההורמון אצל פרות להן הוזרק במעכב. ואולם ב-2 הניסויים סינכרון המחזור המיני של הפרות לא צלח אצל חלק מן הפרות, מה שפגע בתוצאות הניסוי.  
במהלך השנה השנייה נמשכה בחינת מעכבי COX-2 על השתקת האנזים. היות והפרשת COX-2 הינה ריאקציה מושרית, בשלב הראשון נבחנה התגובה לאינדוקציה של תאי גרנולוזה ע"י hCG או פורסקולין (FRS) – שני גורמים העשויים להעלות רמת cAMP בתא. התוצאות מוצגות בתרשים מס' 1. שני הגורמים (FRS ו-hCG) השרו התבטאות הגן COX-2 מתאי גרנולוזה באופן משמעותי, עם יתרון ל-FRS (פי 12) לעומת hCG (פי 8).

**תרשים מס' 1:** התבטאות הגן ל- COX-2 בתאי גרנולוזה בתגובה ל- hCG (A) או FRS (B).



למרות ש- FRS לא נמצא באופן טבעי בבעלי חוליות, היות ובעבודה זו הזקיקים שנאספו מבית המטבחיים היו בשלבי התפתחות שונים עם סיכויים שונים להימצאות רצפטורים ל- LH, החלטנו לעשות שימוש ב- FRS ובכך להימנע בתלות התגובה בהימצאות רצפטורים על התאים. באופן דומה נבחנה התבטאות הגן ל- COX-2 בתאי אנדומטריום בהשפעת TPA הידוע כמשרה הפרשת COX-2 בתאים אלה. התוצאות מוצגות בתרשים מס' 2.

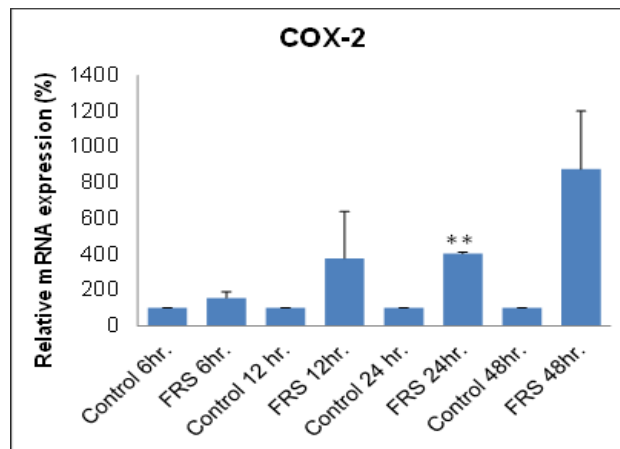
**תרשים מס' 2:** התבטאות הגן ל- COX-2 ע"י תאי אנדומטריום בתגובה ל- TPA.



בשלב השני של העבודה בחנו את התגובה של תאי גרנולוזה ל- FRS בפרקי זמן שונים. ריכוזי ה- COX-2 נקבעו ב- 6, 12, 24 ו- 48 שעות לאחר התחלת האינקובציה. התוצאות מוצגות בתרשים מס' 3.



**תרשים מס' 3:** התבטאות הגן ל- COX-2 ע"י תאי גרנולוזה בתגובה ל- FRS בפרקי זמן שונים לאחר האינדוקציה

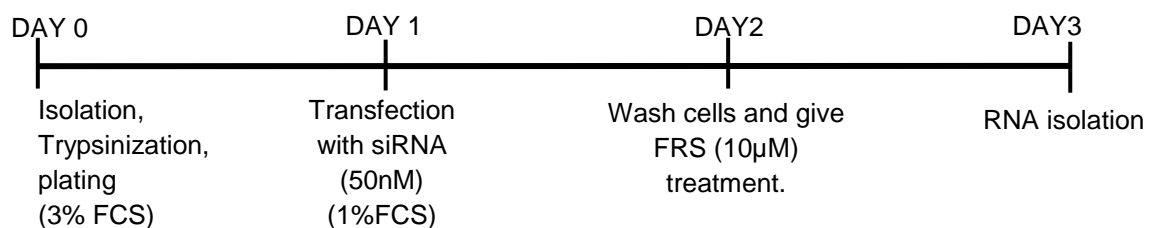


ניתן לראות כי נתקבלה תגובה טובה רק לאחר 12 שעות מתחילת האינדוקציה, עם יציבות יחסית עד ל- 24 שעות ורמות מקסימאליות ב- 48 שעות.

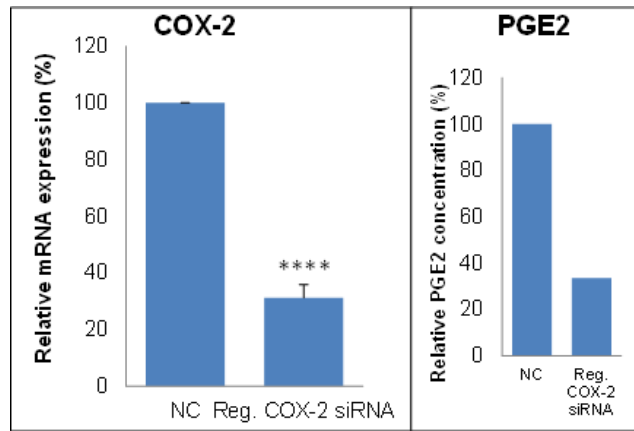
בשלב הבא של הניסוי בחנו את השפעת המעכב siRNA על התבטאות הגן ל- COX-2 ועל הפרשת PGE<sub>2</sub>. המודל שנקבע מוצג בתרשים מס' 4.

**תרשים מס' 4.** פרוטוקול הניסוי לבחינת השפעת מעכב siRNA על התבטאות הגן ל- COX-2

בניסוי הראשון בחנו את השתקת הגן ל- COX-2 ע"י המעכב siRNA וכן על הפרשת ההורמון PGE<sub>2</sub>. שנקבעו בקיט מיוחד להורמון זה במעבדה של ד"ר מועלם. התוצאות מוצגות בתרשים מס' 4.



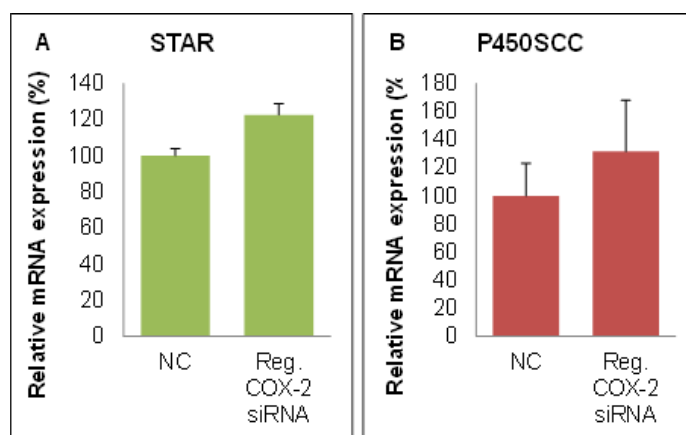
**תרשים מס' 5.** התבטאות הגן ל- COX-2 וריכוזי PGE<sub>2</sub> בתאי גרנולוזה שעברו אינקובציה ע"י siRNA ל- COX-2



מן התוצאות נראה כי המעכב אכן היה אפקטיבי, ורמת COX-2 mRNA הייתה רק 31% מרמתו ללא המעכב. כמו כן ריכוזי ההורמון PGE<sub>2</sub> במדיום ירדו בהשפעת המעכב והם היו רק כשליש מרמתו ללא המעכב.

על מנת לבחון את הספציפיות של המעכב, בחנו התבטאות של מס' גנים לאנזימים רלבנטיים. התוצאות מוצגות בתרשים מס' 6. לא נראו הבדלים ברמות ה- mRNA של STAR ו- P450SCC בין תאי גרנולוזה ללא מעכב ועם siRNA ל- COX-2. מצא זה מעיד על רמת ספציפיות גבוהה של המעכב ל- COX-2.

**תרשים מס' 6.** התבטאות הגן ל- STAR ו- P450SCC בתאי גרנולוזה שעברו אינקובציה ע"י siRNA ל- COX-2



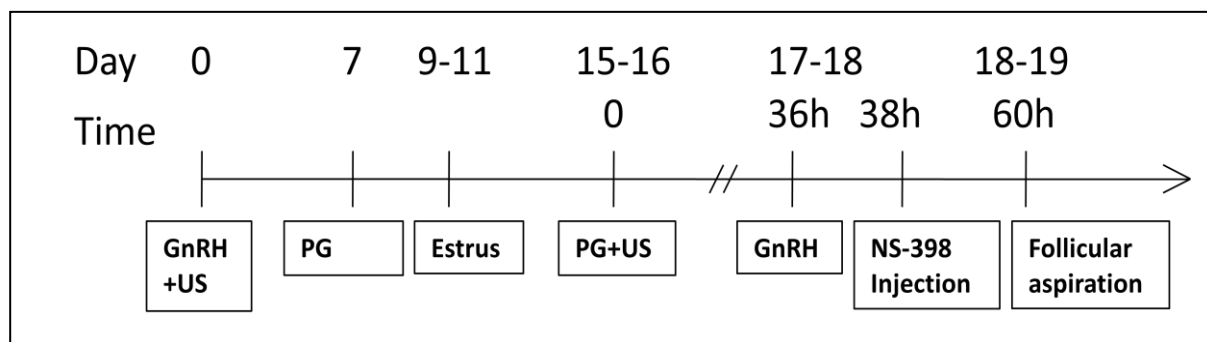
בשלב הבא של העבודה בחנו שימוש בתחליפים לריאגנטי טרנספקציה בהם נעשה שימוש בעבודה in-vitro, בגלל האפשרות להיותם טוקסיים לבעלי החיים. לאחר הניסויים בתחליפים של הריאגנטים,

נבצע ניסויים in-vivo ללא ריאגנטים ונבחן את ההשפעה על התבטאות הגן ל- COX-2 וריכוזי PGE<sub>2</sub> בנוזל הפוליקולרי שיישאב מהשחלות, ובהמשך על הופעת הביזן.

במקביל לניסויי in-vitro בוצע ניסוי נוסף in-vivo על מנת להמשיך ולבחון את השפעת הזרקה של מעכבי COX-2 שונים על ריכוזי ה- PGE<sub>2</sub>.

בניסוי זה עשינו שימוש בפרוטוקול סנכרון שונה מזה שנעשה בניסויים הקודמים על מנת לשפר את שיעור התגובה לסנכרון (תרשים מס' 6). 21 פרות מועמדות נסרקו ע"י אולטרסאונד (US) ולפרות שהראו מופע נורמלי של השחלה בשתי סריקות עוקבות הוזרק אנלוג של GnRH. שבוע לאחר מכן הוזרקה זריקת PG ו-14 פרות שהראו ייחום התנהגותי לאחר זריקת PG השתתפו בניסוי.

**תרשים מס' 6.** פרוטוקול סנכרון מחזור הייחום הזרקות המעכב ושאיבת הנוזל הפוליקולרי



7 ימים לאחר הופעת ייחום התנהגותי הוזרק לפרות PG. 36 שעות לאחר הזרקות PG הוזרק GnRH (זמן 0 בשעות בתרשים מס' 6), ושעתיים לאחר מכן הוזרק סליין לזיקי השחלה של פרות הביקורת או מעכב NS-398 לפרות קבוצת הטיפול. דגימות דם נלקחו מס' פעמים על מנת לעקוב אחר המחזור המיני ושיעור התגובה לסנכרון. 7 פרות שימשו כקבוצת ביקורת ו-7 פרות נוספות שימשו כקבוצת טיפול ולהן הוזרק מעכב COX-2 כפי שיפורט בהמשך.

הזרקות המעכב לזיקי הפרה-אובולטורי נעשתה ע"י שימוש בטכניקה דומה לזו הנעשית בשאיבת נוזל פוליקולרי תחת הרדמה אפידורלית (Moallem et al., 1999). בטכניקה זו תחילה הוזרק לפרה 1 ml של רומפון 2% (XYL-M2 Veterinary, Xylazine base 20mg/ml, מעבדות ביוב, צרפת) לטשטוש, ולאחר מכן הוזרק 5 ml עזרקאין (Esracain 2%, Lidocaine Hcl 2%, 200mg/10ml, מעבדות רפא בע"מ, ירושלים) לחלל האפידורלי מעל בסיס הזנב לשם אלחוש מקומי ושחרור שרירי הרקטום. בעת ההזרקה הוחדר מתמר וגינאלי אשר דרכו עובר מוביל ובקצהו מחט חד פעמית בקוטר 23G. לזיקים של פרות הטיפול הוזרק נפח כולל של 100 µL של המעכב NS-398 בריכוז של 1mM. לפרות הביקורת הוזרק נפח של 100 µL סליין. המעכב והסליין הוזרקו לכל הזיקים שקוטרם היה מעל 7 מ"מ.

## תוצאות:

על פי בדיקות פרוגסטרוגן בדם, 13 פרות הגיבו באופן תקין ל-PG הראשון שהוזרק ו-10 פרות בלבד הגיבו באופן נורמלי לזריקת PG שני. תגובה תקינה נחשבה ככזו שהביאה לנסיגת הגוף הצהוב וגרמה לירידה בריכוזי הפרוגסטרוגן בפלסמה.

בסך הכול הוזרק סליין ל-4 פרות ביקורת ומעכב NS-398 ל-6 פרות טיפול. בדיקת ריכוזי ה-PGE<sub>2</sub> בנוזל הפוליקולרי הייתה 8.74 ng/ml לעומת 7.69 ng/ml בקבוצת הטיפול. בניסוי זה נמצא שיפור ניכר בתגובה לסנכרון ובטכניקת ההזרקה לזקיק, ואולם לא נמצאו ריכוזים נמוכים יותר של PGE<sub>2</sub> אצל פרות שהוזרק להן ומעכב NS-398.

## דיון מסכם לשנה השנייה:

השנה הראשונה שמשמה בעיקר להכרת מערכות הניסוי הן ברמת הפרה החיה והן בתאים *in vitro*. במעבדה של פרופ' רינה מידן נבחנה יכולת ההשתקה של הגן COX-2 ע"י מולוקולות siRNA. בשלב הראשון השתמשנו במודל של תאי אנדותל בהם ניתן להשרות את החלבון ע"י מתן TPA. במעבדה של ד"ר עוזי מועלם נעשו 2 ניסויים בהם נבחנה הזרקת מעכב COX-2 NS-398 לזקיקים פרהאובולטוריים *in-vivo*. בניסוי ראשון נמצא עיכוב במועד הופעת הביוץ כתוצאה מהזרקת המעכב, אבל לא ביטול הביוץ. בניסוי השני נבחנה סינתיזת PGE<sub>2</sub> לאחר הזרקת המעכב ואכן נמצאו רמות נמוכות של ההורמון אצל פרות להן הוזרק במעכב.

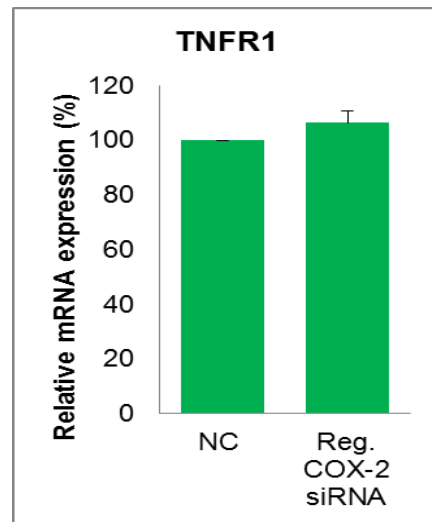
במהלך השנה השנייה נבחנה התבטאות הגן ל-COX-2 בתאי גרנולוזה בתגובה ל-hCG או FRS. שני הגורמים (hCG ו-FRS) השרו התבטאות הגן COX-2 מתאי גרנולוזה באופן משמעותי, עם יתרון ל-FRS (פי 12) לעומת hCG (פי 8). החלטנו לעשות שימוש ב-FRS ובכך להימנע בתלות התגובה בהימצאות רצפטורים על התאים. באופן דומה נבחנה התבטאות הגן ל-COX-2 בתאי אנדומטריום בהשפעת TPA הידוע כמשרה הפרשת COX-2 בתאים אלה.

בשלב הבא בחנו את התבטאות הגן ל-COX-2 ע"י תאי גרנולוזה בתגובה ל-FRS בפרקי זמן שונים לאחר האינדוקציה. נתקבלה תגובה טובה רק לאחר 12 שעות מתחילת האינדוקציה, עם יציבות יחסית עד ל-24 שעות ורמות מקסימאליות ב-48 שעות. בשלב הבא של הניסוי בחנו את השפעת המעכב siRNA על התבטאות הגן ל-COX-2 ועל הפרשת PGE<sub>2</sub>. המעכב אכן היה אפקטיבי, ורמת COX-2 mRNA הייתה רק 31% מרמתו ללא המעכב. כמו כן ריכוזי ההורמון PGE<sub>2</sub> במדיום ירדו בהשפעת המעכב והם היו רק כשליש מרמתו ללא המעכב. על מנת לבחון את הספציפיות של המעכב, בחנו התבטאות של מס' גנים לאנזימים רלבנטיים ונמצאה רמת ספציפיות גבוהה של המעכב ל-COX-2. בנוסף נעשה ניסוי *in-vivo* ובו נוסה פרוטוקול סנכרון שונה של הפרות. אכן נמצא שיפור בתגובה לסנכרון ושיפור בטכניקת השאיבה, אבל לא נמצא ריכוז נמוך יותר של PGE<sub>2</sub> בזקיקים שנשאבו לאחר הזרקת המעכב NS-398.

## שנה שלישית של המחקר

בשנה השלישית של המחקר בחנו את הספציפיות של המעכב COX-2 לגנים נוספים בתאי אנדומטריום בנוסף לאלה שנבחנו בתאי גרנולוזה (P450SCC -I STAR).

**תרשים מס' 7.** התבטאות הגן ל- **TNFR1** בתאי אנדומטריום שעברו אינקובציה ע"י siRNA ל- COX-2



ניתן לראות כי גם בתאי אנדומטריום לא היה עיכוב בהתבטאות הגן ל- **TNFR1** אשר מעיד על ספציפיות המעכב.

בכל השלבים המוקדמים של העבודה נעשה שימוש בריאגנטי טרנספקציה העלולים להיות טוקסיים לבעל החיים. על מנת לבצע ניסוי in-vivo, קיים צורך למצוא תחליפים שיהיו בטוחים לבעל החיים. בשלב הזה של העבודה נעשה ניסיון להשתמש בתחליפים לריאגנטיים. בתחילה השתמשנו במעכב קשור לכולסטרול (תרשים מס' 8) - cholesterol conjugated COX-2 siRNA ( Chol.COX-2 ) (siRNA). באופן בלתי צפוי כאשר עשינו שימוש ב- Chol.COX-2 siRNA בתאי גרנולוזה, רוב התאים מתו. לעומת זאת כאשר בצענו את הניסוי בתאי אנדומטריום לא קבלנו תמותה של תאים, וקבלנו תגובת עיכוב צפויה (תרשים מס' 9). לא ברורה הסיבה לתגובה השונה בין שני סוגי התאים.

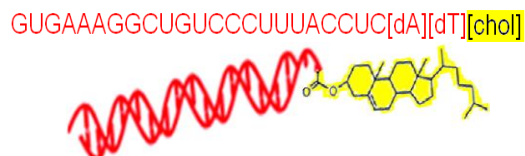
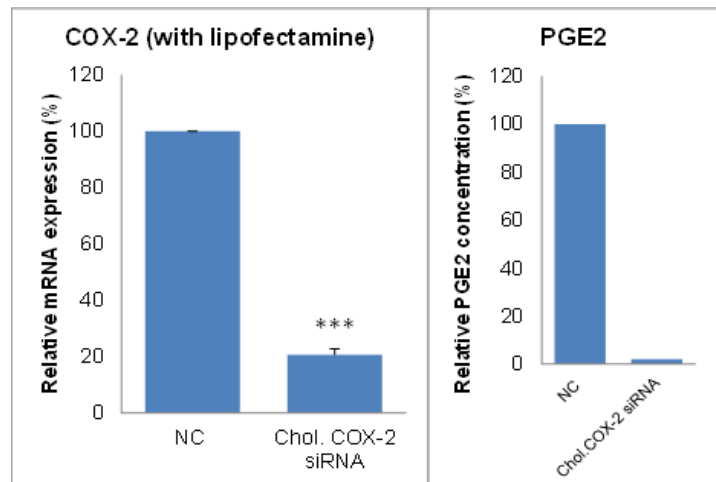


Figure 8. Illustrative COX-2 targeted siRNA

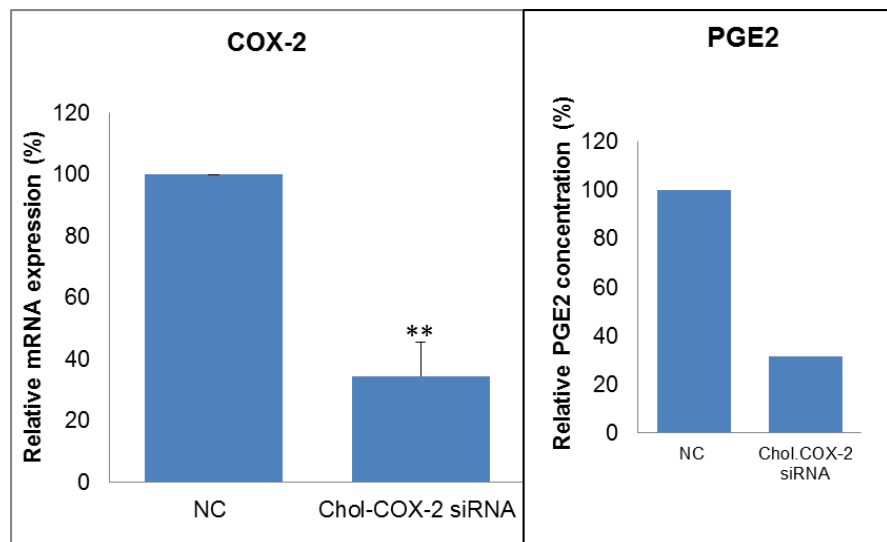
**תרשים מס' 9.** התבטאות הגן ל- COX-2 וריכוזי PGE<sub>2</sub> בתאי אנדומטריום שעברו אינקובציה ע"י Chol.COX-2 siRNA עם ריאגנט (Lipofectamine)



נמצאה ירידה של 81% בהתבטאות הגן ל- COX-2, וירידה של 98% בריכוז PGE<sub>2</sub> בתאי אנדומטריום עם האינקובציה במעבד Chol.COX-2 siRNA (תרשים מס' 9).

על מנת למנוע תמותת תאי גרנולוזה, ביצענו אינקובציה של 4 שעות בלבד עם מעבד Chol.COX-2 siRNA (תרשים מס' 10) עם שימוש בריאגנט. בתנאים אלה קבלנו תגובה טובה למעבד.

**תרשים מס' 10.** התבטאות הגן ל- COX-2 וריכוזי PGE<sub>2</sub> בתאי גרנולוזה שעברו אינקובציה ע"י Chol.COX-2 siRNA למשך 4 שעות בלבד עם ריאגנט (Lipofectamine)

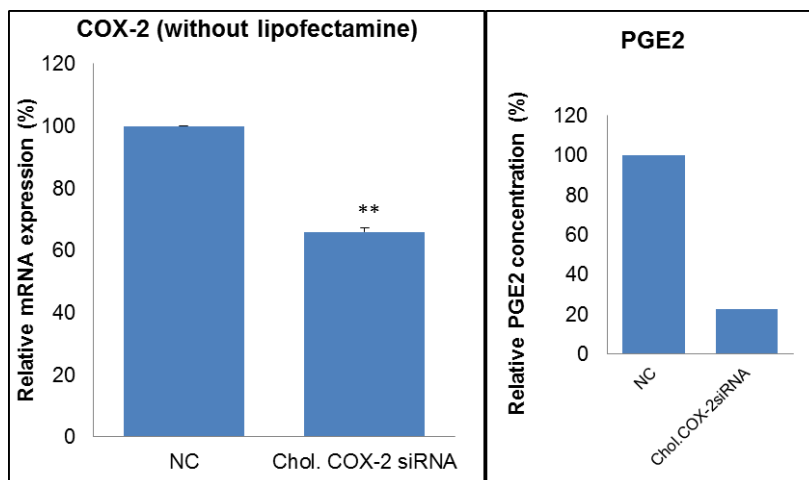


בשלב הבא בצענו אינקובציה של תאי אנדומטריום עם Chol.COX-2 siRNA ללא ריאגנט. כפי שנראה מתרשים מס' 11 הייתה ירידה של 34% בהתבטאות של COX-2 וירידה של 77% בריכוז-

PGE<sub>2</sub>

**תרשים מס' 11.** התבטאות הגן ל- COX-2 וריכוזי PGE<sub>2</sub> בתאי אנדומטריום שעברו אינקובציה ע"י

Chol.COX-2 siRNA ללא ריאגנט



בשלב זה של המחקר ביצענו מבחן ספציפיות של המעכב Chol.COX-2 siRNA ולא נמצא עיכוב על STAR בתאי גרנולוזה, אשר מאשר את ספציפיות המעכב ל- COX-2.

שלב נוסף של המחקר היה בחינה של מס' גנים המעורבים בתהליכים שונים בשחלה ויכולים להיות מושפעים מהשתקה של COX-2 או ירידה בריכוז ה- PGE<sub>2</sub> כמו Amphiregulin ו- Epiregulin, Ptx3 – TNFAIP6. מפתת קוצר היריעה לא יובאו התוצאות בדו"ח זה.

## דיון וסיכום

השנה הראשונה הוקדשה להכרת מערכות הניסוי הן ברמת הפרה החיה והן בתאים *in vitro*. במעבדה של פרופ' רינה מידן נבחנה יכולת ההשתקה של הגן COX-2 ע"י מולוקולות siRNA. בשלב הראשון השתמשנו במודל של תאי אנדותל בהם ניתן להשרות את החלבון ע"י מתן TPA. במעבדה של ד"ר עוזי מועלם נעשו 2 ניסויים בהם נבחנה הזרקת מעכב COX-2 NS-398 לזקיקים פרהאובולטוריים *in-vivo*. בניסוי ראשון נמצא עיכוב במועד הופעת הביץ כתוצאה מהזרקת המעכב, אבל לא ביטול הביץ. בניסוי השני נבחנה סינתזת PGE<sub>2</sub> לאחר הזרקת המעכב ואכן נמצאו רמות נמוכות של ההורמון אצל פרות להן הוזרק במעכב.

במהלך השנה השנייה נבחנה התבטאות הגן ל- COX-2 בתאי גרנולוזה בתגובה ל- hCG או FRS. שני הגורמים (hCG ו- FRS) השרו התבטאות הגן COX-2 מתאי גרנולוזה באופן משמעותי, עם יתרון ל- FRS (פי 12) לעומת hCG (פי 8). החלטנו לעשות שימוש ב- FRS ובכך להימנע בתלות התגובה בהימצאות רצפטורים על התאים. באופן דומה נבחנה התבטאות הגן ל- COX-2 בתאי אנדומטריום בהשפעת TPA הידוע כמשרה הפרשת COX-2 בתאים אלה.

בשלב הבא של הניסוי בחנו את השפעת המעכב siRNA באינקובציה עם ריאגנט טרנספקציה על התבטאות הגן ל- COX-2 ועל הפרשת PGE<sub>2</sub>. המעכב אכן היה אפקטיבי, ורמת COX-2 mRNA הייתה

רק 31% מרמתו ללא המעכב. כמו כן ריכוזי ההורמון  $PGE_2$  במדיום ירדו בהשפעת המעכב והם היו רק כשליש מרמתו ללא המעכב. על מנת לבחון את הספציפיות של המעכב, בחנו התבטאות של מס' גנים לאנזימים רלבנטיים ונמצאה רמת ספציפיות גבוהה של המעכב ל- COX-2.

בנוסף נעשה ניסוי *in-vivo* ובו נוסה פרטוקול סנכרון שונה של הפרות. אכן נמצא שיפור בתגובה לסינכרון ושיפור בטכניקת השאיבה, אבל לא נמצא ריכוז נמוך יותר של  $PGE_2$  בזקיקים שנשאבו לאחר הזרקת המעכב NS-398.

בגלל האפקט הטוקסי שיכול להיות לריאגנט טרנספקציה על בעל החיים, השנה השלישית הוקדשה לבחינת יכולת ההשתקה של המעכב siRNA על התבטאות הגן ל- COX2 וריכוז  $PGE_2$  בתאי גרנולוזה ותאי אנדומטריום ללא שימוש בריאגנט טרנספקציה. בשלב זה בחנו כולסטרוול כנשא של המעכב Chol.COX-2 siRNA. בתאי גרנולוזה שהוגדרו עם מעכב זה נמצא כי רוב התאים מתו, ואילו תגובה טובה נמצאה בתאי אנדומטריום בנוכחות ריאגנט וגם ללא ריאגנט. כאשר ביצענו אינקובציה של תאי גרנולוזה ל- 4 שעות בלבד קבלנו תגובה טובה אבל רק בנוכחות ריאגנט טרנספקציה. בשלב נוסף של המחקר בחנו את השפעת המעכב ל- COX-2 על התבטאות גנים נוספים במעורבים בפעילות השחלתית.

בגלל תמותת תאי גרנולוזה בנוכחות המעכב עם נשא הכולסטרוול - Chol.COX-2 siRNA, והחשש להזרקת מעכב עם ריאגנט טרנספקציה לבעל החיים בגלל האפשרויות לטוקסיות של החומר, לא ביצענו הזרקה *in-vivo* לתוך זקיקי בהשחלה. היות ותופעה דומה לא נתקבלה בתאי האנדומטריום, שקלנו לבצע הזרקה של Chol.COX-2 siRNA ללא הריאגנט לתוך הרחם ובדיקת ההשפעות הפיזיולוגיות שלו – כגון הארכת המחזור המיני, אבל מפאת חוסר תקציב המחקר נעצר בשלב הזה. ביקשנו הארכת בשנה על מנת להשלים את המחקר ובקשתנו לא אושרה.

#### פרסומים מדעיים –

Ketan Shrestha, Karolina Lukasik, Anja Baufeld, Jens Vanselow, Uzi Moallem and Rina Meidan. Regulation Of Ovulatory Genes In Bovine Granulosa Cells: Lessons From siRNA Silencing Of PTGS2. *Reproduction in press*

עבודת מסטר של סטודנט בפקולטה לחקלאות קטאן שקסתה



## References

- Ambros, V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350–355.
- Butler, W. R., and R. D. Smith. 1989. Interrelationship between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 72:767-783 .
- Carletti MZ, Fiedler SD, Christenson LK. MicroRNA 21 blocks apoptosis in mouse periovulatory granulosa cells. *Biol Reprod.* 2010 Aug 1;83(2):286-95
- Folman Y, Rosenberg M, Herz Z, Davidson M. The relationship between plasma progesterone concentration and conception in post-partum dairy cows maintained on two levels of nutrition. *J Reprod Fertil.* 1973 3:267-78
- Garverick, H. A. 1997. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:995–1004.
- Ha, M., Pang, M., Agarwal, V., and Chen, Z.J. (2008) Interspecies Regulation of MicroRNAs and Their Targets. *Biochim Biophys Acta* 1779(11); 735-42.
- Hong X, Luense LJ, McGinnis LK, Nothnick WB, Christenson LK Dicer1 is essential for female fertility and normal development of the female reproductive system. *Endocrinology* 2008; 149: 6207 6212.
- Jordan, E. R. 2003. Effects of heat stress on reproduction. *J. Dairy Sci.* 86:(Suppl.):104–114.
- Kim, V.N. (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(5); 376-85
- Klipper E, Levit A, Mastich Y, Berisha B, Schams D, Meidan R. Induction of endothelin-2 expression by luteinizing hormone and hypoxia: possible role in bovine corpus luteum formation. *Endocrinology.* 2010 151:1914-22 .
- Ko C, Gieske MC, Al-Alem L, Hahn Y, Su W, Gong MC, Iglarz M, Koo Y. Endothelin-2 in ovarian follicle rupture. *Endocrinology.* 2006 147:1770-9
- Mamluk R, Greber Y, Meidan R. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid expression for steroidogenic factor-1, steroidogenic acute regulatory protein, and

cytochrome P450 side-chain cleavage in bovine luteal cells. *Biol Reprod.* 1999 60:628-34.

Manjunath N, Dykxhoorn DM. Advances in synthetic siRNA delivery. *Discov Med.* 2010 48:418-30.

Moallem, U., Y. Folman, A. Bor, A. Arav, and D. Sklan. 1999. Effect of calcium soaps of fatty acids and administration of somatotropin on milk production, preovulatory follicular development, and plasma and follicular fluid lipid composition in high yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:2358–2368.

Rathbone MJ, Macmillan KL, Inskeep K, Burggraaf S, Bunt CR 1998 Fertility regulation in cattle. *J Control Release* 54:117-48

Rayhman O, Klipper E, Muller L, Davidson B, Reich R, Meidan R. Small interfering RNA molecules targeting endothelin-converting enzyme-1 inhibit endothelin-1 synthesis and the invasive phenotype of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 2008 68 :9265-73.

Savio JD, Thatcher WW, Morris GR, Entwistle K, Drost M, Mattiacci MR 1993 Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *J Reprod Fertil* 98:77-84

Sheldon IM, Noakes DE, Dobson H. Effect of the regressing corpus luteum of pregnancy on ovarian folliculogenesis after parturition in cattle. *Biol Reprod.* 2002 66:266-71

Siqueira LG, Torres CA, Souza ED, Monteiro PL Jr, Arashiro EK, Camargo LS, Fernandes CA, Viana JH. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. *Theriogenology.* 2009 72:949-58.

Stock AE, Fortune JE 1993 Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* 132:1108-14

Tiemann K, Rossi JJ. RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects. *EMBO Mol Med.* 2009 3:142-51.

Tuschl T. RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem*. 2001 2;239-45. Review

Wiltbank, M. C., A Gumen, and R. Sartori. 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57:21-52

Yao N, Lu CL, Zhao JJ, Xia HF, Sun DG, Shi XQ, Wang C, Li D, Cui Y, Ma X. A network of miRNAs expressed in the ovary are regulated by FSH. *Front Biosci*. 2009 14:3239-45.

### סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

**הערה:** נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
מטרות המחקר היו לבחון את השפעת מעכבי COX-2 בזיק קדם ביוצי על הביוץ והתפתחות ציסטות. בתוכנית מחקר זו בחנו השפעת מעכב siRNA על התבטאות הגן ל- COX-2 בתרבית תאים במעבדה, וכמו כן בחנו הזרקת מעכבים אחרים in-vivo.
עיקרי התוצאות.
נתקבל עיכוב אפקטיבי של התבטאות הגן ל- COX-2 בתאי גרנולוזה ותאי אנדומטריום לאחר אינדוקציה עם siRNA. המעכב נמצא ספציפי ל- COX-2. כמו כן נמצא עיכוב בהפרשת PGE2 בתאי גרנולוזה. במקביל ביצענו הזרקות של המעכב NS-398 לזיקים קדם ביוציים בפרות in-vivo וקבלנו תוצאות חלקיות. בחנו את האפקט ללא ריאגנט טרנספקציה וקבלנו תמותת תאי גרנולוזה והצלחה בתאי אנדומטריום.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדו"ח?
המטרות הושגו ואכן בעבודה in-vitro הושג עיכוב בהתבטאות COX-2 בתאי גרנולוזה ובתאי אנדומטריום. בהזרקה in-vivo של מעכבים אחרים, קבלנו תוצאות חלקיות בהזרקת המעכב NS-398. בגלל הטוקסיות האפשרית של ריאגנטי טרנספקציה נעשה שימוש בכולסטרול כנשא של המעכב וקבלנו תמותה של תאי גרנולוזה, ולכן לא הזרקנו את מעכב ה- COX-2 לזיקי פרות in-vivo
בעיות שנתרו לפתרון ואו שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר
הבעיה שנתרה לפיתרון היא שימוש בריאגנטי טרנספקציה שאינם טוקסיים לבעל החיים, על מנת שנוכל לבחון את האפקט של המעכב in-vivo. השימוש ברכיבים אחרים בפלטפורמה אחרת להחדרת המעכב (כולסטרול) גרם לתמותה של תאי גרנולוזה ולכן לא בחנו את העיכוב in-vivo.

הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטוט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי;
K Shrestha, K Lukasik, A Baufeld, J Vanselow, U Moallem and R Meidan.
Regulation Of Ovulatory Genes In Bovine Granulosa Cells: Lessons From siRNA Silencing Of
PTGS2. Reproduction <i>in press</i>
עבודת מסטר של סטודנט.
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
◀ ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
◀ חסוי – לא לפרסום: יש לצרף אישור ומידע ממוסד המחקר –
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -
בקשנו להאריך את המחקר בשנה על מנת להשלים את העבודה ובקשתנו נדחתה.

\*יש לענות על שאלה זו רק בדו"ח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדו"ח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים