

תיאור מולקולרי של הקולטן ל- PBAN בנקבות העש

Helicoverpa armigera

עבודת הגמר

מוגשת לחוג לביוטכנולוגיה

של האוניברסיטה העברית בירושלים

לשם קבלת תואר "מוסמך בביוטכנולוגיה"

מאת:

לירון בקר

נובמבר 2006

כסלו תשס"ז

עבודה זו נעשתה בהדרכתה של:

פרופסור עדה רפאלי, מכון וולקני

שלמי תודות

תקופת המחקר הייתה ללא ספק מעניינת ומרתקת עבורי, הן מהבחינה המקצועית והן מהבחינה האישית. לשמחתי הרבה, התאפשר לי לשלב בין השניים בהרמוניה, וזאת בזכות אלה שסייעו לי וליוו אותי, ועל כך אני מבקשת להודות להם מקרב לב:

פרופסור עדה רפאלי ראשונה לקבל את תודתי על כל שהעניקה לי- ההזדמנות לבצע את המחקר, ההדרכה המעולה, הסיוע הרב, העצות הטובות ביותר, התמיכה והגיבוי, והעידוד לכל אורך הדרך ובעיקר ברגעים הקשים. זכיתי להנות מניסיונה העצום, בקיאותה הרבה, נועם הליכותיה, יחסה החם, גישתה האוהדת ודבריה שנאמרו תמיד בנחת.

לאבי עזריאלי, תודה על עבודת גידול העש, על הסיוע הרב לעבודתי, הן מהצד הטכני והן מהצד הרעיוני, ועל האווירה הנעימה שאתה משרה במעבדה.

לרחלי בובר, חברתי למעבדה, תודה על כך שלימדת אותי את מרבית שיטות העבודה במעבדה שהיו כה נחוצות לעבודתי, על שיתוף הפעולה הרב מצידך שהוליד פרק נוסף וחשוב בעבודה, על השעות הרבות שהקדשת בכדי לסייע לי, על הסבלנות הרבה, ועל כך שלימדת אותי מניסיוןך, הן במחקר והן בחיים.

ליתר חברי למעבדה בשנתיים האחרונות, **וידיה, אורלי, זיו, אורן, אלכס וליאן**, תודה על עזרתכם בהיבטים השונים של עבודתי, על השיחות המעניינות ועל כך שיצרנו כולנו, יחד עם עדה, אבי ורחלי, תא מגובש, שמח ויצירתי.

ולבסוף, לבני משפחתי היקרים, הוריי **שרי ודרור** ואחותי **נועה**, ולבן זוגי **דניאל**, תודה לכם על שהאמנתם בי, תמכתם בי וחיזקתם את ידי לאורך כל הדרך.

כולכם תבואו על הברכה.

תוכן העניינים:

עמוד

6	רשימת קיצורים ומונחים
9	רשימת איורים
11	רשימת טבלאות
12	תקציר
15	הקדמה
16	מטרות העבודה
18	1. מבוא
18	1.1 (1.1) תקשורת כימית בחרקים
19	1.2 (1.2) המין <i>Helicoverpa armigera</i>
20	1.3 (1.3) התנהגות מינית בעש
20	1.4 (1.4) תהליך ייצור פרומון המין
21	1.5 (1.5) בקרת סינתזת פרומון המין
23	1.6 (1.6) PBAN ואופן פעולתו
23	1.6.1 (1.6.1) PBAN
28	1.6.2 (1.6.2) נוכחות PBAN ו/או פפטידים דמויי-PBAN ברקמות השונות
29	1.6.3 (1.6.3) אתר המטרה של PBAN
30	1.6.4 (1.6.4) מסלול הולכת הסיגנל ותיווך שליחים משניים
34	1.7 (1.7) G protein-coupled receptors (GPCRs)
35	1.8 (1.8) הקולטן של PBAN
41	1.9 (1.9) סיכום
43	2. שיטות וחומרים
43	רשימת חומרים וציוד
45	2.1 (2.1) העש <i>Helicoverpa armigera</i> ותנאי גידולו
46	2.2 (2.2) יצירת ובידוד הליגנד Atf-Bct-NHS-PBAN
47	2.3 (2.3) בידוד וזיהוי האנלוג Atf-Bct-NHS-PBAN
	2.4 (2.4) זיהוי הקולטן ל-PBAN באמצעות הליגנד Atf-Bct-NHS-PBAN ועל ידי
47	SDS-PAGE
48	2.4.1 (2.4.1) התאמת השיטה הקיימת לרקמות השונות
48	2.4.2 (2.4.2) הכנת הבלוטות והרקמות השונות למבחני הקשירה
49	2.4.3 (2.4.3) הפקת הממברנות מהרקמות השונות
49	2.4.4 (2.4.4) מבחן קשירה בין הליגנד והקולטן הנחקר ברקמה

עמוד

50	2.4.5 קביעת חלבון בדוגמאות הממברנות
51	2.4.6 SDS-PAGE ו- Western blot
52	2.5 קביעת פעילות פרומונטרופית על ידי תגובת שליחים משניים
52	2.5.1 הפקת cAMP
53	2.5.2 Radio Immuno Assay (RIA)
54	2.6 בחינת הפעילות הפרומונטרופית של פפטידים דמויי- PBAN
54	2.6.1 ייצור פרומון <i>in vitro</i>
55	2.6.2 הפרדה ב- Gas Chromatograph
55	2.7 בחינת חוסמי תעלת סידן
56	2.8 קביעת ביטוי הגן ל- PBAN-R ברקמות השונות
56	2.8.1 הכנת הבלוטות והרקמות השונות להפקת ה- RNA
57	2.8.2 הפקת RNA
58	2.8.3 הפיכת ה- RNA ל- cDNA (Reverse Transcription)
59	2.8.4 אנליזה לתוצרי ה- PCR
59	2.8.5 מיצוי ה- DNA מהג'ל
60	2.9 ניתוח סטטיסטי
61	3. תוצאות
61	3.1 הבהרת נוכחותו של חלבון הקולטן ל- PBAN ברקמות שונות
70	3.2 קביעת ביטוי הגן ל- PBAN-R ברקמות השונות
75	3.3 קביעת פעילות פרומונטרופית על ידי תגובת שליחים משניים
78	3.4 בחינת השפעת חוסמי תעלות סידן על ביוסינתזת פרומון המין
81	3.5 בחינת הפעילות הפרומונטרופית של פפטידים דמויי- PBAN
88	4. דיון
100	רשימת ספרות
124	תקציר באנגלית

1. **7TM**- seven transmembrane receptors
2. **AG**- Abdominal ganglia
3. **Atf-Bct-NHS-PBAN**- (N-[N-azido-tetrafluorobenzoyl] biocytinyloxyl-succinimide)- pheromone biosynthesis activating neuropeptide
4. **B + S**- Bursa & Spermatheca
5. **Br**- Brain
6. **Br-SOG**- brain-subesophageal ganglion complex
7. **BSA**- bovine serum albumin
8. **CA**- corpora allata
9. **Ca²⁺**- calcium ions
10. **CaM**- calmodulin
11. **cAMP**- cyclic AMP (3',5'-cyclic monophosphate)
12. **CC**- corpora cardiaca
13. **CNS**- Central Nervous System
14. **cpm**- counts per minute
15. **D (Displacement)**- a binding treatment performed on membrane preparations from the tested tissues, in a presence of *Hez*-PBAN ligand labeled with a photo affinity group (Atf-Bct-NHS-PBAN) and with biotin in an excess of unlabeled *Hez*-PBAN.
16. **DH**- Diapuse Hormone
17. **DMF**- Dimethyl formamide
18. **E (Endogenous)**- a binding treatment performed on membrane preparations from the tested tissues, without supplement of *Hez*-PBAN
19. **E-value**- Expect value; a parameter that describes the number of hits one can expect to see just by chance. In other words, it is the frequency of occurrence by chance for a reporting alignment. For example, an E-value of 1 assigned to a hit means in a database of particular size one might expect to see one match of particular length with similar percent identity by chance.

20. **EC₅₀**- Effective Concentration; the concentration of a ligand, which produces 50% of the maximum possible response for that ligand (e.g. binding to a receptor or pheromone production)
21. **ETH**- Ecdysis Triggering Hormone
22. **GC**- Gas Chromatograph
23. **GI**- Pheromone glands
24. **GPCR**- G-protein-coupled receptor
25. **Hez-PBAN**- *Helicoverpa zea* pheromone biosynthesis activating neuropeptide
26. **HPLC**- High performance liquid chromatograph
27. **HRP**- horseradish peroxidase
28. **IBMX**- 3-Isobutyl-1-methylxanthine
29. **IDV**- integrated density value
30. **IDV_D**- IDV received for the displacement treatment
31. **IDV_E**- IDV received for the endogenous treatment
32. **IDV_L**- IDV received for the labeling treatment
33. **JH**- Juvenile hormone
34. **L (Labeled)**- binding of *Hez*-PBAN ligand labeled with a photo affinity group (Atf-Bct-NHS-PBAN) and with biotin to membrane preparation from the tested tissues
35. **LPK**- Leucopyrokinin
36. **LPK₄₋₈**- the FTPRLamide C-terminal end of Leucopyrokinin
37. **M**- Wing muscle
38. **Md**- Myomodulin
39. **MRCH**- Melanization and reddish coloration hormone
40. **NMU**- Neuromedin U
41. **PBAN**- Pheromone biosynthesis activating neuropeptide
42. **PBAN-R**- Pheromone biosynthesis activating neuropeptide
43. **PCR**- Polymerase chain reaction
44. **PGNs**- PBAN gene neuropeptides (PBAN gene products)
45. **PGN-7**- 7 amino acid-long PBAN gene product
46. **PGN-8**- 8 amino acid-long PBAN gene product
47. **PGN-18**- 18 amino acid-long PBAN gene product
48. **PGN-24**- 24 amino acid-long PBAN gene product

49. **Pss-Pt**- Pheromonotropin
50. **RIA**- Radio Immuno Assay
51. **RMCE**- Receptor-mediated calcium entry
52. **RT-PCR**- Reverse transcription polymerase chain reaction
53. **SDS-PAGE**- Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis
54. **SEM**- standard error of the means
55. **Sf9 cells**- a cell line derived from *Spodoptera frugiperda*, that expresses the gene of *H. zea* PBAN-R
56. **SOG**- subesophageal ganglion
57. **TAG**- Terminal abdominal ganglion
58. **TFA**-Trifluoroacetic acid
59. **TG**- Thoracic ganglion
60. **UV**- Ultra violet
61. **VNC**- Ventral nerve cord
62. **Z9-16:Ald**- (Z)-9-hexadecenal
63. **Z11-16:Ald**- (Z)-11-hexadecenal
64. **Z11-16:OH**- (Z)-11-hexadecenol

רשימת איורים

עמוד

	איור 1: סכימה המתארת את ההתנהגות הרבייתית ואת מערכת העצבים
24	ב- <i>Helicoverpa spp.</i>
	איור 2: משפחת פפטידי ה- PBAN/pyrokinin ופפטידים דומים
25	(FxPRXamide, PRXamide)
	איור 3: שליחים משניים המתווכים בביוסינתזת פרומון המין
32
	איור 4: דוגמת Western blot המראה נוכחות PBAN-R <u>בבלוטות פרומון המין</u> של
62	נקבות בוגרות באמצעות שימוש בליגנד Atf-Bct-NHS-PBAN
	איור 5: דוגמת Western blot המראה נוכחות PBAN-R ספציפי ל- PBAN <u>בגנגליוני</u>
63	<u>החזה</u> של נקבות בוגרות באמצעות שימוש בליגנד Atf-Bct-NHS-PBAN
	איור 6: דוגמת Western blot המראה נוכחות PBAN-R ספציפי ל- PBAN <u>בצינור</u>
64	<u>העצבי</u> של נקבות בוגרות באמצעות שימוש בליגנד Atf-Bct-NHS-PBAN
	איור 7: דוגמת Western blot המראה נוכחות PBAN-R ספציפי ל- PBAN <u>במוחות</u>
66	של נקבות בוגרות באמצעות שימוש בליגנד Atf-Bct-NHS-PBAN
	איור 8: דוגמת Western blot שבוצע ב- <u>Bursa & Spermatheca</u> ובשריר הכנף,
67	לפיו לא ניתן להמחיש את נוכחות ה- PBAN-R ברקמות אלו
	איור 9: דוגמת Western blot המעיד על ביטוי PBAN-R ספציפי ל- PBAN <u>בתאי</u>
	<u>Sf9</u> אליהם הוחדר הגן לקולטן באמצעות שימוש בליגנד Atf-Bct-NHS-PBAN,
68	ומאמת את זיהוי PBAN-R ברקמות השונות
	איור 10: דוגמת הרצה לתוצרי PCR שמקורם ב- GI, המראה נוכחות מקטע cDNA
70	באורך 81 bp
	איור 11: דוגמת הרצה לתוצרי PCR שמקורם ברקמות השונות, המראה נוכחות
71	מקטע cDNA באורך 81 bp
	איור 12: השוואת alignment בין רצף ה- cDNA <u>מה-GI</u> ורצף הגן ל- PBAN-R
71	ב- <i>H. armigera</i>
	איור 13: השוואת alignment בין רצף ה- cDNA <u>מה-TG</u> ורצף הגן ל- PBAN-R
72	ב- <i>H. armigera</i>
	איור 14: השוואת alignment בין רצף ה- cDNA <u>מה-VNC</u> ורצף הגן ל- PBAN-R
72	ב- <i>H. armigera</i>
	איור 15: השוואת alignment בין רצף ה- cDNA <u>מה-Br</u> ורצף הגן ל- PBAN-R
73	ב- <i>H. armigera</i>

עמוד

איור 16:	השוואת alignment בין רצף ה- cDNA מה- <u>M</u> ורצף הגן ל- PBAN-R	
73	ב- <i>H. armigera</i>	
איור 17:	השפעת ה- PBAN על רמות ה- cAMP הנוצרות בבלוטת הפרומון	76
איור 18:	השפעת ה- PBAN על רמות cAMP הנוצרות	
77	ב- Bursa & Spermatheca	
איור 19:	השפעת ה- PBAN על רמות cAMP בשריר הכנף	78
איור 20:	תגובת בלוטות פרומון המין לנוכחות ולהיעדר Ca^{2+}	79
איור 21:	תגובת בלוטות פרומון המין ל- amiloride	80
איור 22:	תגובת בלוטות פרומון המין ל- verapamil	81
איור 23:	עקומת תגובת ייצור פרומון כנגד ריכוזים שונים של Pss-Pt בהשוואה	
82	ל- Hez-PBAN	
איור 24:	עקומת תגובת ייצור פרומון כנגד ריכוזים שונים של PGN-7 בהשוואה	
83	ל- Hez-PBAN	
איור 25:	עקומת תגובת ייצור פרומון כנגד ריכוזים שונים של PGN-8 בהשוואה	
83	ל- Hez-PBAN	
איור 26:	עקומת תגובת ייצור פרומון כנגד ריכוזים שונים של PGN-24 בהשוואה	
84	ל- Hez-PBAN	
איור 27:	עקומת תגובת ייצור פרומון כנגד ריכוזים שונים של LPK בהשוואה	
84	ל- Hez-PBAN	
איור 28:	עקומת תגובת ייצור פרומון כנגד ריכוזים שונים של NMU בהשוואה	
85	ל- Hez-PBAN	
איור 29:	עקומת תגובת ייצור פרומון כנגד ריכוזים שונים של Md בהשוואה	
85	ל- Hez-PBAN	

רשימת טבלאות

עמוד

- טבלה 1:** השוואה בין טיפולי ה- Labeling וה- Displacement בערכי ה- IDV
69 היחסיים ברקמות הנבחנות
- טבלה 2:** סיכום השוואות ה- alignment בין רצפי ה- cDNA מהרקמות הנבחנות
74 ורצף הגן ל- PBAN-R ב- *H. armigera*
- טבלה 3:** תכונות הפפטידים הנבחנים
87

תקציר

העש *Helicoverpa armigera*, חרק מודל של המחקר הנוכחי, שייך למשפחת התנשמיים ומהווה מזיק לגידולים חקלאיים רבים ברחבי העולם. הוא פעיל בשעות הלילה ומשתמש בתקשורת כימית לצורך התרבותו. נקבות העש משחררות תערובת של פרמוני מין למשיכת הזכרים להזדווגות. ייצור פרמוני המין על ידי נקבות *H. armigera* נעשה בבלוטת הפרומון. הפחתת אוכלוסיית מין העש המזיק תלויה במידה רבה בפיתוח אמצעי בקרה שונים על שחרור פרומון המין. לכן, ישנה חשיבות רבה להבנת המנגנונים המולקולריים, האחראיים לייצור הפרמונים, על מנת למצוא אסטרטגיות להפרעת הזיווג.

במיני עש רבים, סינתזת פרמוני המין נעשית תחת בקרת יום ולילה ומתווכת על ידי נירופפטיד, הנוצר בגנגליון התת ושטי, הממוקם ליד המוח, ומכונה PBAN (נירופפטיד המאקטב סינתזת פרומון). PBAN שייך למשפחת פפטידים בעלי תפקידים שונים - FxPRLamide (x=G, S or T), הנושאים את הרצף PBAN- pyrokinin peptide family בקצה ה-C טרמינלי, המהווה את הרצף החיוני והמינימלי לפעילות פרומוטרופית. בבלוטת הפרומון של נקבות עש מהמין *Helicoverpa zea* זוהה קולטן ל-PBAN (PBAN-R), המצומד לחלבון G. קולטנים נוספים ל-PBAN נמצאו במינים נוספים, כולל *H. armigera*. המינים *H. armigera* ו-*H. zea* קרובים במידה רבה, ו-PBAN-R דומה בשני המינים. על ידי שימוש באנלוג ל-PBAN, המסומן בקבוצת פוטואפיניות וב-biotin, ובבלוטת פרומון של נקבות בוגרות מהמין *H. armigera*, הומחשה קשירה ספציפית של PBAN לחלבון הקשור לממברנה של כ-50 kDa.

המטרה העיקרית של מחקר זה היא אפיון הקולטן ל-PBAN בעש, ברמת החלבון והגן. מחקר זה, המבוצע בנקבות עש מהמין *H. armigera*, בוחן את השערת המחקר, לפיה קיימים קולטנים ל-PBAN ברקמות שונות בגוף העש נוסף לבלוטת פרומון המין, ושאותם קולטנים מהווים אתרי פעולה לפעילויות נוספות של PBAN או של פפטידים דמויי-PBAN השייכים למשפחת ה-FxPRLamide. בחלק הראשון של העבודה נקבעה הנוכחות האפשרית של PBAN-R ברמת החלבון ברקמות נוספות לבלוטת הפרומון ובתאי Sf9 המבטאים את הגן לקולטן של *H. zea*, הדומה במידה רבה לקולטן מ-*H. armigera*. השימוש בתאי ה-Sf9 מהווה ביקורת חיובית לבדיקה ביולוגית, המבוססת על קשירת ליגנד מסומן ל-PBAN-R. בחלק השני של העבודה נבחנה נוכחותו של הגן לקולטן ברקמות השונות בכדי לאמת, כי החלבונים שזוהו ברקמות הם אכן קולטנים ל-PBAN. בחלק השלישי נחקרה מעורבות שליחים משניים בביוסינתזת פרומון המין, על מנת לברר את תפקיד הקולטן ל-PBAN בביוסינתזת הפרומון ברמת התא, בבלוטת פרומון המין. בחלק הרביעי והאחרון של העבודה נבחנה הפעילות הפרומוטרופית של פפטידים ממשפחת

ה- pyrokinin-PBAN ושל פפטידים דומים ל-PBAN, בבלוטות הפרומון של נקבות *H. armigera*.

הניסיון לזהות את חלבון הקולטן ל-PBAN ברקמות השונות נעשה באמצעות בדיקה ביולוגית, המבוססת על קשירת ליגנד PBAN מסומן בקבוצת פוטואפיניות וב-biotin לממברנות שהופקו מהרקמות, ועל ידי אנליזת SDS-PAGE ו-Western blot לחלבונים אליהם נקשר הליגנד המסומן. בניסויים אלו נמצאו חלבונים במשקל מולקולרי של 50 kDa במוח, בגנגליון החזה, בצינור העצבי ובבלוטות הפרומון, כמו גם בתאי ה-Sf9 המבטאים את הגן ל-PBAN-R של *H. zea*. בכל הרקמות הללו נמצא גם, כי ליגנד PBAN שאינו מסומן שניתן בעודף במקביל לליגנד המסומן הצליח לדחוק את הליגנד המסומן מהקשירה לקולטן. הדבר מעיד על נוכחות קולטנים ל-PBAN או קולטנים דומים ל-PBAN-R, הספציפיים ל-PBAN ברקמות העצביות בגוף העש. עם זאת, בשתי רקמות אחרות שנבחנו, שריר הכנף וה-bursa & spermatheca, המחשת נוכחותו של חלבון הקולטן לא התאפשרה באמצעות שיטת ה-Western blot. בשתי רקמות אלו נערך מבחן כמותי *in vitro* לבדיקת נוכחותו של PBAN-R, המבוסס על העובדה, כי רמתו התוך תאית בבלוטת פרומון המין של השליח המשני בביוסינתזת פרומון המין, cyclic-AMP (cAMP), עולה כתוצאה מזירוז על ידי PBAN. בשריר הכנף וב-bursa & spermatheca לא נמצאה השפעה מובהקת של מתן PBAN חיצוני על ייצור ה-cAMP, בניגוד לבלוטות פרומון המין, ששימשו כביקורת חיובית בניסויים אלו, בהן נצפתה עליה מובהקת בייצור ה-cAMP כפונקציה של ריכוז ה-PBAN במדיום ההדגרה. משמעות הדבר היא, כי שריר הכנף וה-bursa & spermatheca אינם מגיבים לזירוז על ידי PBAN, או ש-PBAN משרה מסלול שונה של שליחים משניים ברקמות אלו.

נוכחות הגן ל-PBAN-R או לקולטן הדומה ל-PBAN-R ברקמות השונות של נקבות *H. armigera* נקבעה על פי נוכחותו של mRNA, שה-cDNA ממנו הוא משועתק, מקודד ל-PBAN-R (או לקולטן דומה), בכל אחת מהרקמות. תחלים עוצבו כנגד הקולטן ל-PBAN, ובחיפוש ב-Blast שנערך לרצפי ה-cDNA שהתקבלו מהרקמות השונות, רצפים אלו נמצאו דומים במידה רבה (96%-100% הומוולוגיה) לרצף המופיע ב-GenBank של הגן ל-PBAN-R מבלוטות פרומון המין של *H. armigera*. המסקנה מתוצאות אלו היא, כי הגן ל-PBAN-R (או גן דומה לו) אכן קיים ומתבטא ברקמות הנבחנות; בלוטת הפרומון, המוח וגנגליון החזה. לכן החלבונים שנמצאו ברקמות אלו במשקל מולקולרי של 50 kDa הם אכן קולטנים ל-PBAN או קולטנים דומים לו. לעומת זאת, בשריר הכנף, בו נמצא כאמור, כי הרקמה כנראה אינה מכילה קולטנים ל-PBAN, רצף ה-cDNA שהופק ממנו נמצא הומוולוגי לגן ה-PBAN-R מ-*H. armigera*, ולכן סביר להניח, כי מדובר בקולטן אחר, הדומה ל-PBAN-R, אך עובד במנגנון שונה משל PBAN-R המבוסס על שליחים משניים שאינם cAMP.

החלק השלישי של העבודה, חקירת מעורבותו של Ca^{2+} בביוסינתזת פרומון המין לשם מציאת תפקידו של PBAN-R בביוסינתזת הפרומון ברמת התא, ביקש לבדוק האם הקשירה הספציפית בין PBAN ו-PBAN-R שבמברנת התא של בלוטת פרומון המין מתווכת במנגנון הביוסינתזה על ידי הפעלת השליחים המשניים בתא. הדבר נעשה באמצעות מבחני *in vitro*, בהם הודגרו בלוטות הפרומון עם חוסמי תעלות סידן הפועלים באופנים שונים. התוצאות מראות, כי מבין החומרים שנבחנו, SKF 96365 ו-verapamil עיכבו באופן מובהק את ייצור הפרומון בבלוטות פרומון המין, בעוד ש-amiloride לא השפיע על רמות הפרומון. היות ו-SKF 96365 ידוע כמעכב של כניסת Ca^{2+} המתווכת על ידי קולטן, העובדה כי הוא מונע ייצור פרומון מין מצביעה על כך, שכניסתו של ה- Ca^{2+} , החיוני לביוסינתזת פרומון המין, מתווכת על ידי הקולטן ל-PBAN.

בחלק האחרון של העבודה נבחנה הפעילות הפרומונוטרופית של פפטידים ממשפחת ה-PBAN-pyrokiniin ושל פפטידים דומים ל-PBAN באמצעות מבחני *in vitro*, שבדקו את רמת פרומון המין הנוצר כפונקציה של ריכוז אחד הפפטידים. התוצאות מראות, כי מרבית הפפטידים הקרובים ל-PBAN, כולל אלו המקודדים על ידי אותו הגן כמו PBAN (המכונים PGNs), הם בעלי פעילות פרומונוטרופית בבלוטות פרומון המין של נקבות

H. armigera

לסיכום, המחקר הנוכחי הצליח להמחיש לראשונה את נוכחותם של קולטנים ל-PBAN (או קולטנים דומים ל-PBAN-R) ברקמות העצביות בגוף נקבת העש *H. armigera* ברמת החלבון וזיהה ברקמות אלו, כמו גם בבלוטת פרומון המין, גנים המקודדים ל-PBAN-R (או לקולטנים דומים לו). יש לציין, כי בעבודה זו הגנים לקולטנים שנמצאו ברקמות השונות לא רוצפו במלואם, וכן לא נבדק האם PBAN הינו הפפטיד בעל האפיניות הגבוהה ביותר לקולטנים הללו בהשוואה לפפטידים דומים אחרים. לכן, לא ניתן לקבוע בודאות האם מדובר בקולטנים ל-PBAN או לפפטידים אחרים הנוצרים ב-*H. armigera*, כגון ה-PGNs. כמו כן, המחקר הראה כי מרבית הפפטידים הקרובים ל-PBAN, כולל ה-PGNs, הינם בעלי פעילות פרומונוטרופית בבלוטות פרומון של נקבות *H. armigera*. משמעות הדבר היא, כי PBAN דומה מבחינה תפקודית לפפטידים הקרובים לו, והדבר מציע ש-PBAN הוא בעל תפקידים נוספים ברקמות בהן הפפטידים הללו פועלים. לבסוף, העבודה הראתה כי הקשירה הספציפית בין PBAN ו-PBAN-R המעוגן למברנת התא של בלוטת הפרומון מתווכת במנגנון ביוסינתזת פרומון המין על ידי הפעלת שליחים משניים בתא (cAMP), וכי Ca^{2+} חיוני לביוסינתזת פרומון המין. המחקר הנוכחי עשוי לסייע בהבנת המנגנונים המולקולריים האחראיים לייצור פרומון מין. עבודה זו, בשילוב מחקרים נוספים בנושא, תתרום לפיתוח אמצעי בקרה יעיל וספציפי על אוכלוסיות העש המזיק, המבוסס על הפרעה לתהליך ביוסינתזת פרומון המין בעש, ולעניין ישנה חשיבות כלכלית רבה.

הקדמה

בשנים האחרונות, השימוש המוגבר בחומרי הדברה כנגד חרקים מזיקים בחקלאות גרם להתפתחות של עמידות המזיקים נגד חומרי הדברה. כחלק מהמלחמה במזיקים, ועקב שיקולים של בריאות, בטיחות ואיכות הסביבה, נשקלת הגבלה בשימוש בתרכובות רעילות במזון ובתוצרים חקלאיים אחרים. הדבר הוביל לחיפוש אחר אלטרנטיבות בטוחות יותר לבקרת אוכלוסיות חרקים מזיקים בחקלאות.

קבוצת התנשמיות מהווה את אחת הקבוצות של החרקים המזיקים העיקריים בחקלאות. ברוב מיני העש, נקבות מייצרות ומשחררות תערובת של פרמוני מין לכיוון הזכרים, וכך מושכות אותם להזדווגות. עד כה נעשו מאמצים רבים בזיהוי מרכיבי התערובת של פרמוני המין ובפיתוח אנלוגים לפרמונים, אך הדבר קצר הצלחה מוגבלת בבקרת אוכלוסיית המזיק. פיתוח אמצעי בקרה שונים על שחרור פרומון המין יסייע במידה רבה לבקרת אוכלוסיית מין העש המזיק. הבנת המנגנונים המולקולריים, האחראיים לייצור הפרמונים, חיונית למציאת אסטרטגיות אידיאליות להפרעת הזיווג, כגון תכנון אנטגוניסטים אפקטיביים וסלקטיביים, המסוגלים לחסום את התקשורת באמצעות פרמוני מין.

במיני עש רבים, סינתזת פרמוני המין נעשית תחת בקרת יום ולילה ומתווכת על ידי נירופפטיד, המכונה PBAN (נירופפטיד המאקטב סינתזת פרומון). הנירופפטיד נוצר בגנגליון התת ושטי, הממוקם ליד המוח (Raina and Klun, 1984), ומשחרר תחת בקרה פוטופריאודית (Ichikawa, 1988) לדם (המולימפה) (Fabrias et al., 1994).

PBAN מקודד על ידי גן, היוצר חמישה פפטידים, כולל PBAN, אשר כולם בעלי רצף FxPRLamide (x=G, S or T) בקצה ה-C טרמינלי (Kawano et al., 1992; Sato et al., 1994; Ma et al., 1993), שהינו הרצף המינימלי וההכרחי לפעילות פרומוטרופית (Raina and Kempe, 1990, 1992; Kuniyoshi et al., 1991). ב-*H. zea*, ארבעת הפפטידים הנוספים מכונים PBAN gene products (PGNs), והם צוינו כ-PGN-24, PGN-7, PGN-18 ו-PGN-8 (Ma et al., 1996). כל ה-PGNs הינם בעלי פוטנציאל לזירוז ביוסינתזת פרומון מין (Ma et al., 1996; Teal et al., 1989).

PBAN שייך למשפחה של פפטידים בעלי תפקידים שונים - PBAN-pyrokinin peptide family, שכל הפפטידים החברים בה נושאים את הרצף FxPRLamide בקצה ה-C טרמינלי (ראה Rafaeli, 2002 Review).

Choi et al. (2003) זיהו בבלוטות הפרומון של נקבות עש מהמין *Helicoverpa zea* קולטן ל-PBAN, המצומד לחלבון G (AY319852). גנים דומים לקולטן ה-PBAN נמצאו במינים נוספים: *Bombyx mori* (AB181298), *H. armigera* (AY792036), *Plutella xylostella* (AY974334), *Spodoptera littoralis* (DQ407742) (Choi et al., 2004; Hull et al., 2004).

2004, GENBank; Lee and Boo, 2005, GENBank; Zheng et al., 2006, pyrokinins-DMOYI של פפטידים דמויי-PBAN גם לקולטנים של (GENBank Diapause מהמינים הבאים: *Tribolium castaneum* (רצף חזוי עבור קולטן לפפטיד דמוי- Diapause *Anopheles* (Hormone (XM_623963), *Apis mellifera* (רצף חזוי) (XM_963636), *Drosophila melanogaster* (Cazzamali et al., 2005) (DQ103706) *gambiae* הגן CG9918 (AF52291) (Park et al., 2002) (AF522190) CG8795 (Park et al., 2002) (AF522190) CG8795) והגן (Homma et al., 2006) (AB164390/89/88/87/86) *B. mori* (al., 2002). בין המינים *H. armigera* ו-*H. zea* ישנה קרבה רבה, והקולטן ל-PBAN דומה בשני המינים. על סמך הרצף של PBAN-R מ-*H. zea*, שאורכו 346 חומצות אמינו, הוסק כי משקלו המולקולרי של הקולטן הינו 38.6 kDa (Choi et al., 2003). על ידי שימוש באנלוג ל-PBAN, המסומן בקבוצת פוטואפיניות וב-biotin, ובבלוטות פרומון של נקבות בוגרות מהמין *H. armigera*, הומחשה קשירה ספציפית של PBAN לחלבון הקשור לממברנה של כ-50 kDa (Rafaeli and Gileadi, 1997, 1999; Rafaeli et al., 2003). לאחר לקיחה בחשבון של ה-PBAN המסומן ב-biotin שנשאר קשור לקולטן, הגודל הנראה של PBAN-R הופחת לכ-45 kDa, אך לפי הגן, גודל החלבון של *H. armigera* אינו שונה מגודל החלבון של *H. zea*, דבר שעשוי להצביע על אי דיוק ב-SDS-PAGE.

המטרה העיקרית של מחקר זה היא אפיון הקולטן ל-PBAN בעש, ברמת החלבון והגן. מחקר זה, המבוצע בנקבות עש מהמין *H. armigera*, בוחן את השערת המחקר, לפיה קיימים קולטנים ל-PBAN ברקמות שונות בגוף העש נוסף לבלוטות פרומון המין, ושאותם קולטנים מהווים אתרי פעולה לפעילויות נוספות של PBAN או של פפטידים דמויי-PBAN השייכים למשפחת ה-FxPRLamide. השערה זו מתבססת על העובדה, ש-PBAN שייך למשפחת פפטידים בעלי תפוצה רחבה בחרקים ועם תפקידים רבים בתהליכים פיסיולוגיים שונים (ראה Rafaeli, 2002 Review). נוכחות פפטידים דומים ל-PBAN בעלי הרצף FxPRLamide בקצה ה-C טרמינלי, ההכרחי לפעילות פרומוטרופית (Raina and Kempe, 1990) ברקמות שונות בגוף העש מציעה, כי PBAN פעיל גם הוא באותן רקמות.

מטרות העבודה:

1. קביעת הנוכחות האפשרית של קולטן ה-PBAN ברמת החלבון ברקמות נוספות לבלוטת הפרומון ובתאי Sf9 המבטאים את הגן לקולטן של *H. zea*, הדומה לקולטן מ-*H. armigera*. השימוש בתאי ה-Sf9 מהווה ביקורת חיובית לבדיקה ביולוגית, המבוססת על קשירת ליגנד מסומן לקולטן ה-PBAN. היות ו-PBAN נוצר

במוח וקשור למערכת העצבים, ייתכן כי קיימים קולטנים ל- PBAN ברקמות העצביות.

2. **קביעת נוכחותו של הגן לקולטן ברקמות-** על מנת לאמת, כי החלבונים שזוהו ברקמות השונות הם אכן קולטנים ל- PBAN.
3. **בחינת הפעילות הפרומונוטרופית של פפטידים ממשפחת ה- pyrokinin/PBAN**
ושל פפטידים דומים ל- PBAN. פעילות פרומונוטרופית של פפטידים בעלי תפקידים פיסיוולוגיים ברקמות אחרות עשויה להצביע על דמיון תפקודי בינם לבין PBAN, המציע כי ל- PBAN תפקידים נוספים באותן רקמות.
4. **בחינת מעורבות שליחים משניים בביוסינתזת פרומון המין-** בכדי לברר את תפקיד הקולטן ל- PBAN בביוסינתזת הפרומון ברמת התא, בבלוטת פרומון המין.

זיהוי קולטנים ל- PBAN ברקמות אחרות בגוף העש יביא לחקירה מעמיקה יותר של פעילות ה- PBAN באותן רקמות במקביל לחקירת הקולטן ל- PBAN בבלוטת הפרומון. המחקר הנוכחי עשוי לסייע בהבנת המנגנונים המולקולריים האחראיים לייצור פרומון מין. למרות שלתוצאות מחקר זה לא יהיו יישומים חקלאיים ישירים, המחקר הנוכחי, בשילוב מחקרים נוספים בנושא, יתרום לפיתוח אמצעי בקרה יעיל וספציפי על אוכלוסיות העש המזיק, המבוסס על הפרעה לתהליך ביוסינתזת פרומון המין בעש, ולעניין ישנה חשיבות כלכלית רבה.

1. מבוא

1.1 תקשורת כימית בחרקים

חרקים משתמשים בדרכי תקשורת שונות, כתלות בתנאים הסביבתיים, להעברת מסרים. סוגי התקשורת הנפוצים הינם תקשורת ויזואלית, אקוסטית וכימית. חוש הריח של חרקים רגיש מאוד, בייחוד לגירויים חשובים בסביבת החרק כגון מקור מזון, מקום מחיה וכן או בת זוג (Wedell, 2005).

התקשורת בין הסביבה החיצונית והפנימית של החרק חיונית לקיום תהליכים פיסיולוגיים רבים, והיא תלויה בפעולת הורמונים. אלו הם כימיקלים, הנוצרים בכמויות מועטות בגוף החרק, ואשר ממקום הווצרותם מגיעים לרקמת המטרה. לעומת זאת, תקשורת בין אורגניזמים נעשית באמצעות כימיקלים מסוג אחר, המועברים דרך הסביבה החיצונית ומכונים סמיו-כימיקלים. השימוש בהם נפוץ באורגניזמים ליליים או תת קרקעיים, החיים בסביבות חשוכות, כיוון שהם מסוגלים להתגבר על מכשולים פיסיים, בניגוד לתקשורת היוזואלית (Hunsell, 1985).

פרומונים הינם חומרים כימיים נדיפים, המתווכים בתגובות פיסיולוגיות או התנהגותיות על ידי העברת אותות בין פרטים באותו המין. חישת הפרומונים דורשת כמויות זעירות בלבד (Karlson and Luscher, 1959). הפרומונים הינם נגזרות של שרשראות פחמימניות או של טבעות טרפניות. הם מצויים לרוב בתערובת, שמרכיביה עשויים להווצר באותו מסלול ביוסינתזה. השונות הרבה בין הפרומונים קיימת הודות לאפשרויות הרבות ולשילובים שונים של נגזרות בתערובות הפרומונים. משמעות הדבר היא בידוד מיני בין המינים השונים (ראה Tillman et al., 1999 Review). בידוד מיני מושג גם על ידי שחרור הפרומון בזמנים שונים של היום או הלילה, במקרים בהם מינים שונים משתמשים באותו הכימיקל לתקשורת. הפרומונים הינם מתווכי תקשורת חשובים בחיידקים, צמחים ובעלי חיים ובסביבות מימיות (ראה Tillman et al., 1999 Review).

פרומוני מין משמשים למשיכה ולתקשורת מינית בחרקים רבים. תערובת פרומוני המין, המשוחררת על ידי אחד משני הזוויגים, הזכר או הנקבה, נקלטת על ידי בני הזוויג השני מאותו מין ומשפיעה על התנהגותם המינית. במיני עש, ובייחוד במינים הליליים, ייצור הפרומון נעשה לרוב על ידי הנקבות.

פרומוני המין במיני עש מורכבים לרוב מתערובת של תרכובות אליפטיות קרובות מבנית, שהנן נגזרות של חומצות שומן, המשתנות באורך השרשרת, בגיאומטריה, בכמות ובמיקום הקשרים הכפולים והקבוצות הפונקציונליות. התרכובות הללו נוצרות על ידי מגוון פעולות של דלתא-דסטוראזות (Δ -desaturases) ספציפיות ומשולבות ליצירת קשרים כפולים בשרשרת, קיצורה או הארכתה ושינויים נוספים (ראה Rafaeli, 2002 Review).

במין *H. armigera* נמצאו שלושה מרכיבים עיקריים בתערובת. המרכיב העיקרי הנו נגזרת אלדהידית של חומצת שומן באורך 16 פחמנים, עם קשר כפול בפחמן מספר אחת עשרה, המכונה cis 11 hexadecenal (וגם (Z)-11-hexadecenal או Z11-16:Ald). המרכיבים המשניים כוללים נגזרת אלדהידית של אותה חומצת שומן באורך 16 פחמנים, אך בעלת קשר כפול בפחמן מספר תשע, המכונה cis 9 hexadecenal (וגם (Z)-9-hexadecenal או Z9-16:Ald) ונגזרת כהלית של חומצת השומן בעלת הקשר הכפול בפחמן מספר 11, והוא קרוי cis 11 hexadecenol (וגם (Z)-11-hexadecenol או Z11-16:OH) ומהווה את הפרקורסור ל- (Z)-11-hexadecenal (Nesbitt et al., 1979). מחקרם של Deming et al. (1997) מצא, כי היחס בין שלושת מרכיבים אלו ב- *H. armigera* הוא 100:4.5:8.8 ((Z)-11-hexadecenal: (Z)-9-hexadecenal: (Z)-11-hexadecenol). במין *H. armigera* נמצא, כי שני המרכיבים האלדהידיים, ביחסים של 1:10 ביניהם, ואף המרכיב העיקרי (Z)-11-hexadecenal לבדו, מספיקים למשיכת הזכרים (Kehat et al., 1980; Kehat and Dunkelblum, 1990; Deming et al., 1997). לעומת זאת, המרכיב הכהלי היה בעל השפעה הפוכה על התנהגות הזכרים, כלומר דחה אותם, כאשר היווה 5% ומעלה מכלל תערובת פרומון המין, הכוללת מרכיבים נוספים (Kehat and Dunkelblum, 1990; 1993; Deming et al., 1997).

1.2 המין *Helicoverpa armigera*

המין *Helicoverpa armigera*, חרק מודל של המחקר הנוכחי, שייך למשפחת התנשמיים. הוא מהווה מזיק לגידולים חקלאיים רבים ברחבי העולם, כגון: חמוס, כותנה, תירס, עגבניות ובטטות (איזנשטיין, 1983). כמו שאר המינים במשפחה, גם הוא פעיל בשעות הלילה (Lingren et al., 1982), ומשמעות הדבר היא שימוש כמעט בלעדי בתקשורת כימית, וחיוניות פרומוני המין לצורך התרבותו.

H. armigera בוקע מהביצים כ- 2-3 ימים לאחר ההזדווגות. מבין חמש דרגות הזחל הנוצרות במהלך החיים, הדרגה השנייה והשלישית הן המזיקות ביותר. בתום דרגת הזחל החמישית, הזחל מתחיל באיתור מקום מתאים להתגלמות (שלב ה- wandering). על מנת לחקות את הפוטופריאודה הקיימת בטבע בעונת הקיץ, החרקים גודלו בתנאים מבוקרים של 14 שעות אור ו- 10 שעות חושך. בתנאי הגידול (טמפרטורה של כ- 25 °C), העש חי כזחל למשך 15 יום, ולאחר מכן הוא עובר התגלמות ונחנט. ניתן להבחין בהתגלמות הקרבה של הזחל, כאשר הוא מתחפר במצע המזון בשלב ה- wandering, לאחר שסיים לאכול.

הגולם מתפתח לבוגר חבוי (pharate) בגיל 8 ימים (Fan et al., 1999a), ולאחר שסיים להתפתח בצורה מלאה במשך 3-5 הימים הבאים, הוא מגיח כעש בוגר. בתנאים הקיימים

בתנאי הגידול נמצא, שהזכרים מגיחים בגיל צעיר ביום מאשר הנקבות- הגחתם מתרחשת בגילאי 11-12 יום לעומת הנקבות, שמגיחות בגילאי 12-13 יום.

1.3 התנהגות מינית בעש

נקבות עש משחררות מולקולות של פרומוני מין למשיכת זכרים (Birch and Haynes, 1982) במהלך התנהגות קריאה (Wedell, 2005). הרצפטיביות של נקבות בפרפראים ובמיני עש מושפעת מגורמים רבים, המשתנים בין נקבות בתולות למזווגות (Wedell, 2005). ברוב מיני הפרפראים, הנקבה מפרישה פרומון (קוראת) ורצפטיבית לזיווג רק במהלך תקופה קצרה יחסית במהלך היום או הלילה. התקופתיות של תגובת הזכר פחות או יותר חופפת לקצב האטרקטיביות של הנקבה (Roelofs and Carde, 1974).

ייצור פרומוני המין על ידי הנקבות למשיכת זכרים נעשה לרוב בבלוטת הפרומון, כמו במין *H. armigera* (Rafaëli and Soroker, 1989a). במהלך התנהגות הקריאה נקבת העש חושפת את בלוטת הפרומון על ידי הבלטת קצה הבטן. פעולה זו מכונה "איתות", ובכך הנקבה מאפשרת לתערובת הפרומונים להתנדף לסביבה (Sanderford and Conner, 1990; איזנשטיין, 1983).

פרומוני המין נקלטים על ידי odorant receptors או איברי חישה במחושים של הזכרים (איזנשטיין, 1983), ובעקבות זאת הזכרים מגיבים בהתנהגות אופיינית, במהלכה הם עפים כנגד כיוון הרוח אל הנקבות המאותותות, מה שמביא להזדווגות (O'Connell, 1972). מינים מסויימים מזדווגים פעם אחת בלבד במהלך חייהם, בעוד שאחרים מזדווגים יותר מפעם אחת. במינים שמזדווגים יותר מפעם אחת (מינים פוליאנדריים), הנקבות עושות הפוגה זמנית בהתנהגות הקריאה ובייצור הפרומון (Shorey and Gaston, 1965; Raina et al., 1986b). נקבות מהמין *H. armigera* הינן פוליאנדריות, ובכל scotophase הן מזדווגות פעם אחת בלבד, שכן במהלך ההזדווגות הזכר מעביר לנקבה חומרים שונים בנוסף לזרע מבלוטת העזר שלו (Raina, 1989). חלק מהחומרים הללו משרים התנהגות לאחר הזיווג בנקבה, הכוללת הפסקה בייצור הפרומון, ירידה ברצפטיביות המינית לזכרים וזירוז בהטלת ביצים (Fan et al., 1999b; Eliyahu et al., 2003; Nagaklashmi et al., 2004).

1.4 תהליך ייצור פרומון המין

מסלול ביוסינתזת פרומוני מין נחקר במיני עש רבים (ראה Tillman et al., 1999 Review), ונמצא, כי הוא זהה בתחילתו למסלול סינתזת חומצות שומן. מחקרים אלו הראו, כי סינתזת פרומונים במיני העש מתחילה מ- acetate כחומר מוצא (ראה Rafaëli, 2002 Review),

ממנו נוצרות ברוב המינים שרשראות אליפטיות בנות 12, 14 ו-16 פחמנים, יחד עם קבוצות פונקציונליות מסוג alcohol, ester או aldehyde.

תהליך הביוסינתזה מתחיל בציטופלסמה, כסינתזה של חומצות שומן. ראשית, האנזים acetyl-CoA-carboxylase (ACCCase) הופך Acetyl-CoA ל-Malonyl-CoA. לאחר מכן, סדרת האנזימים fatty acid synthetase (FAS) מאריכים את השרשרת לחומצת שומן בת 16 או 18 פחמנים (חומצה פלמיטית או סטארית, בהתאמה). בעת שתוצרי הביניים נוצרים, הם ממשיכים בכיוונום במסלול הביוסינתזה ליצירת התוצרים הסופיים (ראה Review (Rafaeli, 2002).

השלב הבא הנו יצירת קשרים כפולים בחומצות השומן כתוצאה מפעולת אנזימי desaturase (דסטוראזות) ייחודיים, המצויים ברשתית האנדופלסמטית, ליצירת חומצות שומן חד ודו-בלתי רוויות. מספר הקשרים הכפולים ומיקומם בשרשרת קובעים את הספציפיות למין העש. ב-*Helicoverpa*, האנזים $\Delta 11$ -desaturase קובע קשר כפול בפחמן מספר 11 בשרשרת. לאחר מכן מתבצע קיצור השרשרת באמצעות אנזימים ספציפיים, אשר מביא לחומצת שומן באורך השרשרת הנכון. בשלב האחרון, מתווספות לשרשרת הקבוצות הפונקציונליות באופן ספציפי למין, על ידי האנזימים reductase, alcohol oxidase ו-acetate esterase. האנזים reductase הופך את חומצת השומן לאלכוהול, ואילו alcohol oxidase או acetate-esterase הופכים את האלכוהול שנוצר לאלדהיד או אצטט-אסטר, בהתאמה. האנזים alcohol oxidase נמצא ברובו מחוץ לתא, בקוטיקולה שעל גבי הבלוטה. עובדה זו מאפשרת לעש להפטר מהתוצרים האלדהידים, שעלולים להיות רעילים. בכך נוצרת תערובת הפרומונים הסופית (Bjostad et al., 1987; Jurenka and Roelofs, 1993; Tillman et al., 1999 Review). חרקים עברו התפתחות אבולוציונית, שהביאה להוספת אנזים בודד או מספר אנזימים ספציפיים לרקמה, שהופכים את התוצרים של המטבוליזם הרגיל לתרכובות פרומון. במיני עש רבים נעשה שילוב של ריאקציות דסאטורציה וקיצור השרשרת, המלוות על ידי חיזור הפחמימן הקרבונילי.

1.5 בקרת סינתזת פרומון מין

ההצלחה האבולוציונית והאקולוגית של החרק תלויה ביכולתו להתחיל ולסיים את ביוסינתזת פרומוני המין. המנגנונים הניוראנדוקריניים והמולקולריים המעורבים בייצור ובשחרור פרומוני מין, מושפעים מגורמים פיסיולוגיים וסביבתיים, ביניהם: פוטופריאודה- חלוקת היממה לשתי תקופות; זמן האור (photophase) וזמן החושך (scotophase). בחלק ממיני העש, photophase מהווה את זמן המנוחה, בו החרק אינו פעיל, וה- scotophase הינו זמן הפעילות, שבו מתרחשים רוב התהליכים הפיסיולוגיים בחיי העש. עונות השנה משפיעות על

החלוקה בין שתי תקופות אלו בטבע. מלבד הפוטופריאודה, גורמים נוספים מבקרים את סינתזת פרומון המין: טמפרטורה, הזדווגויות, מהירות זרימת האוויר ונוכחות צמח מאכסן, וגורמים פנימיים, כגון גיל הנקבה, מצב פיסיוולוגי ובקרה אנדוקרינית (פעילות הורמונים ונירוהורמונים) ונירומודולוטורים (Raina et al., 1986; Raina, 1993); ראה (Rafaëli, 2002 Review) ייצור והפרשת פרומונים מבוקרת על ידי קצב סירקאדי אנדוגני, שמועלה על ידי אותות פוטופריאודיים (Raina and Klun, 1984; Rafaëli and Soroker, 1989a). בסוג *Helicoverpa* נמצא, כי השיא ברמת הפרומון מתרחש באמצע ה-scotophase (Raina et al., 1986), וכי קיימת חפיפה במועדי שחרור פרומוני המין והתנהגות הקריאה בנקבות (Rafaëli and Soroker, 1989a). במין העש *Bombyx mori* נמצא, כי השפעת הפוטופריאודה באה לידי ביטוי בשחרור ניורופפטידים פרומונוטרופיים מתאים ניורוסקרטוריים, וכן בתנועתיות הבטן במהלך הקריאה (Ichikawa, 1998). במין *Grapholitha molesta* נמצא, כי הן התנהגות הקריאה והן תגובת הזכר לפרומון המין על ידי פרישת הכנפיים בעת ההליכה מושפעות באופן חלקי על ידי אות פוטופריאודי. באותו מין, רמות טמפרטורה מוחלטות קבעו את תזמון הקריאה, ובזמנים ספציפיים של הפוטופריאודה, נמצא טווח טמפרטורה אופטימלי לקריאה. השילוב בין אותות השעון האנדוגני ושל הטמפרטורה האקסוגנית בסינכרוניזציה הפעילות המינית בחרקים מאפשר התאמה לאיזורים בעלי טמפרטורות שונות (Baker and Carde, 1979). חלק מהמינים, כגון *Helicoverpa zea*, נצפו כמעכבים את ייצור הפרומון בטרם מציאת צמח מאכסן מתאים להטלת הביצים (Raina, 1988).

הורמוני הנעורים, Juvenile Hormones (JH) (מורבים בבקרת ההתרבות של נקבות בוגרות של מיני חרקים רבים. רמות JH עולות בנקבות בוגרות נמצאו מעורבות בזירוז יצירת החלמון (Nijhout, 1994), וכן במיני פרפראים רבים JH חיוני ליצירת הביצים (vitellogenesis) (Ramaswamy et al., 1997). הפעילות רחבת התפוצה של JH, הפועל על מגוון רקמות מטרה שונות ובדרכים שונות, תועדה על ידי (Wyatt and Davey, 1996; Gilbert et al., 2000). JH משחק תפקיד חשוב בבקרת ביוסינתזת הפרומון בתיקנים (Schal et al., 1997) ובחיפושיות קליפת העץ (Tittiger, 2003). תפקיד ה-JH בבקרת ייצור הפרומון הומחשה במספר מיני עש, המציגים התנהגות נדידה (Cusson and Picimbon et al., 1995; McNeil, 1989; Gadenne, 1993). רמות נמוכות של JH מעכבות את רצפטיביות הזכרים לנקבות עש, ורמות JH גבוהות (הדרושות להתפתחות השחלות הויטלוגניות) משרות התנהגות רצפטיבית בנקבות (Cusson et al., 1994). סינתזת ושחרור JH מבוקרים על ידי ה-*corpora allata* (CA) וניורופפטידים מגוונים הנוצרים על ידי מערכת העצבים המרכזית (Nijhout, 1994; Simonet et al., 2004). מאחר ו-JH חיוני לרצפטיביות הנקבה, וניורופפטידים מבקרים ייצור JH, הם מתווכים

בבקרת התרבות הנקבה. (2003) Rafaeli et al. מצאו, כי JH עשוי לבקר חיובית את הקולטן ל-PBAN (up regulation) בנקבות גולם 3 ימים לפני הגחתן. (2005) Rafaeli and Bober המחישו, כי ייצור פרומון על ידי נקבות בוגרות מהמין *H. armigera* הוא תלוי-גיל. התגובה הפרומונוטרופית מוגברת עד למקסימום בגיל 4 ימים, ולאחר מכן ישנה ירידה בתגובה. (2005) Rafaeli and Bober הציעו, כי JH עשוי לפעול על תבנית גנטית הקשורה בגיל, בכך שהוא מקדם את התוכנית להשלמה, ולכן "מבגר" את הנקבות שבשלב הבוגר החבוי למצב של נקבות שכבר הגיחו (בקרה חיובית) או מקדם נקבות שהגיחו זה עתה למצב של נקבות מבוגרות יותר (בקרה שלילית).

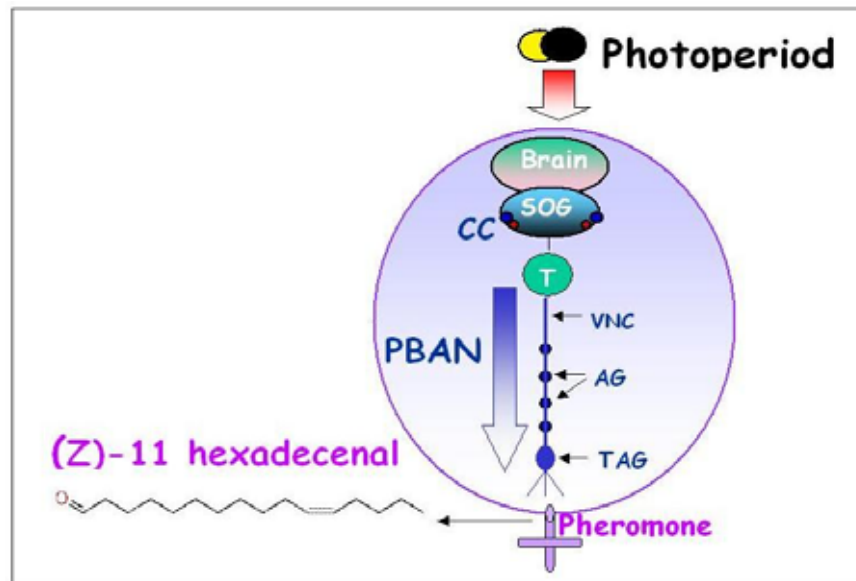
1.6 PBAN ואופן פעולתו

PBAN 1.6.1

ניורופפטידים מתפקדים כשליחים במערכת הניורואנדוקרינית ברוב בעלי החיים. הניורופפטידים מבקרים תהליכים רבים במחזור חייהם של החרקים, כגון בקרת תהליכי הנשל, הגלגול, התרדמה וההתפתחות המינית. הם מופרשים על ידי תאים ניורוסקרטוריים במוח, בגנגליון התת ושטי, בגנגליוני החזה ובגנגליוני הבטן. פפטידים אלו לרוב מקובצים יחד למשפחות בהתבסס על זהות ברצפי חומצות האמינו (ראה (Rafaeli, 2002 Review)). ייצור פרמוני מין בנקבות העש *Helicoverpa zea* מבוקר על ידי גורם הורמונלי, שהינו ניורופפטיד המיוצר על ידי תאים ניורוסקרטוריים בגנגליון התת ושטי (SOG) של הנקבה הממוקם ליד המוח (Jaffe et al., 1986; Raina et al., 1987, 1989) ומשוחרר תחת בקרה פוטופריאודית מה- corpora cardiaca (CC) להמולימפה בזמן ה-scotophase, וכך מזרז את בלוטת הפרומון לייצר פרומון מין (Raina and Klun, 1984). בנקבות *H. zea*, כמו בנקבות ממגוון מינים אחרים, כמויות הפרומון עולות בבלוטת הפרומון במהלך ה-scotophase, כאשר הנקבות רצפטיביות מינית לזכרים. בעוד שהפעילות הפרומונוטרופית נמצאה במהלך ה-photophase וה-scotophase בקומפלקסי המוח והגנגליון התת-ושטי (Br-SOG) של נקבות. עם זאת, בהמולימפה, פעילות זו נמצאה במהלך ה-scotophase בלבד (Raina and Klun, 1984; Jaffe et al., 1986; Raina et al., 1987).

הניורוהורמון שהתגלה כונה Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide (PBAN), ניורופפטיד המאקטב סינתזת פרומון. במין *H. zea*, PBAN זוהה לראשונה על ידי Raina et al. (1987, 1989) כפפטיד באורך 33 חומצות אמינו ובמשקל מולקולרי של 3.9 kDa. במחקרי מבנה ופעילות שנערכו במינים *H. zea* ו-*B. mori* נמצא, כי רצף של חמש חומצות אמינו בקצה ה-C טרמינלי (FXPRLamide, Xaa=Ser, or Thr) מהווה את

הרצף המינימלי ההכרחי לזירוז ייצור פרומון מין בבלוטת הפרומון בנקבות (Raina and
 .(Kempe, 1990, 1992; Kuniyoshi et al., 1991



איור 1: סכימה המתארת את ההתנהגות הרבייתית ואת מערכת העצבים ב- *Helicoverpa spp.* בעש מהסוג *Helicoverpa*, ייצור פרומון המין מושפע על ידי הפוטופריאודה. בזמן החושך (Scotophase), אז הנקבות רצפטיביות לזכרים, כמות הפרומון בבלוטת הפרומון עולה. מערכת העצבים והמערכת הניורואנדוקרינית מורכבת על ידי המוח וגנגליונים הממוקדים לאורך גוף החרק: הגנגליון התת ושתי (SOG), גנגליוני החזה (TG) וגנגליוני הבטן (AG ו-TAG), המרכיבים את הצינור הונטרלי (VNC). פפטיד הורמונלי, PBAN, המיוצר ב-SOG ומשוחרר מה- corpora cardiaca (CC) להמולימפה פועל על בלוטת הפרומון בכדי לזרז ביוסינתזת פרומון. המרכיב העיקרי של הפרומון הוא (Z)-11-hexadecenal.

פעילותו הפרומונוטרופית של PBAN נצפתה בקומפלקסי Br-SOG של זכרים ושל נקבות ממיני עש רבים; *H. zea* (Raina and Klun, 1984), *H. assulta* (Choi et al., 1998), *Bombyx mori* (Kitamura et al., 1989, 1990), *Lymantria dispar* (Masler et al., 1994), *Agrotis ipsilon* (Duportet et al., 1999), ו- *Mamestra brassicae* (1994). כמו כן נמצאה פעילות דומה של פפטידים דמויי-PBAN ברקמות עצביות של נקבות של מיני עש, כגון *B. mori* (Kitamura et al., 1989), *Ostrinia nubilalis* ו- *Lymantria dispar* (Masler et al., 1994); במיני פרפראים רבים, בסדרות חרקים אחרות (Gade et al., 1997), בתיקנים ואף בסרטניים (Torfs et al., 2001). פפטידים אלו, כמו גם PBAN, שייכים למשפחת הפפטידים PBAN/pyrokinin/myotropin, שנושאים את מוטיב ה-FXPRLamide (ראה Review Rafaeli, 2002) בקצה ה-C טרמינלי. הם נמצאו אחראים למגוון תפקידים פיסיולוגיים והתנהגותיים בחרקים.

<u>Peptide</u>	<u>Residue position</u>
Hez-PBAN	LSDDMPATPADQEMYRQDPEQIDSRTKYFSPRL _{amide}
Pheromonotropin	KLSYDDKVFENVEFTPRL _{amide}
PGN-18	SLAYDDKSFENVEFTPRL _{amide}
PGN-7	VIFTPKL _{amide}
PGN-8	TMNFSPRL _{amide}
PGN-24	NDVKDGAASGAHSDRLGLWFGPRL _{amide}
Diapause Hormone	TD MKDES DRGAH SERGALWFGPRL _{amide}
CAP2b-3	TGPSASSGLWFGPRL _{amide}
Leucopyrokinin	PETSFTPRL _{amide}
Neuromedin U	YFLFRPRN _{amide}
Neuromedin S	FFLFRPRN _{amide}
Ecdysis-triggering hormone (ETH)	DDSSPGF FLKITKNVPRL _{amide}
Myomodulin	PMSMLRL _{amide}

איור 2: משפחת פפטידי ה- PBAN/pyrokinin ופפטידים דומים (F_xPRXamide, PRXamide). PBAN שייך למשפחת פפטידים הנקראת pyrokinin. כל הפפטידים במשפחה נושאים קצה C טרמינלי משותף. חלק מהפפטידים פרומונטורפיים, ולחלקם תפקידים אחרים. הרצף המינימלי הדרוש לפעילות הינו 5 חומצות האמינו בקצה ה- C טרמינלי- FXPRLamide.

Leucopyrokinin (LPK) (איור 2) הינו נירופפטיד חרקי, שבודד על ידי Holman et al. (1986a) ממיצוי מוחות של התיקן *Leucophaea maderae*. LPK נמצא מזרז את פעילות התכווצות המעי האחורי בתיקנים (Holman et al., 1986). המקטע הפנטאפפטידי FTPRLamide זוהה כליבה הפעילה של LPK (Nachman et al., 1986) (איור 2). התגלמות בזבובי cyclorrhaphous מערבת הן פעילויות התנהגותיות (ניוח, נסיגת הפרקים הקדמיים, כיווץ אורכי של הגוף) והן את השחמת הקוטיקולה (ירידה בגמישותה והקשחתה על ידי השחרה פנולית) (Zdarek and Fraenkel, 1972; Zdarek et al., 1979). LPK ואנלוגים שלו נמצאו פעילים במידה רבה בהאצת התגלמות של זבובים מהמין *Sarcophaga bullata* המצויים בשלב ה- wandering, והחישו את האירועים ההתנהגותיים והקוטיקולריים גם יחד (Zdarek et al., 1997; Nachman et al., 1997). כל האנלוגים ל-LPK חולקים את הרצף ה- C טרמינלי F_xPRLamide (x=V,T,S or G) (Holman et al., 1990), שנמצא כליבה הפעילה המספיקה להפקת פעילויות אלו. האנלוג LPK[2-8] הוא הפרגמנט הראשון של נירופפטיד חרקי, המראה פעילות גבוהה יותר מאשר LPK עצמו (Nachman et al., 1986). בנוסף, LPK נמצא גם כבעל השפעות ביולוגיות בחולדות (Plech et al., 1997).

הוצע, כי מבנה ה- β -turn בליבה הפעילה של LPK מזוהה על ידי קולטן מיוטרופי (Nachman et al., 1991).

Pheromonotropin (*Pss-PT*) הינו נירופפטיד באורך 18 חומצות אמינו שבודד זוהה ממיצויי מוחות של זחל העש *Pseudaletia separata* (Matsumoto et al., 1992a). פפטיד זה נמצא בעל פעילות פרומונוטרופית גבוהה מאוד, כאשר נבחן בנקבות עש של *B. mori*. ניתוח רצף חומצות האמינו והשוואה לפפטידים סינתטיים גילו את המבנה הראשוני של הפפטיד (איור 2). *Pss-PT* קרוב מבנית ל-LPK, נירופפטיד חרקי מיוטרופי, והוא נושא גם כן את הפנטאפפטיד FTPRLamide בקצה ה-C טרמינלי, האחראי לפעילות הביולוגית. המופרש מה-SOG בפרפראים, אשר מבקר את המלאניזציה והצביעה לחום אדמדם של הקוטיקולה (Ogura, 1975; Hiruma et al., 1984; Morita et al., 1988; Mastumoto et al., 1988). לאחר זיהוי ה-*Pss-PT* (Matsumoto et al., 1992b), תיארו פעילות דמויית-MRCH עבור *Pss-PT* סינתטי ופפטידים הקרובים לו, בזחלי *P. separata*. MRCH נמצא זהה ברצפו ל-*Bom-PBAN* (Matsumoto et al., 1990). הפעילות נמצאה קשורה ברצף חמש חומצות האמינו בקצה ה-C טרמינלי. כמו כן, (Matsumoto et al., 1992b) המחישו בנקבות *B. mori*, כי *Pss-PT* הוא בעל פעילות דמויית הורמון התרדמה (Diapuse Hormone; DH) של *B. mori* (איור 2), שמיוצר אף הוא ב-SOG על ידי אותו גן המקודד ל-DH. *PBAN* זהה ברצפו ל-SGNP I מ-*B. mori* (המקביל ל-PGN-24 מ-*H. zea*) (Imai et al., 1991; Sato et al., 1993), כלומר נושא גם כן את רצף חמש חומצות האמינו FGPRamide בקצה ה-C טרמינלי (Imai et al., 1991). חברי המשפחה הם בעלי פעילות מצולבת, בה כל פפטיד עשוי להיות פעיל בכל התפקודים הפיסיולוגיים (Kuniyoshi et al., 1992; Nachman et al., 1993a,b; Raina and Kempe, 1992).

נמצא, שרצף הפנטאפפטיד ה-C טרמינלי המינימלי הכרחי ומספיק לכל תפקידי ה-PBAN למעט התגלמות, בה רצף מינימלי ל-10% מהתגובה זוהה כ-3 חומצות אמינו בקצה ה-C טרמינלי, PRLamide, אך לתגובה מקסימלית, מקטע של 4 חומצות האמינו TPRLamide זוהה כרצף הליבה הפעיל (Raina and Kempe, 1990, 1992; Holman et al., 1990; Kuniyoshi et al., 1991; Zdarek et al., 1998).

הגן ל-PBAN ב-*H. zea* כולל ארבעה פפטידים נוספים מלבד *PBAN* עצמו. כל הפפטידים המקודדים על ידי הגן נושאים את רצף ה-FXPRLamide המשותף בקצה ה-C טרמינלי שלהם, ורובם נצפו כמזרזים את ביוסינתזת פרומון המין, כשנבחנו על בלוטות פרומון מבודדות ממיני עש שונים (Ma et al., 1994; Ma et al., 1996). בבדיקת תפוצת ה-PBAN ברקמות השונות של *H. zea* ו-*H. armigera* הומחש, כי קומפלקס המוח והגנגליון תת ושטי הכיל את הרמות הגבוהות ביותר של חומר דמוי-PBAN, ואחריו

ה- corpora cardiaca וגנגליון החזה, בהתאמה (Ma et al., 1996). פעילות דמויית-
 PBAN ו/או אימונוריאקטיביות נמצאה גם במיני עש אחרים; *Heliothis peltigera*,
S. descoinsi, *S. latifascia*, *Spodoptera littoralis*, *Chrysodeixis chalcities*
 Gazit et al.,) *Agrotis ipsilon* ו- *H. assulta*, *Pieris brassicae*, *Eldana saccharina*
 1992; Jacquin-Joly and Descoins, 1996; Marco et al., 1996; Choi et al., 1998;
 (Duportes et al., 1998).

רצף חלקי של הגן המקודד ל- *Hez-PBAN* דווח על ידי (Davis et al., 1992). לאחר מכן,
 רצף הנוקלאוטידים המלא של הגן נמצא (Ma et al., 1994). כמו כן, הרצף השלם של
 ה- cDNA המקודד ל- *Bom-PBAN* נקבע ב- *B. mori* (Sato et al., 1992; Kawano et al.,
 1993). רצף חומצות האמינו המוסק מה- cDNA של המינים *H. zea* ו- *B. mori* הראה,
 כי *Hez-PBAN* ו- *Bom-PBAN* מקודדים כחלק מפרה-פרוהורמון, המכיל מספר אתרי
 עריכה אנדופרוטאוליטיים משוערים. במידה וכל האתרים הפרוטאוליטיים הללו מנוצלים
 במהלך עריכה שלאחר התרגום, צפוי שחמישה פפטידים, כולל PBAN, אשר כולם בעלי רצף
 FXPRLamide זהה בקצה ה- C טרמינלי, ייוצרו (Sato et al., 1992; Kawano et al.,
 1994; Ma et al., 1993). ב- *H. zea*, ארבעת הפפטידים הנוספים מכונים- נורופפטידים
 המקודדים על ידי הגן ל- PBAN (PBAN gene products; PGNs), והם צוינו כ- PGN-24,
 PGN-7, PGN-18 ו- PGN-8 (Ma et al., 1996) (איור 2). ה- PGNs נמצאו זהים מבחינה
 מבנית ל- *Hez-PBAN*, בכך שרצפיהם מסתיימים במקטע הפנטאפפטידי, שהינו הרצף
 המינימלי וההכרחי לפעילות פרומונטרופית (Raina and Kempe, 1990, 1992);
 (Kuniyoshi et al., 1991) FXP(R/K)Lamide, (X=G, S or T) Raina and Kempe,)
 (Nagasawa et al., 1994; Nagasawa et al., 1990). לכן, כל ה- PGNs הינם בעלי פוטנציאל לזירוז
 ביוסינתזת פרומון מין (Ma et al., 1996; Teal et al., 1989; Ma et al., 2000). הראו, כי
 בקרת ביוסינתזת פרומוני מין בעש עשויה להתבצע על ידי תערובת פפטידים, יותר מאשר על
 ידי הפפטיד היחיד, *Hez-PBAN*.

השפעת ה- PBAN על שלבים שונים במסלול הביוסינתזה נחקרה במספר מיני פרפראים.
 האנזים העיקרי במסלול ביוסינתזת הפרומון המבוקר על ידי PBAN טרם זוהה באופן סופי.
 במיני עש המייצרים את פרומון המין שלהם באמצעות עריכת שינויים בחומצות השומן, נראה
 כי השלב מגביל הקצב ל- PBAN עשוי להיות התחלת ביוסינתזת חומצות השומן, או חיזורן
 (Rafaeli, 2005 Review). מציאת האנזים מגביל הקצב הסתמכה בעיקר על ניסויים,
 בהם נעשה שימוש בפרקורסורים מסומנים ובתוצרי ביניים בהעדר PBAN או בנוכחותו.
 PBAN נצפה כמזרז את האנזים *reductase*, ההופך *acyl-CoA* לאלכוהול כפרקורסור
 במספר מיני עש, כולל *Bombyx mori* (Osawa et al., 1995; Arima et al., 1991),
Spodoptera littoralis (Fabrias et al., 1995) ו- *Thaumetopoea pityocampa*

Fang et al.,) *Manduca Sexta* -ו (Martinez et al., 1990; Fabrias et al., 1994)
 (1995; Tumlinson et al., 1997).
 במינים *Argyrotaenia velutinana* (Tang et al., 1989) *Helicoverpa zea* (Jurenka)
 (Jurenka, 1997) *Spodoptera exigua*, *Cadra cautella*, (et al., 1991a)
 -ו *Mamestra brassicae* (Jacquin et al., 1994) שוער, כי PBAN שולט על ביוסינתזת
 פרומון על ידי בקרת שלב לפני או במהלך ביוסינתזת חומצות השומן. הוכחות נסיבתיות
 שהתקבלו ב- *Agrotis segetum* (Zhu et al., 1995) -ו *H. armigera* (Rafaeli et al.,)
 (1990) העידו על בקרת סינתזת חומצות שומן על ידי PBAN גם במינים אלו. האנזים מגביל
 הקצב בביוסינתזת חומצות השומן הוא לרוב acetyl coenzyme-A carboxylase
 (ACCCase), אך לא נקבע האם אנזים זה מבוקר חיובית בתגובה לטיפול ב-PBAN.
 בעש מהמין *Argyrotaenia velutinana* ביוסינתזת פרומון מבוקרת על ידי פעולת שני
 פפטידים שונים- PBAN, ופפטיד אחר המצוי ב- bursa copulatrix ומכונה BPP
 (Jurenka et al., 1991b; Fabrias et al., 1992; Jurenka and Roelofs, 1993). שני
 הפפטידים נמצאו מזרזים את ביוסינתזת פרומון המין בבלוטות פרומון מבודדות של מין עש
 זה (Jurenka et al., 1994).

1.6.2 נוכחות PBAN ו/או פפטידים דמויי- PBAN ברקמות השונות

במטרה להבין טוב יותר את מנגנון בקרת ייצור הפרומון במיני עש, התפוצה המרחבית
 והזמנית של PBAN ברקמות השונות נחקרה במיני עש שונים ונמצאה קשורה לפעילות
 האימונוריאקטיבית דמויית- PBAN (PBAN-IR).
 במחקרים אימונוציטוכימיים שבוצעו בהתאם לכך, תוכנן אנטיסרום רב שבטי כנגד הקצה
 ה-C טרמינלי של PBAN על מנת לעקוב אחר גופי תאים עצביים ואקסונים. מחקרים רבים
 מסוג זה הוכיחו, כי קיימת פעילות אימונוריאקטיבית דמויית- PBAN במיצויים של המוח
 והגנגליון התת ושטי (SOG) (Rafaeli et al., 1991, 1993; Ma et al., 1996; Kingan et al.,
 1994) *Corpora cardiaca* (CC) (Rafaeli et al., 1992; Ma and Roelofs, 1995a; Sato et al.,
 1996) (TG) (Rafaeli et al., 1991, 1993; Ma et al., 1996) גנגליון בית החזה
 (VNC), (al., 1991, 1993), הצינור העצבי (VNC), (Rafaeli et al., 1991, 1993; Ma et al.,
 1996; Kingan et al., 1992; Ma et al., 1996; Teal et al., 1996) גנגליון הבטן (AG)
 (Rafaeli et al., 1991, 1993) וגנגליון קצה הבטן (TAG) (Rafaeli et al., 1991, 1993)
 בנקבות ובזכרים של *H. zea* -ו *H. armigera* מגילאים שונים. כמו כן, בנקבות עש ממינים
 אחרים (Iglesias et al., 1998), ובמיני פרפראים נוספים (Predel and Eckert, 2000;)
 (Schoofs et al., 1992; Tips et al., 1993; Choi et al., 2001) התקבלו עדויות לפעילות
 אימונוריאקטיבית דמויית- PBAN. המצאות פפטידים פרומונוטרופיים באיזורים רבים בגוף
 החרק מציעה, כי פפטידים אלו עשויים להיות מנויידים מאתרי שחרור מרכזיים והיקפיים.

נמצא, כי קומפלקס המוח והגנגליון התת ושטי (Br-SOG) מכיל את הרמות הגבוהות ביותר של פפטידים דמויי-PBAN, ואחריו ה-CC וגנגליון החזה (TG). (Raina et al., 1987;)
 (Rafaeli et al., 1991, 1993; Ma et al., 1996). כמו כן, נראה כי PBAN נמצא בעיקר ב-SOG וב-CC, בעוד ש-TG מכיל פעילות דמויית PBAN, שאינו Hez-PBAN (Ma et al., 1996). מבחנים ביולוגיים שנערכו במיצויי רקמות העצביות הצביעו אף הם על אותן רמות יחסיות של חומר דמוי-PBAN בכל חלקי מערכת העצבים. הפרדה ב-HPLC של הרקמה העצבית המלווה ב-ELISA הצביעה על נוכחות מספר פפטידים נוספים הקרובים ל-PBAN בקומפלקס Br-SOG וב-CC (Ma et al., 1996).
 (Golubeva et al., 1997), שחקרו את תפקיד ה-VNC בביוסינתזת פרומון המין בעש *Lymantria dispar*, מצאו כי קיימת פעילות אימונוריאקטיבית בצברי תאים לאורך ה-VNC, וכי מצברי התאים בגנגליוני הבטן יוצאים אקסונים אימונוריאקטיביים לכיוון הגנגליונים המצויים בפרקים השונים. על סמך מידע זה, (Golubeva et al., 1997) שיערו, כי תפקיד ה-VNC הינו בבקרת התאים הניורוסקרטוריים בגנגליונים הפרקיים. במין *L. dispar*, אימונוריאקטיביות דמויית-PBAN הומחשה ב-SOG, ובגנגליוני הבטן (Golubeva et al., 1997).
 מידע זה מרמז, כי PBAN משוחרר לתוך ההמולימפה ולאחר מכן נודד לאתר הפעולה שלו. מחקרי *in vivo* המחישו, כי כריתת ה-VNC ב-*M. brassicae* פגעה בייצור הפרומון התקין בנקבות ב-scotophase השלישי שלהן, כפי שהוצג לפני כן ב-*S. littoralis* (Marco et al., 1996). בנוסף, רמות האימונוריאקטיביות היו נמוכות יותר בדגימות המולימפה, שהושגו בזמן השיא של ייצור הפרומון על ידי נקבות משני המינים, *S. littoralis* ו-*M. brassicae*, שהיו בעלות VNC כרותים. תוצאות אלו, יחד עם מידע שדווח קודם לכן, מהוות אינדיקציה לכך שבקרת ייצור פרומון מין בשני המינים עשוי לערב הן PBAN (או פפטידים דמויי-PBAN) והן את ה-VNC, ותומכות בהשערה לפיה גורם עצבי מה-VNC גורם לשחרור פפטידים פרומוטרופיים להמולימפה, שלאחר מכן פועלים ישירות על בלוטת הפרומון לזירוז ביוסינתזת פרומון (Iglesias et al., 1998).
 המחשת פעילות ביולוגית בהמולימפה של *H. zea* (Raina and Klun, 1984;)
 (Ramaswamy et al., 1995) הציעה, כי PBAN משוחרר להמולימפה מה-*corpus cardiaca* (CC) (Raina, 1996).

1.6.3 אתר המטרה של PBAN

הוכחה מבנית מוקדמת רמזה על אפיתליום הבלוטה בין הפרקים השמיני והתשיעי של הבטן בקצה צינור ההטלה כאתר אפשרי לייצור פרומון מין בנקבות של מספר מיני עש (Percy and Weatherston, 1974; Teal et al., 1983; Aubrey et al., 1983). נמצא, כי קפלים בקו האורך מגבירים את שטח פני הממברנה הבין פרקית (Roelofs and Feng, 1968;)

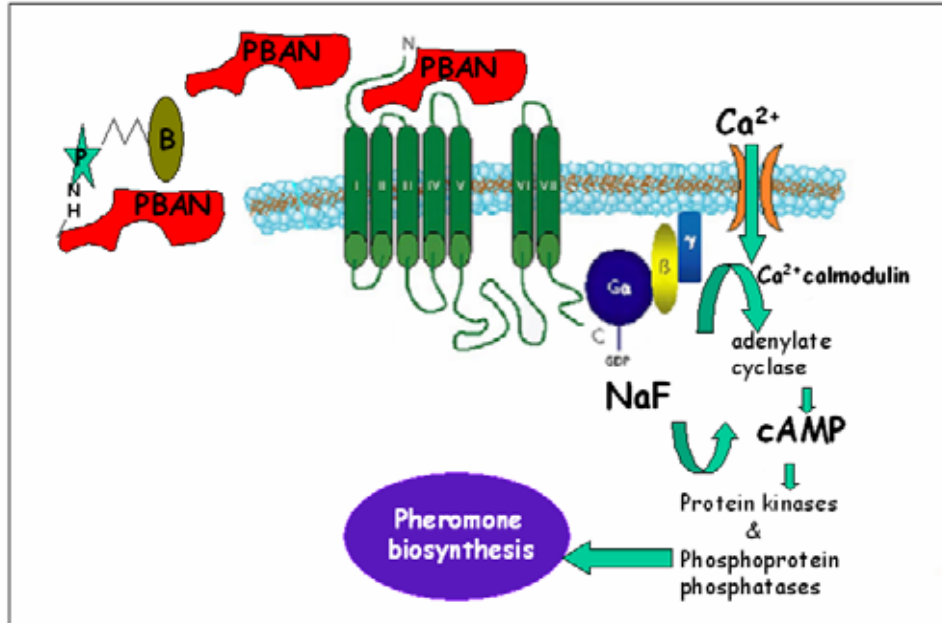
Weatherson and Percy, 1970). מחקרם של Raina et al. (2000) ביחס לארגון המבני של בלוטת פרומון המין ב- *H. zea* המחיש, כי הפרומון נוצר על ידי טבעת כמעט שלמה של תאים עמודיים, הממוקמים בין הפרקים השמיני והתשיעי של הבטן. במחקר זה התגלו מאפיינים על מבניים, שנוצרו בזמני ביוסינתזת פרומון המין. מבחני *in vitro* שנערכו בבלוטות פרומון מבודדות של המינים *H. armigera* ו-*H. zea*, בהם מיצויי מוח ו- *Hez-PBAN* (שמקורו ב- *H. zea*) סינתטי זירזו את ביוסינתזת המרכיב העיקרי של פרומון המין, Z-11-hexadecenal, הראו כי פעילות פרומונוטרופית ספציפית לבלוטת הפרומון (Soroker and Rafaeli, 1989; Rafaeli et al., 1990, 1993). הוכח, כי תגובת הבלוטה המבודדת לגירוי הפרומונוטרופי אינה תלויה במצבן הפיסיולוגי, בגילן הכרונולוגי, בפוטופריאודה או בהזדווגות של הנקבות (Rafaeli et al., 1993; ראה Rafaeli, 2002 Review). על סמך מחקרים אלו, הוכח לגבי המינים *H. armigera* ו-*H. zea*, כי הממברנה הבין פרקית, הממוקמת בין הפרקים השמיני והתשיעי של בבטן העש, מהווה את רקמת המטרה העיקרית לפעילות הפרומונוטרופית של *PBAN* (Soroker and Rafaeli, 1989; Rafaeli, 1996; and Gileadi, 1995a; Jurenka, 1996). הוכחות נוספות לכך הצטברו במיני עש נוספים; *Thaumetopoea*, *Plodia interpunctella*, *O. nubilalis*, *S. litura*, *B. mori* (Arima et al., 1991; Fonagy et al., 1992; Ma and Roelofs,) *pityocampa* (1995a,b; Fabrias et al., 1995). *Fan et al.* (1999a) הראו, כי בלוטות פרומון מין של בוגרים חבויים, בטרם ההגחה, אינן מייצרות פרומון מין באופן עצמאי, ולא מגיבות ל- *PBAN* הניתן חיצונית. בהתבסס על המסקנה ממחקרי ה- *in vitro*, כי הממברנה הבין פרקית מייצגת את רקמת המטרה של ה- *PBAN* ברוב המינים הנחקרים, נקבע כי רקמה זו מכילה ככל הנראה קולטנים משוערים ל- *PBAN* (ראה Rafaeli, 2002 Review). יש לציין, עם זאת, כי המגוון התפקודי של הפפטידים ממשפחת ה- *PBAN-pyrokinin-myotropin* מציע, כי עשויים להיות מספר אתרים לפעולה (Nassel, 1993).

1.6.4 מסלול הולכת הסיגנל ותיווך שליחים משניים

לרוב, קשירת הורמונים פפטידיים לקולטן ספציפי בממברנת תאי אתר המטרה הכרחית לפעולתם. לאחר שהקולטן מקבל סיגנל ממקור עצבי והורמונלי אודות קשירתו ל- domain חוץ תאי של הקולטן, הוא מעביר ומגביר את המסר מסביב לממברנת התא באמצעות שליחים משניים ובכך משפיע על מסלול ביוכימי באמצעות פעילויות אנזימים ותוצריהם. תהליך מעבר אותות מתרחש ברוב סוגי התאים, ולכל תא עשוי להיות שילוב ייחודי של מנגנוני האיתות הללו (ראה Rafaeli, 2002 Review).

מחקרן של (Rafaeli and Soroker, 1989b) במין *H. armigera* באשר למאורעות התאיים, שמתרחשים בבלוטות פרומון המין כתוצאה מזירוז על ידי PBAN, גילה מעורבות של יוני סידן ושל הנוקלאוטיד הציקלי Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP) כשליחים משניים בביוסינתזת פרומון המין. השליחים המשניים הללו מופעלים כתוצאה מקשירת ה-PBAN לקולטן בממברנת התא של בלוטת פרומון המין (Jurenka et al., 1991c; Jurenka, 1996; Rafaeli and Soroker, 1989b) ומפעילים את מסלול הביוסינתזה של פרומון המין (איור 3).

ניסויים פרמקולוגיים הראו, כי רמות cAMP תוך תאיות עולות כתוצאה מזירוז על ידי PBAN (Rafaeli and Soroker, 1989b; Rafaeli et al., 1990). חומרים הגורמים לפתיחת תעלות סידן בממברנת תאי המטרה (ionophores), כגון ionomycin (Soroker and Rafaeli, 1995) ו-thapsigargin (Rafaeli and Gileadi, 1996a) נמצאו מזרזים את ייצור פרומון המין וגרמו לעליות משמעותיות ברמות ה-cAMP התוך תאיות. הדבר רמז כי סידן מפעיל את האנזים adenylate cyclase במהלך זירוז ביוסינתזת הפרומון. Rafaeli and Gileadi (1996a) מצאו בנקבות מהמין *H. armigera*, כי PBAN גורם לפתיחת תעלת סידן, המביאה לכניסת סידן חוץ תאי אל הציטוזול. הוצע, כי סידן הנכנס לתא נקשר ל-calmodulin (CaM) ליצירת קומפלקס calcium-calmodulin, וכך מפעיל את האנזים adenylate cyclase המייצר cAMP (Soroker and Rafaeli, 1995). CaM הוא חלבון קושר סידן, המתווך בפעולת הסידן על אנזימים רבים ותהליכים תוך תאיים (Klee et al., 1980). בנוכחות cAMP, thapsigargin מעודד את יוני הסידן ליצירת קומפלקס calcium-calmodulin (Rafaeli and Gileadi, 1996a), ובכך מחקה את פעולת ה-PBAN בביוסינתזת הפרומון. בנוסף, מעכבי CaM בנוכחות PBAN נטרלו את העלייה ברמת ה-cAMP ובייצור פרומון המין שנגרמת על ידי PBAN, ב-*H. armigera* וב-*B. mori* (Soroker and Rafaeli, 1995; Matsumoto et al., 1995). משמעות הדבר היא, שהקומפלקס calcium-calmodulin משחק תפקיד קריטי בפעילות הפרומונוטרופית, וכי ישנה תקשורת הדדית בין שני השליחים המשניים.



איור 3: שליחים משניים המתווכים בביוסינתזת פרומון המין. ייצור הפרומון מתווך על ידי שליחים משניים ברמת התא. מולקולת PBAN מגיעה ונקשרת לקולטן המעוגן בממברנת התא, ועל ידי כך מפעיל שני שליחים משניים: פתיחת תעלות Ca^{2+} והפעלת cAMP, והמסלול ממשיך ליצירת פרומון. ניסויים פרמקולוגיים הראו, כי יצירת פרומון מופעלת על ידי NaF, המפעיל חלבון G, שמאקטב את האנזים adenylate cyclase. לכן ניתן לומר, שהקולטן ל-PBAN קשור לחלבון G ושייך למשפחת ה-GPCRs. לצורך זיהוי הקולטן, סונתז ליגנד מסומן, הכולל PBAN עם קבוצת פוטואפיניות ו-biotin, המאפשר מעקב אחר קשירת ה-PBAN לקולטן.

כמו כן, סידן חוץ תאי נמצא חיוני לפעילות הפרומונוטרופית המושרית על ידי PBAN ב-*H. zea* (Jurenka et al., 1991c); ב-*Bombyx mori* וב-*Spodoptera litura* (Jurenka et al., 1994); ב-*Argyrotaenia velutinana* (Fonagy et al., 1992); ב-*H. armigera* (Rafaeli and Soroker, 1993; Soroker and Rafaeli, 1995); וב-*Ostrinia nubilalis* (Ma and Roelofs, 1995b). בהיעדר סידן, PBAN אינו משרה עלייה ברמות cAMP תוך תאיות (Soroker and Rafaeli, 1995). בהתאם לכך, חוסמים של תעלת הסידן נצפו כמעכבים את הפעילות הפרומונוטרופית בתגובה לזירוז על ידי PBAN (Jurenka et al., 1991c, 1994). לעומת זאת, (Rafaeli and Gileadi (1996a) הוכיחו, כי הפעילות הפרומונוטרופית של PBAN בריכוזים גבוהים אינה תלויה ב-cAMP, בעוד שבריכוזים נמוכים של PBAN ייצור פרומון המין תלוי בעליית רמת ה-cAMP התוך תאי. verapamil hydrochloride הינו אנטגוניסט ליוני סידן (Fleckenstein, 1977; Rosenberger and Triggle, 1978), שפעולתו אינה מוגבלת לתעלות סידן. מפריע להווצרות מפל הפוטנציאל בתא, בכך שמשפיע על תעלת K^+ -ATP ומדכא את שטף ה- K^+ , המביא לקיצור פוטנציאל המנוחה (Kimura et al., 1992; Bellamy, 1996). (Jurenka et al. (1991c). אשר המחישו בבלוטות פרומון מבודדות של *H. zea*, כי

Ca^{2+} חוץ תאי חיוני לפעילות הפרומונוטרופית המושרית על ידי PBAN, הראו במחקרם, כי verapamil, על אף היותו חוסם תעלות סידן, לא עיכב את פעילות ה-PBAN בבלוטות, לעומת חוסמי תעלות הסידן La^{3+} ו- Mn^{2+} , שנמצאו בעלי השפעה מעכבת על PBAN. משמעות הדבר היא, ש-verapamil אינו חוסם כניסת סידן לתא המתווכת על ידי קולטן (RMCE; Receptor-mediated calcium entry). מאחר וכניסת הסידן לתא לא נמצאה מעוכבת על ידי verapamil ו-nifedipine (חוסמי תעלות תלויות מתח), Jurenka et al. (1991c) קבעו, כי כניסת הסידן לתא נעשית באמצעות תעלות, המשופעות על ידי האינטרקציה בין הליגנד PBAN וקולטן.

מחקרי פעילות שעשו שימוש ברצף המלא של Hez-PBAN ובקטע של 6 חומצות האמינו בקצה ה-C טרמינלי של Hez-PBAN (YFSPRLamide), הציעו תגובה דו-מנגנונית ל-PBAN. אחד המנגנונים מגיב לריכוזים נמוכים של PBAN (אפיניות גבוהה לקולטן או לאתר הקולטן), והאחר מגיב לרמות גבוהות של PBAN (אפיניות נמוכה לקולטן או לאתר הקולטן) (Raina and Kempe, 1992; Rafaeli, 1994; Rafaeli and Gileadi, 1996a).

גורמים פרמקולוגיים אחדים, כדוגמת forskolin (המפעיל את האנזים adenylylate cyclase הממזרז יצירת cAMP מ-ATP), IBMX; 3-Isobutyl-1-methylxanthine (המעכב את האנזים phosphodiesterase) ואנלוגים ל-cAMP (8-bromo-cAMP, dibutyryl cAMP ו-cAMP Sp) נמצאו מחקים את התגובה הפרומונוטרופית של PBAN (Rafaeli and Soroker, 1989b; Rafaeli et al., 1990; Jurenka et al., 1991c; Jurenka, 1996).

מעכבי phosphoprotein phosphatases כגון סודיום פלואוריד (NaF) נמצאו מעכבים את ביוסינתזת הפרומון *in vitro*, ב-*B. mori* (Matsumoto et al., 1995) ו-*H. zea* ו-*H. virescens* (Jurenka, 1996). מצד שני, NaF בריכוזים נמוכים משפעל את adenylylate cyclase דרך חלבון G (Howlett et al., 1979) על ידי פעולתו על תת היחידה G_α (Northup et al., 1983). ב-*H. armigera*, NaF בריכוז גבוה נמצא מעכב ייצור פרומון *in vitro*, אך בריכוזים נמוכים יותר הוא הפעיל, באופן תלוי בסידן, ייצור פרומון וגם רמות cAMP תוך תאיות, והדבר רמז על מעורבות חלבוני G בפעילות הפרומונוטרופית (Rafaeli and Gileadi, 1996b).

Rafaeli and Gileadi (1995b) המחישו את פעולתו הפרומונוסטטית של האמין הביוגני, octopamine, על ייצור פרומון המין *in vitro* בנוכחות PBAN. אמינים ביוגניים, משמשים כניורטרנסמיטורים, ניירוהורמונים ונירומודולורים במערכות חולייתנים (tyramine) וחסרי חוליות (octopamine) (Evans, 1980). מאחר והפעילות הפרומונוטרופית מתווכת על ידי cAMP, ההשפעה של octopamine על זירוז העליה רמות ה-cAMP על ידי PBAN נחקרה אף היא (Rafaeli and Gileadi, 1995b), ונמצא כי עיכוב משמעותי בעליית רמות ה-cAMP התוך תאיות ובייצור פרומון המין נגרמת על ידו (Rafaeli and Gileadi, 1995b).

ביוסינתזת פרומון עשויה להיות מבוקרת גם ברמת קולטן הממברנה על ידי אינטרקציה עם קולטן ל- octopamine, שגורם לעיכוב adenylate cyclase במשוב שלילי (Rafaeli and Gileadi, 1995b).

יש לציין, כי PBAN מאקטב ביוסינתזת פרומון *in vitro* כמו גם את השליח השניוני התוך תאי שלו, cAMP, רק ברקמות בין פרקיות של בלוטת הפרומון של נקבות שהגיו (Rafaeli et al., 2003). רקמות בין פרקיות של נקבות בשלב הגולם והרקמות ההומולוגיות של זכרים בוגרים אינם מגיבים ל- PBAN (Rafaeli et al., 2003).

(GPCRs) G protein-coupled receptors (1.7)

קולטנים של פפטידים הורמוניים יכולים להיות מסווגים לשלוש קטגוריות עיקריות של חלבונים ממברנליים: (1) תעלות יונים הנפתחות על ידי הליגנד, (2) קולטנים המצומדים לחלבון G (GPCR) ו- (3) קולטנים בעלי דומיין טרנסממברנלי יחיד (Vanden Broeck, 1996).

קולטנים המצומדים לחלבון G (GPCRs) יוצרים משפחה גדולה ומגוונת של חלבונים, המצויים בכל האוקריוטים, כולל אורגניזמים חד תאיים (Bohm et al., 1997). אלו הם חלבונים הנעוצים בממברנה, שתפקידם העיקרי הוא בהמרת גירויים חוץ תאיים לסיגנלים תוך תאיים. GPCRs קושרים מגוון של ליגנדים, הכוללים יוני סידן, הורמונים, נירורטרנסמיטורים, אמינים ביוגניים, chemokins, פפטידים ואף חלבונים גדולים (Hargrave and McDowell, 1992; Strader et al., 1994; Sakmar, 1998; Shichida, 1998; Hamm, 1998; Bohm et al., 1997; Imai, 1998). האינטרקציה של GPCRs עם הליגנד או אגוניסט לרוב מובילה לשפעול מסלולי מעבר סיגנל מצומד לחלבון G (Bockaert, 1991; Van Roey et al., 2004).

ה- GPCRs חולקים הומולוגיה גבוהה הן במבנה הראשוני והן במבנה השלישוני, והדבר משקף את מנגנון הפעולה המשותף שלהם (Gilman, 1987). מאפייני המבנה הכללי של משפחת ה- GPCRs שמורים במידה רבה. המבנה הכולל שבעה domains הידרופוביים של סילי α המקיפים את הממברנה (טרנסממברנליים) (7TM) (Baldwin et al., 1997; Palczewski et al., 2000) וקשורים על ידי לולאות חוץ תאיות ושלוש לולאות תוך תאיות הידרופיליות (IC₁, IC₂ ו- IC₃); domain חוץ תאי בקצה ה- N טרמינלי וקצה C טרמינלי תוך תאי (Hamm, 1998; Harmer, 2001). רוב ההומולוגיה ברצף הראשוני מצויה בדומיין הטרנסממברנלי ההידרופובי, בעוד שאיזורי הלולאות ההידרופיליות מגוונים יותר בין ה- GPCRs (Strader et al., 1995).

קשירת ליגנדים ספציפיים ל- domains החוץ תאיים והטרנסממברנליים של ה- GPCRs גורמת לשינויים במבנה, הפועלים כמתג להעברת הסיגנל לחלבוני G, שמעוררים תגובות

תוך תאיית נוספות, המונחות ביסוד התגובות הפיסיולוגיות של רקמות ושל אורגניזמים (Iiri et al., 1998). למעשה, GPCRs ממירים גירויים חוץ תאיים לאותות תוך תאיים על ידי אינטרקציה של הדומיינים התוך תאיים שלהם עם חלבוני heterotrimer G (Kroeze et al., 2003). חלבוני heterotrimer G מורכבים מתת היחידות α , β ו- γ (Bohm et al., 1997). הם משחקים תפקיד חשוב בקביעת הספציפיות ומאפייני התגובות התאיות לאותות. שפעול ה-GPCRs על ידי קשירת ליגנד גורם לשינוי מבני בו, המביא לקשירתו לחלבון G הטרוטרימרי ולשחלוף נוקלאוטיד, guanine, בתת היחידה G_α של חלבון G. הקטליזה של שחלוף הנוקלאוטיד על ידי GPCR מאוקטב מורכבת ממספר שלבים. בטרם השפעול, תת היחידה G_α קשורה ל-GDP. חלבוני G הם בלתי-פעילים במצב קשירתם ל-GDP, כלומר במצב הטרודימרי, והם מופעלים על ידי החלפת הנוקלאוטיד guanine המזורזת על ידי הקולטן.

כאשר הקולטן המשופעל קושר את חלבון G הטרוטרימרי, הוא גורם לדיסוסיאציה של GDP מתת היחידה G_α ולקשירת GTP על ידה. כתוצאה מכך, G_α הקשורה היטב ל-GTP ותת היחידות $G_{\beta\gamma}$ של החלבון G נפרדות זו מזו ומה-GPCR ונעשות חופשיות ליצור אינטרקציה עם חלבונים במורד הזרם של מעבר הסיגנל (אפקטורים) ולשפעלם. האנזים GTPase פועל על G_α וגורם להידרוליזה של GTP הקשור אליה. עקב כך, משתחרר פוספט מה-GTP, והוא הופך ל-GDP. בשלב זה, G_α הקשורה כעת ל-GTP, ניתקת מאותם חלבונים אליהם נקשרה, ומתחברת שוב לתת היחידה $G_{\beta\gamma}$ (Fung, 1983; Bohm et al., 1998; Hamm, 1997). הפיכת חלבון G לבלתי פעיל מחדש מהווה גורם מגביל קצב בכיובי התגובה התאית ומתרחשת כאשר GTP הקשור לתת היחידה G_α מתפרק ל-GDP. על אף המבנה האוניברסלי של ה-GPCRs, השוואות רצפים רבות של קולטנים גילו מספר משפחות חלבונים (Kolakowski, 1994; Josefsson, 1999). בחלק ממשפחות ה-GPCRs, הקולטנים ששייכים להן כבר הוכחו כקושרים ליגנדים פפטידיים: (1) הגדולה ביותר היא משפחת ה-Rhodopsin (המכונה גם משפחה A של GPCRs) Rhodopsin הינו GPCR המהווה מודל ל-GPCRs אחרים (Unger et al., 1997; Baldwin et al., 2000; Palezewski et al., 1997). במשפחת ה-Rhodopsin חברים בין השאר קולטנים לפפטידי PRXa (איור 2): pyrokinin/myotropin/PBAN (-FXPRLa), CAP2b, (-FPRXa) ו-ETH (Ecdysis Triggering Hormone) (-PRXa) (Claeys et al., 2005).

1.8 הקולטן של PBAN

קביעת הרצף של גנום ה-*Drosophila melanogaster* בשלמותו אפשרה זיהוי קולטנים רבים יותר לפפטידים בחרקים (Adams et al., 2000). באמצעות שיטות אימונוציטוכימיות ומבחני פעילות ביולוגית נקבע, כי *D. melanogaster* מכיל פפטידים, השייכים למשפחת

ה- PBAN-pyrokinin (Choi et al., 2001). בגנום ה- *D. melanogaster* נמצאו כ- 44 גנים המקודדים לקולטנים פפטידיים המצומדים לחלבון G (GPCRs) (Hewes and Taghert, 2001), ולפחות אחד הקולטנים תואר כקושר פפטידים בעלי המוטיב FXPRLamide (Park et al., 2002). מתוך אותם 44 גנים, ארבעה נמצאו זהים לקולטנים של neuromedin U (NMU) בחולייתנים (Hewes and Taghert, 2001). ניתן לשער, כי רצפי הליגנד והקולטן שמורים, ולכן הליגנדים לקולטני ה- *Drosophila* עשויים להיות דומים לליגנד neuromedin U, המכיל FRPRNamide בקצהו ה-C טרמינלי (Park et al., 2002). העובדה, כי *D. melanogaster* מכיל פפטידים השייכים למשפחת ה- PBAN-pyrokinin (Choi et al., 2001), וכי לפחות קולטן אחד תואר כקושר פפטידים בעלי המוטיב FXPRLamide (Park et al., 2002) סייעו בחיפוש אחר קולטן ל- PBAN בעש על ידי Choi et al. (2003) מבלוטות פרומון המין של נקבות העש *Helicoverpa zea* (AY319852).

Neuromedin U (NMU) (איור 2) הינו נירופפטיד בעל פעילות גבוהה בכיווץ שריר חלק, שבודד לראשונה מעמוד השדרה של חזירים (Minamino et al., 1985), ומאוחר יותר מהמוח, עמוד השדרה והמעי של מינים רבים אחרים כגון כלב (O'Harte et al., 1991), ארנב (Kage et al., 1991), צפרדע (Domin et al., 1989), בני אדם (Austin et al., 1995) ועופות (Domin et al., 1992).

שתי צורות מולקולריות של הנירופפטיד נוקו; אוקטאפפטיד (NMU-8) (איור 2), המורכב מהליבה הפעילה בקצה ה-C טרמינלי של NMU, והרצף ה-N טרמינלי המורכב מ- 25 או מ- 23 חומצות אמינו בבני אדם ובחולדות, בהתאמה (Austin et al., 1995; Conlon et al., 1988; Minamino et al., 1985; 1988). שתי הצורות המולקולריות של NMU פעילות ביולוגית. האיזור הפעיל ביולוגית של הפפטיד (הקצה ה-C טרמינלי), שמור במידה רבה במינים שהוזכרו. הפעילויות הפריפריאליות של NMU כוללות את האצת התכווצות הרחם של נקבות עכברים (Minamino et al., 1985), כיווץ כלי דם בחולדות ובכלבים (Gardiner et al., 1987; Minamino et al., 1985; Sumi et al., 1990; et al., 1990), החלפת מעבר היונים במעי (Brown et al., 1988) ובקרה מרכזית של האכילה בחולדות, המתבטאת בדיכוי התיאבון (Howard et al., 2000; Nakazato et al., 2000).

Howard et al. (2000) הראו, כי שני GPCRs "יתומים", FM-3 (המכונה גם GPR66) ו-FM-4 הינם קולטנים ל-NMU, והם צוינו כ- NMU1R ו-NMU2R, בהתאמה. הקולטן FM-3 (NMU1R) הוא בעל תפוצה רחבה ברקמות פריפריות רבות של חולדות ושל בני אדם, כולל מערכת העיכול והריאות (Howard et al., 2000; Raddatz et al., 2000; Szekeres et al., 2000). זאת בעוד ש-FM-4 (NMU2R) מבוטא באיזורים ספציפיים של המוח בלבד (Austin et al., 1995; Howard et al., 2000). אחד מהאיזורים הללו במוח חולדות הוא ה- suprachiasmatic nucleus (SCN) של ה- hypothalamus (Nakahara et al., 2000).

et al., 2004). ה- SCN שולט על המחזור הסירקאדי של תהליכים התנהגותיים ופיסיולוגיים ביונקים, והוא מבוקר על ידי אותות פריאודיים סביבתיים, כגון מחזוריות של אור וחושך (אות התלוי באור) או טמפרטורה (אות שאינו תלוי באור) (Lowrey and Takahashi, 2000; Moore et al., 2001, 2002). נמצא, כי איזור הליבה של ה- SCN (Reppert and Weaver, 2001, 2002) משחק תפקיד חשוב בסינכרוניזציה היומית של תהליכים (Hamada et al., 2002). ידוע, כי נירופפטידים אחדים משתתפים בבקרת הקצב ה- circadian ב- SCN (2001). (Reppert and Weaver, 2001). העובדה כי קולטן ה- FM-4 מבוטא ב- SCN הציעה, כי הליגנד האנדוגני של הקולטן מעורב במערכת המקצב הסירקאדית (Mori et al., 2005). במחקרם, זיהו (Mori et al., 2005) נירופפטיד באורך 36 חומצות אמינו במוחות של חולדות כליגנד האנדוגני ל- FM-4, שהינו גם הקולטן ל- NMU (Howard et al., 2000). הפפטיד, שצוין כ- neuromedin S (NMS), הנושא רצף C טרמינלי זהה ל- NMU (FRPRNamide) (באיור 2 מוצג הרצף השמור המשותף לאורגניזמים שונים), מבוטא ספציפית באיזור ליבת ה- SCN של ה- hypothalamus. נמצא, כי ביטוי של NMS משתנה על פי המקצב היומי, במחזוריות של אור וחושך, בעוד שייצור ה- NMS נותר יציב בתנאים קבועים של חושך (Mori et al., 2005). הזרקת NMS למוחותיהן של חולדות גרמה להפעלת הניורונים ב- SCN והשרתה תזוזת פאזה (phase shift) במקצב הסירקאדי של פעילות התנועה בחולדות. התזוזה בפאזה נמצאה בלתי תלויה באור, אלא באות סביבתי אחר (Mori et al., 2005). ממצאים אלו מציעים, כי NMS מעורב בבקרת המקצב היומי, המשפיע על תהליכים שונים ביונקים, וכי מערכת סירקאדית זו מבוקרת על ידי אות סביבתי שאינו קשור באור (Mori et al., 2005). מעניין לציין, כי אותה תופעה נמצאה גם ב- NMU, ששוער אף הוא כגורם בקרה במערכת המקצב הסירקאדי ביונקים (Nakahara et al., 2004).

נמצא, כי פפטידים בעלי הומולוגיה מסויימת ל- neuromedin U שזוהו מחרקים ממינים שונים הינם פפטידים דמויי-PBAN (Park et al., 2002). לכן, Choi et al. (2003) שיערו כי neuromedin U עשוי לזרז ביוסינתזת פרומון מין בבלוטות פרומון מבודדות. נמצא, כי neuromedin U בריכוז של 1 μ M שמקורו בחזיר אכן מסוגל לזרז ביוסינתזת פרומון מין *in vitro* בנקבות מהמינים *H. zea*. מכאן הוסק, כי ישנה הומולוגיה בין הקולטן ל- neuromedin U בחולייתנים לבין הקולטן המשוער ל- PBAN בבלוטת פרומון המין, והדבר היווה את הבסיס להמשך מחקרם של Choi et al. (2003). עם זאת, יש לציין, כי בריכוז נמוך יותר (10 nM), NMU אינו פעיל פרומוטרופית ב- *H. zea* (Choi et al., 2003).

נוסף ל- neuromedin U, נבחנו פפטידים נוספים באשר לפעילותם הפרומוטרופית בבלוטות פרומון מבודדות של נקבות *H. zea*. Hez-PBAN (איור 2) נמצא בעל פעילות פרומוטרופית בשני הריכוזים הנבחנים (10 nM ו- 1 μ M). הפפטיד CAP2b-3

מ- *Drosophila* (איור 2) נמצא אף הוא פעיל בשני הריכוזים הללו, בעוד שפפטיד אחר מ- *Drosophila*, ETH-1 (אחד הפפטידים המקודדים על ידי הגן *ETH*) (איור 2) נמצא לא פעיל בריכוז של 10 nM, אלא בריכוז של 1 μ M בלבד (Choi et al., 2003).

פפטידי ה- *Md* myomodulin (איור 2), הם משפחה גדולה של נוירופפטידים, שזוהו לראשונה בנוהרן מוטורי כולרינרגי (cholinergic buccal) (B16) ברכיכה *Aplysia californica* (Cropper et al., 1987). *Md* נמצא מעורב בבקרת התכווצות שרירי ה- ARC (accessory radula closer) הבורסליים ב- *A. californica* על ידי העברת מסרים שריריים-עצביים לשרירים אלו (Cropper et al., 1987; Whim and Lloyd, 1990).

פפטידים דמויי- *Md* נמצאו גם במערכת העצבים המרכזית (CNS) של מגוון אורגניזמים אחרים, הכוללים טפילים (Keating and Sahley, 1996), סרטניים (Christie et al., 1994), ארבה (Swales and Evans, 1994) וזבובים (Nassel et al., 1994). (1998) O'Brien and Taghert הראו ב- *D. melanogaster*, כי תאים לאורך הטרכיאות בפריפריה משחררים פפטידים דמויי-*Md* כחלק מהבקרה האנדוקרינית של תהליך ההתנשלות בחרקים. (Evans 1994) הראה, כי *Myomodulin A* (אחד מפפטידי ה- *Md*) מבקר את המתח הנוצר בשריר המותח של הרגל האחורית בארבה מהמין *Schistocerca gregaria*.

Md נמצא לא פעיל פרומונטרופית ב- *H. zea* בשני הריכוזים הנבחנו (Choi et al., 2003). מבין הפפטידים שנבחנו על ידי (Choi et al., 2003) לגבי זירוז ביוסינתזת פרומון בבלוטות פרומון מבודדות של *H. zea*, *Hez-PBAN* נמצא הפעיל ביותר, ואחריו בסדר יורד: CAP2b-3, NMU, ETH-1 ו- *Md*, שנמצא לא פעיל בטווח הריכוזים הנבחנו (Choi et al., 2003).

בשלב הבא, בוצעה על ידי (Choi et al., 2003) אסטרטגיית שיבוט המבוססת על PCR ל- mRNA מבודד מבלוטות הפרומון של *H. zea*. לשם כך, תוכננו פריימרים דגנרטיביים כנגד רצפים שמורים במידה רבה של שלושה גנים לקולטנים מ- *Drosophila*, שנמצאו הומולוגיים לקולטני ה- *neuromedin U* מבעלי חוליות, CG8784, CG8795 ו- CG9918 (Hewes and Taghert, 2001). הדבר אפשר זיהוי גן המקודד לקולטן המצומד לחלבון G (GPCR) מבלוטות הפרומון של נקבות העש *H. zea* (Choi et al., 2003). כמוזכר בתת הפרק הקודם, מעורבות חלבוני G נקבעה פרמקולוגית, והדבר רמז על היות הקולטן המשוער ל- *PBAN* קשור לחלבון G (GPCR) (Rafaeli and Gileadi, 1996b).

אנליזה הידרופתית שבוצעה על ידי (Choi et al., 2003) הצביעה על נוכחות שבעה דומיינים טרנסממברנליים, שהנם מאפיינים של GPCRs. כמו כן, נמצא וריאנט ה- ERY של דומיין ה- DRY מיד לאחר החלק הטרנסממברנלי השלישי, ששמור במידה גבוהה בקרב GPCR וחיוני לקישור ולשפעול חלבוני G. נוסף על כך, שני אתרים משוערים של גליקוזילציה התגלו

באיזור ה- N טרמינלי ובין הדומיינים הטרנסמברליים 4 ו- 5 (Choi et al., 2003). לבסוף, שאריות אחדות של סרין ותריאונין נמצאו בקצה ה- C טרמינלי כאותות אפשריים לפוספורילציה. חיפוש BLAST שנערך במאגר המידע GenBank הצביע על כך, שהחלבונים מחוליייתנים בעלי זהויות הרצף הקרובות ביותר ל- PBAN-R מ- *H. zea* היו קולטני neuromedin U, מלווים בקולטני ghrelin (Choi et al., 2003). על סמך מידע זה הוסק, כי PBAN-R, המזרז ביוסינתזת פרומון בנקבות עש, הנו GPCR, המתאים לפפטידים ממשפחה זו (Choi et al., 2003).

על מנת להוכיח שהקולטן מ- *H. zea* אכן מעורב בסינתזת פרומון מין ופעיל בקשירת PBAN, נעשתה טרנספורמציה לגן של הקולטן בתאים חרקיים, Sf9, לצורך הדמייה על ידי סידן בתא בודד, ונבחנה האפיניות של הקולטן ל- PBAN ולפפטידים דמויי- PBAN. קשירת הליגנדים (הפפטידים) ל- PBAN-R הוערכה על ידי מדידת שטפי הסידן בציטוזול. לשם כך, נעשה שימוש בכילטור פלואורסנטי, Fluo-4/ AM, הקושר יוני סידן באופן תלוי במנה. בטרם הוספת הליגנדים הפפטידיים, תאי ה- Sf9 הודגרו בחושך בתמיסה המכילה Fluo-4, ורמת הפלואורסנציה נמדדה באמצעות מיקרוסקופ קונפוקלי. לאחר הוספת אחד הליגנדים, נמדדו השינויים ברמת פלואורסנציה כפונקציה של זמן ההדגרה עם הליגנד. על מנת לקבל קריאה מקסימלית של הפלואורסנציה, הוסף ionomycin, הפותח תעלות סידן בממברנת התא, וכך גורם לכניסת סידן לתוך התא.

עבור כל ליגנד שנקשר לקולטן, שורטטה עקומה המתארת את עוצמת הפלואורסנציה היחסית (רמת הפלואורסנציה שהתקבלה כתוצאה מקשירתו מחולקת ברמה המקסימלית) כנגד לוגריתם של ריכוז הליגנד. באמצעותה חושב ה- EC_{50} (Effective Concentration), המבטא את ריכוז הליגנד הנדרש לקבלת מחצית מעילות הקשירה המקסימלית שלו לקולטן (Choi et al., 2003).

הליגנדים שנבחנו במערכת זו הינם: *Hez-PBAN*, *Hez-PBAN* מחומצן, PGN-7, FMRFamide, Md, NMU, ETH-1, CAP2b-3, LPK, PGN-24, PGN-8, PGN-18 ו- Proctolin (Choi et al., 2003). ערך ה- EC_{50} הנמוך ביותר נמצא עבור PBAN. שני הפפטידים מ- *Drosophila*, CAP2b-3 ו- ETH-1 נמצאו כבעלי ערכי ה- EC_{50} הגבוהים ביותר מבין הליגנדים שנבדקו. הפפטידים Myomodulin, FMRFamide ו- Proctolin נמצאו בלתי פעילים במערכת זו ($> 10 \mu M$) (Choi et al., 2003). מתוצאות אלו הוסק, כי PBAN, PGN-7, PGN-18 ו- LPK הם הפפטידים הפעילים ביותר בניוד סידן על ידי PBAN-R, ולכן בעלי היכולת הסבירה ביותר בזירוז ביוסינתזת הפרומון בריכוזים פיסילוגיים. כמו כן, היות והפפטידים בעלי ערכי EC_{50} זהים ל- PBAN, והם קצרים יותר מאשר PBAN (איור 2), הוסק כי החלק ה- N טרמינלי של PBAN אינו בהכרח מעניק אפיניות קשירה נוספת, אלא די ברצף FxPRLamide בקצה ה- C טרמינלי (Choi et al., 2003).

הגן לקולטן CG8795 מ- *Drosophila* עבר גם הוא טרנספורמציה לתאי Sf9, ונבחן גם הוא לגבי קשירתו לליגנדים שונים באותה מערכת כמו PBAN-R מ- *H. zea*, למטרות השוואתיות (Choi et al., 2003). הקולטן CG8795 תואר לפני כן כקושר פפטידים הנושאים את הרצף FxPRLamide, כאשר בוטא בתאי oocytes של *Xenopus*, וסווג לאותה משפחה כמו *H. zea* PBAN-R בהתבסס על הומולוגיה ברצף (Park et al., 2002). על מנת להשוות בין פעילות שני הקולטנים שעברו טרנספורמציה לתאי ה- Sf9 (*H. zea* PBAN-R ו- *Drosophila* CG8795), מבין הליגנדים שנבחנו קשירתם ל- PBAN-R, ערך ה- EC₅₀ הנמוך ביותר נמצא עבור LPK, ו- ETH-1 נמצא כבעל ערך ה- EC₅₀ הגבוה ביותר. NMU נמצא בלתי פעיל במערכת זו ($< 10 \mu\text{M}$) (Choi et al., 2003). יש לציין, כי במחקרם של (Park et al., 2002), בו CG8795 הוחדר לתאי oocytes של *Xenopus*, התקבלו ערכי EC₅₀ נמוכים יותר עבור הפפטידים CAP2b-3 ו- ETH-1. Choi et al. (2003) הסבירו את ההבדלים בערכי ה- EC₅₀ בכך, שלמערכת הביטוי עשויות להיות השפעות שונות על פעילות הפפטידים הנבחנים בהן. מהשוואה בין ערכי ה- EC₅₀ שהתקבלו עבור קשירת הליגנדים השונים על ידי שני הקולטנים במערכת הביטוי בתאי Sf9 הוסק, כי ל- PBAN-R ישנה אפיניות גבוהה יותר ל- PBAN מאשר הליגנדים הנבחנים לעומת קולטן ה- CG8795 (Choi et al., 2003). לסיכום, במחקרם של (Choi et al., 2003) נמצא בעל ערך ה- EC₅₀ הנמוך ביותר מבין הפפטידים הנבחנים, מלווה במספר פפטידים נוספים בעלי מוטיב ה- FxPRLamide. תוצאות אלו מספקות הוכחה מוצקה לכך, שה- cDNA שבודד מ- *H. zea* מקודד לחלבון, הפועל כקולטן ל- PBAN בתאי בלוטת הפרומון של *H. zea*. פפטידים אחרים הנושאים את מוטיב ה- FxPRLamide עשויים אמנם לזרז ביוסינתזת פרומון בנקבות עש, אך PBAN הינו הפפטיד הסביר ביותר בזירוז ביוסינתזת פרומון בריכוזים פיזיולוגיים (Choi et al., 2003).

מחקרם של (Choi et al., 2003) מהווה את הזיהוי הראשון של GPCR בעל תפקיד ידוע של זירוז ביוסינתזת פרומון בנקבות עש, עם משפחת פפטידי ה- PBAN/ pyrokinin. מאחר ורצף ה- FxPRLamide ה- C-טרמינלי של PBAN מצוי במגוון פפטידים ומייצג את הרצף המינימלי הדרוש לפעילות פרומוטרופית (Raina and Kempe, 1990, 1992; Kuniyoshi et al., 1991), צפוי שחלבוני קולטן ה- PBAN יהיו מתוארים גם כמשפחה של קולטנים ספציפיים לחרק, המצויים במגוון רקמות של חרקים. הרצף המוסק של PBAN-R מ- *H. zea* הנו באורך 346 חומצות אמינו, והדבר מצביע על משקל מולקולרי של 38.6 kDa עבור חלבון הקולטן (Choi et al., 2003).

המחקר הנדון (Choi et al., 2003) הביא לזיהוי ולבידוד קולטן המצומד לחלבון G (GPCR) ל- PBAN מבלוטות הפרומון של נקבות *H. zea* (AY319852). קולטנים ל- PBAN ההומולוגיים במידה רבה ל- Hez-PBAN-R נמצאו במינים נוספים: *Bombyx mori*

(80% הומולוגיה) (AB181298), *H. armigera* (98% הומולוגיה) (AY792036),
Plutella xylostella (86% הומולוגיה) (AY974334) ו-*Spodoptera littoralis*
(87% הומולוגיה) (DQ407742) (Hull et al., 2004; Choi et al., 2004, GENBank;)
בין המינים (Lee and Boo, 2005, GENBank; Zheng et al., 2006, GENBank).
דומה בשני המינים. *H. armigera* ו-*H. zea* ישנה קרבה רבה, ולכן הקולטן ל-PBAN דומה בשני המינים.
Hez-PBAN-R נמצא דומה גם לקולטנים של פפטידים דמויי-pyrokoinins מהמינים הבאים:
Tribolium castaneum (רצף חזוי עבור קולטן לפפטיד דמוי Diapause-Hormone)
(XM_623963), *Apis mellifera* (חזוי) (XM_623963), *Anopheles gambiae*
(DQ103706) (Cazzamali et al., 2005), *Drosophila melanogaster* (CG9918;
(Park et al., 2002) (AF52291) ו- (Park et al., 2002) (AF522190) CG8795,
GPCR להורמון התרדמה, DH-R) (AB164390/89/88/87/86) (Homma et al., 2006).
על ידי שימוש באנלוג ל-PBAN, המסומן בקבוצת פוטואפיניות וב-biotin, ובבולטות פרומון
של נקבות בוגרות מהמין *H. armigera*, הומחשה קשירה ספציפית של PBAN לחלבון
הקשור לממברנה של כ-50 kDa בשיטת SDS-PAGE (Rafaeli and Gileadi, 1997,)
(1999a; Rafaeli et al., 2003). לאחר לקיחה בחשבון את הגודל של ה-PBAN המסומן
ב-biotin שנשאר קשור לקולטן במערכת זו, הגודל המחושב של PBAN-R הופחת
לכ-45 kDa ו-*H. armigera* הם מינים קרובים במידה רבה, שמבקרים ייצור
פרומון בדרכים זהות (ראו Rafaeli, 2002 Review), ובנוסף רצף הגן מקודד לחלבון בגודל
זהה (AY319852, AY792036). ההבדלים הנראים בגודל החלבון שהופרד בגלל נובעים
קרוב לודאי מגליקוזילציות באתרי גליקוזילציה שונים או אי דיוק של שיטת ה-SDS-PAGE,
בהערכה מדוייקת של המשקל המולקולרי. השערות אלו טרם נבדקו.
הקשירה הספציפית של הליגנד המסומן לחלבון הקולטן המשוער בגודל 50 kDa לא נצפתה
בנקבות בשלב הגולם, 3 ימים לפני ההגחה. הדבר היה נכון גם עבור נקבות צעירות יותר
בשלב הגולם, 4 ימים לפני ההגחה (Rafaeli et al., 2003). (Rafaeli and Bober (2005)
המחישו, כי קשירת ה-PBAN ל-PBAN-R הינה תלוית-גיל, ועוצמת הקשירה הגבוהה
ביותר מתרחשת בנקבות בוגרות בגיל 4-5 ימים.

1.9 סיכום

במיני עש רבים, ביוסינתזת פרמוני המין הינה תחת בקרה פוטופריאודית
(Ichikawa, 1988) של PBAN, הנוצר בגנגליון התת ושטי (Raina and Klun, 1984).
מהגן המקודד ל-PBAN נוצרים ארבעה פפטידים נוספים, שבדומה ל-PBAN נושאים את
הרצף FxPRLamide (x=G, S or T) בקצה ה-C טרמינלי (Kawano et al., 1992; Sato)

1994; Ma et al., 1993; et al.), שהינו הרצף המינימלי וההכרחי לפעילות פרומונטרופית (Raina and Kempe, 1990, 1992; Kuniyoshi et al., 1991). ב- *H. zea*, ארבעת הפפטידים הללו מכונים PGNs (Ma et al., 1996), והם בעלי פוטנציאל לזירוז ביוסינתזת פרומון מין (Teal et al., 1989; Ma et al., 1996).

PBAN שייך ל- PBAN-pyrokinnin peptide family, אשר לפפטידים החברים בה תפקידים שונים, וכולם נושאים את הרצף FxPRLamide בקצה ה- C טרמינלי (ראה Review Rafaeli, 2002).

Choi et al. (2003) זיהו בבלוטות הפרומון של נקבות עש מהמין *Helicoverpa zea* קולטן ל- PBAN, המצומד לחלבון G. הקולטן נמצא בעל אפיניות גבוהה ל- *Hez*-PBAN, אך גם לכמה פפטידים אחרים במשפחה. קולטנים נוספים ל- PBAN, הדומים ל- PBAN-R מ- *H. zea*, נמצאו גם במינים אחרים, דוגמת *H. armigera*. שני המינים הללו קרובים, והקולטן ל- PBAN דומה בשני המינים (98% הומוולוגיה).

משקלו המולקולרי של *Hez*-PBAN-R, 38.6 kDa, הוסק על סמך רצף הגן לקולטן, שאורכו 346 חומצות אמינו (Choi et al., 2003). באמצעות אנלוג ל- PBAN, המסומן בקבוצת פוטואפיניות וב- biotin, ובבלוטות פרומון של נקבות בוגרות מהמין *H. armigera*, הומחשה קשירה ספציפית של PBAN לחלבון הקשור לממברנה של כ- 50 kDa (Rafaeli and Gileadi, 1997, 1999; Rafraeli et al., 2003).

מחקרים אימונוציטוכימיים ומחקרי ELISA הוכיחו, כי קיימת פעילות אימונוריאקטיבית דמוית- PBAN בכל חלקי מערכת העצבים של מיני עש ופרפראים שונים. הדבר מציע, כי כמה מן הפפטידים הקרובים ל- PBAN, שנושאים את הרצף FxPRLamide, ואשר ל- PBAN-R ישנה אפיניות קשירה גבוהה עבורם, הם בעלי פעילות פרומונטרופית בבלוטות הפרומון, בהן נוכחות PBAN-R בוססה. היות ופפטידים אלו גם בעלי תפקידים מגוונים ברקמות השונות בגוף העש, יש לשער כי קיימים קולטנים ל- PBAN ברקמות שונות בגוף העש נוסף לבלוטות פרומון המין, המהווים אתרי פעולה לפעילותם.

2. שיטות וחומרים

רשימת חומרים וציוד

1. 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide (Ethidium bromide) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
2. 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
3. 8-(4-chlorophenylthio)adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP acid) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
4. β -counter (Kontron Instruments, USA)
5. β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
6. Acetic acid (Bio Lab, Jerusalem, Israel)
7. Acetic anhydride (Merck Chemicals Ltd, Poole, Dorset, England, UK)
8. Acetonitrile (Bio Lab, Jerusalem, Israel)
9. Activated charcoal (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
10. Adenosine 3',5'-cyclic phosphate, Ammonium salt [2,8- ^3H] (NEN, Boston, MA, USA)
11. Agarose (Hispanagar, Burgos, Spain)
12. Amiloride hydrochloride (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA)
13. Anti-Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) antibody produced in rabbit (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
14. Avidin-Horse Radish Peroxidase conjugated (Avidin-HRP) (Pierce, Rockford, IL, USA)
15. Bio-rad Protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
16. Biotinylated standard protein mixture for gel electrophoresis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
17. Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
18. Centrifuge rotor (Sorvall, RC-5B, DuPont Instruments, Newtown, CT, USA)
19. Complete EDTA free (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
20. Dimethyl formamide (DMF) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
21. DNA-freeTM DNase Treatment and Removal Reagents kit (Ambion, Inc., Austin, TX, USA)

22. Ethanol (Bio Lab, Jerusalem, Israel)
23. Formaldehyde (Bio Lab, Jerusalem, Israel)
24. Gc-17 Gas Chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan)
25. HCl (Merck, Darmstadt, Germany)
26. *Heliothis* Premix (Stonefly Industries, Inc, Bryan, TX, USA)
27. Heraeus Biofuge Fresco (DJB Labcare, Newport Pagnell, Buckinghamshire, England, UK)
28. Hexane (Bio Lab, Jerusalem, Israel)
29. *Hez*-PBAN (Bachem, AG, Bubendorf, Switzerland)
30. HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan)
31. Image Master[®] VDS (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)
32. iMupid (i-Mupid) Mini Agarose Gel Electrophoresis Apparatus System (Helixx Technologies, Inc., Toronto, Ontario, Canada)
33. isopropanol (Bio Lab, Jerusalem, Israel)
34. Leucopyrokinin₄₋₈ (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
35. Methanol (Bio Lab, Jerusalem, Israel)
36. MinElute[™] Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)
38. Myomodulin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
39. N-[N-4-azido-tetrafluorobenzoyl]-biocytinyloxylsuccinimide (Atf-Bct-NHS) (Boehringer-Roche, Mannheim, Germany)
40. NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)
41. neuromedin U (Bachem, AG, Bubendorf, Switzerland)
42. PCR primers (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
43. PCR-Ready Mix Supreme[™] (Syntezza Bioscience Ltd, Jerusalem, Israel)
44. PGN-7 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
45. PGN-8 (Hebrew University, Jerusalem, Israel)
46. PGN-24 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
47. Pheromonotropin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
48. Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate (Tween 20) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
49. Quick-Load 100bp DNA ladder (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA)

50. Reverse-iT™ 1st Strand Synthesis Kit (ABgene, Epsom, Surrey, England, UK)
51. RNA Stabilization Reagent (RNA/later) (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)
52. RNase-Off™ (PureBiotech, Llc, Middlesex, NJ, USA)
53. RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)
54. SDS-PAGE long life gels (8-16% mini gels) (Gradipore, Frenchs Forest NSW, Australia)
55. SDS-PAGE products (Mini-Protean Gel Electrophoresis Unit, Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA)
56. Sequencing services (Hy Laboratories Ltd., Rehovot, Israel)
57. SKF 96365 hydrochloride (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA)
58. SuperFreeze™ Peroxidase conjugate Stabilizer (Pierce, Rockford, IL, USA)
59. Supersignal- West Dura Extended Duration Substrat (Pierce, Rockford, IL, USA)
60. Thermal Cycler BioCyclerTC-S (Medical-Biological Research & Technologies (BioSan), Riga, Latvia)
61. Tridecyl-acetate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
62. Triethylamine (Merck Chemicals Ltd, Poole, Dorset, England, UK)
63. Trifluoro acetic acid (TFA) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
64. UV₂₅₄ lamp (Ultra-Violet Products, Inc, San Gabriel, California, USA)
65. Verapamil hydrochloride (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
66. Vydac C4 reversed phase- HPLC columns (Alltech®, Lexington, KY, USA)

2.1 העש *Helicoverpa armigera* ותנאי גידולו

בכל שלבי ההתפתחות, גודל העש *H. armigera* בטמפרטורה קבועה של 26°C ובפוטופריאדה של 14 שעות אור ו-10 שעות חושך. העש ניזון ממזון מלאכותי *Heliolithis Premix*, המיוצר ע"י Stonefly Industries Inc. (המכיל 1 ק"ג אבקת מזון, 3 ליטרים מים, 4 מ"ל פורמלין (35% פורמאלדהיד) ו-8 מ"ל חומצה אצטית). לשם מניעת inbreeding, המאגר הגנטי של הגידול חודש מדי שנה על ידי הוספת פרטים שנלכדו בשדה. זחלים בדרגת התפתחות שנייה- שלישית הועברו לתאים בנפח של כ-30 מ"ל בתבניות פלסטיק חד פעמיות. על מנת למנוע קניבליזם, כל זחל הועבר לתא נפרד, עם כ-57 גרם מזון. כעבור כשבוע, בשלב החיפוש אחר מקום להתגלם (Wandering), הועברו הזחלים

בדרגה החמישית לתאי גידול חדשים עם מצע ורמיקוליט לשם התגלמות. עבור כל זחל, צוין תאריך ההתגלמות על גבי התבנית בכדי לקבוע את גיל הגולם לפני הגחתו. כעבור כשבוע נוסף הגלמים מוינו לפי זוויגים, על מנת שהגחת בוגרי הזכרים והנקבות תתרחש בנפרד. לאחר מיונם, הגלמים הושמו בכלובי פלסטיק מאווררים ומקורים בלוח פרספקס, בתוספת צמר-גפן ספוג בתמיסת סוכרוז 10% כמקור מזון.

מדי יום הופרדו הגלמים מהבוגרים שהגיחו בזמן החושך (scotophase) שלפני כן. כשליש מהגלמים הגיחו ביום ה-12 לאחר התגלמותם, וכשני שלישי ביום ה-13 (Rafaeli et al., 2003). זמן האור (photophase) בו הופרדו הבוגרים הוגדר כיום 1, והבוגרים נחשבו כבני יום בעת הפרדתם.

לשם ריבוי העשים, נלקחו כ-20 נקבות בנות יום וכ-40 זכרים בני יומיים, והוכנסו לכלוב פלסטי מאוורר, המכוסה בלוח זכוכית. על דופן הכלוב הונחו רבדי צמר גפן, שעליהם הוטלו רוב הביצים, והוספה לו צלחת פטרי עם צמר גפן הספוג בתמיסת סוכרוז 10%. כעבור 3-4 ימים הודבקו רבדי הצמר גפן על גבי הצד הפנימי של מכסי קופסאות פלסטיק, ובתחתית הקופסאות הונחו 6 גושים של כ-7 גרם מזון. הזחלים שבקעו מהביצים בקופסאות, בהגיעם לדרגת התפתחות שנייה-שלישית, הועברו לתאים בתבניות פלסטיק חד פעמיות עם מזון כמתואר.

2.2 יצירת ובידוד הליגנד Atf-Bct-NHS-PBAN

על פי פרוטוקול השיטה, שתוארה על ידי (Rafaeli and Gileadi 1999), *Hez-PBAN*, סינתטי הומס ב-50% מתאנול, כך שריכוזו בתמיסה היה $100 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ ($20.4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). לאחר ייבוש הדוגמא, היא הומסה פעם נוספת ב- $15 \mu\text{l}$ dimethyl formamide (DMF) ובתמיסת 1M borate buffer, pH 8.5. הריאגנט [N-4-azido-tetrafluorobenzoyl-biocytynyloxylsuccinimide] (*Atf-Bct-NHS*) שהינו בעל זיקה לאור (פוטואפיניות), הוסף בנפח של $4 \mu\text{l}$ לתמיסת ה-*Hez-PBAN*, והריאקציה ביניהם נעשתה למשך הלילה בטמפרטורה של 4°C . ביום השני, נלקחה מתערובת הריאקציה כמות של $2.5 \mu\text{l}$, ונעשתה הפסקת הריאקציה בה על ידי $10 \mu\text{l}$ של 1 M glycine ו- $0.5 \mu\text{l}$ של 0.1 M borate buffer, pH 8.5. *PBAN* שסומן בקבוצה בעלת פוטואפיניות וב-biotin, עבר הפרדה באמצעות HPLC בקולונת Vydac (4.6 mm X 25 cm) C4 reversed phase, על פי מפל ריכוזים שטוח מ-20% acetonitrile ב-0.1% TFA ל-30% acetonitrile ב-0.1% TFA, בקצב השתנות של 1% לדקה, כאשר הזרימה נשמרה בקצב של 0.5 ml לדקה. על מנת להבטיח כי ה-*PBAN* המסומן אכן יופרד מה-*Hez-PBAN* הסינתטי, הוספו $5 \mu\text{g}$ מה-*Hez-PBAN* לדוגמא.

בליעת פרופיל השטיפה נמדדה באורך גל של 220 nm והשוותה לביקורת, שהכילה ריאגנט לא פעיל, glycine ואת תוספת ה-Hez-PBAN. איסוף כל מקטע ארך שתי דקות, ובמהלכו נאסף נפח סופי של 1 ml. התמיסות מהמקטעים השונים נודפו ושימשו לאחר מכן הן לצורך זיהוי תוצרי הריאקציה באמצעות טכנולוגיית avidin-biotin והן לצורך מבחנים ביולוגיים אחרים. שאר תערובת הריאקציה נוקתה לפי תנאי ההפרדה שתוארו למעלה, אולם בפעם זו לא בוצע הזיהוי באמצעות UV ולא הוסף הפפטיד הלא מסומן, וזאת כדי לייצר מאגר של תמיסת ליגנד פעילה.

2.3) בידוד זיהוי האנלוג Atf-Bct-NHS-PBAN

על מנת לבדוד את המקטע המכיל את הליגנד לאחר ההפרדה ב-HPLC זוהה הליגנד על ידי avidin-HRP. מקטעים מסיסים של הליגנד שהתקבלו מההפרדה ב-HPLC עברו הדגרה בצלחת עם 96 בארות וטולטלו במטלטלת בתנאי חושך למשך 3 שעות. לאחר מכן, הדוגמאות הוקרנו למקור אור UV באורך גל של 254 nm למשך 30 דקות. לאחר החשיפה, הושלך תוכן הבארות, והבארות נשטפו בתמיסה שהכילה: phosphate buffer ו-0.05% Tween 20. הוסף בופר חוסם (blocking buffer), שהורכב מ: phosphate buffer ו-1% BSA. לאחר שטיפה נוספת, בוצעה הריאקציה על ידי צירוף האנזים avidin-HRP אל הבופר החוסם. הריאקציה נמשכה שעה בטמפרטורת החדר. לאחר שטיפה נוספת, הוסף הסובסטר TMB, ולבסוף הריאקציה הופסקה באמצעות $1\text{M H}_3\text{PO}_4$. התוצר הסופי כומת על ידי קריאה באורך גל של 450 nm. בנוסף לזיהוי קבוצת biotin קשורה לליגנד, נבחנו המקטעים השונים מהפרדת ה-HPLC במבחן *in vitro* לצורך זיהוי נוסף. לפי פעילות המקטעים ובהשוואה לפעילות PBAN סינתטי, כמות הליגנד הוערכה כ- $1\text{ pmol}/\mu\text{l}$.

2.4) זיהוי הקולטן ל- PBAN באמצעות הליגנד Atf-Bct-NHS-PBAN

וע"י SDS-PAGE

במטרה להבהיר את הנוכחות האפשרית של הקולטן החלבוני המשוער ל- PBAN (PBAN-R) ברקמות השונות בגוף הנקבה למעט בלוטת פרומון המין, נערכו ניסויי קשירה על הכנות ממברנות מרקמות הגוף השונות של נקבות מהמין *H. armigera* בגילאי 2-5 ימים. בניסויים אלו נבחנו הרקמות הבאות: גנגליוני החזה (TG, thoracic ganglia), הצינור העצבי הונטרלי (VNC, ventral nerve cord), שק ה- bursa copulatrix יחד עם שק ה- spermatheca (B + S), שריר הכנף (M, wing muscle) והמוח (Br). נוכחות חלבון הקולטן המשוער נקבעה באמצעות אנליזת Western blot לאחר SDS-PAGE על ידי קשירתו הספציפית לליגנד ה- PBAN המסומן בקבוצת פוטואפיניות וב- biotin. בנוסף

לחיפוש PBAN-R משוער ברקמות גוף הנקבה, נערכו מבחני קשירה לתאי מחדר המכונים Sf9 מ-*Spodoptera frugiperda*, אשר הגן ל- PBAN-R של *H. zea* הוחדר אליהם, כמתואר על ידי Choi et al., (2003).

2.4.1 התאמת השיטה הקיימת לרקמות השונות

לפני עריכת ניסויי הקשירה ברקמות השונות, נערכה בדיקה במטרה לוודא, שבכל רקמה נחקרת אין ייצור אנדוגני של חלבונים הקשורים ל- biotin בגודל זהה לקולטן, המפריעים בזיהויו. לשם כך, נבחנו בנקבות בנות יומיים כל הרקמות. לצורך כך נעשתה הפקת ממברנות בכל אחת מהרקמות הנבחנות, ועבור כל רקמה נמצאה כמות החלבון, שהינה שוות ערך לבלוטות הפרומון. לאחר מכן, נערכה אנליזת SDS-PAGE ו- Western blot. רק ברקמות שלא הופיע בהן חלבונים אנדוגניים במשקל מולקולרי של 50 kDa, שהינו משקלו המולקולרי של קולטן ה- PBAN (Rafaeli et al., 2003), בוצעו ניסויי הקשירה.

2.4.2 הכנת הבלוטות והרקמות השונות למבחני הקשירה

לאחר הסרת ראש הנקבה, הוצאו בנפרד בלוטות הפרומון, החזה והבטן. הוצאת הבלוטות נעשתה באמצעות לחיצה בעדינות על הפרק השביעי של הבטן על ידי פינצטה, שגרמה להבלטת הבלוטה מחוץ לבטן, וחיתוך באיזור הפרק השמיני בעזרת מספריים מתאימים, כך שהושגו הפרקים השמיני והתשיעי והרקמה הבין-פרקית של הבטן. הבלוטות שהוצאו בדרך זו הונחו בטיפות בנפח $20 \mu\text{l}$ של תמיסה פיסיולוגית ללא סידן, שהכילה:
3 mM calcium chloride, 18 mM magnesium chloride, 5 mM pipes buffer, 85 mM glucose, 12 mM sodium chloride, 21 mM potassium chloride, 43 mM trehalose, וכאינדיקטור ל- pH הוסף גם 0.001 M phenol red. על מנת להגיע ל- pH 6.6, נעשתה טיטרציה עם KOH. הכנת התמיסה נעשתה בהתאם לפרוטוקול שפותח על ידי Jurenka et al. (1991b).

ניתוח הבלוטות כלל את הסרת גופי השומן, הביצים וקצה צינור ההטלה, ואת חיתוך של הפרק השמיני, כך שנותרה מבלוטת הפרומון הרקמה הבין-פרקית, שכללה את האפידרמיס ואת הקוטיקולה. כל המתואר לעיל נעשה על גבי קרח, בכדי לעכב פעילות אנזימטית ברקמה.

ניתוח הרקמות האחרות נעשה על ידי הוצאת כל רקמה מהאיבר המכיל אותה (TG ו- M מהחזה, VNC ו- B + S מהבטן ו- Br מהראשים), ואת ניקיונה מגופי שומן, גם כן על גבי קרח.

2.4.3 הפקת הממברנות מהרקמות השונות

בדומה לשיטה המבוססת שנחקרה ברמת החלבון בבלוטות הפרומון, נעשתה הפקת ממברנות מכל אחת מהרקמות הנבחנות. 20 בלוטות פרומון המין (או הכמות האקוויולנטית מרקמה אחרת) נותחו כמפורט לעיל בתמיסה פיסיוולוגית ללא סידן. לאחר מכן עברו הבלוטות או הרקמות כתישה בהומוגנייזר מסוג זכוכית- זכוכית עם $600 \mu\text{g}$ של 50 mM HEPES buffer, $\text{pH } 7.4$ (להלן- בופר ההומוגניזציה). הבופר הכיל מעכבי פרוטאזות ללא EDTA. שארית הרקמות הכתושות הורחפה באותו נפח של הבופר ($600 \mu\text{g}$) ונכתשה קלות בשנית. בשלב הבא, הרקמות הכתושות בבופר סורכזו בצנטריפוגה בעלת רוטור זוויתי קבוע מסוג Sorvall SE12 במהירות $234 \times \text{g}$ ובטמפרטורה של 4°C במשך 5 דקות. התסנין נאסף וסורכז שנית, במהירות $23,000 \times \text{g}$ ובטמפרטורה של 4°C למשך שעה. בתום הסרכוז המשקע שהתקבל הורחף בנפח של $800 \mu\text{g}$ מבופר ההומוגניזציה, ולאחר מכן סורכז פעם נוספת, במהירות $23,000 \times \text{g}$ ובטמפרטורה של 4°C למשך שעה. המשקע שנוצר בשלב זה שימש כתוצר של ממברנות בלוטות הפרומון או של אחת הרקמות האחרות בגוף העש.

2.4.4 מבחן קשירה בין הליגנד והקולטן הנחקר ברקמה

ניסויי הקשירה ברקמות השונות כללו את הטיפולים הבאים:

- (א) **ביקורת ללא קשירה ל-PBAN** - מטרתה להראות, כי הרקמה אינה מכילה חלבונים אנדוגניים הקשורים ל-biotin בגודל זהה לקולטן, ולכן ניתן לבחון את המצאות הקולטן המשוער ברקמה (E, Endogenous).
- (ב) **אנלוג מסומן של PBAN** - במידה והקולטן המשוער אכן מצוי ברקמה, תתקבל קשירה בינו לבין הליגנד המסומן (L, Labelled).
- (ג) **אנלוג מסומן של PBAN בנוכחות עודף של PBAN ללא סימון** - על מנת לבדוק, האם הקשירה בין הקולטן והליגנד ספציפית (D, Displacement).

במקביל להפקת הממברנות, תמיסת הליגנד Atf-Bct-NHS-PBAN (עבור כל בלוטה או רקמה אחרת בכמות האקוויולנטית נדרשה כמות של 1 pmol) נודפה כולה בחושך באמצעות זרם קל של חנקן. למשקע הממברנות שהתקבל בהפקת הממברנות, הוסף בופר קשירה בנפח $10 \mu\text{g}$ שהכיל: 0.25 M sucrose, 5 mM HEPES, ו- 0.25 M NaHCO_3 , $\text{pH } 7.4$. כמו כן, הוספו לו $30 \mu\text{g}$ תמיסה פיסיוולוגית ללא סידן. לאחר הרחפת משקע הממברנות, הוא הועבר למבחנה, המכילה את הליגנד Atf-Bct-NHS-PBAN המנוסף (final concentration $1 \mu\text{g PBAN} = 25 \text{ nM}$).

הריאקציה בין הליגנד והממברנות הועמדה למשך שעה, בתנאי חושך ובטמפרטורת החדר. בתום השעה, הופסקה הריאקציה על ידי חשיפת הממברנות לקרינת UV באורך גל של 254 nm למשך 15 דקות ועל גבי קרח. לאחר מכן, בוצעה צנטריפוגה אחרונה ב- $23,000 \times g$ ובטמפרטורה של $4^{\circ}C$ למשך שעה. לבסוף, המשקע שהתקבל נאסף ונשמר במקפוא, בטמפרטורה של $-80^{\circ}C$. ממברנות ששימשו כביקורת בניסוי עברו את אותו התהליך, למעט הקשירה לליגנד .Atf-Bct-NHS-PBAN

ממברנות ששימשו לטיפול ה- Displacement עברו את אותו התהליך, אך לאחר ההעברה למבחנה המכילה את הליגנד המסומן, הוסף להן הליגנד הלא מסומן- 1.5μ של Hez-PBAN בכמות של 5000 pmol המומס בתמיסת מתאנול חומצי (50% MeOH) ב- (0.001 M HCl), והממברנות הורחפו בשנית (final concentration unlabelled PBAN = 125 nM).

2.4.5 קביעת חלבון בדוגמאות הממברנות

מטרת קביעת כמות החלבון היחסית לכל הדוגמאות שהתקבלו במבחן הקשירה היא בכדי להבטיח בהמשך הטענת כמויות חלבון שוות על גבי ג'ל ה- SDS-PAGE עבור כל הדוגמאות, על מנת שניתן יהיה להשוות את עוצמות הפסים של החלבונים שיפורדו בג'ל בין הדוגמאות.

לצורך קביעת החלבון, הוכנו תמיסות סטנדרט של BSA בריכוזים עולים, בתחום שבין $10-100 \mu g/ml$.

משקע הממברנות, שהתקבל במבחן הקשירה מ- 20 בלוטות פרומון (או מהכמות האקוויולנטית של אחת הרקמות האחרות), הורחף ב- 10μ מים מזוקקים פעמיים. לצורך קביעת חלבון לממברנות, נלקחה מהמשקע המורחף דוגמא, שנפחה שווה ערך ל- 5 בלוטות פרומון.

הדוגמאות שנלקחו מהממברנות הונחו בצלחת בעלת 96 בארות, יחד עם תמיסות הסטנדרט. לדוגמאות הוספו מים בבארות, וכך נפח תמיסות הדוגמאות והסטנדרטים בכל הבארות היה 160μ . לכל באר הוסף ריאגנט צבע (Bio-Rad Dye Reagent) בנפח של 40μ , והתמיסות הורחפו באמצעות פיפטציה. הצלחת הוכנסה למטלטלת, ועברה טלטול בטמפרטורה של $37^{\circ}C$ למשך 10 דקות, ולאחר מכן הדוגמאות והסטנדרטים נקראו באורך גל של 595 nm. הקריאות שהתקבלו עבור הסטנדרטים שימשו לבניית עקומת כיוול, לפיה נמצאה כמות החלבון בדוגמאות שנלקחו, וכן בנפח שנותר מהדוגמאות המקוריות, דהיינו המשקעים הממברנליים שהופקו בשלב מבחן הקשירה.

לנפח שנותר בדוגמאות הוסף 2 x sample buffer ביחס נפחי של 1:1. הדוגמאות הועברו לאמבט וחוממו ב- 94 °C למשך 5 דקות. לאחר הוצאת הדוגמאות מהאמבט וקירורן למשך 10 דקות בקרח, הן אוחסנו במקפיא בטמפרטורה של 20 °C-.

Western blot ו- SDS-PAGE 2.4.6

הפרדת החלבונים נעשתה באמצעות הרצה אלקטרופורטית של הדוגמאות על גבי ג'ל. ההרצה בוצעה במתקן מיני ג'ל בגודל של 0.1 cm x 10 cm x 8 cm ובמפל ריכוזים של 8-16%, במתח של 150 V ובתוך בופר הרצה (שהוכן על פי הוראות היצרן). בשלב הבא, החלבונים המופרדים הועברו למשך שעה מהג'ל לממברנת ניטרוצלולוז בתוך בופר Towbin מקורר (1 liter methanol, 57.5 gr glycine, 12.1 gr Tris, pH 8.61, והשלמת הנפח ל- 5 ליטר עם מים), במתח של 180 V ובתנאי קור. לצורך חסימת אתרי הקשירה, הוכן בופר חוסם, המורכב מ- 1 ml 10% Tween 20, 1.5 gr BSA, והנפח הושלם ל- 50 ml עם 30% TBS, שהכיל 137 mM NaCl, 20 mM Tris, HCl, pH 7.6. בתוך הבופר החוסם הונחה ממברנת הניטרוצלולוז למשך הלילה.

ביום המחרת, הוספו לתמיסת הבופר החוסם בו נמצאה ממברנת הניטרוצלולוז, 60 µl של avidin-HRP (0.5 µg/ml), בכדי שניתן יהיה, באמצעות ריאקציית avidin-biotin, לזהות את ה- biotin שקשור לליגנד המסומן, Atf-Bct-NHS-PBAN. התמיסה טולטלה בטמפרטורה של 25 °C למשך שעה, שבסיומה נשטפה ממברנת הניטרוצלולוז חמש פעמים בבופר שהורכב מ- 10 ml 10% Tween 20, 240 ml TBS, על ידי הנחתה במטלטלת עם 50 ml מהבופר במשך 10 דקות בכל שטיפה. לאחר מכן, נשטפה הממברנה בפעם האחרונה עם מים מזוקקים פעמיים.

הפיתוח לממברנת הניטרוצלולוז נעשה באמצעות מערכת Chemiluminescence, שכללה מצלמת CDC, וכן על ידי שימוש בסובסטרט Supersignal. הערכת המשקל המולקולרי של החלבונים נעשתה באמצעות סמני גודל חלבוניים (biotinylated protein standards). מתוך תמונת הממברנה, שהתקבלה בעזרת התוכנה Alpha EaseFC Chemilmager, ניתן היה לראות היכן התקבלה קשירה בין הליגנד לקולטן המשוער, על ידי קבלת פס במקום המתאים ל- 50 kDa, שהינו משקלו המולקולרי המוערך של הקולטן. לבסוף, עוצמות הקשירה לקולטן נותחו באמצעות ערך יחסי- integrated density value (IDV). השוואת ערך זה בין הביקורת ללא הליגנד Atf-Bct-NHS-PBAN לטיפולים בהם ניתן הליגנד המסומן בלבד או בתוספת ליגנד לא מסומן בעודף סיפקה אינדיקצייה להבדלים בין הטיפולים (אך יש לציין שהדבר אינו מאפשר השוואה בין ג'לים שונים כפי שהם, כיוון שרמות החשיפה לצבע בעת הפיתוח משתנות מפעם לפעם). לכל רקמת בוחן, פרט ל- M ול- B + S, נערכו לפחות

3 הרצות נפרדות. עבור כל אחת מההרצות שנערכו בכל אחת מהרקמות, חושבו ערכי

ה-IDV היחסיים באופן הבא:

$$\text{Relative IDV}_{(-\text{PBAN})} = (\text{IDV}_L - \text{IDV}_E) / \text{IDV}_E$$

(IDV_L הנם ערכי IDV, שהתקבלו עבור טיפולי ה-Labeling, דהיינו קשירה לליגנד המסומן)

$$\text{Relative IDV}_{(+\text{PBAN})} = (\text{IDV}_D - \text{IDV}_E) / \text{IDV}_E$$

(IDV_D הנם ערכי IDV, שהתקבלו עבור טיפולי ה-Displacement, דהיינו קשירה תחרותית

לליגנד המסומן יחד עם הליגנד הלא מסומן, הניתן בעודף ריכוז).

בדרך זו, נוטרלו ההבדלים בעוצמות הרקע בין הרקמות השונות, והדבר מאפשר בין טיפולי

ה-Labeling וה-Displacement בכל רקמה. על מנת להשוות את חוזק

ה-Displacement שהתקבל ברקמות השונות, עבור כל הרצה חושב ערך ה- ΔIDV

($\Delta \text{IDV} = \text{IDV}_D - \text{IDV}_L$). ככל שערך ה- ΔIDV של הרצה מסויימת שלילי יותר, כך

ה-Displacement באותה הרצה חזק יותר.

כאמור, רמות החשיפה לצבע בעת הפיתוח נבדלות בין ג'ל אחד לשני באותה רקמה, והדבר

יוצר הבדלים בערכי ה- ΔIDV בין הרצה להרצה ברקמה מסויימת, שאינם נובעים

מה-Displacement, כך שאין משמעות לחישוב ערך ΔIDV ממוצע לכל רקמה. לכן, לא

נערך מבחן סטטיסטי לערכי ה- ΔIDV , וניתוח הערכים שהתקבלו נעשה באופן

אינדיבידואלי.

2.5 קביעת פעילות פרומנוטרופית על ידי תגובת שליחים משניים

2.5.1 הפקת cAMP

בלוטות הפרומון והרקמות השונות הוצאו ונותחו כמתואר בסעיף 2.4.2. כל אחת מהרקמות

הנבחנות הודגרה בתמיסה פיסיולוגית, המכילה 0.9 mM IBMX, pH 6.6, שמעכב את

פירוק ה-cAMP על ידי phosphodiesterases. התמיסה הפיסיולוגית הכילה אחד

משלושה ריכוזים שונים של PBAN (0.05, 0.1, 0.5 μM), או לחילופין לא הכילה PBAN

(כביקורת), וההדגרה בוצעה למשך 10, 20 או 30 דקות. כל טיפול (ביקורת או PBAN

בריכוז מסויים וזמן אינקובציה מסויים) כלל 5 חזרות.

עצירת הריאקציה ומיצוי ה-cAMP שנוצר על ידי הרקמה נעשו על ידי העברת כל בלוטה או

רקמה ל-RIA buffer בנפח של 60 μl שהכיל: 50 mM NaOAc, 0.02% NaN_3 ,

0.001% phenol red, pH 6.2, וחימומן באמבט בטמפרטורה של 95 °C למשך 5 דקות.

לאחר הוצאת הדוגמאות מהאמבט וקירורן למשך 20 דקות בקרח, הן אוחסנו במקפא

בטמפרטורה של -80 °C.

Radio Immuno Assay (RIA) 2.5.2

לצורך מבחן ה-RIA, הוכנו תמיסות סטנדרט של cAMP acid בריכוזים עולים, בתחום שבין $25-400 \text{ fmol}/50 \mu\text{l}$, ששימשו בהמשך לבניית עקומת כיוול. דוגמאות מיצוי ה-cAMP שהתקבלו מבלוטות הפרומון או מהרקמות השונות הוקפאו והופשרו 4 פעמים על מנת לפרק את התאים. מכל דוגמא או סטנדרט נאסף נפח של $50 \mu\text{l}$ והועבר למבחנות חדשות. לכל דוגמא וסטנדרט נעשתה אצטילציה באמצעות הוספת $5 \mu\text{l}$ של תערובת אצטילציה, שהכילה Triethylamine ו-Acetic anhydride ביחס נפחי של 2:1 וערבוב מייד. לאחר מכן, $50 \mu\text{l}$ של antiserum ל-cAMP (במיהול של 1:50) הוספו לכל אחד מהם. הדוגמאות והסטנדרטים עברו פרה-אינקובציה באמבט בטמפרטורה של $30-35^\circ\text{C}$ למשך שעתיים לפחות. לאחר הוצאת הדוגמאות והסטנדרטים מהאמבט והעברתם לקרח, הוסף להם cAMP מסומן ב- ^3H - Adenosine 3',5'-cyclic phosphate, Ammonium salt $[2,8-^3\text{H}]$ המכיל $10,000 \text{ cpm}/50 \mu\text{l}$ ושעבר אצטילציה על ידי $100 \mu\text{l}/\text{ml}$ של תערובת האצטילציה 2:1. לכל דוגמא וסטנדרט הוספו $50 \mu\text{l}$ של ה-cAMP המסומן רדיואקטיבית ($^*\text{cAMP}$), והדוגמאות הודגרו במקרר בטמפרטורה של 4°C למשך הלילה (ה-cAMP* מתחרה עם ה-cAMP הלא מסומן שנוצר על ידי הרקמות השונות או מהסטנדרטים על הקשירה ל-antiserum).

התהליך המתואר למעלה בוצע גם על שני סטנדרטים נוספים. לאחד מהם לא הוסף antiserum ולא cAMP שאינו מסומן, אלא $100 \mu\text{l}$ של RIA buffer, ולכן הוא מייצג קשירה לא ספציפית של ה-cAMP* (ומכונה "blank"). הסטנדרט השני לא הכיל גם הוא cAMP שאינו מסומן, אך הוסף לו antiserum בנפח של $50 \mu\text{l}$, והנפח הושלם ל- $100 \mu\text{l}$ באמצעות RIA buffer. סטנדרט זה (המכונה "max.") מייצג קשירה מלאה וללא תחרות של ה-cAMP* ל-antiserum. שני הסטנדרטים הללו שימשו אף הם לבניית עקומת הכיוול. בסיום ההדגרה, לכל הדוגמאות והסטנדרטים הוספו $300 \mu\text{l}$ charcoal suspension, שהכיל: 100 mM phosphate buffer pH 7.4, 1% dextran, 0.5% BSA, 2% charcoal. וספח את ה-cAMP* וה-cAMP שלא נקשרו ל-antiserum. לאחר מכן, הדוגמאות והסטנדרטים סורכזו למשך 10 דקות ב- $13,000 \times g$. לאחר הוצאתם מהצנטריפוגה, התסנין נאסף מכל אחד מהם למבחנות סנטילציה יחד עם נוזל סנטילציה ונספר באמצעות מונה- β . באמצעות ערכי ה-cpm שנקראו במונה עבור הסטנדרטים, נבנתה עקומת כיוול, המתארת את ערכי ה-cpm כפונקציה של כמות ה-cAMP הלא מסומן. עקומת הכיוול הראתה מגמת ירידה, לפיה ככל שכמות ה-cAMP בתמיסה גבוהה יותר, כך פחות cAMP* מסומן נקשר ל-antiserum, והקריאה המתקבלת במונה נמוכה יותר, ולהיפך. באמצעות עקומת הכיוול, נמצאה כמות ה-cAMP שנוצרה על ידי כל אחת מהרקמות הנבחנות בעת הדגרתן עם PBAN בריכוזים שונים ובזמני אינקובציה שונים.

2.6 בחינת הפעילות הפרומונוטרופית של פפטידים דמויי-PBAN

בניסויים אלו, נבחן ייצור פרומון *in vitro* (ראה סעיף 2.6.1) על ידי בלוטות פרומון מבודדות, שהוצאו מנקבות בוגרות בגילאים 2-4 ימים, בתגובה לריכוזים שונים של כל אחד מהפפטידים הנבחים, שכללו את Hez-PBAN (dose responses עד לרוויה). הבלוטות הודגרו למשך שלוש שעות בנוכחות אחד מהפפטידים הנבחים, וכל טיפול (הדגרה עם פפטיד מסויים ובריכוז מסויים או הדגרה בתמיסה שלא מכילה את אחד הפפטידים, כביקורת) כלל לפחות 5 חזרות.

כמות מרכיב הפרומון העיקרי ב- *H. armigera*, (Z)-11-hexadecenal, שנוצר על ידי הבלוטות, נקבעה באמצעות הפרדת הדוגמאות ב-GC. באמצעות log probit analysis, שורטטה עבור כל פפטיד עקומה, המתארת את רמת ייצור הפרומון (ביחידות ng/female) כנגד לוגריתם בבסיס 10 של ריכוז הפפטיד, ונמצאה משוואת הישר עבור העקומה. באמצעות משוואת הישר חושב ערך ה- EC_{50} (Effective Concentration), המבטא את ריכוז הפפטיד הנדרש לקבלת מחצית מהכמות המקסימלית של (Z)-11-hexadecenal. הפפטידים הנבחים כללו שלושה מארבעת ה-PGNs המקודדים על ידי הגן ל-PBAN (PGN-7, PGN-8, ו-PGN-24); את הפפטידים Pheromonotropin (Pss-Pt) ו-Leucopyrokinin (LPK) השייכים למשפחת ה-PBAN/pyrokinin וכן שני פפטידים דומים להם; (NMU) neuromedin U מחולייתנים ו-(Md) Myomodulin. הערה: לאחר שערכי ה- EC_{50} חושבו עבור הפפטידים, נמצא כי דרגת הנקיין של הפפטידים הנבחים היא 98-95%, למעט PGN-8, אשר הינו נקי ב- 73% בלבד (Jurenka and Choi, personal communication), ולכן תוקן ערך ה- EC_{50} עבור PGN-8 באופן הבא:

100% purity of PGN-8 → $EC_{50}=175$ nM

73% purity of PGN-8 → $EC_{50}=128$ nM

כמו כן, יתר התוצאות המתייחסות ל-PGN-8 וניתוח התוצאות תוקנו בהתאם לנתון זה.

2.6.1 ייצור פרומון *in vitro*

השיטה, שפותחה על ידי Soroker and Rafaeli (1989), מאפשרת מעקב אחר ביוסינתזת פרומון המין על ידי בלוטת הפרומון.

בלוטות הפרומון, שהוסרו ונוקו כמתואר בסעיף 2.4.2, הודגרו למשך שלוש שעות (אלא אם צוין אחרת) בתמיסה פיסילוגית (ראה סעיף 2.4.2) ללא ועם PBAN (או פפטיד דמוי-PBAN), בריכוז מסויים (או מספר ריכוזים), בהתאם למטרת המבחן הספציפי. בתום ההדגרה, כל בלוטה, שהיוותה חזרה אחת, הונחה על נייר מגבת בכדי לייבשה קלות. לצורך מיצוי הפרומון, הוכנסה הבלוטה לבקבוקוני זכוכית (inserts), הנמצאים בתוך

בקבוקי זכוכית קטנים, יחד עם 10 µl של hexane, המכיל 25 ng Tridecyl-acetate, ששימש כסטנדרט פנימי. כעבור רבע שעה לאחר מכן, הבלוטות הוצאו מהבקבוקונים, והדוגמאות נבדקו לבסוף במכשיר Gas Chromatograph (GC) במטרה לכמת את פרומון המין הנוצר על ידי הבלוטות.

2.6.2 הפרדה ב- Gas Chromatograph

שיטה זו מאפשרת לכמת את מרכיב הפרומון העיקרי (Z-11-hexadecenal) ב- *H. armigera* (Kehat & Dunkelblum, 1993), שנוצר על ידי בלוטות הפרומון במבחני *in vitro*. הדוגמאות המהוות מיצויים של הבלוטות ב- hexane יחד עם הסטנדרט הפנימי, נודפו בעזרת זרם חנקן איטי עד לנפח של כ- 4-8 µl. הדוגמאות הוזרקו למכשיר ה- GC, הכולל גלאי יוניזציה (FID) ותוכנת מחשב לביצוע האנליזה (Class VP™ Chromatography Data System). ה- injector של ה- GC היה ללא פיצול, וכגז הנשא שימש הליום בלחץ של 22 psi. הסטנדרטים והדוגמאות הופרדו על עמודה קפילרית (SE-54, של Alltech; אורך 30 מטר, קוטר 0.25 mm). טמפרטורת הגלאי נשמרה ב- 280 °C ושל ה- injector ב- 300 °C. ההפרדות נעשו תוך עליית הטמפרטורה במהלך 15 הדקות הראשונות, מ- 120 °C עד 270 °C, והטמפרטורה נשארה בערך זה למשך 15 דקות נוספות. כמות הפרומון חושבה על פי היחס בין שטח הקריאה שהתקבל בדוגמא לבין שטח הקריאה של הסטנדרט הפנימי, שהוסף לה. על מנת להקל על הבדיקות נמדדה רק כמותו של מרכיב הפרומון העיקרי, Z-11-hexadecenal (Z-11-16:Ald).

2.7 בחינת חוסמי תעלת סידן

פעילות של חוסמי יונים נבדקה במבחני *in vitro* (כמתואר בסעיף 2.6.1), שנערכו על בלוטות פרומון מין מבודדות, שהוצאו מנקבות בוגרות בגילאי 2-4 ימים. הבלוטות המבודדות הודגרו למשך שלוש שעות בתמיסת הדגרה ללא PBAN, עם PBAN או עם PBAN בתוספת החומר המעכב הנבחן. תמיסת ה- PBAN ששימשה בניסויים אלו הייתה בריכוז של 0.5 µM.

SKF 96365 (1- β -[3-(4-methoxyphenyl)propoxy]-4-methoxyphenethyl)-imidazole hydrochloride) הינו מעכב של כניסת Ca^{2+} המתווכת על ידי קולטן (RMCE; Receptor-mediated calcium entry) (Meldolesi and Pozzan, 1987;) (Hallam and Rink, 1989), ושל שחרור Ca^{2+} מהמאגרים הפנימיים בתא, שתואר על ידי Merritt et al. (1989, 1990). לעומת זאת, מחקרם של Chan and Greenberg (1991) מצא, כי SKF 96365 חוסם תעלות סידן המתווכות הן ע"י מתח והן ע"י קולטן. SKF 96365 הינו אמצעי חיוני לחקירת תפקיד ה- RMCE בתיווך התגובות התפקודיות של תאים.

amiloride הוא מעכב של החלפת הקטיונים Na^+ / Ca^{2+} בתא, בכך שהוא חוסם את כניסת ה- Ca^{2+} לתא (Debetto et al., 1989). החומרים חוסמי תעלת הסידן נבחנו בריכוזים הבאים: SKF96365-10 μM , 100 μM , 1 mM, 10 mM, PBAN, בריכוז של 100 μM ; 2 mM, 20 mM-verapamil; 20 mM-amiloride. כביקורת שלילית בניסויים אלו, נבחן ייצור פרומון על ידי בלוטות שהודגרו בתמיסת הדגרה ללא Ca^{2+} בנוכחות PBAN בריכוז של 0.5 μM . כל הטיפולים הנבחנו כללו 5 חזרות. כמות ה- Z-11-hexadecenal הנוצר על ידי הבלוטות נקבע באמצעות הפרדת הדוגמאות ב-GC (כמתואר בסעיף 2.6.2).

2.8 קביעת ביטוי הגן ל- PBAN-R ברקמות השונות

(פרק זה בוצע בשיתוף פעולה עם רחל בובר, סטודנטית לתואר שלישי בהנחיית פרופ' עדה רפאלי.)

2.8.1 הכנת הבלוטות והרקמות השונות להפקת ה-RNA

לאחר הסרת ראש הנקבה, הוצאו בנפרד בלוטות הפרומון, החזה והבטן מנקבות בנות 2-4 ימים. הוצאת הבלוטות נעשתה באמצעות לחיצה בעדינות על הפרק השביעי של הבטן על ידי פינצטה, שגרמה להבלטת הבלוטה מחוץ לבטן, וחיתוך באיזור הפרק השמיני בעזרת מספרים מתאימים, כך שהושגו הפרקים השמיני והתשיעי והרקמה הבין-פרקית של הבטן. המתואר לעיל נעשה על גבי קרח, בכדי לעכב פעילות אנזימטית ברקמה. הבלוטות או כל אחת מהרקמות האחרות, במשקל אקוויולנטי ל-20 בלוטות פרומון, נותחו תחת בינוקולר מיד לאחר הסרתן בתנאים נקיים מ-RNases, שהושגו על ידי שימוש בחומר RNase-Off, ההורס RNases, בעת העבודה. ניתוח הבלוטות כלל את הסרת גופי השומן, הביצים וקצה צינור ההטלה, ואת חיתוך של הפרקים השמיני והתשיעי, כך שנותרה מבלוטת הפרומון הרקמה הבין-פרקית, שכללה את האפידרמיס ואת הקוטיקולה. ניתוח הרקמות האחרות נעשה על ידי הוצאת כל רקמה מהאיבר המכיל אותה (TG ו-M מהחזה, VNC מהבטן ו-Br מהראשים), ואת ניקיונה מגופי שומן. על מנת לשמור על יציבות הרקמות, הן הוקפאו בחנקן נוזלי מיד לאחר הניתוח (Br, TG, GI, M ו-Br) או נאספו לאחר ניתוחן ב-50 μ של הריאגנט המייצב RNA/ater ונשמרו על גבי קרח (VNC).

2.8.2 הפקת RNA

הפקת ה-RNA מהרקמות השונות בוצעה בטמפרטורת החדר, באמצעות הקיט RNAeasy של QIAGEN לפי הוראות היצרן. במטרה להשיג תפוקת RNA אופטימלית, כמות הרקמה ששימשה להפקה הייתה כ- 30 mg. כל רקמה הוצאה מה-RNA/later בעזרת פינצטה ונכתשה בהומוגניזר מעוקר בנפח 1 ml מסוג זכוכית-זכוכית עם 600 µl של RLT buffer, אליו הוסף β-Mercaptoethanol (β-Me/1 ml RLT) 10 µl. שארית הרקמות הכתושות הורחפה באותו נפח של הבופר (600 µl) ונכתשה קלות בשנית. בשלב הבא, הרקמות המרוסקות בבופר סורכזו בצנטריפוגה מסוג microfuge (DJB Labcare) במהירות 10,000 x g ובטמפרטורה של 20-25 °C למשך 5 דקות. התסנין נאסף, והוספו לו 600 µl של 70% ethanol. למבחנת האיסוף הוכנסה קולונה, אליה הוטענו 700 µl מהדוגמא. בוצע סרכוז נוסף של הדוגמא במהירות 10,000 x g ובטמפרטורה של 20-25 °C למשך 15 שניות. בתום הסרכוז הנוזל שהצטבר במבחנה הושלך. במידה ונפח הדוגמא היה גבוה מ-700 µl, שלב זה בוצע פעם נוספת. בתום הסרכוז והשלכת הנוזל שהצטבר במבחנת האיסוף, הוספו לקולונה 700 µl של RW1 buffer לשטיפת הקולונה, ובוצע סרכוז ל-15 שניות במהירות 10,000 x g. המבחנה עם הנוזל שנאסף הושלכה, והקולונה הועברה למבחנת איסוף חדשה. בשלב הבא, הוספו 500 µl של RPE buffer (שנמהל 1:5 עם 100% ethanol) לקולונה, ובוצע סרכוז ל-15 שניות במהירות 10,000 x g, ובתום הסרכוז הנוזל במבחנה הושלך. לאחר מכן הוספו שנית 500 µl של RPE buffer לקולונה, והדוגמא סורכזה שוב למטרת ייבוש הממברנה ל-2 דקות במהירות 10,000 x g. הקולונה הועברה פעם נוספת למבחנת איסוף חדשה, ובוצע סרכוז לדקה במהירות 10,000 x g. לבסוף, בשלב מיצוי ה-RNA מהקולונה, הקולונה הועברה למבחנת איסוף בנפח של 1.5 ml, הוספו 30 µl של DEPC water למרכז הקולונה, ובוצע סרכוז לדקה ב-10,000 x g. כמויות ה-RNA שהופקו מהרקמות השונות הוערכו על ידי מכשיר Nano Drop (NanoDrop Technologies).

לאחר הפקת ה-RNA מהרקמות השונות בוצע ניקוי תוצרי ההפקה מ-DNA באמצעות Ambion Kit. בשלב הראשון הוספו לדוגמאות 10 x Dnase I Buffer בנפח של 3 µl ו-rDNase (2U/µl) בנפח של 1 µl. לאחר מכן הדוגמאות הודגרו במשך 22 דקות ב-37 °C. בתום ההדגרה, הוספו לדוגמאות 3 µl של Dnase Inactivation Reagent, והן הודגרו למשך 2 דקות בטמפרטורת החדר ועורבבו מדי פעם. לבסוף, הדוגמאות סורכזו בטמפרטורה של 4°C למשך דקה וחצי במהירות של 10,000 x g, והתסנין נאסף למבחנות נקיות וסטריליות. בתום הניקוי, דוגמאות ה-RNA אוחסנו בטמפרטורה של -80°C. יש לציין, כי עקב בעיה טכנית בהפקת ה-RNA מה-Bursa & spermatheca, לא ניתן היה לקבוע את ביטוי הגן ל-PBAN-R ברקמה זו.

2.8.3 הפיכת ה-RNA ל-cDNA (Reverse Transcription)

הפיכת ה-RNA ל-cDNA בוצעה באמצעות Reverse-iT™ 1st Strand Synthesis Kit של ABgene. הריאקציה נעשתה בשני שלבים- סינתזת הגדיל הראשון של ה-cDNA והגברת מספר העותקים שלו (amplification) תוך יצירת cDNA דו גדילי. לצורך סינתזת הגדיל הראשון של ה-cDNA, הוספו למבחנת הריאקציה המרכיבים הבאים: RNA template שעבר טיפול ב-DNase (בנפח שהכיל כ- 500 ng RNA), primer לגדיל הראשון בנפח של 1 µl (450 ng/µl), שהכיל תערובת 50%-50% של Oligo-dT מבודדים (500 ng/µl) ושל decamers אקראיים (400 ng/µl) ומים סטריליים לנפח כולל של 20 µl. על מנת להסיר מבנים שניוניים, דוגמאות ה-RNA חוממו במכשיר PCR לטמפרטורה של 70 °C למשך 5 דקות. בתום החימום, הדוגמאות הועברו לקרח, והוספו להן המרכיבים הבאים: 4 µl של 5x 1st Strand Synthesis buffer, 2 µl של dNTP mix (תערובת נוקלאוטידים) (5 mM/nucleotide), 1 µl של תערובת האנזים Reverse Transcriptase המכילה מעכב ל-Rnase (50 U/µl) ו- 1 µl של DTT (100 mM). הדוגמאות הודגרו במכשיר ה-PCR בטמפרטורה של 47 °C למשך 50 דקות, ומיד לאחר מכן בטמפרטורה של 75 °C למשך 10 דקות. בתום סינתזת הגדיל הראשון הדוגמאות אוחסנו ב-20 °C. השלב הבא, הגברת מספר העותקים של ה-cDNA, בוצע במבחנות ריאקציה המכילות PCR Master Mix של Syntezza שעבר ייבוש, הכולל את כל מרכיבי ה-PCR למעט ה- template וה- primers: 10x One-Step buffer (15 mM MgCl₂), dNTP mix (5 mM/nucleotide) ו- Taq DNA polymerase (5U/ µl). אל מבחנות הריאקציה וה- Master Mix הוספו המרכיבים הבאים: תערובת הריאקציה של הגדיל הראשון של ה-cDNA (בנפח המכיל כ- 100 ng של DNA, כלומר 3-5 µl), 1 µl של תערובת פריימרים ספציפיים ל- PBAN-R (0.4 µM); PBAN-R-400F: ttcacggtggagcgggtacat; PBAN-R-480R: gaagcgcaccgctcttga, (T_m=60 °C; 55% gc), (T_m 60 °C; 61% gc) היוצרים cDNA amplicon באורך 81 bp (T_m 83 °C; T_a 61 °C), ומים מזוקקים (לנפח של 25 µl). בוצעה ריאקצית PCR ב-35 מחזורים בתנאים הבאים: בשלב הראשון, בוצע מחזור אחד של דנטורציה התחלתית ל-cDNA בטמפרטורה של 94 °C למשך 2 דקות. לאחר מכן בוצעו 35 מחזורים שכללו 3 שלבים: דנטורציה של שני הגדילים בטמפרטורה של 94 °C למשך 30 שניות, התחברות שני הגדילים (היברידיזציה) בטמפרטורה של 67 °C למשך 30 שניות והתארכות הגדילים המחוברים בטמפרטורה של 72 °C לדקה, ובתום 35 המחזורים, התארכות סופית של שני הגדילים המחוברים בטמפרטורה של 72 °C למשך 5 דקות. תוצרי ה-PCR של הגן ל- PBAN-R באורך 81 bp אוחסנו בטמפרטורה של 4 °C. על מנת לוודא כי קיט ה- Reverse Transcription של ABgene איתו עבדנו תקין, השתמשנו בביקורת החיובית ל-RNA שבקיט שכללה: MS2 RNA template בריכוז 50 ng/µl, primer 1 (10 µM) ו- primer 2 (10 µM) לביקורת. קבלת תוצר PCR יחיד

באורך 522 bp מה- MS2 template העידה על תקינותו של הקיט. תנאי ה- PCR עבור הביקורת היו כדלקמן: דנטורציה התחלתית לגדילי ה- DNA בטמפרטורה של 94 °C למשך 2 דקות, 30 מחזורים שכללו דנטורציה של שני הגדילים בטמפרטורה של 94 °C למשך 30 שניות, היברידיזציה בטמפרטורה של 60 °C למשך 30 שניות והתארכות הגדילים המחוברים בטמפרטורה של 72 °C למשך 40 שניות, ובתום 30 המחזורים, התארכות סופית של שני הגדילים המחוברים בטמפרטורה של 72 °C למשך 5 דקות.

2.8.4 אנליזה לתוצרי ה- PCR

תוצרי ה- PCR עברו הרצה אלקטרופורטית על גבי ג'ל. ההרצה בוצעה במתקן מיני ג'ל וב- 1% agarose, במתח של 50 V ובתוך בופר הרצה (שהוכן על פי הוראות היצרן). הפיתוח לג'ל נעשה באמצעות מצלמת Image Master VDS (Pharmacia Biotech), וכן על ידי שימוש ב- Ethidium Bromide. הערכת אורכם של מקטעי ה- cDNA נעשתה באמצעות סמן נוקלאוטידים (DNA marker). מתוך תמונת הג'ל שהתקבלה במצלמה ניתן היה לזהות את מקטעי ה- cDNA שנוצרו בריאקציית ה- PCR על ידי קבלת פס במקום המתאים ל- 81 bp, שהינו אורך ה- amplicon המתקבל באמצעות הפריימרים בהם השתמשנו בריאקציה. במידה והתקבלו תוצרי PCR באורך 81 bp, הג'ל נחתך בעזרת סקלפל באופן בו הפסים שהופיעו על גבי הג'ל במקום המתאים ל- 81 bp בודדו לחתיכות נפרדות, וחתיכות הג'ל הללו עברו תהליך למיצוי ה- DNA מהג'ל (ניקוי ה- DNA), שתוצריו נשלחו לריצוף.

2.8.5 מיצוי ה- DNA מהג'ל

מיצוי ה- DNA מהג'ל בוצע בטמפרטורת החדר, באמצעות MiniElute Gel Extraction Kit של QIAGEN. לאחר קבלת חתיכות הג'ל המכילות את פס ה- 81 bp, החתיכות נשקלו. לכל דוגמא (חתיכת ג'ל) הוסף נפח 3x של Buffer QG לנפח אחד של ג'ל (100 µg ~ 100 mg). לאחר מכן, הדוגמאות הודגרו בטמפרטורה של 50 °C למשך 10 דקות תוך ערבובן מדי 2-3 דקות. בתום ההדגרה, לאחר שחתיכות הג'ל הומסו לחלוטין בבופר (צבע התערובת הפך לצהוב, כצבע הבופר עצמו), הוסף נפח 1x של isopropanol לדוגמאות, והן עורבבו קלות. למבחנת איסוף בנפח 2 ml הוכנסה קולונה, אליה הוטענו 800 µg מכל דוגמא, ובוצע סרוז לדוגמאות בצנטריפוגה מסוג microfuge (DJB Labcare). במהירות 10,000 x g ובטמפרטורה של 20-25 °C למשך דקה. בתום הסרוז, הנוזל שהצטבר במבחנה הושלך. במידה ונפח הדוגמא היה גבוה מ- 700 µg, שלב זה בוצע פעם נוספת. בתום הסרוז והשלכת הנוזל שהצטבר במבחנת האיסוף, הוספו לקולונה 500 µg של Buffer QG, ובוצע סרוז במהירות 10,000 x g ובטמפרטורה של 20-25 °C למשך דקה. בתום הסרוז, הנוזל שהצטבר במבחנה הושלך. על מנת לשטוף את הקולונה, הוספו 750 µg של Buffer PE

(המכיל 100% אתאנול) לקולונה, הדוגמא הודגרה בטמפרטורת החדר למשך 5 דקות וסורכזה במהירות $10,000 \times g$ ובטמפרטורה של $20-25^{\circ}\text{C}$ למשך דקה. בתום הסרוכז, הנוזל שהצטבר במבחנה הושלך, והדוגמא סורכזה שנית, הפעם ללא הבופר באותם תנאים למשך דקה נוספת. בתום הסרוכז, המבחנה עם הנוזל שנאסף הושלכה. לבסוף, בשלב מיצוי ה-DNA מהקולונה, הקולונה הועברה למבחנת איסוף בנפח של 1.5 ml, הוספו $10 \mu\text{l}$ של Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) למרכז הקולונה, הדוגמא הודגרה למשך דקה, ובוצע סרוכז לדקה ב- $10,000 \times g$. בתום התהליך, דוגמאות ה-DNA אוחסנו בטמפרטורה של -20°C .

2.9 ניתוח סטטיסטי

הניתוח הסטטיסטי במחקר הנוכחי מבוסס על ניתוח שונות, ונעשה באמצעות התוכנה StatView™ ומבחן Fisher PLSD-ANOVA test. במקרים בהם הניתוח הסטטיסטי היה מבוסס על שני טיפולים בלבד, נעשה שימוש במבחן Unpaired T-test, 1 tail ובאותה תוכנה. בפרק העוסק בקביעת פעילות פרומונוטרופית על ידי תגובת שליחים משניים, בטרם הניתוח הסטטיסטי שבאמצעות התוכנה StatView™, נבחנה השפעת הגומלין בין שני הגורמים הנבחנים (ריכוז ה-PBAN וזמן ההדגרה), על מנת לקבוע האם ניתן לבחון כל אחד מהגורמים בנפרד, או שיש להשוות בין הצירופים השונים שמתקבלים משני גורמים אלו. הדבר נעשה באמצעות התוכנה הסטטיסטית JMP® IN 5. בפרק המתייחס לבחינת הפעילות הפרומונוטרופית של פפטידים דמויי-PBAN, עבור כל אחד מהפפטידים הנבחנים נעשתה log probit analysis, שבה שורטטה עקומה, המתארת את רמת ייצור הפרומון (ביחידות ng/female) כנגד לוגריתם בבסיס 10 (\log_{10}) של ריכוז הפפטיד, ונמצאה משוואת הישר עבור העקומה. באמצעות משוואת הישר חושב ערך ה- EC_{50} , המבטא את ריכוז הפפטיד הנדרש לקבלת מחצית מרמת הפרומון המקסימלית לכל פפטיד בנפרד.

3. תוצאות

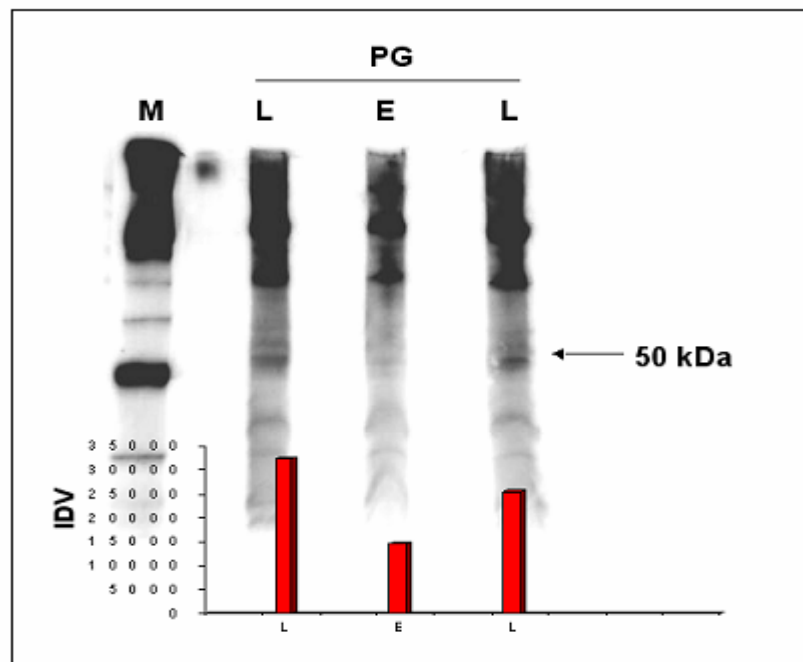
3.1 הבהרת נוכחותו של חלבון הקולטן ל- PBAN ברקמות שונות:

על מנת להבהיר את הנוכחות האפשרית של הקולטן ל- PBAN ברקמות השונות בגוף הנקבה, נערכו ניסויי קשירה באמצעות הליגנד Aff-Bct-NHS-PBAN המסומן בקבוצת photo-affinity וב- biotin, יחד עם אותו ליגנד ללא הסימון, על ממברנות שהוכנו מרקמות הגוף השונות של נקבות בגילאי 2-5 ימים. בניסויים אלו נבחנו הרקמות הבאות: ventral nerve cord (VNC - הצינור העצבי), thoracic ganglia (TG - גנגליוני החזה), bursa copulatrix (Bu - השק דרכו מוחדרים הזרע וחומרים נוספים מהזכר) יחד עם Spermatheca (השק בו נאגרים החומרים הנ"ל), wing muscle (M - שריר הכנף) והמוח (Br).

הערכת הקשירה הספציפית של ליגנד ה- PBAN המסומן ברקמות השונות נעשתה על פי העוצמה היחסית של הקולטן (PBAN-R), במשקל מולקולרי של 50 kDa. באיורים הבאים (4-9), הסימון באמצעות חץ מורה על מיקום הפס במשקל מולקולרי זה של PBAN-R. במסלולים שסומנו ב- M ממוקמים סמני הגודל המולקולריים הקשורים ל- biotin. במסלולים המסומנים כ- E ממוקמות ממברנות שהופקו מאחת הרקמות או מבלוטות הפרומון ללא הוספת הליגנד Aff-Bct-NHS-PBAN, במטרה להראות נוכחות חלבונים אנדוגניים הקשורים ל- biotin, המפריעים בזיהויו של PBAN-R. המסלולים שסומנו ב- L מציינים את מיקומן של ממברנות מאחת הרקמות או מבלוטות, שעברו קשירה עם הליגנד המסומן. המסלולים המסומנים ב- D מראים את מיקומן של ממברנות כדלקמן, שעברו קשירה תחרותית עם הליגנד המסומן וליגנד שאינו מסומן, בעודף, במטרה לקבוע את ספציפיות הקשירה בין PBAN ו- PBAN-R.

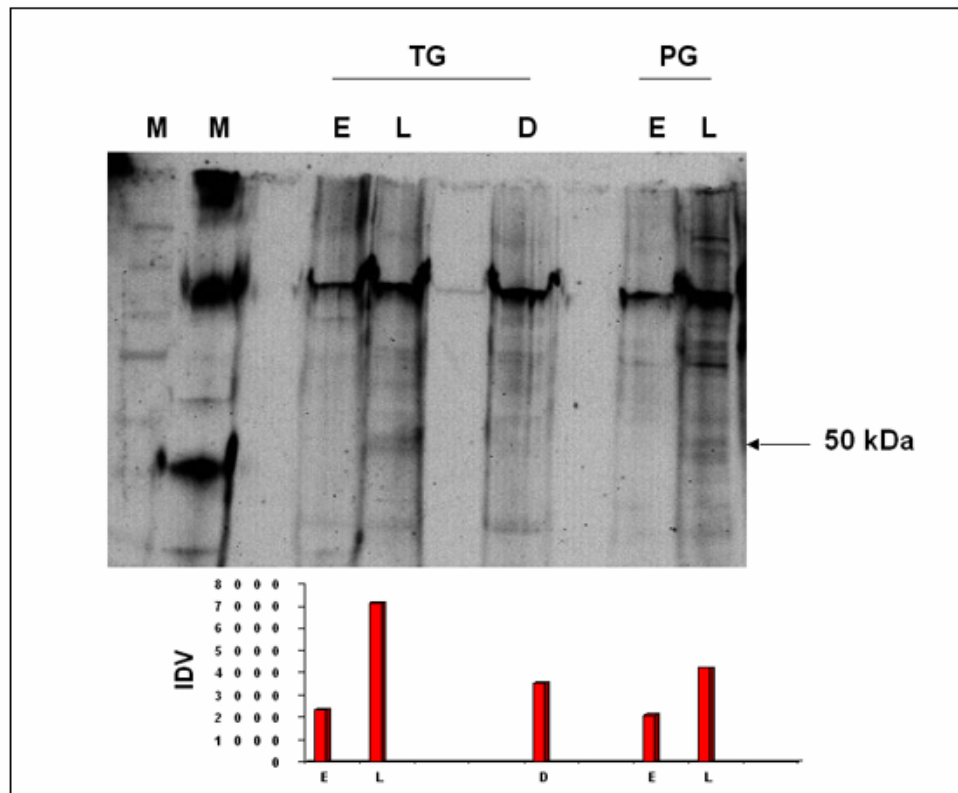
דיאגרמת העמודות המוצגת מתחת למסלולים ממחישה את עוצמתם היחסית (IDV) של הפסים המופיעים במקום המתאים למשקל מולקולרי של 50 kDa, באמצעות התוכנה Alpha EaseFC Chemilmager 4400. נוכחות חלבון הקולטן נקבעה לאחר SDS-PAGE ואנליזת Western blot על ידי קשירתו הספציפית לליגנד PBAN מסומן בקבוצת photo-affinity וב- biotin. החישובים של IDV מאפשרים להשוות בין רקמות שונות (טבלה 1), היות וערך זה הינו יחסי.

איור 4 מציג מבחן קשירה שנערך בממברנות שהופקו מבלוטות פרומון המין, כביקורת לניסויים ברקמות האחרות, מאחר ונוכחות ה-PBAN-R בבלוטת הפרומון בוססה באמצעות מבחני קשירה על ידי (Rafaeli et al. 2003). במסלול המסומן ב-E, עוצמת הפס בגודל של כ-50 kDa הייתה נמוכה, כלומר לא הייתה נוכחות חלבונים אנדוגניים קושרי biotin בבלוטות הפרומון, והדבר אפשר את המשך זיהוי של PBAN-R ללא הפרעה. במסלולים שסומנו ב-L התקבל פס בגודל 50 kDa, והדבר מעיד על נוכחות PBAN-R בבלוטת פרומון המין, שבאה לידי ביטוי בקשירת הליגנד המסומן אליו. מהשוואת עוצמת הפסים היחסית (IDV) במסלולים השונים, ניכר כי עוצמת החלבון אליו נקשר הליגנד המסומן גבוהה באופן משמעותי מאשר בביקורת. ניתן היה לזהות biotin אנדוגני בתחום משקל מולקולרי הגבוה מ-50 kDa בכל מסלול (כולל מסלול הביקורת), כעוצמות הרקע. תוצאות דומות התקבלו גם בניסוי קשירה נוספים שנערכו בבלוטות הפרומון (טבלה 1).



איור 4: דוגמת Western blot המראה נוכחות PBAN-R בבלוטות פרומון המין של נקבות בוגרות באמצעות שימוש בליגנד Atf-Bct-NHS-PBAN. החץ מראה את מיקום חלבון הקולטן בגודל 50 kDa, אליו נקשר הליגנד באופן ספציפי. המסלול המסומן ב-M מצביע על מיקום סמני הגודל המולקולריים. המסלול המסומן ב-E מצביע על מיקום הממברנות אליהן לא הוסף הליגנד, המראה biotin אנדוגני (עוצמת רקע). המסלולים המסומנים ב-L מייצגים ממברנות שעברו קשירה עם הליגנד המסומן בקבוצת photo-affinity וב-biotin. העמודות מתחת למסלולים מתארות את העוצמות היחסיות (IDV) של פס ה-50 kDa באמצעות התוכנה AlphaEaseFC Chemilmager 4400.

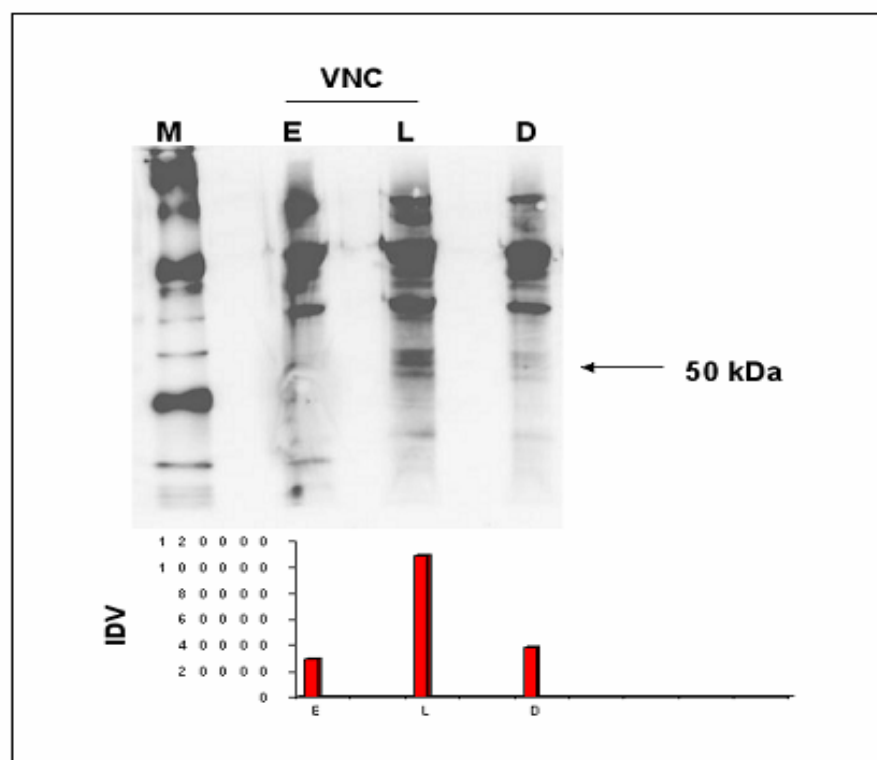
באיור 5 מוצג מבחן קשירה שנערך בממברנות שהופקו מגנגליוני החזה (TG), יחד עם ממברנות שהופקו מבלוטות פרומון המין (PG), כביקורת. במסלול המסומן ב-E המתייחס ל-TG, עוצמת הפס בגודל של כ-50 kDa אינה נראית לעין, כלומר לא נמצאה נוכחות חלבונים אנדוגניים קושרי biotin ב-TG, ולכן ניתן היה להמשיך בזיהוי PBAN-R ברקמה זו. במסלול שסומן ב-L התקבל פס בגודל 50 kDa, והדבר מעיד על נוכחות PBAN-R בגנגליוני החזה, שהתבטאה בקשירת הליגנד המסומן אליו. ניתן לראות, כי אותן תוצאות התקבלו ב-PG כרקמת הביקורת. במסלול שסומן ב-D המתייחס ל-TG התקבל פס חלש לעומת הפס במסלול ה-L. הדבר מראה, כי הליגנד הלא מסומן הניתן בעודף ריכוז הצליח לדחוק את הליגנד המסומן ולהקשר ל-PBAN-R. משמעות הדבר היא, שישנה ספציפיות בין הקולטן לליגנד שלו, PBAN, בגנגליוני החזה. מהשוואת עוצמת הפסים היחסית (IDV) במסלולים השונים, ניתן לראות, כי עוצמת החלבון אליו נקשר הליגנד המסומן גבוהה באופן משמעותי מאשר בביקורת; בעוד שעוצמת החלבון בממברנות שעברו קשירה גם עם הליגנד הלא מסומן בעודף ריכוז, אינה גבוהה בהרבה מאשר בביקורת. תוצאות דומות התקבלו גם בניסוי קשירה נוספים שנערכו בגנגליוני החזה (טבלה 1).



איור 5: דוגמת Western blot המראה נוכחות PBAN-R ספציפי ל-PBAN בגנגליוני החזה של נקבות בוגרות באמצעות שימוש בליגנד Atf-Bct-NHS-PBAN. בלוטות פרומון המין שימשו כרקמת הביקורת. החץ מראה את מיקום חלבון הקולטן בגודל 50 kDa, אליו נקשר הליגנד באופן ספציפי. המסלול המסומן ב-M

מצביע על מיקום סמני הגודל המולקולריים. המסלול המסומן ב- E מצביע על מיקום הממברנות אליהן לא הוסף הליגנד, המראה biotin אנדוגני (עוצמת רקע). המסלול המסומן ב- L מייצג ממברנות שעברו קשירה עם הליגנד המסומן ב- photo-affinity וב- biotin. המסלול המסומן ב- D מצביע על מיקום הממברנות שעברו קשירה תחרותית עם הליגנד המסומן וליגנד שאינו מסומן, בעודף, במטרה לקבוע את ספציפיות הקשירה בין PBAN-R ו- PBAN. העמודות מתחת למסלולים מתארות את העוצמות היחסיות (IDV) של פס ה- 50 kDa באמצעות התוכנה AlphaEaseFC Chemilmager 4400.

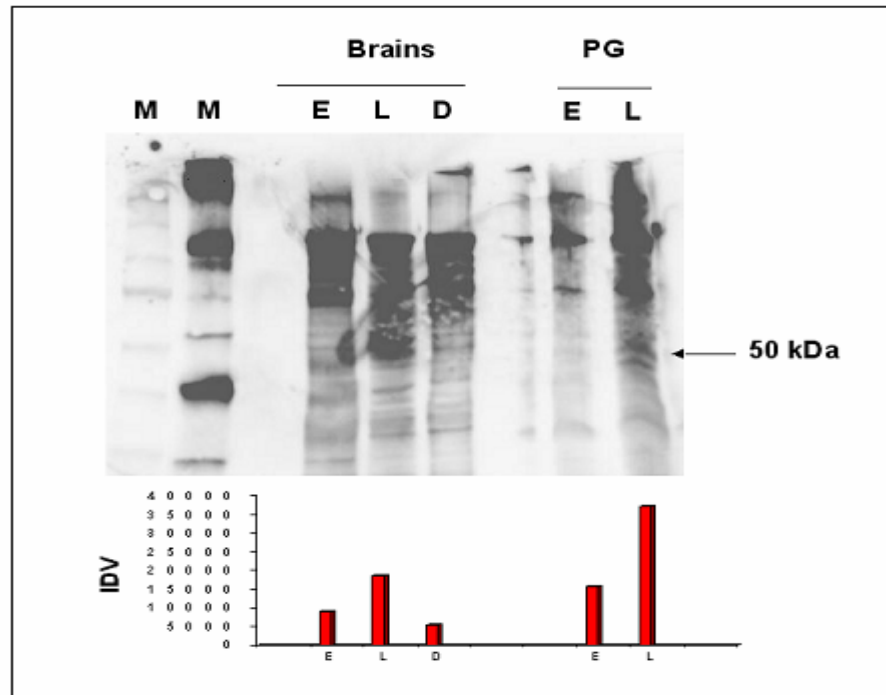
איור 6 מציג מבחן קשירה שנערך בממברנות שהופקו מהצינור העצבי (VNC). במסלול E ניתן לראות שעוצמת פס ה- 50 kDa נמוכה, כלומר ה- VNC אינו מכיל חלבונים אנדוגניים קושרי biotin, והדבר אפשר את זיהויו של PBAN-R ברקמה. במסלול L התקבל פס של 50 kDa, המראה כי PBAN-R קיים בצינור העצבי, וכי הליגנד המסומן נקשר אליו. במסלול D התקבל פס חלש לעומת הפס במסלול L. כלומר, הליגנד הלא מסומן המצוי בעודף דחק את הליגנד המסומן ונקשר ל- PBAN-R. מכאן, שהקולטן ספציפי לליגנד שלו, PBAN, בצינור העצבי. השוואת עוצמת הפסים היחסית (IDV) במסלולים השונים העלתה, כי עוצמת החלבון בטיפול ה- Labeling גבוהה באופן ניכר לעומת הביקורת, בניגוד לטיפול ה- Displacement, עברו התקבל ערך IDV שאינו גבוה בהרבה מאשר בביקורת. בניסויי קשירה נוספים שנערכו בצינור העצבי התקבלו תוצאות דומות (טבלה 1).



איור 6: דוגמת Western blot המראה נוכחות PBAN-R ספציפי ל- PBAN בצינור העצבי של נקבות בוגרות באמצעות שימוש בליגנד Atf-Bct-NHS-PBAN. החץ מראה את מיקום חלבון הקולטן בגודל

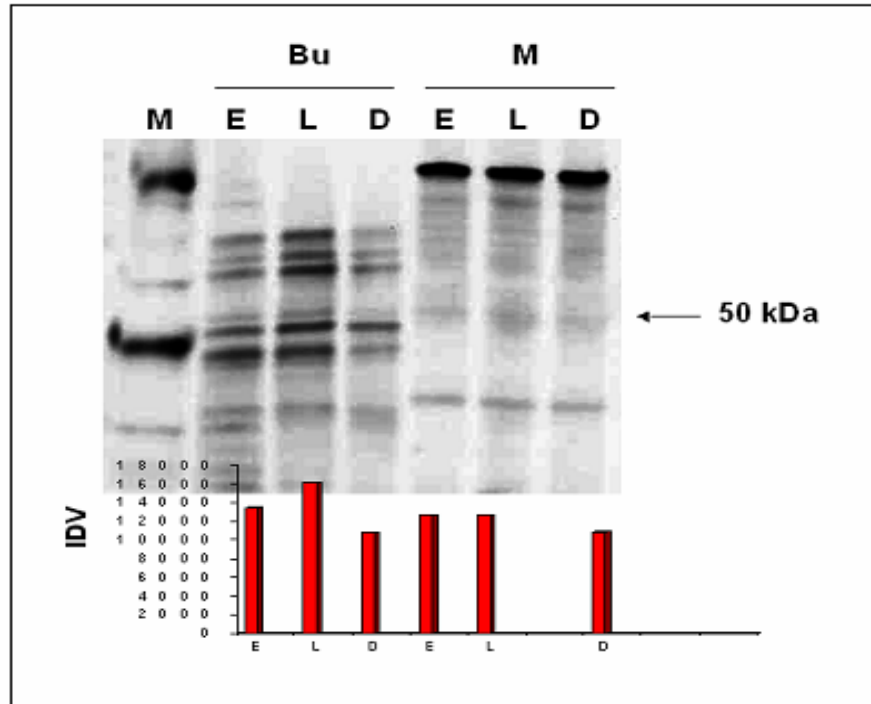
50 kDa, אליו נקשר הליגנד באופן ספציפי. המסלול המסומן ב-M מצביע על מיקום סמני הגודל המולקולריים. המסלול המסומן ב-E מצביע על מיקום הממברנות אליהן לא הוסף הליגנד, המראה biotin אנדוגני (עוצמת רקע). המסלול המסומן ב-L מייצג ממברנות שעברו קשירה עם הליגנד המסומן ב-photo-affinity וב-biotin. המסלול המסומן ב-D מצביע על מיקום הממברנות שעברו קשירה תחרותית עם הליגנד המסומן וליגנד שאינו מסומן, בעודף, במטרה לקבוע את ספציפיות הקשירה בין PBAN-R ו-PBAN. העמודות מתחת למסלולים מתארות את העוצמות היחסיות (IDV) של פס ה-50 kDa באמצעות התוכנה AlphaEaseFC Chemilmager 4400.

איור 7 מציג מבחן קשירה שנערך בממברנות שהופקו מהמוחות (Br), יחד עם ממברנות שהופקו מבלוטות פרומון המין (PG), ששימשו כביקורת. במסלול E המתייחס ל-Br, עוצמת הפס בגודל של כ-50 kDa חלשה, כלומר לא נמצאו חלבונים אנדוגניים קושרי biotin ב-Br, וניתן היה לפיכך להמשיך בזיהוי הקולטן ברקמה זו. במסלול L התקבל פס בגודל 50 kDa, מה שמעיד על המצאות PBAN-R במוח, שהתבטאה בקשירת הליגנד המסומן אליו. אותן תוצאות התקבלו ב-PG כרקמת הביקורת. במסלול D המתייחס ל-Br נצפה פס חלש לעומת הפס במסלול L. מכאן, שהליגנד הלא מסומן הניתן בעודף ריכוז הצליח לדחוק את הליגנד המסומן ולהקשר לקולטן. כלומר, ישנה ספציפיות בין הקולטן לליגנד שלו, PBAN, במוח. מהשוואת ערכי ה-IDV במסלולים השונים ניכר, כי עוצמת החלבון אליו נקשר הליגנד המסומן גבוהה משמעותית מאשר בביקורת; ואילו עוצמת החלבון בממברנות שעברו קשירה גם עם הליגנד הלא מסומן בעודף ריכוז, אינה גבוהה יותר באופן משמעותי לעומת הביקורת. תוצאות דומות התקבלו גם בניסוי קשירה נוספים שנערכו במוח (טבלה 1).



איור 7: דוגמת Western blot המראה נוכחות PBAN-R ספציפי ל-PBAN במוחות של נקבות בוגרות באמצעות שימוש בליגנד Atf-Bct-NHS-PBAN. בלוטות פרומון המין שימשו כרקמת הביקורת. החץ מראה את מיקום חלבון הקולטן בגודל 50 kDa, אליו נקשר הליגנד באופן ספציפי. המסלולים המסומנים ב-M מצביעים על מיקום סמני הגודל המולקולריים. המסלול המסומן ב-E מצביע על מיקום הממברנות אליהן לא הוסף הליגנד, המראה biotin אנדוגני (עוצמת רקע). המסלול המסומן ב-L מייצג ממברנות שעברו קשירה עם הליגנד המסומן ב-photo-affinity וב-biotin. המסלול המסומן ב-D מצביע על מיקום הממברנות שעברו קשירה תחרותית עם הליגנד המסומן וליגנד שאינו מסומן, בעודף, במטרה לקבוע את ספציפיות הקשירה בין PBAN-R ו-PBAN. העמודות מתחת למסלולים מתארות את העוצמות היחסיות (IDV) של פס ה-50 kDa באמצעות התוכנה AlphaEaseFC Chemilmager 4400.

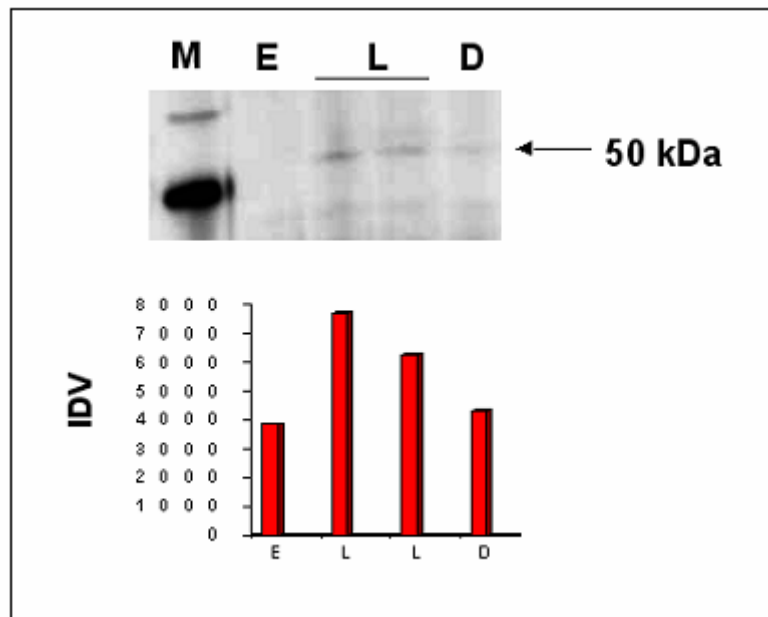
איור 8 מציג מבחן קשירה שנערך ב-Bursa & Spermatheca (Bu) ובשריר הכנף (M). במסלולים המסומנים ב-E בשתי רקמות אלו, התקבל פס הנראה לעין בגודל של כ-50kDa כלומר שתי הרקמות, הבורסה (יחד עם הספרמטיקה) ושריר הכנף, מכילות חלבונים אנדוגניים קושרי biotin המפריעים בזיהוי הקולטן, ולכן לא ניתן היה להמשיך בזיהוי של PBAN-R באותן רקמות. למעשה, בשלושת המסלולים (E, L ו-D) התקבל פס בגודל של כ-50 kDa, שעוצמתו היחסית הייתה דומה ביניהם, הן בבורסה והן בשריר הכנף.



איור 8: דוגמת Western blot שבוצע ב- *Bursa & Spermatheca* ובשריר הכנף, לפיו לא ניתן להמחיש את נוכחות ה- **PBAN-R ברקמות אלו**. החץ מראה את מיקום החלבונים בגודל 50 kDa הקשורים ל- biotin. המסלול המסומן ב- M מצביע על מיקום סמני הגודל המולקולריים. המסלול המסומן ב- E מצביע על מיקום הממברנות אליהן לא הוסף הליגנד, המראה biotin אנדוגני (עוצמת רקע). המסלול המסומן ב- L מייצג ממברנות שעברו קשירה עם הליגנד המסומן ב- photo-affinity וב- biotin. המסלול המסומן ב- D מצביע על מיקום הממברנות שעברו קשירה תחרותית עם הליגנד המסומן וליגנד שאינו מסומן, בעודף, במטרה לקבוע את ספציפיות הקשירה בין PBAN-R ו- PBAN. העמודות מתחת למסלולים מתארות את העוצמות היחסיות (IDV) של פס ה- 50 kDa באמצעות התוכנה AlphaEaseFC Chemilmager 4400.

איור 9 מציג מבחן קשירה לתאי Sf9 מ- *Spodoptera frugiperda*, אשר הגן ל- PBAN-R מ- *Helicoverpa zea* הוחדר אליהם, על מנת לאמת כי החלבון בגודל 50 kDa שזיהינו בניסויי הקשירה ברקמות השונות הוא אכן PBAN-R. במסלול E, לא נצפה פס בגודל של כ- 50 kDa, כלומר תאי ה- Sf9 אינם מכילים חלבונים אנדוגניים קושרי biotin, והדבר אפשר את זיהוי PBAN-R שהגן המקודד לו הוחדר לתאים. במסלולי ה- L התקבל פס של 50 kDa, המעיד על ביטוי מוצלח של PBAN-R בתאי ה- Sf9, שהתבטא בקשירת הליגנד המסומן אליו. במסלול D התקבל פס חלש לעומת הפס במסלולי ה- L. כלומר, הליגנד הלא מסומן בעודף הצליח לדחוק את הליגנד המסומן ונקשר לקולטן. היות ובניסויי הקשירה בתאי ה- Sf9 הגן ל- PBAN-R של *H. zea* הוחדר לתאים,

ותוצאות הניסוי דומות לאלו שהתקבלו בניסויי הקשירה שברקמות, ניתן לקבוע כי החלבון שזוהה ברקמות הוא אכן PBAN-R של *H. armigera* (או קולטן הדומה לו). על פי השוואת עוצמת הפסים היחסית (IDV), ניתן לומר, שעוצמת החלבון אליו נקשר הליגנד המסומן גבוהה באופן משמעותי מאשר בביקורת; בעוד שעוצמת החלבון בתאים שעברו קשירה גם עם הליגנד הלא מסומן בעודף, אינה גבוהה בהרבה מאשר בביקורת. תוצאות דומות התקבלו גם בניסוי קשירה נוספים שנערכו בתאי ה-Sf9 (טבלה 1).



איור 9: דוגמת Western blot המעיד על ביטוי PBAN-R ספציפי ל-PBAN בתאי Sf9 אליהם הוחדר הגן לקולטן באמצעות שימוש בליגנד Atf-Bct-NHS-PBAN, ומאמת את זיהוי PBAN-R ברקמות השונות. החץ מראה את מיקום חלבון הקולטן בגודל 50 kDa, אליו נקשר הליגנד. המסלול המסומן ב-M מצביע על מיקום סמני הגודל המולקולריים. המסלול המסומן ב-E מצביע על מיקום התאים אליהן לא הוסף הליגנד, המראה biotin אנדוגני (עוצמת רקע). המסלולים המסומנים ב-L מייצגים תאים שעברו קשירה עם הליגנד המסומן ב-photo-affinity וב-biotin. המסלול המסומן ב-D מצביעים על מיקום התאים שעברו קשירה תחרותית עם הליגנד המסומן וליגנד שאינו מסומן, בעודף, במטרה לקבוע את ספציפיות הקשירה בין PBAN-R ו-PBAN. העמודות מתחת למסלולים מתארות את העוצמות היחסיות (IDV) של פס ה-50 kDa באמצעות התוכנה AlphaEaseFC Chemilmager 4400.

טבלה 1 מציגה השוואה בין ערכי ה-IDV היחסיים שחושבו עבור טיפול ה-Labeling וטיפול ה-Displacement לכל אחת מההרצות שנערכו ברקמות הנבחנות (אלו שכללו לפחות 3 חזרות), כמתואר בפרק השיטות. כפי שניתן לראות בטבלה, בכל ניסויי הקשירה שבוצעו על בלוטת הפרומון נבחן טיפול ה-Labeling בלבד. השוואה בין הרקמות השונות בערכי ה-IDV היחסיים מראה, כי ב-VNC, TG, Br ובתאי ה-Sf9 התקבלו עוצמות יחסיות

נמוכות יותר בטיפול ה- Displacement לעומת טיפול ה- Labeling. עם זאת, באף אחת מבין הרקמות הנבחנות או בתאי ה- Sf9 לא התקבלו הבדלים מובהקים בערכי ה- IDV היחסיים בין שני הטיפולים, Labeling ו- Displacement. כמו כן, ניתן לראות על פי ערכי ה- Δ IDV, כי התקבל Displacement מוצלח בכל ההרצות של ה- Br ושל ה- Sf9. בשתי הרקמות האחרות המוצגות, TG ו- VNC, התקבל Displacement חזק בשתיים מתוך שלוש הרצות, בעוד שבאחת ההרצות ה- Displacement אינו מוצלח (ערכי Δ IDV חיוביים משמעותם שעוצמת פס ה- 50 kDa הייתה גבוהה יותר בטיפול ה- Displacement לעומת טיפול ה- Labeling).

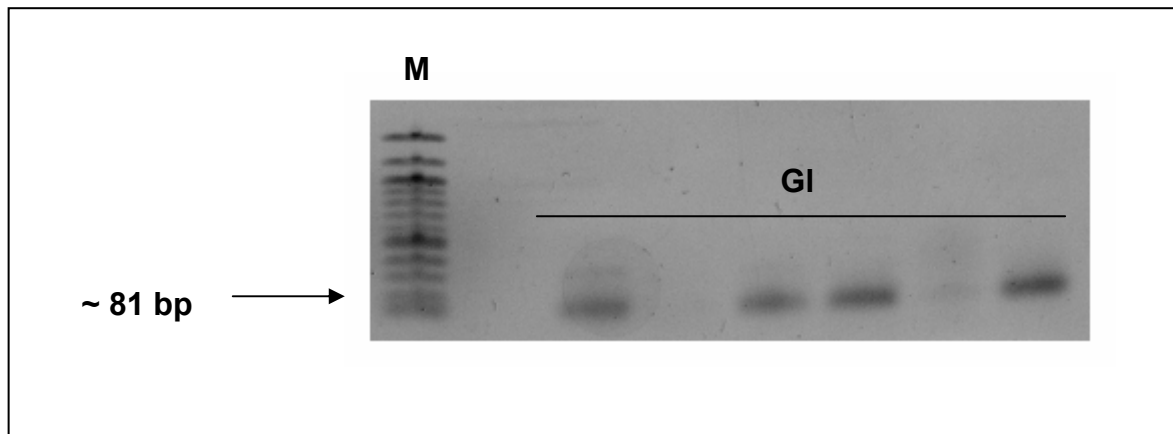
Tissue	Relative IDV values: Labeling						Relative IDV values: Displacement							p
	Gel1	Gel2	Gel3	Gel4	Gel5	Mean \pm SEM	Gel1	Gel2	Gel3	Gel4	Gel5	Mean \pm SEM		
GI	1.21	1.36	1	1.83	1.58	1.4 \pm 0.16	-	-	-	-	-	-	only one treatment	
TG	1.5	2	3.73	-	-	2.41 \pm 0.83	0	0.5	4	-	-	1.5 \pm 1.54	0.2794	
						Δ IDV	-1.5	-1.5	0.27	-	-			
VNC	1.36	0.29	2.67	-	-	1.44 \pm 0.84	0.94	0.94	0.3	-	-	0.73 \pm 0.26	0.1891	
						Δ IDV	-0.42	0.65	-2.37	-	-			
Br	7.5	1.1	0.44	0.96	0.8	2.16 \pm 1.5	2	0	0.07	0	0	0.41 \pm 0.44	0.1544	
						Δ IDV	-5.5	-1.1	-0.37	-0.96	-0.8			
Sf9	0.13	0.33	1	0.88	0.88	0.64 \pm 0.19	0	0.13	0.13	0.75	0.63	0.33 \pm 0.17	0.1032	
						Δ IDV	-0.13	-0.2	-0.87	-0.13	-0.25			

טבלה 1: השוואה בין טיפולי ה- Labeling וה- Displacement בערכי ה- IDV היחסיים ברקמות הנבחנות. העמודות בחלק השמאלי של הטבלה מתייחסות לערכי ה- IDV היחסיים שהתקבלו מטיפול ה- Labeling (קשירה בנוכחות ליגנד מסומן, ובהיעדר ליגנד לא מסומן בעודף ריכוז). העמודות בחלק הימני של הטבלה מתייחסות לערכי ה- IDV היחסיים שהתקבלו מטיפול ה- Displacement (קשירה בנוכחות ליגנד מסומן, ובנוכחות ליגנד לא מסומן בעודף ריכוז). כל הרצה, הכוללת טיפול Labeling ו- Displacement, מופיעה בשני חלקי הטבלה (n=1-5). הקיצורים GI, TG, VNC, Br ו- Sf9 מייצגים את בלוטות הפרומון, גנגליון החזה, הצינור העצבי, המוח ותאי ה- Sf9 אליהם הוחדר הגן ל- PBAN-R, בהתאמה. (טיפול ה- Displacement לא נבחן ב- GI במחקר זה, כיוון שכבר פורסם על ידי Rafraeli and Gileadi, 1997;

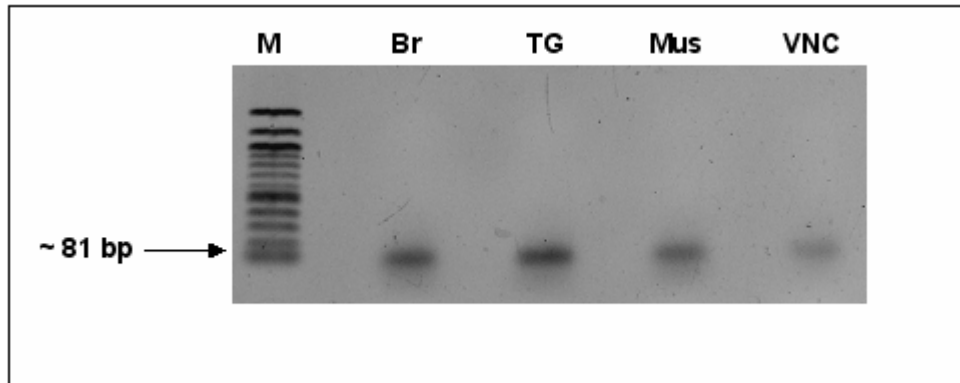
Rafaeli et al., 2003). לא נמצאה השפעה מובהקת של הטיפול (L או D) על ערכי ה-IDV היחסיים ברקמות השונות; TG (p=0.2794; Unpaired T test, 1 tail), VNC (p=0.1891; Unpaired T test, 1 tail), Br (p=0.1544; Unpaired T test, 1 tail), M (p=0.1869; Unpaired T test, 1 tail), ובתאי ה-Sf9 (p=0.1032; Unpaired T test, 1 tail). ערך Δ IDV חושב לכל הרצה, רמה שלילית גבוהה מצביעה על Displacement יותר חזק.

3.2 קביעת ביטוי הגן ל- PBAN-R ברקמות השונות

על מנת לקבוע את ביטוי הגן ל- PBAN-R ברקמות השונות של נקבות *H. armigera*, הופק ה-RNA מכל אחת מהרקמות הנבחנות, וה-cDNA שנוצר מה-RNA בריאקציית RT-PCR עבר הגברה עם פריימרים ספציפיים לגן ה-PBAN-R היוצרים amplicon באורך של 81 bp. תוצרי ה-PCR הוטענו על גבי ג'ל. לאחר זיהוי הפסים באיזור ה-81 bp שהתקבלו בג'ל עבור הרקמות השונות (איורים 10-11), חתיכות הג'ל המכילות את הפסים בודדו ועברו תהליך למיצוי ה-DNA מהג'ל. תוצרי מיצוי ה-DNA נשלחו לריצוף. בחיפוש Blast שנערך לרצפים שהתקבלו מהרקמות השונות, רצפים אלו נמצאו דומים במידה רבה לרצף הגן ל- PBAN-R בבלוטות פרומון המין של *H. armigera* (AY792036) (Choi et al., 2004,). GENBank). איורים 12-16 מציגים את השוואות ה-alignment בין רצפי ה-cDNA שנמצאו ברקמות השונות לבין רצף הגן ל- PBAN-R ב-*H. armigera*. בכל אחד מאיורים אלו מוצג הקטע ההומולוגי בין שני הרצפים, כאשר הרצף העליון (Query) הוא זה שהתקבל מאחת הרקמות, והתחתון מביניהם (Sbjct) שייך לרצף הגן הידוע. ערך ה-Expect value (E-value) הינו ההסתברות לקבלת ההומולוגיה מקרית בין שני הרצפים. gaps הינם מקומות בהם אחד הרצפים חסר חומצת אמינו הנמצאת בקטע ההומולוגי של הרצף המשווה אליו.



איור 10: דוגמת הרצה לתוצרי PCR שמקורם ב-GI, המראה נוכחות מקטע cDNA באורך 81 bp. החץ מראה את מיקום מקטע ה-DNA באורך 81 bp. המסלול המסומן ב-M מצביע על מיקום סמן הנוקלאוטידים. המסלולים המסומנים ב-GI מצביע על מיקום תוצרי ה-PCR שמקורם ב-GI.



איור 11: דוגמת הרצה לתוצרי PCR שמקורם ברקמות השונות, המראה נוכחות מקטע cDNA באורך 81 bp. החץ מראה את מיקום מקטע ה-DNA באורך 81 bp. המסלול המסומן ב-M מצביע על מיקום סמן הנוקלאוטידים. המסלולים המסומנים ב-TG, GI, Mus, ו-VNC מצביעים על מיקום תוצרי ה-PCR שמקורם ב-TG, GI, Mus, ו-VNC, בהתאמה.

```

>gi|57231400|gb|AY792036.1| Helicoverpa armigera pherom
receptor mRNA, complete cds
Length=1041

Score = 79.8 bits (40), Expect = 2e-11
Identities = 50/52 (96%), Gaps = 1/52 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query 11 ATGGTGTGCGACATGAAGGGACGACATATNCGCTATGTACCGCTCC
      |||
Sbjct 452 ATGGTGTGCGACATGAAGGGCCGACATAT-CGCTATGTACCGCTCC
  
```

איור 12: השוואת alignment בין רצף ה-cDNA מה-GI ורצף הגן ל-PBAN-R ב-*H. armigera*. בקטע ההומולוגי בין שני הרצפים, שאורכו 52 נוקלאוטידים, נמצאה זהות של 96% ביניהם, והתקבל כי E-value = $2e^{-11}$.

```

>gi|57231400|gb|AY792036.1| Helicoverpa armigera pherom
receptor mRNA, complete cds
Length=1041

Score = 91.7 bits (46), Expect = 5e-16
Identities = 46/46 (100%), Gaps = 0/46 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 19 GTGCGACATGAAGGGCCGACATATCGCTATGTACCGCTCCACCGTG
          |||
Sbjct 447 GTGCGACATGAAGGGCCGACATATCGCTATGTACCGCTCCACCGTG

```

איור 13: השוואת alignment בין רצף ה- cDNA מה- TG ורצף הגן ל- PBAN-R ב- *H. armigera*. בקטע ההומולוגי בין שני הרצפים, שאורכו 46 נוקלאוטידים, נמצאה זהות של 100% ביניהם, והתקבל כי E-value = $5e^{-16}$.

```

>gi|57231400|gb|AY792036.1| Helicoverpa armigera pheromone biosynthesis-
activating neuropeptide
receptor mRNA, complete cds
Length=1041

Score = 75.8 bits (38), Expect = 3e-10
Identities = 45/46 (97%), Gaps = 1/46 (2%)
Strand=Plus/Minus

Query 23 GACATGAAGGGCCGACATATACGCTATGTACCGCTCCACCGTGAAC 68
          |||
Sbjct 443 GACATGAAGGGCCGACATATCGCTATGTACCGCTCCACCGTGAAC 399

```

איור 14: השוואת alignment בין רצף ה- cDNA מה- VNC ורצף הגן ל- PBAN-R ב- *H. armigera*. בקטע ההומולוגי בין שני הרצפים, שאורכו 46 נוקלאוטידים, נמצאה זהות של 97% ביניהם, והתקבל כי E-value = $3e^{-10}$.


```

>gi|57231400|gb|AY792036.1| Helicoverpa armigera pherom-
receptor mRNA, complete cds
Length=1041

Score = 91.7 bits (46), Expect = 5e-16
Identities = 46/46 (100%), Gaps = 0/46 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 19 GTGCGACATGAAGGGCCGACATATCGCTATGTACCGCTCCACCGTG
          |||
Sbjct 447 GTGCGACATGAAGGGCCGACATATCGCTATGTACCGCTCCACCGTG

```

איור 15: השוואת alignment בין רצף ה- cDNA מה- Br ורצף הגן ל- PBAN-R ב- *H. armigera*. בקטע ההומולוגי בין שני הרצפים, שאורכו 46 נוקלאוטידים, נמצאה זהות של 100% ביניהם, והתקבל כי $E\text{-value} = 5e^{-16}$.

```

>gi|57231400|gb|AY792036.1| Helicoverpa armigera pherom-
receptor mRNA, complete cds
Length=1041

Score = 75.8 bits (38), Expect = 2e-11
Identities = 38/38 (100%), Gaps = 0/38 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 31 AAGGGCCGACATATCGCTATGTACCGCTCCACCGTGAA 68
          |||
Sbjct 437 AAGGGCCGACATATCGCTATGTACCGCTCCACCGTGAA 400

```

איור 16: השוואת alignment בין רצף ה- cDNA מה- M ורצף הגן ל- PBAN-R ב- *H. armigera*. בקטע ההומולוגי בין שני הרצפים, שאורכו 38 נוקלאוטידים, נמצאה זהות של 100% ביניהם, והתקבל כי $E\text{-value} = 2e^{-11}$.

טבלה 2 מסכמת את תוצאות ה-alignments בין רצפי ה-cDNA מהרקמות הנבחנות ורצף הגן ל-PBAN-R ב-*H. armigera*. ניתן לראות, כי מכל אחת מהרקמות התקבל רצף cDNA הדומה במידה רבה לרצף הגן ל-PBAN-R בבלוטות פרומון המין של *H. armigera*. למרות זאת, קיים הבדל בערכי ה-E-value שהתקבלו עבור השוואות ה-alignment השונות, הנובע מאחוז הזהות בין הרצפים, מאחוז ה-gaps בקטע ההומולוגי ומאורך הקטע ההומולוגי. ערך ה-E-value הנמוך ביותר התקבל עבור ה-alignments של רצף הגן עם רצפי ה-cDNA מה-TG ומה-Br, וב-alignments אלו התקבלה זהות מוחלטת בקטע ההומולוגי לרצף הגן, ללא gaps. ערך E-value גבוה יותר התקבל כאשר רצף הגן השווה לרצף מה-M וכן לרצף מה-GI. אמנם רצף ה-cDNA מה-M נמצא הומולוגי ב-100% לרצף הגן ל-PBAN-R, ללא gaps, אך אורך הקטע ההומולוגי קצר יותר ביחס לקטע ההומולוגי שנמצא ב-alignments עם הרצפים מה-TG ומה-Br. לעומת זאת, הדמיון בין רצף ה-cDNA מה-GI לרצף הגן אינו מושלם וכולל gap, אולם העובדה כי הרצף ההומולוגי ארוך יותר לעומת ה-TG וה-Br, תרמה לערך E-value שווה לזה שהתקבל עבור ה-M. לבסוף, ערך ה-E-value המקסימלי, שאפיין את השוואה בין רצף הגן לרצף ה-cDNA מה-VNC, נובע מכך שההומולוגיה אינה מושלמת ומהווצרות gaps בקטע ההומולוגי שאורכו אינו שונה ביחס ל-TG ול-Br. לסיכום, התקבלו ערכי הומולוגיה גבוהים (96-100%) הומולוגיה) בין רצפי ה-cDNA לרצף גן ה-PBAN-R ב-*H. armigera*, יחד עם ערכי E-value גבוהים מ- 0 ($3e^{-10}$ - $5e^{-16}$).

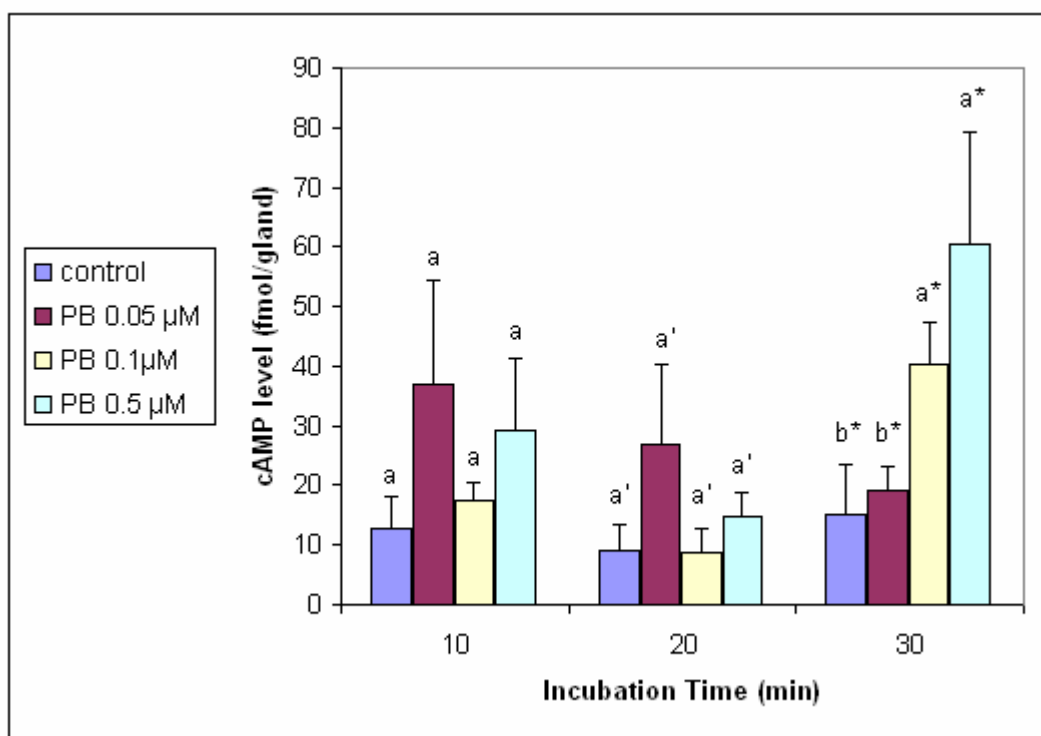
Tissue	E-value	% Identity	% Gaps	nucleotides
GI	$2e^{-11}$	96%	1%	52
TG	$5e^{-16}$	100%	0%	46
VNC	$3e^{-10}$	97%	2%	46
Br	$5e^{-16}$	100%	0%	46
M	$2e^{-11}$	100%	0%	38

טבלה 2: סיכום השוואות ה-alignment בין רצפי ה-cDNA מהרקמות הנבחנות ורצף הגן ל-PBAN-R

ב-*H. armigera*. העמודה השמאלית (Tissue) מייצגת את הרקמה ממנה הופק רצף ה-cDNA שעבר alignment עם רצף הגן ל-PBAN-R. הקיצורים GI, TG, VNC, Br ו-M מייצגים את בלוטות הפרומון, גנגליון החזה, הצינור העצבי, המוח ושריר הכנף. שלוש העמודות הבאות מסכמות את הפרמטרים המתייחסים להומולוגיה שהתקבלה בכל השוואות alignment: ערכי ה-E-value (E-value), אחוז ההומולוגיה בין שני הרצפים (% Identity), אחוז ה-gaps (gaps (%)) ואורך הקטע ההומולוגי בנוקלאוטידים (nucleotides).

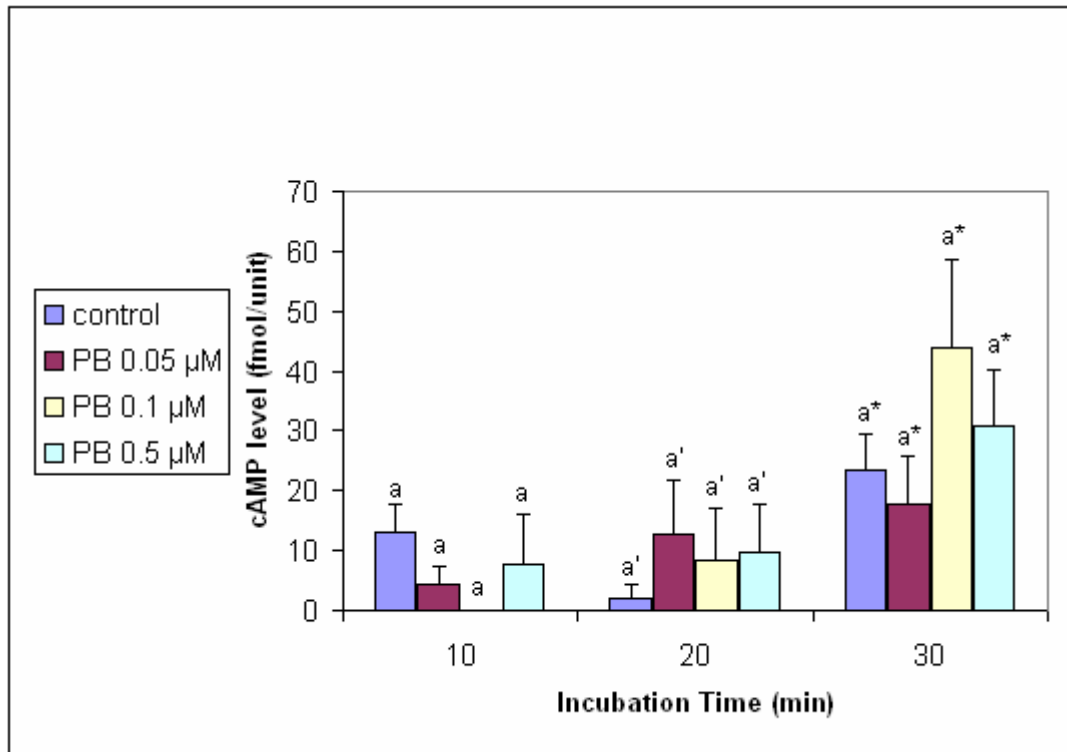
3.3 קביעת פעילות פרומונוטרופית על ידי תגובת שליחים משניים

cAMP הנו שליח משני בביוסינתזת פרומון המין בעש *H. armigera* (Rafaeli and Soroker, 1989b), ורמות ה-cAMP התוך תאיות עולות כתוצאה מזירוז על ידי PBAN (Rafaeli and Soroker, 1989b; Rafaeli et al., 1990). על סמך מידע זה, בחנו את נוכחות הקולטן ל-PBAN בחלק מהרקמות השונות גם באופן כמותי, באמצעות מבחן המכמת את רמת ה-cAMP שנוצר ברקמה כתוצאה מגירוי על ידי PBAN הניתן חיצונית. בכל אחת מהדוגמאות נמצאה כמות ה-cAMP שנוצר במהלך ההדגרה באמצעות עקומת כיוול. איורים 17-19 מציגים ניסויים שנערכו לבדיקת רמות ה-cAMP שנוצרו ברקמות השונות; בלוטות פרומון המין, ה-bursa יחד עם ה-spermatheca (B + S) ושריר הכנף, בהתאמה. העמודות מייצגות את רמת ה-cAMP (ביחידות fmol/gland) הנוצרת על ידי אחת הרקמות בתגובה לריכוזים שונים של PBAN בזמני ההדגרה שונים. בפרק העוסק בקביעת פעילות פרומונוטרופית על ידי תגובת שליחים משניים, בטרם הניתוח הסטטיסטי שבאמצעות התוכנה StatView™, נבחנה השפעת הגומלין בין שני הגורמים הנבחנים (ריכוז ה-PBAN וזמן ההדגרה), על מנת לקבוע האם ניתן לבחון כל אחד מהגורמים בנפרד, או שיש להשוות בין הצירופים השונים שמתקבלים משני גורמים אלו. הדבר נעשה באמצעות התוכנה הסטטיסטית JMP 5. ניתן לראות באיור 17, כי בזמני הדגרה קצרים יותר של בלוטות הפרומון (10 ו-20 דקות), השפעת ריכוז ה-PBAN על רמות ה-cAMP אינה מוגדרת. לעומת זאת, בזמן הדגרה של 30 דקות, ככל שריכוז ה-PBAN המסופק במדיום ההדגרה גבוה יותר, כך רמת ה-cAMP הנוצר גבוהה יותר. כמו כן, ללא PBAN או בנוכחות PBAN בריכוז $0.05 \mu\text{M}$ בתמיסת ההדגרה, אין השפעה למשך זמן ההדגרה על ייצור ה-cAMP, בעוד שבנוכחות ריכוזי ה-PBAN הגבוהים (0.1 ו- $0.5 \mu\text{M}$), משך זמן ההדגרה השפיע על רמת ה-cAMP, והרמה הגיעה לשיאה בהדגרה למשך 30 דקות.



איור 17: השפעת ה-PBAN על רמות ה-cAMP הנוצרות בבלוטת הפרומון. העמודות מייצגות ערכי ממוצעים \pm SEM (n=9-10). נמצא, כי אין השפעת גומלין מובהקת בין ריכוז ה-PBAN וזמן ההדגרה ($p=0.0740$; F test), ולכן כל גורם נותח בנפרד וברמה קבועה של הגורם השני. נמצאה השפעה מובהקת של ריכוז ה-PBAN בזמן ההדגרה של 30 דקות על רמת ה-cAMP הנוצרת (Fisher PLSD-ANOVA test; $p=0.0162$). כמו כן, נמצאה השפעה מובהקת של משך זמן הדגרת הבלוטות בנוכחות PBAN בריכוזים 0.1 μM (Fisher PLSD-ANOVA test; $p=0.0002$) ו-0.5 μM (Fisher PLSD-ANOVA test; $p=0.0388$) על רמות ה-cAMP. ממוצעים עם אותה האות אינם שונים באופן מובהק זה מזה, וסימון זה מתייחס לגורם של ריכוז ה-PBAN.

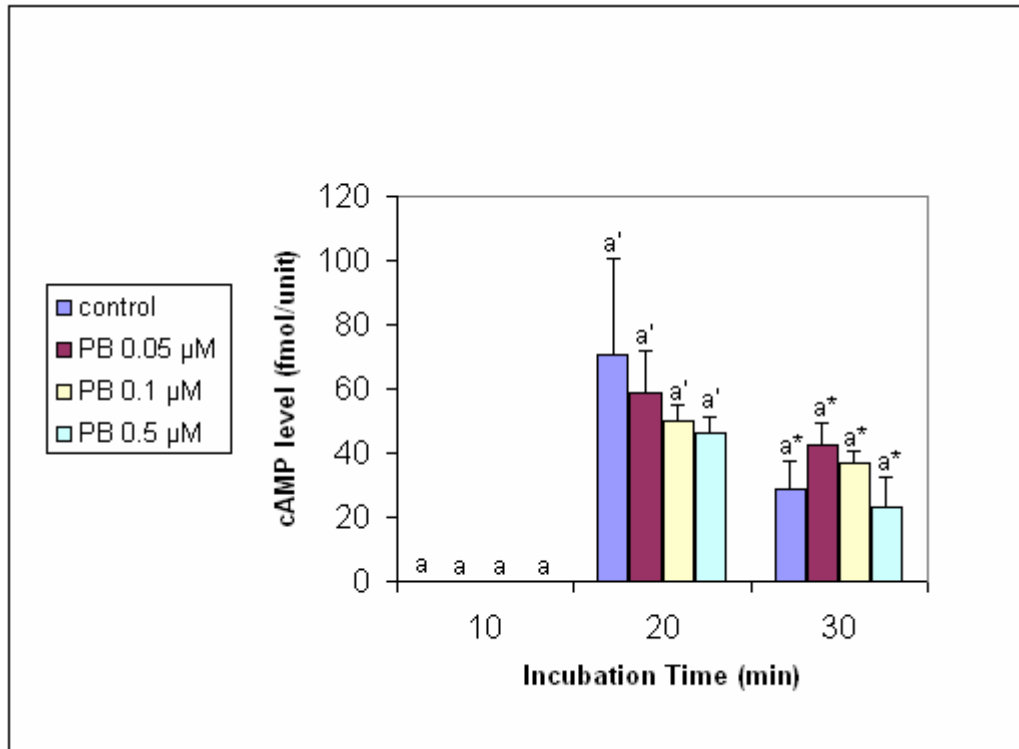
באיור 18 ניתן לראות, שבכל שלושת זמני ההדגרה של ה-B + S, לריכוז ה-PBAN לא הייתה השפעה מוגדרת על רמות ה-cAMP הנוצרות. עם זאת, רמת ה-cAMP נמצאה תלויה במשך זמן ההדגרה והגיעה לשיאה במשך 30 דקות ההדגרה.



איור 18: השפעת ה-PBAN על רמות cAMP הנוצרות ב-Bursa & Spermatheca. העמודות מייצגות

ערכי ממוצעים \pm SEM (n=5). נמצא, כי אין השפעת גומלין מובהקת בין ריכוז ה-PBAN וזמן ההדגרה (p=0.1746; F test), ולכן כל גורם נותח בנפרד וברמה קבועה של הגורם השני. לא נמצאה השפעה מובהקת של ריכוז ה-PBAN בזמני ההדגרה השונים על רמת ה-cAMP הנוצרת (Fisher PLSD-ANOVA test; 10 דקות: p=0.2667; 20 דקות: p=0.7241; 30 דקות: p=0.2371). נמצאה השפעה מובהקת של משך זמן הדגרת הבלוטות ללא מתן PBAN ובנוכחות PBAN בריכוז 0.1 μ M (Fisher PLSD-ANOVA test; p=0.0118; p=0.0101) על רמות ה-cAMP. ממוצעים עם אותה אינם שונים באופן מובהק זה מזה, וסימון זה מתייחס לגורם של ריכוז ה-PBAN.

ניתן לראות באיור 19, כי בזמן ההדגרה הקצר ביותר של שריר הכנף (10 דקות), לא נוצר כלל cAMP כתוצאה מהוספת PBAN למדיום ההדגרה. בשני זמני ההדגרה הממושכים יותר (20 ו-30 דקות), השפעת ריכוז ה-PBAN על רמות ה-cAMP אינה מוגדרת. עם זאת, בכל ריכוזי ה-PBAN הנבחנים (כולל הביקורת ללא PBAN), רמת ה-cAMP נמצאה תלויה במשך זמן ההדגרה והגיעה לשיאה במשך 20 דקות הדגרה. בנוכחות ריכוזי ה-PBAN הגבוהים (0.1 ו-0.5 μ M), רמת ה-cAMP הייתה באופן מובהק נמוכה יותר בהדגרה למשך 30 דקות לעומת 20 דקות הדגרה.



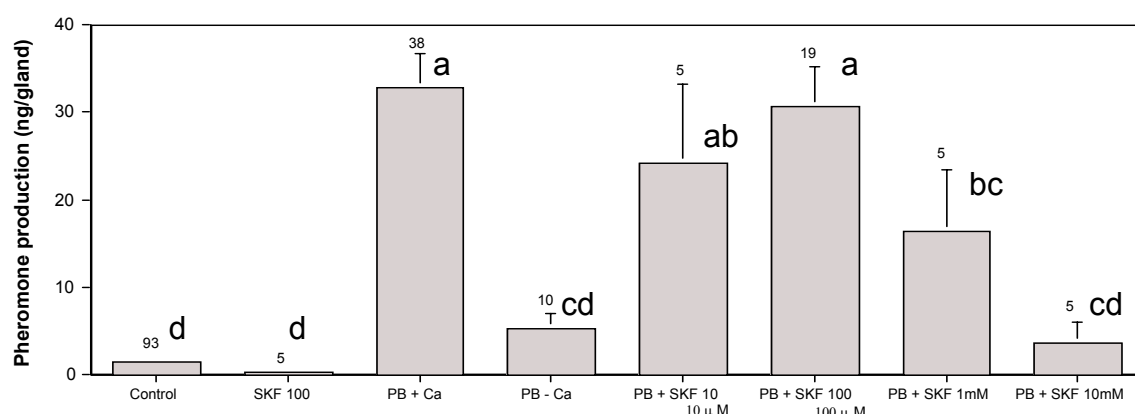
איור 19: השפעת ה-PBAN על רמות cAMP בשריר הכנף. העמודות מייצגות ערכי ממוצעים \pm SEM (n=5). נמצא, כי אין השפעת גומלין מובהקת בין ריכוז ה-PBAN וזמן ההדגרה (F test; $p=0.6926$), ולכן כל גורם נותח בנפרד וברמה קבועה של הגורם השני. לא נמצאה השפעה מובהקת של ריכוז ה-PBAN בזמני ההדגרה השונים על רמת ה-cAMP הנוצרת (Fisher PLSD-ANOVA test; $p=0.2034$; $p=0.6837$; $p=1$). נמצאה השפעה מובהקת של משך זמן הדגרת הבלוטות בכל הריכוזים הנבחים של PBAN (Fisher PLSD-ANOVA test; $p=0.0002$; $p=0.0001$; $p=0.0005$; $p=0.05$). ממוצעים עם אותה האות אינם שונים באופן מובהק זה מזה, וסימון זה מתייחס לגורם של ריכוז ה-PBAN.

3.4 בחינת השפעת חוסמי תעלות סידן על ביוסינתזת פרומון המין

בפרק הנוכחי נעשה ניסיון להמחיש את אופן כניסת ה- Ca^{2+} , החיוני לביוסינתזת פרומון המין (Jurenka et al., 1991c), לתאי בלוטת הפרומון ב-*H. armigera*. כיוון שתהליך ביוסינתזת הפרומון מופעל על ידי קשירת ליגנד (PBAN) לקולטן (PBAN-R), המחקר הנוכחי ביקש לבחון האם כניסת ה- Ca^{2+} נעשית באמצעות תעלות, המשופעלות על ידי אינטרקציה בין PBAN ל-PBAN-R, כפי שדווח ב-*H. zea* (Jurenka et al., 1991c). לשם כך, נבחנו שלושה חומרים, הידועים כחוסמי תעלות סידן באופנים שונים, SKF 96365, amiloride hydrochloride ו-verapamil hydrochloride, לגבי יכולתם לעכב את ביוסינתזת הפרומון בנקבות *H. armigera*. המחקר הנוכחי ביקש לבחון האם חומר החוסם את ה-RMCE כ-SKF 96365 מעכב את ביוסינתזת פרומון המין, בהשוואה לחומרים אחרים שחוסמים את תעלות הסידן במגנונים אחרים.

בניסויים אלו, נבחנה תגובת בלוטות פרומון המין, שהוצאו מנקבות בוגרות בגילאי 2-4 ימים, לחוסמי תעלות הסידן הנבחנים, בריכוז אחד או יותר, כמפורט ב"שיטות וחומרים", באמצעות מבחן *in vitro*. כמות ה-(Z)-11-hexadecenal (להלן, ייצור פרומון המין) הנוצר על ידי הבלוטות נקבעה באמצעות הפרדת הדוגמאות ב-GC (כמפורט בשיטות וחומרים). העמודות באיורים 20-22 מייצגות את רמת ייצור פרומון המין (ביחידות ng/gland) על ידי בלוטות פרומון המין הנבחנות, בנוכחות ובהיעדר Ca^{2+} (איור 20), amiloride (איור 21) או verapamil (איור 22).

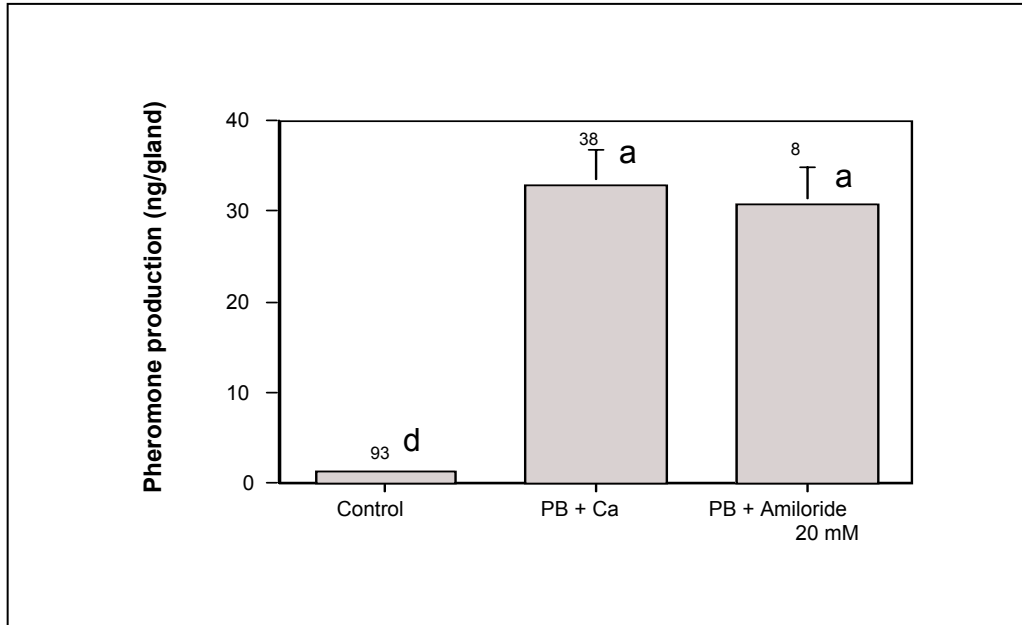
ניתן לראות באיור 20, כי ייצור הפרומון המושג על ידי Hez-PBAN ללא הוספת Ca^{2+} נמוך באופן משמעותי לעומת התגובה ל-PBAN בנוכחות Ca^{2+} . SKF 96365 עצמו אינו משפיע על ביוסינתזת פרומון המין, אך ניתן לראות, כי ריכוזים גבוהים של SKF 96365 (1 mM ו-10 mM) גרמו לירידה בייצור פרומון המין על ידי הבלוטות המבודדות, כלומר חסמו את תעלות הסידן שבתאי הבלוטה באופן יעיל.



איור 20: תגובת בלוטות פרומון המין לנוכחות ולהיעדר Ca^{2+} . העמודות מייצגות ערכי ממוצעים \pm SEM.

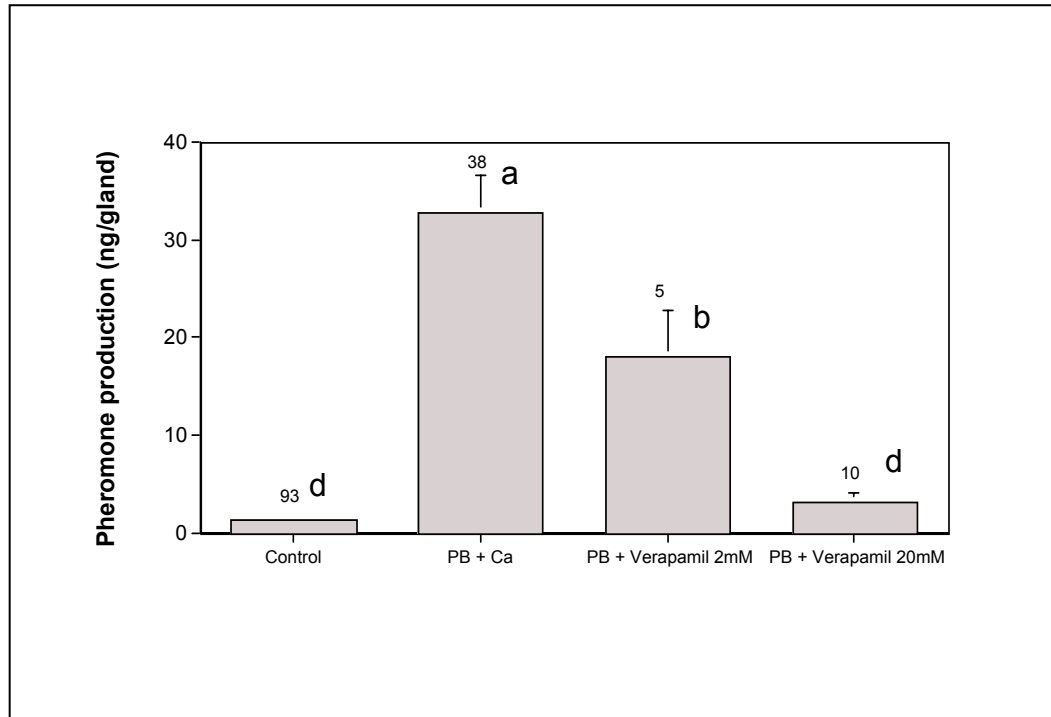
עבור הטיפולים הבאים: ביקורת (מדיום בלבד) (control), SKF 96365 בריכוז $100 \mu\text{M}$ ($n=5-93$)
 Hez-PBAN בריכוז $0.5 \mu\text{M}$ בתוספת Ca^{2+} (PB + Ca), Hez-PBAN בריכוז $0.5 \mu\text{M}$ ללא Ca^{2+} (PB - Ca),
 Hez-PBAN בריכוז $0.5 \mu\text{M}$ בנוכחות SKF 96365 בריכוז $10 \mu\text{M}$ (PB + SKF 10),
 Hez-PBAN בריכוז $0.5 \mu\text{M}$ בנוכחות SKF 96365 בריכוז $100 \mu\text{M}$ (PB + SKF 100),
 Hez-PBAN בריכוז $0.5 \mu\text{M}$ בנוכחות SKF 96365 בריכוז 1mM (PB + SKF 1mM) ו-Hez-PBAN בריכוז $0.5 \mu\text{M}$
 בנוכחות SKF 96365 בריכוז 10mM (PB + SKF 10mM). נמצא, כי בהיעדר Ca^{2+} , בין אם עקב אי הוספתו למדיום
 מלכתחילה ובין אם עקב נוכחות ריכוז גבוה (1mM או 10mM) של SKF 96365, ייצור פרומון המין יורד
 באופן מובהק אף על פי הוספת PBAN למדיום ההדגרה (Fisher PLSD-ANOVA test; $p=0.0001$).
 ממוצעים עם אותה האות אינם שונים באופן מובהק זה מזה.

באיור 21 ניתן לראות, כי ייצור הפרומון המושרה על ידי *Hez-PBAN* אינו מושפע מנוכחות *amiloride* במדיום ההדגרה, היות ורמת ייצור הפרומון דומה בנוכחות ובהיעדר *amiloride*. כלומר, החומר אינו מהווה חוסם יעיל של תעלות הסידן שבתאי בלוטת פרומון המין.



איור 21: תגובת בלוטת פרומון המין ל- *amiloride*. העמודות מייצגות ערכי ממוצעים \pm SEM (n=8-93) עבור הטיפולים הבאים: ביקורת (מדיום בלבד) (*control*), *Hez-PBAN* בריכוז $0.5 \mu\text{M}$ בתוספת Ca^{2+} (PB + Ca) ו- *Hez-PBAN* בריכוז $0.5 \mu\text{M}$ בנוכחות *amiloride* בריכוז 20 mM (PB + Amiloride 20 mM). נמצא, כי נוכחות *amiloride* במדיום ההדגרה לא גרמה לירידה בייצור הפרומון.

ניתן לראות באיור 22, כי *verapamil* גרם לירידה משמעותית בייצור פרומון המין על ידי הבלוטות המבודדות בריכוז הנמוך יותר שנבחן (2 mM), לירידה משמעותית אף יותר בריכוז הגבוה שנבחן (20 mM), כלומר *verapamil* נצפה חוסם את תעלות הסידן שבתאי הבלוטה באופן יעיל.



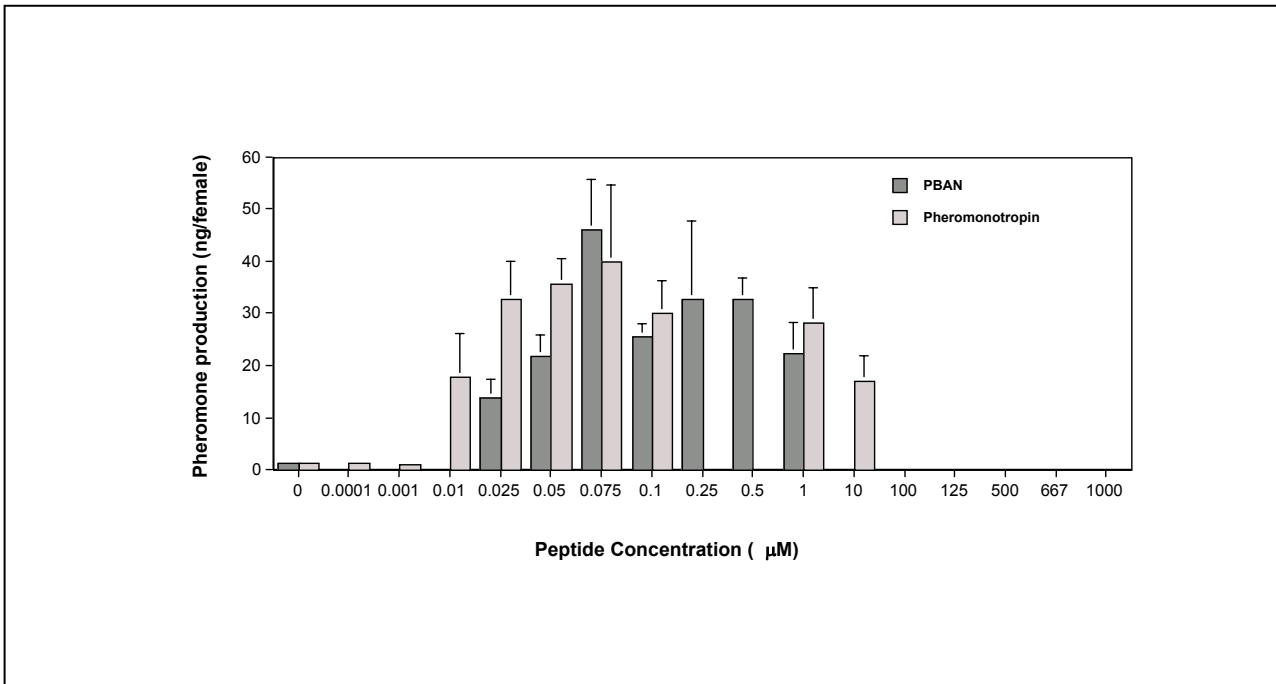
איור 22: תגובת בלוטות פרומון המין ל- verapamil. העמודות מייצגות ערכי ממוצעים \pm SEM (n=5-93) עבור הטיפולים הבאים: ביקורת (מדיום בלבד) (control), Hez-PBAN בריכוז $0.5 \mu\text{M}$ בתוספת Ca^{2+} (PB + Ca), Hez-PBAN בריכוז $0.5 \mu\text{M}$ בנוכחות verapamil בריכוז 2 mM (PB + Verapamil 2mM) ו- Hez-PBAN בריכוז $0.5 \mu\text{M}$ בנוכחות verapamil בריכוז 20 mM (PB + Verapamil 20mM). נמצא, כי verapamil גרם, הן בריכוז הנמוך שנבחן (2 mM) והן בריכוז הגבוה (20 mM), לירידה בייצור פרומון המין על ידי בלוטות הפרומון המבודדות.

3.5 בחינת הפעילות הפרומונוטרופית של פפטידים דמויי-PBAN

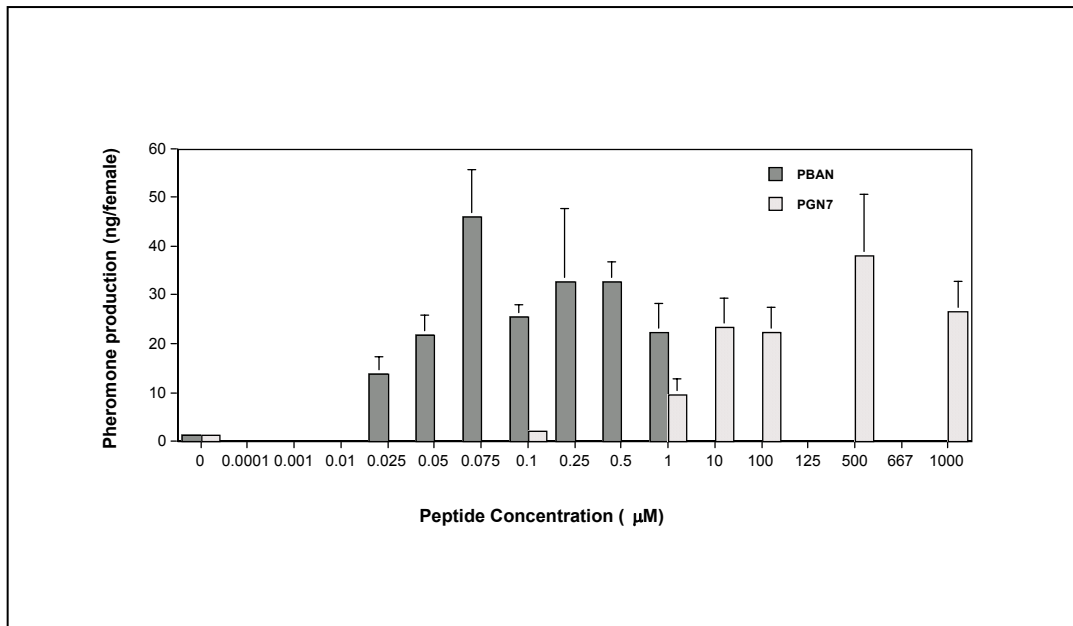
בפרק הנוכחי נבחנו פפטידים אחדים ממשפחת ה- PBAN/pyrokinin, בעלי תפקידים שונים בגוף העש, לגבי פעילותם בזירוז ביוסינתזת הפרומון בבלוטות פרומון מבודדות של נקבות *H. armigera*. בהשוואה ל- PBAN, היות והפפטידים החברים במשפחה זו נושאים את המוטיב FXPRLamide החיוני לביוסינתזת פרומון בקצה ה- C טרמינלי (Raina and Kempe, 1990, 1992; Kuniyoshi et al., 1991). מאחר ובמחקר הנוכחי הובהרה נוכחות הקולטן ל- PBAN ברקמות אחדות בגוף נקבות העש *H. armigera*, מציאת פפטידים דמויי-PBAN המסוגלים לזרז את ביוסינתזת הפרומון בבלוטת הפרומון עשויה לרמז על יכולת קשירתם לקולטנים שנמצאו ברקמות האחרות, המביאה לביצוע תפקידים אחרים בגוף החרק.

במבחנים אלו, נבחנה תגובת בלוטות פרומון המין, שהוצאו מנקבות בוגרות בגילאים 2-4 ימים, לריכוזים שונים של כל אחד מהפפטידים הנבחנים, כולל Hez-PBAN. כל פפטיד נבחן

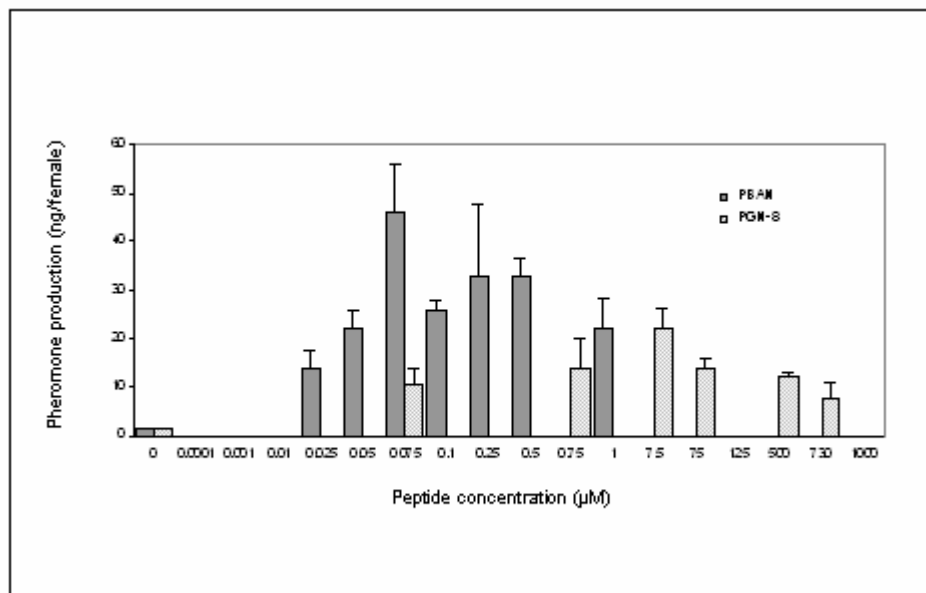
בריכוזים שונים כמפורט ב"שיטות וחומרים" באמצעות מבחן *in vitro*. כמות מרכיב הפרומון העיקרי זוהה כמפורט בפרק שיטות וחומרים. העמודות באיורים 23-29 מייצגות את רמת הפרומון (ביחידות ng/female), שנוצרה על ידי בלוטות פרומון המין הנבחנות, בתגובה לאחד הפפטידים הנבחנים ובהשוואה ל-Hez-PBAN.



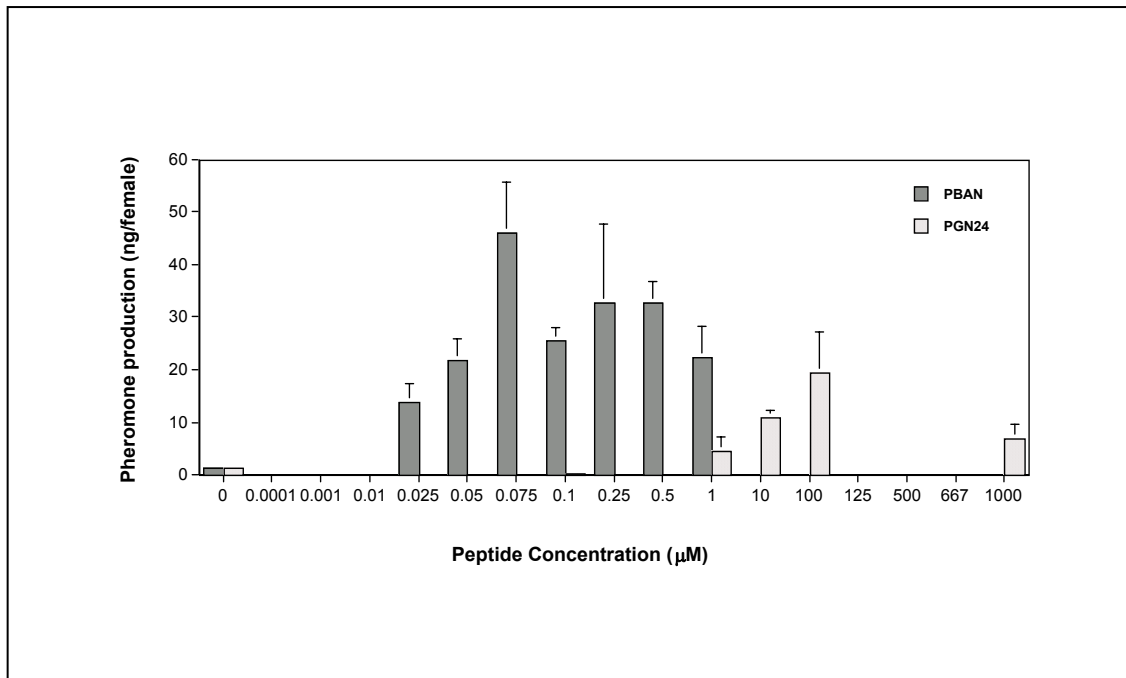
איור 23: עקומת תגובת ייצור פרומון כנגד ריכוזים שונים של *Pss-Pt* בהשוואה ל-*Hez-PBAN*. העמודות מייצגות ערכי ממוצעים \pm SEM (n=5-93). רמת השיא בייצור הפרומון אינה שונה באופן מובהק עבור שני הפפטידים (Fisher PLSD-ANOVA test; p=0.0031).



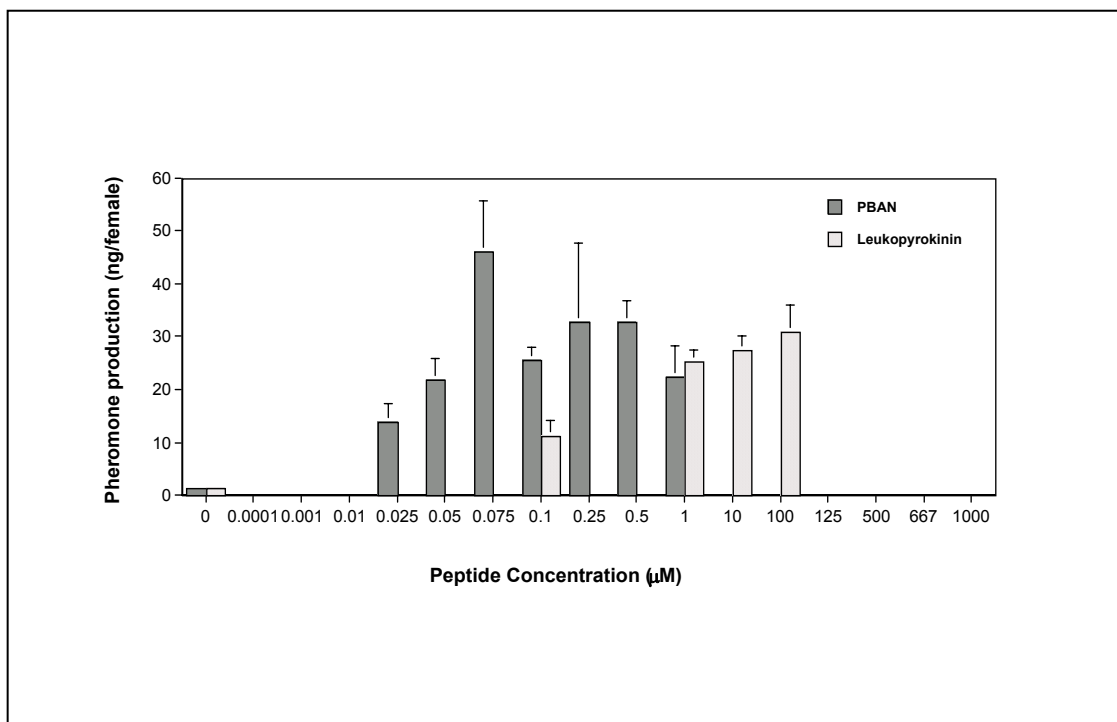
איור 24: עקומת תגובת ייצור פרומון כנגד ריכוזים שונים של PGN-7 בהשוואה ל-Hez-PBAN. העמודות מייצגות ערכי ממוצעים \pm SEM (n=5-93). רמת השיא בייצור הפרומון אינה שונה באופן מובהק עבור שני הפפטידים (Fisher PLSD-ANOVA test; p=0.0031).



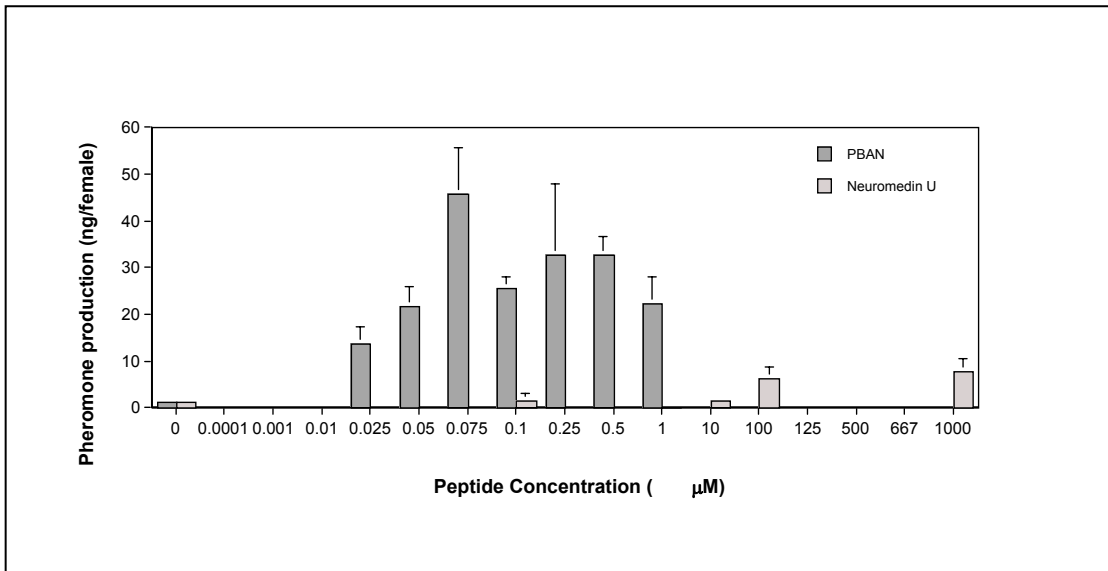
איור 25: עקומת תגובת ייצור פרומון כנגד ריכוזים שונים של PGN-8 בהשוואה ל-Hez-PBAN. העמודות מייצגות ערכי ממוצעים \pm SEM (n=5-93). רמת השיא בייצור הפרומון שונה באופן מובהק עבור שני הפפטידים (Fisher PLSD-ANOVA test; p=0.0031).



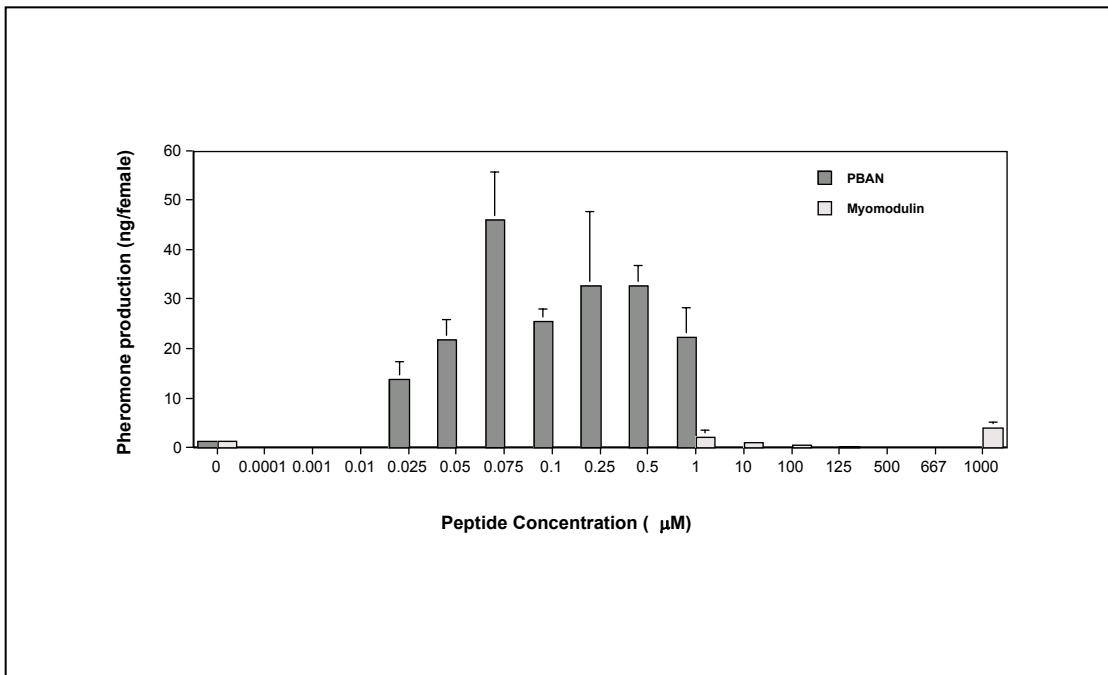
איור 26: עקומת תגובת ייצור פרומון כנגד ריכוזים שונים של PGN-24 בהשוואה ל-Hez-PBAN. העמודות מייצגות ערכי ממוצעים \pm SEM (n=5-93). רמת השיא בייצור הפרומון שונה באופן מובהק עבור שני הפפטידים (Fisher PLSD-ANOVA test; p=0.0031).



איור 27: עקומת תגובת ייצור פרומון כנגד ריכוזים שונים של LPK₄₋₈ בהשוואה ל-Hez-PBAN. העמודות מייצגות ערכי ממוצעים \pm SEM (n=5-93). רמת השיא בייצור הפרומון אינה שונה באופן מובהק עבור שני הפפטידים (Fisher PLSD-ANOVA test; p=0.0031).



איור 28: עקומת תגובת ייצור פרומון כנגד ריכוזים שונים של NMU בהשוואה ל- *Hez-PBAN*. העמודות מייצגות ערכי ממוצעים \pm SEM (n=5-93). רמת השיא בייצור הפרומון שונה באופן מובהק עבור שני הפפטידים (Fisher PLSD-ANOVA test; p=0.0031).



איור 29: עקומת תגובת ייצור פרומון כנגד ריכוזים שונים של Md בהשוואה ל- *Hez-PBAN*. העמודות מייצגות ערכי ממוצעים \pm SEM (n=5-93). רמת השיא בייצור הפרומון שונה באופן מובהק עבור שני הפפטידים (Fisher PLSD-ANOVA test; p=0.0031).

כמתואר בפרק השיטות, חושבו ערכי ה- EC_{50} עבור כל אחד מהפפטידים הנבחנו. ערכי ה- EC_{50} הללו הושוו לערך ה- EC_{50} שהתקבל עבור PBAN (טבלה 3).

טבלה 3 מסכמת את תכונות כל הפפטידים הנבחנו, יחד עם שני פפטידים נוספים הקרובים במידה רבה לחלקם (הרצף המלא של LPK ו-PGN-18 המקודד על ידי אותו גן כמו PBAN ודומה ל-Pss-Pt), אשר נבחנו במחקרם של Choi et al. (2003); Jurenka and Choi, personal communication.

על פי ערכי ה- EC_{50} שהתקבלו, ניתן לומר שכל הפפטידים הנבחנו, למעט Md, הם בעלי פעילות פרומונטרופית. דרך נוספת לבחינת הפעילות הפרומונטרופית של הפפטידים הנבחנו, היא על פי רמות השיא בייצור הפרומון הנגרמות על ידי כל פפטיד. רמת השיא בייצור הפרומון המזורז על ידי הפפטידים Pss-Pt, PGN-7 ו-LPK₄₋₈ אינה נבדלת באופן מובהק מרמת השיא הנגרמת על ידי Hez-PBAN. לעומת זאת, רמת השיא בייצור הפרומון המזורז על ידי הפפטידים PGN-8, PGN-24, NMU ו-Md נמוכה באופן מובהק מרמת השיא הנגרמת על ידי Hez-PBAN (איורים 23-29, טבלה 3).

מניתוח שני הפרמטרים שנבדקו עבור כל פפטיד (ערכי ה- EC_{50} ורמת השיא בייצור הפרומון), ניתן ללמוד, כי הפפטידים בעלי פעילות פרומונטרופית קרובה ל-PBAN הם Pss-Pt, PGN-7 ו-LPK₄₋₈. חשוב לציין, כי PGN-7 גורם לייצור פרומון ברמת שיא דומה ל-PBAN, אך היות והוא פעיל בטווח ריכוזים גבוה ($1-1000 \mu M$), ערך ה- EC_{50} שלו גבוה מאוד ($8.4 \mu M$) ביחס לשני הפפטידים האחרים שגורמים לייצור פרומון ברמה מקסימלית שאינה שונה באופן מובהק ביחס ל-PBAN (Pss-Pt ו-LPK₄₋₈).

בנוסף לממצאים אלו, ניתן לראות, כי מבין כל הפפטידים הנבחנו, Pss-Pt הינו היחיד שמזרז ייצור פרומון ברמת השיא המקסימלי באותו ריכוז כמו Hez-PBAN, $0.075 \mu M$. לעומת זאת, בשאר הפפטידים הנבחנו דרושים ריכוזים גבוהים יותר לייצור מקסימלי של הפרומון; $7.3 \mu M$ (PGN-8), $100 \mu M$ (PGN-24, LPK₄₋₈), $500 \mu M$ (PGN-7), $1000 \mu M$ (NMU), וריכוז מעל ל- $1000 \mu M$ (Md) (טבלה 3). יש לציין, כי בטבלה נתון ריכוז של $1000 \mu M$ כריכוז הדרוש לפעילות מקסימלית של Md, אולם המספר מתייחס לריכוז הגבוה ביותר **הניתן לבדיקה** של Md, והוא מצויין בטבלה כנגד רמת הפרומון המקסימלית שנוצרה על ידי Md בריכוז זה, לכן ניתן לומר שריכוז ה-Md הגורם לפעילות מקסימלית גבוה מ- $1000 \mu M$ (ערך תיאורטי בלבד).

מכל האמור לעיל ניתן ללמוד, כי מבין הפפטידים הנבחנו, Pss-Pt, LPK, PGN-7, PGN-8 ו-PGN-24, NMU נמצאו כבעלי פעילות פרומונטרופית, ויחד עם זאת יש לציין, כי למעט Pss-Pt, פעילותם הפרומונטרופית של הפפטידים הנבחנו נמוכה יותר מאשר פעילותו של PBAN.

Peptide	Sequence	EC ₅₀ - Sf9 cells expressing PBAN-R	Linear Regression Equation	EC ₅₀ - Pheromone glands <i>in vitro</i>	Peptide concentration required for maximal pheromonotropic response	Maximal level pheromone production attained (ng/gland)
PBAN	LSDDMPATPADQEMYRQDPEQIDSRTKY FSPRL_a	25 nM	y=16.06x+75.433	0.54 nM	0.075 μM	45.99 (9.74) ^a
Pheromonotropin	KLSYDDKVFENVE FTPRL_a	Not tested	y=13.173x+45.01	12.6 nM	0.075 μM	40 (14.55) ^{ab}
PGN-18	SLAYDDKSFENVE FTPRL_a	29 nM	-	Not tested	-	-
PGN-7	V I FTP KL_a	87 nM	y=8.882x+10.831	8.4 μM	500 μM	38.08 (12.7) ^{ab}
Leucopyrokinin	PETS FTPRL_a	30 nM	-	Not tested	-	-
Leucopyrokinin₄₋₈	FTPRL_a	Not tested	y=6.119x+20.718	140 nM	100 μM	30.93 (5) ^{abc}
PGN-8	TMN FSPRL_a	30 nM	y=5.85x+15.593	128 nM	7.3 μM	22.3 (3.9) ^{bcd}
PGN-24	NDVKDGAASGAHSDRLGLW FGPRL_a	60 nM	y=3.038x+8.106	3.55 μM	100 μM	19.56 (7.7) ^{bcd}
Neuromedin U	YFL FRPRN_a	136 nM	y=2.053x+1.836	9.73 μM	1000 μM	7.73 (2.77) ^{cd}
Myomodulin	PMSML RL_a	> 10 μM	-	> 1000 μM	1000 μM	3.98 (1.17) ^d
Sf9 cells EC₅₀ : PBAN ≤ PGN-18 ≤ PGN-8 = LPK < PGN-24 < PGN-7 < NMU << {Md}						
GI EC₅₀ : PBAN < P _{ss} -Pt (= PGN-18) < PGN-8 ≤ LPK ₄₋₈ << {PGN-24 < PGN-7 ≤ NMU << Md}						

טבלה 3: תכונות הפפטידים הנבחנים. ערכי ה-EC₅₀ עבור הפפטידים הנבחנים חושבו על פי משוואות הישר של העקומות ששורטטו עבורם, והערכים הושוו לערכי ה-EC₅₀ שהתקבלו במחקרם של Choi et al. (2003); Jurenka and Choi, personal communication, בו פעילות הפפטידים נבחנה בתאי Sf9 המבטאים את PBAN-R. כמו כן, ערכי ה-EC₅₀ שהתקבלו הושוו לערך ה-EC₅₀ שהתקבל עבור Hez-PBAN ונמצאו גבוהים יותר בסדר גודל אחד לפחות (אולם ערכי ה-EC₅₀ של P_{ss}-Pt, PGN-8, ו-LPK₄₋₈ הינם באותו תחום ריכוזים כמו ה-EC₅₀ של Hez-PBAN). מהשוואת הריכוז בו ייצור פרומון המין מגיע לשיא מקסימלי, עבור כל הפפטידים הנבחנים לזה של Hez-PBAN, נמצא כי לביצוע הפעילות המקסימלית של הפפטידים הנבחנים דרושים ריכוזים גבוהים יותר בסדר גודל אחד לפחות לעומת Hez-PBAN (למעט P_{ss}-Pt, שמרזר ייצור פרומון ברמת השיא באותו ריכוז כמו Hez-PBAN). עבור כל הפפטידים חושבו ממוצעי רמת השיא בייצור הפרומון ± SEM (שגיאת התקן בסוגריים) (n=5-93). רמות השיא נמצאו נמוכות יותר באופן מובהק לעומת רמת שיא הפעילות של Hez-PBAN, עבור P_{ss}-Pt, PGN-8, PGN-24, NMU, ו-Md (p=0.0031; Fisher PLSD-ANOVA test). ממוצעים עם אותה האות אינם שונים באופן מובהק זה מזה. {} = תחום ה-μM.

4. דיון

המחקר הנוכחי, המבוצע בנקבות עש מהמין *H. armigera*, עוסק בקולטן ל-PBAN (PBAN-R) בהיבטים שונים. חקר ה-PBAN-R מסייע בהבנת המנגנונים בתהליך ביוסינתזת פרומון המין, ועשוי להוביל בהמשך לפיתוח אסטרטגיות יעילות להדברת עשי לילה, שהינם מזיקים עיקריים לחקלאות. אסטרטגיות שכאלו תהיינה מבוססות על הפרעה ספציפית להזדווגותם.

עבודה זו מתמקדת בשלושה היבטים של PBAN-R בנקבות בוגרות מהמין *H. armigera*. שניים מהם, תיאור מולקולרי של PBAN-R ברמת החלבון והגן, ובחינת הפעילות הפרומונוטרופית (היכולת לזרז ייצור פרומון מין) של פפטידים הקרובים ל-PBAN, קשורים בהשערת המחקר, שלפיה קיימים קולטנים ל-PBAN ברקמות שונות בגוף נקבת העש ממין זה, נוסף ל-PBAN-R שנחקר בבלוטת פרומון המין של *H. armigera* (Rafaeli and Gileadi, 1997, 1999; Rafaeli et al., 2003). ההיבט השלישי, חקירת תפקידו של PBAN-R בביוסינתזת הפרומון ברמת התא, בודק האם הקשירה הספציפית בין PBAN-R ו-PBAN המעוגן לממברנת התא של בלוטת פרומון המין מתווכת במנגנון הביוסינתזה על ידי הפעלת השליחים המשניים בתא, כפי שהומחש במין *H. zea* על ידי Jurenka et al. (1991c).

נבחנה נוכחות קולטנים ל-PBAN ברקמות אחרות, שבאה לידי ביטוי בקשירה ספציפית של PBAN מסומן לקולטן שלו ברקמה מסויימת, בה זוהה כחלבון במשקל מולקולרי של 50 kDa. כביקורת חיובית בבדיקה ביולוגית זו שימשו תאי Sf9, המבטאים את הגן לקולטן של *H. zea*, הדומה לקולטן מ-*H. armigera*, ונמצא כי חלבון ה-50 kDa המזוהה ברקמות זהה לחלבון שנמצא בתאי ה-Sf9.

התוצאות מראות, כי קולטנים ל-PBAN (או קולטנים דומים לו) נמצאים גם ברקמות עצביות; גנגליון החזה, הצינור העצבי והמוח. לעומת זאת, בשתי הרקמות הלא עצביות שנבחנו, שריר הכנף וה-bursa & spermatheca, לא הצלחנו לזהות את PBAN-R ברמת החלבון עקב חלבונים אנדוגניים, שהפריעו בטכניקת הזיהוי.

על מנת לאמת, כי החלבונים במשקל מולקולרי של 50 kDa שזוהו ברקמות השונות הם אכן קולטנים ל-PBAN, נעשה ניסיון לקבוע באותן רקמות את ביטוי הגן ל-PBAN-R, כלומר לבחון בהן את נוכחותו של mRNA, שה-cDNA ממנו הוא משועתק, מקודד ל-PBAN-R. בחיפוש Blast שנערך לרצפי ה-cDNA שהתקבלו מהרקמות השונות, רצפים אלו נמצאו דומים במידה רבה לרצף הגן ל-PBAN-R בבלוטות פרומון המין של *H. armigera* (AY792036) (Choi et al., 2004 GenBank). על פי תוצאות אלו ניתן להסיק, כי הגן ל-PBAN-R אכן קיים ומתבטא ברקמות הנבחנו, ולכן החלבונים שנמצאו בהן במשקל

מולקולרי של 50 kDa הם אכן קולטנים ל-PBAN-R. הדבר עולה בקנה אחד עם השערת המחקר, לפיה קיימים קולטנים ל-PBAN ברקמות שונות בגוף העש נוסף לבלוטת הפרומון. עם זאת, למרות שאחוז הדמיון בין כל אחד מרצפי ה-cDNA מהרקמות השונות לבין רצף הגן מ-PBAN-R היה גבוה מאוד (96-100% הומומולוגיה), ערך ה-Expect value (E-value), ההסתברות לקבלת הומומולוגיה מקרית בין שני הרצפים, היה גבוה מאפס ($5e^{-16}$ - $3e^{-10}$). משמעות הדבר היא, שעל פי תוצאות ה-BLAST, הדמיון בין רצפי ה-cDNA מהרקמות לבין רצף הגן ל-PBAN-R מ-*H. armigera* אינו מושלם. ההסבר לכך נובע מאורך ה-amplicon הקצר (81 bp), שאינו משקף במלואו את רצף ה-mRNA הספציפי לגן ה-PBAN-R. לכן, כהמשך לתוצאות שהתקבלו במחקר הנוכחי, יש להשתמש בפריימרים המקודדים ל-amplicon ארוך יותר, שישקף בצורה מלאה את רצף ה-mRNA הספציפי לגן ה-PBAN-R ברקמות הנבחות.

לעומת תוצאות המחקר הנוכחי, הגן לקולטן ה-PBAN מ-*Bombyx mori* (AB181298) (Hull et al., 2004), שדומה ב-78% לגן ה-PBAN-R מ-*H. armigera* (AY792036) (Choi et al., 2004 GenBank), זוהה בבלוטות הפרומון בלבד. אנליזת Northern blot שבוצעה ברקמות שונות של זכרים ונקבות של *B. mori* משלב הבוגר (בלוטת פרומון המין, שריר התעופה, גוף השומן, הביצה והאשכים) ומשלב הזחל (המעיי התיכון, גוף השומן, השחלה והאשכים) גילתה, כי ה-mRNA המקודד ל-PBAN-R ספציפי לבלוטת הפרומון, בה מתרחשת עליה מובהקת בביטוי ביום שלפני ההגחה (Hull et al., 2004). כאמור, בין שאר הרקמות במחקר המוזכר לעיל, נבחן גם שריר הכנף (M), אשר בו לא נמצא ביטוי של הגן ל-PBAN-R, וזאת בניגוד למחקר הנוכחי, בו נמצא ביטוי ל-mRNA של PAN-R. ניתן להסביר את ההבדלים בתוצאות שני המחקרים בהתאם לשיטות האנליזה השונות. ב-Northern blot נדרשות כמויות גדולות כדי לגלות גן מסויים, בעוד שב-PCR הגברה של כמות קטנה של גן גורמת לרגישות יותר גבוהה ולזיהוי הגן, במידה וקיים באותה רקמה. לכן, ייתכן שבמחקרם של Hull et al. (2004) כמות הגן בחלק מהרקמות הנבחות הייתה נמוכה יותר לעומת כמותו בבלוטת הפרומון, ולכן לא ניתן היה לזהותו ברקמות אלו.

זיהוי קולטנים ל-PBAN ברקמות העצביות עשוי להיות מוסבר על ידי התפוצה הרחבה של פפטידים פרומונוטרופיים, אשר התגלתה באמצעות שיטות אימונוציטוכימיות ומציעה, כי פפטידים אלו מנויידים מאתרי שחרור מרכזיים (עצביים) ופריפריים גם יחד.

האימונוריאקטיביות נמצאה בגנגליון האחרון של הבטן (terminal abdominal ganglion) TAG) במיני עש רבים; כגון *H. armigera* (Rafaeli et al., 1991, 1993), *S. littoralis* ו-*M. brassicae* (Iglesias et al., 1998), (Christensen and Hildebrand (1995). הציעו, כי שפעול תקין של בלוטת פרומון המין עשוי לערב מנגנונים עצביים והומורליים במקביל, או לחילופין, שני מנגנוני הבקרה עשויים להיות מאוקטבים באופן שונה בזמנים שונים במהלך מחזור החיים הקצר של הפרפראים או עקב שינויים בתנאי הסביבה. הוצעו

דרכי העברה שונות של PBAN בחרקים (Raina, 1996). על פי אחת ההשערות, PBAN משוחרר להמולימפה מה- *corpus cardiaca* (CC). השערה זו מבוססת על המחשת פעילות ביולוגית בהמולימפה של *H. zea* (Raina and Klun, 1984; Ramaswamy et al., 1995). השערה אחרת מציעה, כי PBAN עובר דרך ה- VNC אל TAG ומשם מגיע לרקמת המטרה (בלוטת פרומון המין שבקצה צינור ההטלה). השערה זו מבוססת על מחקרים, בהם נצפו עלייה בייצור פרומון המין עקב הזרקת PBAN ל- TAG (Thyagaraja and Raina, 1994), ומניעת ייצור הפרומון עקב פגיעה ב- TAG או בשלוחות העצביות היוצאות ממנו לכיוון בלוטת הפרומון (Teal et al., 1989). נמצאו הוכחות אנטומיות לגבי שתי דרכי שחרור אלו של PBAN (Kingan et al., 1992; Davis et al., 1996; Golubeva et al., 1997). Kingan et al. (1992) גילו פעילות אימונוריאקטיבית של PBAN לאורך ה- VNC בנקבות *H. zea* ושיערו, כי בנוסף לשחרורו מה- CC להמולימפה, PBAN משוחרר ממקומות אחרים לאורך ה- VNC. התברר, כי קיים ביטוי ברמה נמוכה של הגן ל- PBAN בחלקים נוספים של מערכת העצבים בנקבות בוגרות, שהינם גנגליון בית החזה וחלק מגנגליוני הבטן, כולל TAG (Ma et al., 1998).

ניסויי הקשירה שבוצעו למטרת זיהוי הקולטנים ברקמות השונות כללו טיפול של Displacement (דחיקה), שבו הוסף לריאקציה לייגנד PBAN לא מסומן בעודף שהתחרה עם לייגנד ה- PBAN המסומן על הקשירה ל- PBAN-R שבמברנות המופקות מאותה רקמה. במידה והליגנד הלא מסומן מצליח לדחוק את הליגנד המסומן מאתרי הקשירה שבקולטן במידה חלקית, הדבר מעיד על ספציפיות בין PBAN ל- PBAN-R ברקמות, בתנאי שהוכח כי הרקמות אינן מכילות חלבונים אנדוגניים קושרי biotin, המפריעים בזיהוי PBAN-R, וכי הקולטן אכן נמצא באותן רקמות. בכל אחת מהרקמות בהן זוהה PBAN-R, בוצעו מספר חזרות על ניסויי הקשירה, ותופעת הדחיקה של הליגנד המסומן על ידי הליגנד המסומן לא חזרה על עצמה בחלק מהמקרים. ייתכנו שני הסברים לתופעה זו. ההסבר הראשון נעוץ בקבוצת ה- photo affinity שקשורה לליגנד המסומן, שתורמת לאפיניות גבוהה יותר של PBAN-R לליגנד המסומן לעומת האפיניות שלו לליגנד הלא מסומן. כמו כן, קבוצת ה- photo affinity ככל הנראה יוצרת הפרעה מרחבית ומפריעה לליגנד המסומן להשתחרר מאתרי הקשירה שבקולטן, ובד בבד לא מאפשרת לליגנד הלא מסומן להקשר. הליגנד המסומן והלא מסומן מוספים לממברנות בזה אחר זה, ולכן, מבחינה סטטיסטית, ברוב מהמקרים נקשרות לאתרי הקשירה יותר מולקולות של הליגנד הלא מסומן שנמצא בעודף גדול. תיאורטית, נוצר מצב של שיווי משקל בין המולקולות של הליגנד המסומן והלא מסומן, שבו ישנה כל הזמן קשירה והשתחררות של המולקולות מאתרי הקשירה. בפועל, קבוצת ה- photo affinity מעוצבת בצורה המאפשרת לה להדבק, ולכן כאשר מולקולות של הליגנד המסומן נקשרות לאתרי הקשירה, הקבוצה הזו מפריעה להן להשתחרר מהקשירה, ומפריעה למולקולות של הליגנד הלא מסומן להקשר במקומן. בשל העובדה שהליגנד הלא

מסומן מצוי בעודף ריכוז, אתרי קשירה רבים יהיו מאוכלסים בתום הריאקציה במולקולות של הליגנד הלא מסומן, אך מבחינה סטטיסטית ייתכנו מקרים, בהם המולקולות של הליגנד המסומן יתפסו את אתרי הקשירה ולא יאפשרו למולקולות הליגנד הלא מסומן להקשר. הוריאציה בין מצבים אלו היא שגרמה לכך שבחלק מהמקרים קיבלנו בג'ל עוצמות פס בגודל 50 kDa נמוכות באופן ניכר עבור טיפול ה- Displacement לעומת טיפול ה- Labeling, בו היה מתן של PBAN מסומן בלבד, בעוד שבמקרים אחרים לא יכולנו להבחין בהבדל בעוצמת הפסים שהתקבלו בשני הטיפולים. מאותה סיבה, בכל הג'לים בהם נעשה שימוש בטיפול ה- Displacement, לא קיבלנו דחיקה מוחלטת של הליגנד המסומן, מה שבא לידי ביטוי בכך שפס ה- 50 kDa, למרות שהיה חלש מאוד, עדיין נראה לעין בג'ל. כאמור, כל זאת מתייחס לרקמות בהן הצלחנו להוכיח את המצאות PBAN-R.

ההסבר השני לתופעה בה ה- Displacement לא חזר על עצמו בכל הניסויים תקף ככל הנראה בעיקר ל- TG ול- VNC, כיוון שברקמות אלו התקבלה וריאציה בחוזק ה- Displacement, כלומר בחלק מהמקרים לא התבצע Displacement מוצלח בשתי הרקמות הללו (הדבר בא לידי ביטוי בערכי Δ IDV חיוביים). ייתכן ובאותן רקמות קיימים קולטנים דומים ל- PBAN-R, אך בעלי אפיניות גבוהה יותר לפפטידים אחרים, דמויי- PBAN, מאשר ל- PBAN עצמו. מאותה סיבה, ייתכן וחלק מהפפטידים הקרובים ל- PBAN היו מצליחים לדחוק את ליגנד ה- PBAN המסומן ביעילות רבה יותר, כגון Pss-Pt, שהאפיניות של PBAN-R אליו גבוהה באותה מידה כמו ל- PBAN, או פפטידים אחרים, הפועלים ברקמה הנבחנת באופן טבעי ונושאים את הרצף FXPRamide בקצה ה- C טרמינלי.

כיוון שטכנית לא היה אפשרי לבדוק את נוכחותו האפשרית של הקולטן באמצעות שיטת ה- Western blot בשתי הרקמות הלא עצביות, שריר הכנף וה- bursa & spermatheca, ערכנו בהן מבחן, המאפשר לבדוק את נוכחותו של PBAN-R באופן כמותי. מבחן זה מנצל את העובדה, כי רמתו התוך תאית בבלוטת פרומון המין של השליח המשני בביסוינתזת פרומון המין, cAMP (Rafaeli and Soroker, 1989b; Jurenka et al., 1991c), עולה כתוצאה מזירוז על ידי PBAN (Rafaeli and Soroker, 1989b; Rafaeli et al., 1990). במבחן זה נעשה כימות של רמת ה- cAMP שנוצר ברקמה הנבחנת כתוצאה מגירוי על ידי PBAN הניתן חיצונית. בשריר הכנף וב- bursa & spermatheca לא נמצאה השפעה מובהקת של מתן PBAN חיצוני ושל ריכוזו על ייצור ה- cAMP. לעומת זאת, בבלוטת פרומון המין, ששימשה כביקורת חיובית בניסויים אלו, נצפתה עליה בייצור ה- cAMP כפונקציה של ריכוז ה- PBAN במדיום ההדגרה, בזמן ההדגרה של 30 דקות, כלומר PBAN זירז את ייצור ה- cAMP בבלוטת הפרומון, כפי שציפינו. הדבר עולה בקנה אחד עם המצאות PBAN-R בבלוטת הפרומון, אליו נקשר PBAN ומזרז את ייצור ה- cAMP. בשריר הכנף, ב- bursa & spermatheca ובבלוטות הפרומון נראתה עלייה בייצור ה- cAMP כפונקציה של זמן

ההדגרה, שהתרחשה גם ללא הוספת PBAN כלל למדיום ההדגרה; ב- bursa & spermatheca ובבלוטות הפרומון ייצור ה- cAMP הגיע לשיאו ב- 30 דקות הדגרה, ובשריר הכנף רמת הייצור הייתה מקסימלית בהדגרה למשך 20 דקות. העלייה בייצור ה- cAMP ברקמות אלו במהלך זמן ההדגרה יכולה להיות מוסברת על ידי ייצור ה- cAMP ברקמות בפרק זמן זה והצטברות ה- cAMP בתמיסת ההדגרה. משמעות התוצאות במבחנים אלו היא, כי שריר הכנף וה- bursa & spermatheca, אינם מגיבים לזירוז על ידי PBAN. היות ונמצא כאמור, כי רצף ה- cDNA שהופק משריר הכנף הומולוגי לגן ה- PBAN-R מ- *H. armigera*, סביר להניח שהקולטן המצוי בשריר הכנף הינו קולטן אחר הדומה ל- PBAN-R, אך עובד במנגנון שונה משלו, המבוסס על שליחים משניים שאינם cAMP. יש לציין, כי שליחי משנה זהים עשויים להווצר באותו תא ולמלא תפקידים שונים הודות למידור בתא. לכן, ייתכן שהקולטן בתאי שריר הכנף מגיב לפפטיד אחר, והתגובה התאית לפפטיד זה מביאה לייצור cAMP. כפי שצויין בפרק השיטות, לא נעשתה קביעת ביטוי הגן ל- PBAN-R ב- Bursa & spermatheca עקב בעיה טכנית, ולכן לא ניתן לקבוע מתוצאות המחקר הנוכחי האם רקמה זו מכילה קולטנים דמויי PBAN-R או לא.

בבחינת הפעילות הפרומונוטרופית של פפטידים בעלי תפקידים שונים ממשפחת ה- pyrokinin/ PBAN ושל הפפטיד neuromedin U מחולייתנים, Pss-Pt, LPK, PGN-7, PGN-8, PGN-24 ו- NMU נמצאו כבעלי פעילות פרומונוטרופית, אך למעט Pss-Pt, פעילותם הפרומונוטרופית של הפפטידים הנבחנים התבררה כנמוכה יותר מאשר פעילותם של PBAN. הדבר בא לידי ביטוי במספר ממצאים. ראשית, פעילותם המקסימלית של הפפטידים הנבחנים (למעט Pss-Pt) התבצעה בריכוזים גבוהים יותר לעומת PBAN בסדר גודל אחד לפחות. שנית, רמת השיא בייצור פרומון המין המזורז על ידי הפפטידים PGN-8, PGN-24, NMU ו- Md נמצאה נמוכה באופן מובהק מרמת השיא הנגרמת על ידי PBAN, בניגוד לפפטידים Pss-Pt, PGN-7 ו- LPK, אשר רמת השיא בייצור הפרומון המזורז על ידם אינה נבדלת באופן מובהק מרמת השיא הנגרמת על ידי PBAN. נוסף על כך, ערכי ה- EC₅₀, המבטאים את ריכוז הפפטיד הנדרש לקבלת מחצית מרמת הפרומון המקסימלית, שהתקבלו עבור הפפטידים השונים נמצאו גבוהים יותר לעומת ערך ה- EC₅₀ שהתקבל עבור PBAN, בשני סדרי גודל לפחות.

ערכי ה- EC₅₀ שחושבו עבור הפפטידים הנבחנים בבלוטת הפרומון הושוו לערכי ה- EC₅₀ שהתקבלו עבורם במחקרם של Choi et al. (2003); Jurenka and Choi, unpublished personal communication, בו פעילותם נבחנה בתאי Sf9 המבטאים את PBAN-R, ושם ה- EC₅₀ מבטא את ריכוז הליגנד הנדרש לקבלת מחצית מעילות הקשירה המקסימלית שלו לקולטן (Choi et al., 2003). בהשוואה זו נלקחו בחשבון גם ערכי ה- EC₅₀ של LPK ברצף המלא הדומה ל- LPK₄₋₈, ושל PGN-18 (המקודד על ידי אותו גן כמו PBAN ודומה ל- Pss-Pt), שנבחנו גם הם על ידי Choi et al. (2003).

למעט PBAN, אשר ערך ה- EC_{50} שהתקבל עבורו במחקר הנוכחי נמוך בשני סדרי גודל מערך ה- EC_{50} שהתקבל במחקרם של Choi et al. (2003), ערכי ה- EC_{50} שהתקבלו עבור יתר הפפטידים הנבחנו במחקר הנוכחי נמצאו גבוהים יותר בסדר גודל אחד לפחות לעומת ערכי ה- EC_{50} שהתקבלו במחקרם של Choi et al. (2003); Jurenka and Choi, unpublished personal communication. הסיבה להבדלים בערכי ה- EC_{50} במחקר הנוכחי ובמחקרם של Choi et al. (2003) נעוצה בעובדה, שמדובר בשתי מערכות ניסוי שונות, האחת של בלוטות פרומון המין, והשנייה של תאי Sf9 המבטאים את PBAN-R. במערכת הניסוי בתאים, קשירת הליגנדים (הפפטידים) ל-PBAN-R הוערכה על ידי מדידת שטפי הסידן בציטוזול, שנצפו באמצעות השינויים ברמת הפלואורסנציה כפונקציה של זמן הדגרת התאים עם הליגנד (Choi et al., 2003), בעוד שבמערכת הניסוי בבלוטות הפרומון, נמדדה רמת ייצור המרכיב העיקרי של פרומון המין. עם זאת, ניתן להשוות על פי ערכי ה- EC_{50} את דירוג הפפטידים, מהפעיל ביותר עד הפעיל פחות, בשתי מערכות הניסוי. ניתן לראות (טבלה 3), כי בשתי מערכות הניסוי התקבל דירוג זהה לפפטידים. PBAN הינו הפעיל ביותר, ואחריו Pss-Pt (נבחן רק בבלוטות הפרומון) ו-PGN-18 (הדומה לו (נבחן רק בתאי ה-Sf9), PGN-8, LPK, LPK₄₋₈, PGN-24, PGN-7, NMU, ו-Md (Choi et al., 2003; Jurenka and Choi, personal communication). ערכי ה- EC_{50} הנמוכים ביותר, השייכים לפפטידים PBAN, PGN-18 (הדומה ל-Pss-Pt), PGN-8 ו-LPK, נמצאו קרובים מאוד במחקרם של Choi et al. (2003); Jurenka and Choi, personal communication.

Hez-PBAN, שעבורו התקבל ערך ה- EC_{50} הנמוך ביותר הן בבלוטות והן בתאי ה-Sf9 (Choi et al., 2003), נושא את הרצף FSPRLamide בקצה ה-C טרמינלי, ולפני כן מופיע רצף באורך 10 חומצות אמינו שאינו מופיע ביתר הפפטידים הנבחנו. השילוב בין השניים הוא זה שמייחד את Hez-PBAN משאר הפפטידים (טבלה 3).

Pss-Pt ו-PGN-18, אשר ערכי ה- EC_{50} שלהם הינם הקרובים ביותר לערך ה- EC_{50} של Hez-PBAN, בבלוטות הפרומון ובתאי ה-Sf9 (Choi et al., 2003) בהתאמה, נושאים את הרצף FTPRLamide בקצה ה-C טרמינלי, יחד עם מקטע המשותף לשניהם באורך 10 חומצות אמינו (YDDKSFENVE) לפני הקצה ה-C טרמינלי, שאינו נמצא בפפטידים האחרים.

ב-PGN-8, הפפטיד הבא בדירוג על פי ערכי ה- EC_{50} , הקצה ה-C טרמינלי הינו FSPRLamide, ופפטיד זה מכיל 3 חומצות אמינו בלבד לפני הקצה ה-C טרמינלי (טבלה 3).

LPK ו-LPK₄₋₈, הפפטידים שאחרי PGN-8 בדירוג, מסתיימים במקטע FTPRLamide כמו Pss-Pt ו-PGN-18, אך אינם כוללים רצף ארוך לפני הקצה ה-C טרמינלי, אלא מקטע

של 4 חומצות אמינו בלבד (LPK), או שמורכבים מהקצה ה-C טרמינלי בלבד (LPK₄₋₈) (טבלה 3).

הפפטידים הבאים בדירוג, PGN-24, PGN-7, NMU ו-Md, נמצאו בשני המחקרים כבעלי ערכי EC₅₀ גבוהים יותר (Choi et al., 2003), בייחוד בבלוטות הפרומון, בהן נמצא, כי ערכי ה-EC₅₀ של פפטידים אלו הם בתחום ה- μM .

PGN-24 נושא בקצהו ה-C טרמינלי את הרצף FGPRamide, בשונה מיתר הפפטידים הנבחנו, וכן רצף ייחודי באורך 10 חומצות אמינו. PGN-7 נושא כמו Pss-Pt, PGN-18 ו-LPK (LPK₄₋₈) גם הוא את חומצת האמינו T בעמדה x ברצף FxPRamide, אך רצפו ה-C טרמינלי הוא למעשה FTPKamide (K במקום R), כלומר שונה בחומצת אמינו אחת מהרצף FxPRamide, החיוני לפעילות פרומונטרופית (Raina and Kempe, 1990), כמו כן, לפני הקצה מופיעות שתי חומצות אמינו בלבד (טבלה 3). ב-NMU הרצף ה-C טרמינלי הינו FRPRamide (טבלה 3), כלומר גם בו קיים שוני בחומצת אמינו אחת לעומת הרצף ההכרחי לפעילות פרומונטרופית, ולפני הקצה ה-C טרמינלי מופיע רצף באורך 3 חומצות אמינו בלבד (טבלה 3). לבסוף, הפפטיד Md, בעל ערך ה-EC₅₀ הגבוה ביותר שנמצא בשתי מערכות הניסוי; $1000 \mu\text{M} >$ בבלוטות הפרומון ו- $10 \mu\text{M} >$ בתאי ה-Sf9 (Choi et al., 2003). אינו כולל את הרצף FxPRamide בשלמותו בקצה ה-C טרמינלי, אלא את הרצף RLamide בלבד (טבלה 3). מניתוח ערכי ה-EC₅₀ שהתקבלו בבלוטת הפרומון עולה, כי הפפטידים Hez-PBAN, PGN-8 ו-LPK₄₋₈ מגיעים לחצי מפעילותם הפרומונטרופית המקסימלית כבר בריכוזים בתחום ה-nM, בניגוד ליתר הפפטידים הנבחנו (PGN-24, PGN-7, NMU ו-Md), שרק בריכוזים בתחום ה- μM הם מסוגלים לזרז ייצור פרומון ברמה שמהווה מחצית מרמת השיא. בריכוזים כה גבוהים מדובר על זירוז לא אמיתי, אלא תיאורטי, של ייצור הפרומון במערכת זו, בייחוד ב-Md, שנמצא לא פעיל כלל בניסוי ($1000 \mu\text{M} > EC_{50}$). לעומת זאת, בתאי ה-Sf9, Md הינו הפפטיד היחיד שנמצא בעל ערך EC₅₀ בתחום ה- μM , בעוד שכל שאר הפפטידים הם בעלי ערכי EC₅₀ בתחום ה-nM, כלומר רוב הפפטידים הנבחנו נמצאו פעילים בניוד סידן כתוצאה מקשירתם ל-Hez-PBAN-R שבוטא בתאי Sf9. הפפטידים PGN-24, PGN-7 ו-NMU נמצאו פעילים במידה פחותה בניוד סידן במערכת זו, ואילו Md נמצא בלתי פעיל (Choi et al., 2003; Jurenka and Choi, personal communication).

בסיכומי של דבר, שני המחקרים ממחישים, כי הרצף FxPRamide בקצה ה-C טרמינלי של הפפטידים הנבחנו חיוני לפעילותם, בין אם פעילות פרומונטרופית בבלוטת הפרומון, או פעילות ניוד סידן בתאי ה-Sf9 (Choi et al., 2003; Jurenka and Choi, personal communication). עם זאת, קיימת שונות בשלושת הפרמטרים שהוזכרו (הריכוז בו מתבצעת פעילותו המקסימלית של הפפטיד, רמת השיא בייצור פרומון המין וערכי ה-EC₅₀)

בין הפפטידים השונים בעלי הרצף ה-C טרמינלי. הדבר נובע מהעובדה, כי PBAN-R בבלוטת פרומון המין של הנקבה הוא בעל אפיניות גבוהה יותר ל-PBAN, כלומר הוא מסוגל לקשור פפטידים דמויי-PBAN, אך בצורה מעט פחות טובה. לעומת זאת, הקולטנים הטבעיים של הפפטידים הנבחנים הם בעלי אפיניות גבוהה יותר, כל אחד לפפטיד הטבעי שלו. כפי ש- Choi et al. (2003) מצאו, קולטנים המסווגים למשפחות בהתבסס על הומולוגיה ברצף הינם בעלי יכולות קשירה שונות לליגנד מסויים. מחקרם של Abernathy et al. (1995) גילה, כי לחומצת האמינו המשתנה ברצף FxPRLamide שבקצה ה-C טרמינלי ישנה השפעה מובהקת על הפעילות הפרומוטרופית, ושגם למבנה הכללי של הפפטיד ישנה חשיבות בקביעת הפעילות. מחד, רצפים קצרים נמצאו כבעלי פעילות פרומוטרופית נמוכה בריכוזים פיסיולוגיים ב- *H. zea* (Raina and Kempe, 1990, Abernathy et al., 1995).

מאידך, נמצא כי פפטידים בעלי חומצת האמינו T בעמדה x בליבה הפעילה, FxPRLamide, כמו Lom-MT-II ושל Lom-PK-II, הם בעלי פעילות פרומוטרופית מלאה אף בריכוזים נמוכים (Abernathy et al., 1995). במחקר הנוכחי נמצא אכן, כי PGN-7, Pss-Pt ו-LPK₄₋₈, הפפטידים אשר נושאים את חומצת האמינו T בעמדה x בקצה ה-C טרמינלי, הינם כל הפפטידים, אשר רמת השיא בייצור הפרומון המזורז על ידם אינה נבדלת באופן מובהק מרמת השיא הנגרמת על ידי PBAN. ראוי לציין, כי PGN-7 אינו פעיל בריכוזים נמוכים, והדבר בא לידי ביטוי בערך ה-EC₅₀ הגבוה שהתקבל עבורו (דרוש ריכוז גבוה יותר שלו על מנת להגיע למחצית מהפעילות המקסימלית), למרות שהוא גורם לרמת ייצור פרומון מקסימלית גבוהה יותר מאשר הפפטידים LPK₄₋₈, PGN-8 ו-PGN-24, פפטידים בעלי ערכי EC₅₀ נמוכים משלו. משמעות הדבר היא, שחומצת האמינו T בעמדה x לבדה אינה מספיקה לפעילות פרומוטרופית גבוהה.

(Abernathy et al., 1995) מצאו, כי פפטידים בעלי G בעמדה x של הליבה הפעילה הינם בלתי פעילים בזירוז סינתזת פרומון. ככל הנראה, חומצת האמינו G בקצה ה-C טרמינלי אינה מאפשרת יצירת מבנה קשיח דיו המתאים לאתר הקשירה בקולטן, החיונית לזירוז ייצור פרומון. עם זאת, הפפטיד השלם עשוי לדחוף את הקצה ה-C טרמינלי לעמדה, בה המבנה הדרוש מושג (Abernathy et al., 1995). במחקר הנוכחי התקבל, כי PGN-24, שקצהו ה-C טרמינלי הינו FGPRamide, מזרז ייצור פרומון ברמת שיא נמוכה באופן מובהק לעומת PBAN, ובכל זאת הוא פעיל פרומוטרופית כבר בריכוזים נמוכים, ולראיה ערך ה-EC₅₀ הנמוך יחסית שהתקבל עבורו- הנמוך ביותר בתחום ה- μM . ניתן להסביר זאת בהתייחס לרצף הארוך של הפפטיד, שעשוי להתאים את מבנהו לאתר הקשירה שבקולטן. ייתכן גם, שהפפטידים Pss-Pt ו-PGN-18, הנושאים לפני הרצף ה-C טרמינלי רצף נוסף באורך 10 חומצות אמינו המשותף לשניהם, פעילים במידה רבה הודות לרצף זה, אשר מאלץ את הפפטיד להגיע למבנה המתאים להקשרות לקולטן.

היות ונמצא כאמור, כי חומצת האמינו G בעמדה X יוצרת הפרעה לפעילות הפרומונוטרופית, ניתן לשער, כי חומצת האמינו K (המופיעה במקום R) בקצה ה-C טרמינלי של PGN-7 (FTPKLamide) גם כן מונעת יצירת מבנה קשיח, ההכרחי לקשירת הפפטיד לקולטן וליכולת לזרז ביוסינתזת פרומון, מה שגורם לכך שרק בריכוזים גבוהים מתאפשרת פעילות פרומונוטרופית.

ניתן לראות, ש-PBAN ו-PGN-8, המקודדים על ידי אותו הגן, נושאים שניהם את חומצת האמינו S בעמדה X ברצף ה-C טרמינלי. כמו כן, ה-EC₅₀ של PGN-8 נמצא בתחום הריכוזים של mM, כמו PBAN. עם זאת, נמצא ש-PGN-8 גורם לרמת ייצור שיא של פרומון נמוכה באופן מובהק לעומת PBAN. ההסבר לכך נעוץ בוודאי ברצף חומצות האמינו הארוך של PBAN (33). חומצות האמינו ביתר המולקולה של PBAN יוצרות מבנה, המתאים יותר למבניהם של אתרי הקשירה בקולטן, כגון מבנה β -turn מטיפוס I באיזור הליבה הפעילה (Abernathy et al., 1995), כך שמתאפשרת קשירת ה-PBAN לקולטן בצורה המדוייקת ביותר. האפיניות של PBAN-R ל-PBAN באה לידי ביטוי בכך שאתרי הקשירה שבקולטן מותאמים בדיוק לרצף השלם של הפפטיד. לכן, כליגנד הטבעי של Hez-PBAN-R, שאפיניות הקולטן אליו היא הגבוהה ביותר, שום פפטיד אחר אינו דומה לו במידה כזו שאפיניות הקולטן לפפטיד האחר תהיה זהה לזו של Hez-PBAN.

הפעילות הפרומונוטרופית של פפטידים ממשפחת ה-pyrokinin-PBAN נבחנה גם במספר מחקרים נוספים. מחקר *in vivo* שנערך בנקבות *B. mori* מצא, כי LPK הינו בעל פעילות פרומונוטרופית גבוהה יותר לעומת Bom-PBAN (Nachman et al., 1993a). יתר על כן, במחקר מבנה ופעילות נמצא, שהפפטידים locustapyrokinin-II (Lom-PK-II) ו-locustamyotropin-II (Lom-MT-II) השרו ייצור פרומון רב יותר לעומת PBAN ב-*H. zea*, וכי פפטידים אחרים במשפחה, LPK, Lom-PK, והרצפים ה-C טרמינליים בלבד של Hez-PBAN, Bom-PBAN, Bom-DH ו-LPK, הראו דרגות משתנות של פעילות פרומונוטרופית (Abernathy et al., 1995). (Kuniyoshi et al., 1992) המחישו פעילות פרומונוטרופית עבור הפפטידים LPK, Lom-PK, Lom-MT-I ו-Lom-MT-II ב-*B. mori*. (Fonagy et al., 1992) הראו, כי הפפטידים Lom-MT-II ו-Lom-MT-III פעילים פרומונוטרופית ב-*B. mori* וב-*Spodoptera litura*. נוסף על כך, מחקרים שונים מצאו פעילות פרומונוטרופית באנלוגים לפפטידים ממשפחת ה-pyrokinin-PBAN, אשר אותם אנלוגים עמידים כנגד פירוק אנזימטי בהמולימפת החרק (Nachman et al., 1991, 1993a, 1996, 2001, 2002; Kochansky et al., 1997; Teal and Nachman, 1997). לסיכום, כל הפפטידים המקודדים על ידי הגן ל-PBAN (ה-PGNs) נמצאו מסוגלים לזרז ביוסינתזת פרומון מין, כמו גם הפפטידים Pss-Pt, LPK ו-NMU (האחרון- במידה פחותה מהשאר), בעוד ש-Md נמצא לא פעיל.

העובדה כי פפטידים דומים ל-PBAN בעלי תפקידים שונים בגוף העש (ראה הרחבה בפרק המבוא) נמצאו בעלי פעילות פרומונטרופית רומזת, כי הקולטנים לפפטידים אלו (חלקם נמצאו, וחלקם טרם נחקרו) ברקמות השונות למעשה מהווים גם קולטנים ל-PBAN או ל-PGNs, המצויים ב-*H. armigera*, ואכן עלה בידינו לזהות את PBAN-R ברקמות העצביות. הדבר מתיישב עם השערת המחקר, לפיה קיימים קולטנים ל-PBAN ברקמות השונות, וכי אותם קולטנים מהווים אתרי פעולה לפעילויות נוספות של PBAN או של פפטידים דמויי-PBAN השייכים למשפחת ה-PBAN-pyrokinin.

ההיבט השלישי של העבודה, חקירת תפקידו של PBAN-R בביוסינתזת הפרומון ברמת התא, בודק האם הקשירה הספציפית בין PBAN ו-PBAN-R שבמברנת התא של בלוטת פרומון המין מתווכת במנגנון הביוסינתזה על ידי הפעלת השליחים המשניים בתא. התוצאות מראות, כי מבין חוסמי תעלות הסידן שנבחנו, SKF 96365 ו-verapamil מעכבים את ייצור הפרומון בבלוטות פרומון המין, בעוד ש-amiloride לא השפיע על רמות הפרומון. SKF 96365 ידוע כמעכב של כניסת Ca^{2+} המתווכת על ידי קולטן (Meldolesi and Pozzan, 1987; Hallam and Rink, 1989; Merritt et al., 1989, 1990; Chan and Greenberg, 1991), והעובדה כי הוא מונע ייצור פרומון מין מצביעה על כך, שכניסתו של Ca^{2+} -ה החיוני לביוסינתזת פרומון המין (Jurenka et al., 1991c) מתווכת על ידי הקולטן ל-PBAN. הדבר תואם את מחקרם של (Jurenka et al. (1991c) שקבע, כי כניסת יוני הסידן לתאי בלוטת הפרומון בנקבות *H. zea* נעשית באמצעות תעלות, המשופעלות על ידי האינטרקציה בין הליגנד PBAN וקולטן. הדבר גם מתיישב עם מחקרו של Jurenka (1996) שמצא כי SKF 96365 מעכב את הזירוז ע"י פפטידים פרומונטרופיים ב-*H. virescens*.

המחקר הנוכחי מצא, כי amiloride hydrochloride, אשר מעכב את שחלוף הקטיונים Na^+ / Ca^{2+} בתעלות (Debetto et al., 1989) אינו מעכב ביוסינתזת פרומון. עם זאת, verapamil hydrochloride, הידוע כאנטגוניסט ליוני סידן (Fleckenstein, 1977; Rosenberger and Triggle, 1978), המפריע להווצרות מפל הפוטנציאל בתעלות (Kimura et al., 1992; Bellamy, 1996) נמצא מעכב את ייצור פרומון המין בבלוטות. הדבר עומד בסתירה למחקרם של (Jurenka et al. (1991c), שמצאו כי כניסת יוני הסידן לתא אינה מעוכבת על ידי verapamil. ייתכן שהדבר נובע מתנאי ניסוי שונים בשני המחקרים. במחקרם של (Jurenka et al. (1991c) הבלוטות לא הודגרו בו זמנית עם PBAN ועם החומר verapamil, אלא עברו הדגרה עם verapamil בלבד למשך 20 דקות, ולאחר מכן הועברו למדיום הדגרה המכיל PBAN, והודגרו בתמיסה זו במשך שעה; בעוד שתנאי הניסוי שבמחקר הנוכחי כללו הדגרה למשך שלוש שעות בתמיסת הדגרה שהכילה PBAN ואת החומר הנבחן, verapamil. העובדה כי verapamil אכן מעכב את ייצור פרומון

המין בבלוטות, רומזת כי התגובה הפרומונוטרופית בתאי בלוטת פרומון המין עשויה להיות מתווכת לא רק על ידי קולטן, אלא גם על ידי מפל הפוטנציאל בתאים.

לסיכום, השערת המחקר הנוכחי הינה, כי קיימים קולטנים ל-PBAN ברקמות השונות בגוף העש נוסף לבלוטת פרומון המין, ושאותם קולטנים מהווים אתרי פעולה לפעילויות נוספות של PBAN או של פפטידים דמויי-PBAN השייכים למשפחת ה-FxPRLamide.

מחקר זה הצליח להמחיש לראשונה את נוכחותם של קולטנים ל-PBAN ברקמות העצביות (בגנגליון החזה, בצינור העצבי ובמוחות) בגוף נקבת העש *H. armigera* ברמת החלבון וזיהה ברקמות אלו, כמו גם בבלוטת פרומון המין, ביטוי גנים ל-PBAN-R. משמעות הדבר היא, שהחלבונים בגודל 50 kDa שנמצאו ברקמות העצביות הם אכן קולטנים ל-PBAN, כפי שהשערת המחקר מציעה.

במקביל, המחקר הראה כי פפטידים הקרובים ל-PBAN, כולל הפפטידים המקודדים על ידי אותו הגן כמו PBAN (ה-PGNs), הם בעלי פעילות פרומונוטרופית בבלוטות פרומון המין של נקבות *H. armigera*. משמעות הדבר היא, כי ל-PBAN-R ישנה אפיניות גבוהה יחסית לכמה מן הפפטידים דמויי ה-PBAN, ולכן הקולטנים הטבעיים לפפטידים אלו צפויים להיות הומוולוגיים ל-PBAN-R, והדבר מחזק את גילוי הקולטנים ל-PBAN ברקמות העצביות. כמו כן, עבודת המחקר הראתה, כי הקשירה הספציפית בין PBAN ו-PBAN-R המעוגן לממברנת התא של בלוטת הפרומון, מתווכת במנגנון ביוסינתזת פרומון המין על ידי הפעלת השליחים המשניים בתא, וכי Ca^{2+} חיוני לביוסינתזת פרומון המין.

חשוב לציין, כי בעבודה זו הגנים לקולטנים שנמצאו ברקמות השונות לא רוצפו במלואם, וכן לא נבדק האם PBAN הינו הפפטיד בעל האפיניות הגבוהה ביותר לקולטנים הללו בהשוואה לפפטידים דומים אחרים. לכן, אף על פי שהקולטנים שזוהו ברקמות העצביות הם, על סמך ממצאי עבודה זו, בעלי אפיניות גבוהה ל-PBAN, לא ניתן בשלב זה לקבוע בודאות האם מדובר בקולטנים אשר PBAN הינו הליגנד הטבעי שלהם (PBAN-R עצמו), או שמדובר בקולטנים לפפטידים אחרים במשפחה הנוצרים ב-*H. armigera*, כגון ה-PGNs. כפי שהוסבר קודם לכן, ייתכן שבאותן רקמות בהן ניסויי ה-Displacement לא חזרו על עצמם (TG ו-VNC), קיימים קולטנים דומים ל-PBAN-R, אך בעלי אפיניות גבוהה יותר לפפטידים דמויי-PBAN.

בהמשך למחקר הנוכחי יש לפנות לחקירה מעמיקה יותר של פעילות הקולטנים שנמצאו ברקמות העצביות, במקביל להמשך חקירת הקולטן ל-PBAN בבלוטת הפרומון. מעניין יהיה לחקור בכל רקמה עצבית בה נמצא קולטן ל-PBAN (או קולטן דומה לו), את פעילותם של פפטידים שונים ממשפחת ה-FxPRLamide לגבי פעילות מסויימת הספציפית לאותה רקמה. באופן זה אפשר לשייך לכל קולטן את הפפטיד המתאים לו ביותר ולמצוא פעילויות נוספות של PBAN ושל פפטידים דמויי-PBAN באותן רקמות.

לדוגמא, הפפטידים NMU ו-NMS (ראה סעיף 1.8 במבוא), המבוטאים באופן ספציפי באיזור ה- SCN שבהיפותלמוס של יונקים, הוצעו כמתווכים במערכת ה- circadian rhythm המשפיעה על תהליכים שונים ביונקים. היות וגם PBAN הינו פפטיד סירקאדי, המשוחרר תחת בקרה פוטופריאודית להמולימפה, ניתן יהיה לבחון האם לשני הפפטידים הללו, NMU ו-NMS, בהשוואה ל- PBAN ולפפטידים נוספים במשפחה, ישנן יכולות קשירה גבוהות לקולטן שנמצא במוח נקבת העש, והאם ביכולתם לבצע פעילות סירקאדית גם בעש (לאחר הזרקתם למוח), ולא רק ביונקים. ריצוף הקולטן שנמצא במוח העש בעבודה זו והשוואתו לקולטן של NMU ו-NMS ביונקים (FM-4) עשויים להיות מעניינים גם כן.

רשימת ספרות

- איזנשטיין יצחק, 1983. פרפרי ארץ- ישראל. הוצאת עם עובד, תל- אביב. עמ' 1-276.
- Abernathy, R. L., Nachman, R. J., Teal, P. E. A., Yamashita, O., Tumlinson, J.H., 1995. Pheromonotropic activity of naturally occurring pyrokinin insect neuropeptides (FXPRLamide) in *Helicoverpa zea*. *Peptides*. 16, 215-219.
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., et al., 2000. The genome sequence of the *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287, 2185-2195.
- Arima, R., Takahara, K., Kadoshima, T., Numazaki, F., Ando, T., Uchiyama, M., Nagasawa, H., Kitamura, A., Suzuki, A., 1991. Hormonal regulation of pheromone biosynthesis in the silkworm moth, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Applied Entomological Zoology*. 26, 137-147.
- Aubrey, Jr, J.G., Boudreaux, H.B., Groodner, M.L., Hammond, A.M., 1983. Sex pheromone-producing cells and their associated cuticle in female *Heliothis zea* and *H. virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 76, 343-348.
- Austin, C., Lo, G., Nandha, K.H., Meleagros, L., Bloom, S.R., 1995. Cloning and characterization of the cDNA encoding the human neuromedin U (NmU) precursor: NmU expression in the human gastrointestinal tract. *Journal of Molecular Endocrinology*. 14, 157-169.
- Baker, T.C., Carde, R.T., 1979. Endogenous and exogenous factors affecting periodicities of female calling and male sex pheromone response in *Grapholita molesta*. *Journal of Insect Physiology*. 25, 943-950.
- Baldwin, J.M, Schertler, G.F.X., Unger, V.M., 1997. An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *Journal of Molecular Biology*. 272, 144-164.
- Bellamy, W.T., 1996. P-glycoproteins and multidrug resistance. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 36, 161-168.

- Birch, M.C., Haynes, K.F., 1982. Insect Pheromones. The Institute of Biology's Studies in Biology no. 147, Edward Arnold (Publishers) Limited, London.
- Bjostad, L.B., Wolf, W.A., Roelofs, W.L., 1987. Pheromone biosynthesis in Lepidoptera: desaturation and chain shortening. In: Prestwich, G.D., Blomquist, G.J. (Ed.). Pheromone Biochemistry. Academic Press, Orlando, pp. 77-120.
- Bockaert, J., 1991. G proteins and G protein-coupled receptors: Structure, function and interactions. *Current Opinion in Neurobiology*. 1, 32-42.
- Bohm, A., Gaudet, R., Sigler, P.B., 1997. Structural aspects of heterotrimeric G-protein signaling. *Current Opinion in Biotechnology*. 8, 480-487.
- Brown, D.R., Quito, F.L., 1988. Neuromedin U octapeptide alters ion transport in porcine jejunum. *European Journal of Pharmacology*. 155, 159-162.
- Cazzamali, G., Torp, M., Hauser, F., Williamson, M., Grimmelikhuijzen, C.J., 2005. The *Drosophila* gene CG9918 codes for a pyrokinin-1 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 335, 14-19.
- Chan, J., Greenberg, D.A., 1991. SK&F 96365, a receptor-mediated calcium entry inhibitor, inhibits calcium responses to endothelin-1 in NG108-15 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 177, 1141-1146.
- Choi, M.Y., Tanaka, M., Kataoka, H., Boo, K.S., Tatsuki, S., 1998. Isolation and identification of the cDNA encoding the pheromone biosynthesis activating neuropeptide and additional neuropeptides in the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28, 759-766.
- Choi, M.-Y., Rafaeli, A., Jurenka, R.A., 2001. Pyrokinin/PBAN-like peptides in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Cell and Tissue Research*. 306, 459-465.
- Choi, M.-Y., Fuerst, E.-J., Rafaeli, A., Jurenka, R., 2003. Identification of a G protein-coupled receptor for pheromone biosynthesis activating neuropeptide from pheromone glands of the moth *Helicoverpa zea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 100, 9721-9726.
- Christensen, T.A., Hildebrand, J.G., 1995. Neural regulation of sex-pheromone glands in Lepidoptera. *Invertebrate Neuroscience*. 1, 97-103.

- Christie, A.E., Hall, C., Oshinsky, M., Marder, E., 1994. Buccalin-like and myomodulin-like peptides in the stomatogastric ganglion of the crab *Cancer borealis*. *Journal of Experimental Biology*. 193, 337-343.
- Claeys, I., Poels, J., Simonet, G., Franssens, V., Van Loy, T., Van Hiel, M.B., Breugelmans, B., Vanden Broeck, J., 2005. Insect neuropeptide and peptide hormone receptors: current knowledge and future directions. *Vitamins and Hormones*. 73, 217-282.
- Conlon, J.M., Domin, J., Thim, L., DiMarzo, V., Morris, H.R. Bloom, S.R. 1988. Primary structure of neuromedin U from the rat. *Journal of Neurochemistry*. 51, 988-991.
- Cropper, E.C., Tenenbaum, R., Gawinowicz Kolks, M.A., Kupfermann, I., Weiss, K.R., 1987. Myomodulin: A bioactive neuropeptide present in an identified cholinergic buccal motor neuron of *Aplysia*. 84, 5483-5486.
- Cusson, M., McNeil, J.N., 1989. Involvement of Juvenile hormone in the regulation of pheromone release activities in a moth. *Science* 243, 210-212.
- Cusson, M., Tobe, S.S., McNeil, J.N., 1994. Juvenile hormones: their role in the regulation of the pheromonal communication system of the armyworm moth *Pseudaletia unipuncta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 25, 329-345.
- Davis, M.B., Vakharia, V.N., Henry, J., Kempe, T.G., Raina, A.K., 1992. Molecular cloning of the pheromone biosynthesis-activating neuropeptide in *Helicoverpa zea*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 89, 142-146.
- Davis, N.T., Homberg, U., Teal, P.E.A., Alstein, M., Agricola, H.-J., Hildebrand, J.G., 1996. Neuroanatomy and immunocytochemistry of the median neuroendocrine cells of the subesophageal ganglion of the tobacco hawkmoth, *Manduca Sexta*: Immunoreactivities to PBAN and other neuropeptides. *Microscopy Research and Technique*. 35, 201-229.
- Debetto, P., Luciani, S., Tessari, M., Floreani, M., Caepenedo, F., 1989. Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange by amiloride acting from opposite sides of cardiac sarcolemma. *Biochemical Pharmacology*. 38, 1137-1145.
- Deming, W., Yunhua, Y., Junrong, C., 1997. Sex pheromone components of *Helicoverpa armigera*: chemical analysis and field tests. *Entomologica*

sinica. 4, 350-356.

- Domin, J., Yiangou, Y.G., Spokes, R.A., Aitken, A., Parmar, K.B., Chrysanthou, B.J., Bloom, S.R., 1989. The distribution, purification, and pharmacological action of an amphibian neuromedin U. *Journal of Biological Chemistry*. 264, 20881-20885.
- Domin, J., Benito-Orfila, M.A., Nandha, K.A., Aitken, A., Bloom, S.R., 1992. The purification and sequence analysis of an avian neuromedin U. *Regulatory Peptides*. 41, 1-8.
- Duportets, L., Gadenne, C., Dufour, M.-C., Couillaud, F., 1998. The pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) of the black cutworm moth, *Agrotis ipsilon*: immunohistochemistry, molecular characterization and bioassay of its peptide sequence. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 591-599.
- Duportets, L., Gadenne, C., Couillaud, F., 1999. A cDNA, from *Agrotis ipsilon*, that encodes the pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) and other FXPRL peptides. *Peptides*. 20, 899-905.
- Eliyahu, D., Nagalakshmi, V., Kubli, E., Choffat, Y., Applebaum, S.W., Rafaeli, A., 2003. Inhibition of pheromone biosynthesis in *Helicoverpa armigera* by pheromonostatic peptides. *Journal of Insect Physiology*. 49, 569-574.
- Evans, P.D., 1980. Biogenic amines in the insect nervous system. *Advances in Insect Physiology*. 15, 317-473.
- Evans, P.D., 1994. The effect of myomodulin and structurally related neuropeptides on skeletal neuromuscular transmission in the locust. *Journal of Experimental Biology*. 190, 253-264.
- Fabrias, G., Jurenka, R.A., Roelofs, W.L., 1992. Stimulation of sex pheromone production by proteinaceous extracts of the bursa copulatrix in the redbanded leafroller moth. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 20, 75-86.
- Fabrias, G., Marco, M.P., Camps, F., 1994. Effect of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide on sex pheromone biosynthesis in *Spodoptera littoralis* isolated glands. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 27, 77-87.

- Fabrias, G., Barrot, M., Camps, F., 1995. Control of sex pheromone biosynthetic pathway in *Thaumetopoea pityocampa* by the pheromone biosynthesis-activating neuropeptide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 25, 655-660.
- Fan, Y., Rafaeli, A., Gileadi, C., Appelbaum, S.W., 1999a. Juvenile hormone induction of pheromone gland PBAN-responsiveness in *Helicoverpa armigera* females. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 29: 635-641.
- Fan, Y., Rafaeli, A., Gileadi, C., Kubli, E., Applebaum, S.W., 1999b. *Drosophila melanogaster* sex peptide stimulates juvenile hormone synthesis and depresses sex pheromone production in *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Physiology*. 45, 127-133.
- Fang, N., Teal, P.E.A., Tumlinson, J.H., 1995. PBAN regulation of pheromone biosynthesis in female tobacco hornworm moths, *Manduca sexta* (L.). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 29, 35-44.
- Fleckenstein, A., 1977. Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 17, 149-166.
- Fonagy, A., Schoofs, L., Matsumoto, S., De Loof, A., Mitsui, T., 1992. Functional cross-reactivities of some locustamyotropins and *Bombyx* pheromone biosynthesis activating neuropeptide. *Journal of Insect Physiology*. 38, 651-657.
- Fung, B.K.-K., 1983. Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. *Journal of Biological Chemistry*. 258, 10495-10502.
- Gade, G., Hoffmann, K.H., Spring, J.H., 1997. Hormonal regulation in insects: Facts, gaps, and future directions. *Physiological Reviews*. 77, 963-1032.
- Gadenne, C., 1993. Effects of fenoxycarb, juvenile hormone mimetic, on female sexual behaviour of the black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology* 39, 25-29.
- Gardiner, S.M., Compton, A.M., Bennett, T., Domin, J., Bloom, S.R., 1990. Regional hemodynamic effects of neuromedin U in conscious rats.

American Journal Physiology. 258, 32-38.

- Gazit, Y., Dunkelblum, E., Ben-Aziz, O., Alstein, M., 1992. Immunochemical and biological analysis of pheromone biosynthesis activating neuropeptide in *Heliothis peltigera*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 19, 247-260.
- Gilbert, L.I., Granger, N.A., Roe, R.M., 2000. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. Insect Biochemistry and Molecular Biology 30, 617-644.
- Gilman, A.G., 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. Annual Reviews of Biochemistry. 56, 615-649.
- Golubeva, E., Kingan, T.G., Blackburn, M.B., Masler, E.P., Raina, A.K., 1997. The distribution of PBAN (pheromone biosynthesis activating neuropeptide)-like immunoreactivity in the nervous system of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 34, 391-408.
- Hallam, T.J., Rink, T.J., 1989. Receptor-mediated Ca²⁺ entry: diversity of function and mechanism. Trends in Pharmacological Science. 10, 8-10.
- Hamada, T., LeSauter, J., Venuti, J.M., Silver, R., 2001. Expression of period genes: rhythmic and nonrhythmic compartments of the suprachiasmatic nucleus pacemaker. Journal of Neuroscience. 21, 7742-7750.
- Hamm, H.E., 1998. The many faces of G protein signaling. The Journal of Biological Chemistry. 273, 669-672.
- Hargrave, P.A., McDowell, J.H., 1992. Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 6, 2323-2331.
- Harmar, A.J., 2001. Family-B G-protein-coupled receptors. Genome Biology. 2, 3013.1-3013.10.
- Hewes, R.S., Taghert, P.H., 2001. Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome. Genome Research. 11, 1126-1142.
- Hilderbrand, J.G., 1996. Neuroanatomy and immunocytochemistry of the median neuroendocrine cells of the subesophageal ganglion of the

tobacco hawkmoth, *Manduca Sexta*: Immunoreactivities to PBAN and other neuropeptides. *Microscopy Research and Technique*. 35, 201-229.

- Hiruma, K., Matsumoto, S., Isogai, A., Suzuki, A., 1984. Control of ommochrome synthesis by both juvenile hormone and melanization hormone in the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. 154, 13-21.
- Holman, G.M., Cook, B.J., Nachman, R.J., 1986. Primary structure and synthesis of a blocked myotropic neuropeptide isolated from the cockroach, *Leucophaea maderae*. *Comparative Biochemistry and Physiology C- Pharmacology Toxicology and Endocrinology*. 85, 219-224.
- Holman, G.M., Nachman, R.J., Wright, M.S., 1990. Insect neuropeptides. *Annual Review of Entomology*. 35, 201-217.
- Homma, T., Watanabe, K., Tsurumaru, S., Kataoka, H., Imai, K., Kamba, M., Niimi, T., Yamashita, O., Yaginuma, T., 2006. G protein-coupled receptor for diapause hormone, an inducer of *Bombyx* embryonic diapause. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 334, 386-393.
- Howard, A.D., Wang, R., Pong, S.-S., Mellin, T. N., Strack, A., Guan, X.-M., Zeng, Z., Williams, Jr, D.L., Feighner, S.D., Nunes, C.N., et al., 2000. Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding. *Nature*. 406, 70-74.
- Howlett, A.C., Sternweis, P.C., Macik, B.A., Van Arsdale, P.M., Gilman, A.G., 1979. Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry*. 254, 2287-2295.
- Hull, J.J., Ohnishi, O., Moto, K., Kawasaki, Y., Kurata, R., Suzuki, M.G., Matsumoto, S., 2004. Cloning and characterization of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide receptor from the silkworm, *Bombyx mori*. Significance of the carboxyl terminus in receptor internalization. *Journal of Biological Chemistry*. 279, 51500-51507.
- Hunsell, M., 1985. Ethology. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Ed.). *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, New York, pp. 1-93.
- Ichikawa, T., 1998. Activity patterns of neurosecretory cells releasing

pheromonotropic neuropeptides in the moth *Bombyx mori*. Proceedings of the National Academy of Science USA. 95, 4055-4060.

- Iglesias, F., Marco, M.P., Jacquin-Joly, E., Camps, F., Fabrias, G., 1998. Regulation of sex pheromone biosynthesis in two noctuid species, *S. littoralis* and *M. brassicae*, may involve both PBAN and the ventral nerve cord. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 37, 295-304.
- Iiri, T., Farfel, Z., Bourne, H.R., 1998. G-protein diseases furnish a model for the turn-on switch. Nature. 394, 35-38.
- Imai, K., Konno, T., Nakazawa, T., Komiya, T., Isobe, M., Koga, K., Goto, T., Taginuma, T., Sakakibara, K., Hasegawa, K., Yamashita, O., 1991. Isolation and structure of diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Proceedings of the Japan Academy, Series B: Physical and Biological Sciences. 67, 98-101.
- Jacquin-Joly, E., Descoins, C., 1996. Identification of PBAN-like peptides in the brain-suboesophageal ganglion complex of Lepidoptera using Western-blotting. Insect Biochemistry and Molecular Biology 26, 209-216.
- Jacquin-Joly, E., Jurenka, R.A., Ljungberg, H., Nagnan, P., Lofstedt, C., Descoins, C., Roelofs, W.L., 1994. Control of sex pheromone biosynthesis in the moth *Mamestra brassicae* by the pheromone biosynthesis activating neuropeptide. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 24, 203-211.
- Jacquin-Joly, E., Burnet, M., Francois, M.-C., Ammar, D., Nagnan-Le Meillour, P., Descoins, C., 1998. cDNA cloning and sequencing determination of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide of *Mamestra brassicae*: a new member of the PBAN family. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 28, 251-258.
- Jaffe, H., Raina, A.K., Hayes, D.K., 1986. HPLC isolation and purification of pheromone biosynthesis activating neuropeptide of *Heliothis zea*. In: Insect Neurochemistry and Neurophysiology. Borkovec, A.C., Gelman, D.B (Ed.) Humana Press, New Jersey, pp. 217-224.
- Josefsson, L.G., 1999. Evidence for kinship between diverse G-protein coupled receptors. Gene. 239, 333-340.

- Jurenka, R.A., 1996. Signal transduction in the stimulation of sex pheromone biosynthesis in moths. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 33, 245-258.
- Jurenka, R.A., 1997. Biosynthetic pathway for producing the sex pheromone component (Z,E)-9,12-tetradecadienyl acetate in moths involves a Δ 12 desaturase. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 53, 501-505.
- Jurenka, R.A., Roelofs, W.L., 1993. Biosynthesis and endocrine regulation of fatty acid derived pheromones in moths. In: *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology*. Stanley-Samuelson, D.W., Nelson, D.R. (Ed.), University of Nebraska Press, Lincoln, Nebraska, pp. 353-388.
- Jurenka, R.A., Jacquin. E., Roelofs, W.L., 1991a. Control of the pheromone biosynthetic pathway in *Helicoverpa zea* by the pheromone biosynthesis activating neuropeptide. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 17, 81-91.
- Jurenka, R.A., Fabrias G., Roelofs, W.L., 1991b. Hormonal control of female sex pheromone biosynthesis in the redbanded leafroller moth, *Argyrotaenia velutinana*. *Insect Biochemistry*. 21, 81-89.
- Jurenka, R.A., Jacquin. E., Roelofs, W.L., 1991c. Stimulation of pheromone biosynthesis in moth *Helicoverpa zea*: action of a brain hormone on pheromone glands involves Ca^{2+} and cAMP as second messengers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 88, 8621-8625.
- Jurenka, R.A., Fabrias, G., DeVoe, L., Roelofs, W.L., 1994. Action of PBAN and related peptides on pheromone biosynthesis in isolated pheromone glands of the redbanded leafroller moth, *Argyrotaenia velutinana*. *Comparative Biochemistry and Physiology C- Pharmacology Toxicology and Endocrinology*. 108, 153-160.
- Kage, R., O'Harte, F., Thim, L., Conlon, J.M., 1991. Rabbit neuromedin U-25: lack of conservation of a posttranslational processing site. *Regulatory Peptides*. 33, 191-198.
- Karlson, P., Luscher, M., 1959. 'Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature*. 183, 55-56.
- Kawano, T., Kataoka, H., Nagasawa, H., Isogai, A., Suzuki, A., 1992. cDNA cloning and sequence determination of the pheromone biosynthesis

- activating neuropeptide of the silkworm, *Bombyx mori*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 189, 221-226.
- Keating, H.H., Sahley, C.L., 1996. Localization of the myomodulin-like immunoreactivity in leech CNS. Journal of Neurobiology. 30, 374-384.
- Kehat, M., Dunkelblum, E., 1990. Behavioral responses of male *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) moths in a flight tunnel to combination of components identified from female sex pheromone glands. Journal of Insect Behavior. 3, 75-83.
- Kehat, M., Dunkelblum, E., 1993. Sex pheromones: achievement in monitoring and mating disruption of cotton pests in Israel. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 22, 425-431.
- Kehat, M., Gothilf, S., Dunkelblum, E., Greenberg, S., 1980. Field evaluation of female sex pheromone components of the cotton bollworm, *Heliothis armigera*. Entomologia Experimentis et Applications. 27, 188-193.
- Kimura, S., Bassett, A.L., Xi, H., Myerburg, R.J., 1992. Verapamil diminishes action potential changes during metabolic inhibition by blocking ATP-regulated potassium currents. Circulation Research. 71, 87-95.
- Kingan, T.G., Blackburn, M.B., Raina, A.K., 1992. The distribution of pheromone-biosynthesis-activating neuropeptide (PBAN) immunoreactivity in the central nervous system of the corn earworm moth, *Helicoverpa zea*. Cell and Tissue Research. 270, 229-240.
- Kitamura, A., Nagasawa, H., Katoaka, H., Inouce, T., Matsumoto, S., Ando, T., Suzuki, A., 1989. Amino acid sequence of pheromone-biosynthesis-activating-neuropeptide (PBAN) of the silkworm, *Bombyx mori*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 163, 520-526.
- Kitamura, A., Nagasawa, H., Katoaka, H., Ando, T., Suzuki, A., 1990. Amino acid sequence of pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN-II) of the silkworm, *Bombyx mori*. Agricultural and Biological Chemistry. 54, 2495-2497.
- Klee, C.B., Crouch, T.H., Richman, P.G., 1980. Calmodulin. Annual Review of Biochemistry. 49, 489-515.
- Kochansky, J.P., Raina, A.K., Kempe, T.G., 1997. Structure-activity relationships in C-terminal fragment analogs of pheromone biosynthesis

- activating neuropeptide in *Helicoverpa zea*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 35, 315-322.
- Kolakowski, L. F., 1994. GPCRb: a G-protein-coupled receptor database. Receptors Channels. 2, 1-7.
- Kroeze, W.K., Sheffler, D.J., Roth, B.L., 2003. G-protein-coupled receptors at a glance. Journal of Cell Science. 116, 4867-4869.
- Kuniyoshi, H., Kitamura, A., Nagasawa, H., Chuman, T., Shimazaki, K., Ando, T., Suzuki, A., 1991. Structure-activity relationships of pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) from the silkworm, *Bombyx mori*. In: Shimonishi, Y. (Ed.). Peptide Chemistry 1990. Protein Research Foundation, Osaka, Japan. pp. 251-254.
- Kuniyoshi, H., Nagasawa, H., Ando, T., Suzuki, A., 1992. N-terminal modified analogs of C-terminal fragments of PBAN with pheromonotropic activity. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 22, 399-403.
- Lingren, P.D., Sparks, A.N., Raulston, J.R., 1982. The potential contribution of moth behaviour research to *Heliothis* management. In: Reed, W., Kumble, V., (Eds.). International Workshop on *Heliothis* Management. ICRISAT, Patncheru, pp. 39-47.
- Lowrey, P.L., Takahashi, J.S., 2000. Genetics of the mammalian circadian system: photic entrainment, circadian pacemaker mechanisms, and posttranslational regulation. Annual Review of Genetetics. 34, 533-562.
- Ma, P.W.K., Roelofs, W.L., 1995a. Site of synthesis and release of PBAN-like factor in the female European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. Journal of Insect Physiology. 41, 339-350.
- Ma, P.W.K., Roelofs, W.L., 1995b. Calcium involvement in the stimulation of sex pheromone production by PBAN in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology. 25, 467-473.
- Ma, P.W.K., Knipple, D.C., Roelofs, W.L., 1994. Structural organization of the *Helicoverpa zea* gene encoding the precursor protein for pheromone biosynthesis activating neuropeptides and other neuropeptides. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 91, 6506-6510.
- Ma, P.W.K., Roelofs, W.L., Jurenka, R.A., 1996. Characterization of PBAN and PBAN-encoding gene neuropeptides in the central nervous system of

- the corn earworm moth, *Helicoverpa zea*. *Journal of Insect Physiology*. 42, 257-266.
- Ma, P.W.K., Garden, R.W., Niermann, J.T., O'Connor, M., Sweedler, J.V., Roelofs, W.L., 2000. Characterization the *Hez*-PBAN gene products in neural clusters with immunocytochemistry and MALDI MS. *Journal of Insect Physiology*. 46, 221-230.
- Marco, M.-P., Fabrias, G., Lazaro, G., Camps, F., 1996. Evidence for both humoral and neural regulation of sex pheromone biosynthesis in *Spodoptera littoralis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 31, 157-167.
- Martinez, T., Fabrias, G., Camps, F., 1990. Sex pheromone biosynthetic pathway in *Spodoptera littoralis* and its activity by a neurohormone. *Journal of Biological Chemistry*. 256, 1381-1387.
- Masler, E.P., Raina, A.K., Wanger, R.M., Kochansky, J.P., 1994. Isolation and identification of a pheromonotropic neuropeptide from the brain-suboesophageal ganglion complex of *Lymantria dispar*: a new member of the family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 24, 829-836.
- Mastumoto, S., Isogai, A., Suzuki, A., 1988. Purification and characterization of melanization and reddish colouration hormone (MRCH) in lepidopteran insects. In: Alan, R., Bagnara, J.T., (Ed.). *Advances in Pigment Cell Research*. Liss, New York, pp. 437-451.
- Matsumoto, S., Kitamura, A., Nagasawa, H., Katoaka, H., Orikasa, C., Mitsui, T., Suzuki, A., 1990. Functional diversity of a neurohormone produced by the suboesophageal ganglion: molecular identity of melanization and reddish colouration hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide. *Journal of Insect Physiology*. 36, 427-432.
- Matsumoto, S., Fonagy, A., Kurihara, M., Uchiumi, K., Nagamine, T., Chijimatsu, M., Mitsui, T., 1992a. Isolation and primary structure of a novel pheromonotropic neuropeptide structurally related to Leucopyrokinin from the Armyworm larve, *Pseudaletia separata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 182, 534-539.
- Matsumoto, S., Yamashita, O., Fonagy, A., Kurihara, M., Uchiumi, K., Nagamine, T., Mitsui, T., 1992b. Functional diversity of a pheromonotropic neuropeptide: Induction of cuticular melanization and embryonic diapause

in Lepidopteran Insects by *Pseudaletia* pheromonotropin. *Journal of Insect Physiology*. 38, 847-851.

- Matsumoto, S., Ozawa, R., Nagamine, T., Kim, G.-H., Uchiumi, K., Shono, T., Mitsui, T., 1995. Intracellular transduction in the regulation of pheromone biosynthesis of the silkworm, *Bombyx mori*: suggested involvement of Calmodulin and phosphoprotein phosphatase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 59, 560-562.
- Meldolesi, J., Pozzan, T., 1987. Pathways of Ca²⁺ influx at the plasma membrane: voltage-, receptor-, and second messenger-operated. *Experimental Cell Research*. 171, 271-283.
- Merritt, J.E., Jacob, R., Hallam, T.J., 1989. Use of Manganese to discriminate between Calcium influx and mobilization from internal stores in stimulated human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*. 264, 1522-1527.
- Merritt, J.E., Armstrong, W.P., Benham, C.D., Hallam, T.J., Jacob, R., Jaxa-Chamiec, A., Leigh, B.K., McCarthy, S.A., Moores, K.E., Rink, T.J., 1990. SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochemical Journal*. 271, 515-522.
- Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., 1985. Neuromedin U-8 and U-25: novel uterus stimulating and hypertensive peptides identified in porcine spinal cord. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 130, 1078-1085.
- Minamino, N., Kangawa, K., Honzawa, M., Matsuo, H., 1988. Isolation and structural determination of rat neuromedin U. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 156, 355-360.
- Moore, R.Y., Speh, J.C., Leak, R.K., 2002. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and Tissue Research*. 309, 89-98.
- Mori, K., Miyazato, M., Ida, T., Murakami, N., Serino, R., Ueta, Y., Kojima, M., Kangawa, K., 2005. Identification of neuromedin S and its possible role in the mammalian circadian oscillator system. *The EBMO Journal*. 24, 325-335.

- Morita, M., Hatakoshi, M., Tojo, S., 1988. Hormonal control of cuticular melanization in the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Journal of Insect Physiology*. 34, 751-758.
- Nachman, R.J., Holman, G.M., Cook, B.J., 1986. Active fragments and analogs of the insect neuropeptide leucopyrokinin: Structure-function studies. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 137, 936-942.
- Nachman, R.J., Roberts, V.A., Dyson, H.J., Holman, G.M., Tainer, J.A., 1991. Active conformation of an insect neuropeptide family. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 88, 4518-4522.
- Nachman, R.J., Kuniyoshi, H., Roberts, V.A., Holman, G.M., Suzuki, A., 1993a. Active conformation of the pyrokinin/PBAN neuropeptide family for pheromone biosynthesis in the silkworm. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 193, 661-666.
- Nachman, R.J., Holman, G.M., Schoofs, L., Yamashita, O., 1993b. Silkworm diapause induction activity of myotropic pyrokinin (FXPRLamide) insect neuropeptides. *Peptides*. 14, 1043-1048.
- Nachman, R.J., Teal, P.E.A., Radcliff, P.A., Holman, G.M., Abernathy, R.L., 1996. Potent pheromontropic /myotropic activity of a carboranyl pseudopeptide analogue of the insect pyrokinin / PBAN neuropeptide family administered via Injection or topical application. *Peptides*. 17, 747-752.
- Nachman, R.J., Zdarek, J., Hayes, T.K., Holman, G.M., 1997. Pupariation acceleration in fleshfly (*Sarcophaga bullata*) larvae by the pyrokinin/PBAN neuropeptide family: Structure activity relationships. In: Beckwith, W.S., Strand, F., (Eds.). *Neuropeptides. Development and Aging*. Annals of the New York Academy of Sciences. 814, pp. 73-79.
- Nachman, R.J., Teal, P.E.A., Ujvary, I., 2001. Comparative topical pheromone activity of insect pyrokinin/PBAN amphiphilic analogs incorporating different fatty and/ or cholic acid components. *Peptides*. 22, 279-285.

- Nachman, R.J., Teal, P.E.A., Strey, A., 2002. Enhanced oral availability/pheromonotropic activity of peptidase-resistant topical amphiphilic analogs of pyrokinin/PBAN insect neuropeptides. *Peptides*. 23, 2035-2043.
- Nagalakshmi, V., Applebaum, S.W., Kubli, E.C., Choffat, Y., Rafaeli, A., 2004. The presence of *Drosophila melanogaster* Sex Peptide-like immunoreactivity in the accessory glands of male *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Physiology*. 50, 241-248.
- Nagasawa, H., Kuniyoshi, H., Arima, R., Kawano, T., Ando, T., Suzuki, A., 1994. Structure and activity of *Bombyx* PBAN. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 25, 261-270.
- Nakahara, K., Hanada, R., Murakami, N., Teranishi, H., Ohgusu, H., Fukushima, N., Moriyama, M., Ida, T., Kangawa, K., Kojima, M., 2004. The gut-brain peptide neuromedin U is involved in the mammalian circadian oscillator system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 318, 156-161.
- Nakazato, M., Hanada, R., Murakami, N., Date, Y., Mondal, M.S., Kojima, M., Yoshimatsu, H., Kangawa, K., Matsukura, S., 2000. Central effects of neuromedin U in the regulation of energy homeostasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 277, 191-194.
- Nassel, D.R., 1993. Neuropeptides in the insect brain: a review. *Cell and Tissue Research*. 273, 1-29.
- Nassel, D.R., Bayraktaroglu, E., Dirksen, H., 1994. Neuropeptides in neurosecretory and efferent neural systems of insect thoracic and abdominal ganglia. *Zoological Science*. 11, 15-31.
- Nesbitt, B.F., Beever, P.S., Hall, D.R., Lester, R., 1979. Female sex pheromone components of the cotton bollworm, *Heliothis armigera*. *Journal of Insect Physiology*. 25, 535-541.
- Nijhout, F.H., 1994. *Insect hormones*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.

- Northup, J.K., Smigel, M.D., Sternweis, P.C., Gilman, A.G., 1983. The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry*. 258, 11369-11376.
- O'Brien, M.A., Taghert, P.H., 1998. A peritracheal neuropeptide system in insects: release of myomodulin-like peptides at ecdysis. *Journal of Experimental Biology*. 201, 193-209.
- O'Connell, R.J., 1972. Responses of olfactory receptors to the sex attractant, its synergist and inhibitor in the red-banded leaf roller, *Argyrotaenia velutinana*. In: *Olfaction and Taste IV*. Schneider, D., (ed.). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH, Stuttgart. pp.180-186.
- O'Harte, F., Bockman, C.S., Abel, P.W., Conlon, J.M., 1991. Isolation, structural characterization and pharmacological activity of dog neuromedin U. *Peptides*. 12, 11-15.
- Ogura, N., 1975. Hormonal control of larval coloration in the armyworm, *Leucania separata*. *Journal of Insect Physiology*. 21, 559-576.
- Osawa, S., Matsumoto, S., GilHah, K., Uchiumi, K., Kurihara, M., Shono, T., Mitsui, T., 1995. Intracellular signal transduction of PBAN action in lepidopteran insects: Inhibition of sex pheromone production by compactin, an HMG CoA reductase inhibitor. *Regulatory Peptides*. 57, 319-327.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M., Miyano, M., 2000. Crystal Structure of Rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science*. 289, 739-745.
- Park, Y., Kim, Y.-J., Adams, M.E., 2002. Identification of G protein -coupled receptors for *Drosophila melanogaster* PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand - receptor coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 99, 11423-11428.
- Percy, J.E., Weatherston, J., 1974. Gland structure and pheromone production in insects. In: Birch, M.C. (Ed.). *Pheromones*. North Holland, Amsterdam, pp. 11-34.
- Picimbon, J.-F., Becard, J.-M., Sreng, L., Clement, J.-L., Gadenne, C., 1995. Juvenile hormone stimulates pheromonotropic brain factor release in the

- female black cutworm, *Agrotis ipsilon*. *Journal of Insect Physiology*. 41, 377-382.
- Plech, A., Rykaczewska-Czerwinska, M., Bartosz-Bechowski, H., Lombarska-Sliwinska, D., Malota, M., Szewczyk, M., 1997. Insect neuropeptide leucopyrokinin-synthesis and antinociceptive effect in rats. *Polish Journal of Pharmacology*. 49, 119-126.
- Predel, R., Eckert, M., 2000. Tagma-specific distribution of FXPRLamides in the nervous system of the American cockroach. *Journal of Comparative Neurology*. 419, 352-363.
- Raddatz, R., Wilson, A.E., Artymyshyn., R., Bonini, J.A., Borowsky, B., Boteju, L.W., Zohu, S., Kouranova, E.V., Nagorny, R., Guevarra, M.S., at al., 2000. Identification and characterization of two neuromedin U receptors differentially expressed in peripheral tissues and the central nervous system. *Journal of Biological Chemistry*. 275, 32452-32459.
- Rafaeli, A., 1994. Pheromonotropic stimulation of moths pheromone gland cultures *in vitro*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 25, 287-299.
- Rafaeli, A., 2002. Neuroendocrine control of pheromone biosynthesis in moths. *International Review of Cytology*. 213, 49-92.
- Rafaeli, A., 2005. Mechanisms involved in the control of pheromone production in moths: recent developments. *Entomologia Experiments et Applicata*. 115, 7-15.
- Rafaeli, A., Bober, R., 2005. The effect of the juvenile hormone analog, fenoxycarb on the PBAN-receptor and pheromone production in adults of the moth *Helicoverpa armigera*: an "aging" hormone in adult females? *Journal of Insect Physiology*. 51, 401-410.
- Rafaeli, A., Gileadi, C., 1995a. Factors affecting pheromone production in the stored product moth, *Plodia interpunctella*: A preliminary study. *Journal of Stored Product Research*. 31, 243-247.
- Rafaeli, A., Gileadi, C., 1995b. Modulation of the PBAN-stimulated Pheromonotropic Activity in *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 25, 827-834.

- Rafaeli, A., Gileadi, C., 1996a. Down regulation of pheromone biosynthesis: Cellular mechanisms of pheromonostatic responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 26, 797-807.
- Rafaeli, A., Gileadi, C., 1996b. Multi-signal transduction of moth pheromone biosynthesis-activating neuropeptide (PBAN) and its modulation: Involvement of G-proteins? In: Kirsch, B., Mentlein, R., (Eds.). *The Peptidergic Neuron*. Birkhauser, Basel, pp. 239-244.
- Rafaeli, A., Gileadi, C., 1997. Neuroendocrine control of pheromone production in moths. *Invertebrate Neuroscience*. 3, 223-229.
- Rafaeli, A., Gileadi, C., 1999. Synthesis and biological activity of a photoaffinity-biotinylated pheromone-biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) analog. *Peptides*. 20, 787-794.
- Rafaeli, A., Soroker, V., 1989a. Influence of diel rhythm and brain hormone on pheromone production in two lepidopteran species. *Journal of Chemical Ecology*. 15, 447-455.
- Rafaeli, A., Soroker, V., 1989b. Cyclic AMP mediation of the hormonal stimulation of ^{14}C -acetate incorporation by *Heliothis armigera* pheromone glands *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 65, 43-48.
- Rafaeli, A., Soroker, V., 1993. Second messenger interactuins in response to PBAN stimulation of pheromonegland cultures. In: Borkovec, A.B., Loeb, M., (Eds.). *Insect Neurochemistry and Neurophysiology*. CRC Press Boca Raton, Florida, pp. 223-226.
- Rafaeli, A., Soroker, V., Kamensky, B., Raina, A.K., 1990. Action of pheromone biosynthesis activating neuropeptide on *in vitro* pheromone glands of *Heliothis armigera* females. *Journal of Insect Physiology*. 36, 641-646.
- Rafaeli, A., Hirsch, J., Soroker, V., Kamensky, B., Raina, A.K., 1991. Spatial and temporal distribution of pheromone biosynthesis activating neuropeptide in *Helicoverpa (Heliothis) armigera* using RIA and *in vitro* bioassay. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 18, 119-129.
- Rafaeli, A., Soroker, V., Hirsch, J., Kamensky, B., Raina, A.K. 1993. Influence of photoperiod and age on the competence of pheromone glands and on the distribution of immunoreactive PBAN in *Helicoverpa spp.* *Archives of Insect Biochem. Physiol.* 22, 169-180.

- Rafaeli, A., Zakharova, T., Lapsker, Z., Jurenka, R.A., 2003. The identification of an age- and female-specific putative PBAN membrane-receptor protein in pheromone glands of *Helicoverpa armigera*: Possible up-regulation by Juvenile Hormone. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 33, 371-380.
- Raina, A.K., 1988. Selected factors influencing neurohormonal regulation of sex pheromone production in *Heliothis* species. *Journal of Chemical Ecology*. 14, 2063-2069.
- Raina, A.K., 1989. Male-induced termination of sex pheromone production and receptivity in mated females of *Heliothis zea*. *Journal of Insect Physiology*. 35, 821-826.
- Raina, A.K., 1993. Neuroendocrine control of sex pheromone biosynthesis in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*. 38, 329-349.
- Raina, A.K., 1996. Control of pheromone production in moths. In: Carde, R.T., Minks, A.K., (Eds.). *Insect Pheromone Research: New Directions*. Chapman & Hall New York, pp. 21-30.
- Raina, A.K., Kempe, T.G., 1990. A pentapeptide of the C-terminal sequence of PBAN with pheromonotropic activity. *Insect Biochemistry*. 20, 849-851.
- Raina, A.K., Kempe, T.G., 1992. Structure activity studies of PBAN of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 22, 221-225.
- Raina, A.K., Klun, J.A., 1984. Brain factor control of sex pheromone production in the female corn earworm moth. *Science*. 225, 531-532.
- Raina, A.K., Klun, J.A., Stadelbacher, E.A., 1986. Diel periodicity and effect of calling age and mating on female sex pheromone titer in *Heliothis zea* [Lepidoptera: Noctuidae]. *Annals of the Entomological Society of America*. Soc. 79, 128-131.
- Raina, A.K., Jaffe, H., Klun, J.A., Ridgway, R.L., Hayes, D.K., 1987. Characteristics of a neurohormone that controls sex pheromone production in *Heliothis zea*. *Journal of Insect Physiology*. 33, 809-814.
- Raina, A.K., Jaffe, H., Kempe, T.G., Keim, P., Blacher, R.W., Fales, H.M., Riley, C.T., Klun, J.A., Ridgway, R.L., Hayes, D.K., 1989. Identification of a

- neuropeptide hormone that regulates sex pheromone production in female moths. *Science*. 244, 796-798.
- Raina, A.K., Wergin, W.P., Murphy, C.A., Erbe, E.F., 2000. Structural organization of the sex pheromone gland in *Helicoverpa zea* in relation to pheromone production and release. *Arthropod Structure and Development*. 29, 343-353.
- Ramaswamy, S.B., Jurenka, R.A., Linn, Jr, C.E., Roelofs, W.L., 1995. Evidence for the presence of a pheromonotropic factor in hemolymph and regulation of sex pheromone production in *Helicoverpa zea*. *Journal of Insect Physiology*. 41, 501-508.
- Ramaswamy, S.R., Shu, S., Park, Y.I., Zeng, F., 1997. Dynamics of Juvenile Hormone-mediated gonadotropism in the Lepidoptera. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 35, 539-558.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., 2001. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual Review of Physiology*. 63, 647-676.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 418, 935-941.
- Roelofs, W.L., Carde, R.T., 1974. Sex pheromones in the reproductive isolation of lepidopterous species. In: Birch, M.C. (Ed.). *Pheromones*. North Holland, Amsterdam, pp. 96-114.
- Roelofs, W., Feng, K.C., 1968. Sex pheromone specificity tests in the Tortricidae- an introductory report. *Annals of Entomological Society of America*. 61, 312-316.
- Rosenberger, L., Triggle, D.J., 1978. Calcium in drug Action. Weiss, G.B., (Eds.). Plenum, New York, pp. 3-31.
- Sakmar, T.P., 1998. Rhodopsin: a prototypical G protein-coupled receptor. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 59, 1-34.
- Sanderford, M.V., Conner, W.E., 1990. Courtship sounds of the Polka-Dot Wasp Moth *Syntomeida epilais*. *Naturwissenschaften*. 77, 345-347.
- Sato, Y., Oguchi, M., Menjo, N., Imai, K., Saito, H., Ikeda, M., Isobe, M., Yamashita, O., 1993. Precursor polyprotein for multiple neuropeptides secreted from the suboesophageal ganglion of the silkworm *Bombyx mori*: characterization of the cDNA encoding the diapause hormone precursor

- and identification of additional peptides. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 90, 3251-3255.
- Sato, Y., Ikeda, M., Yamashita, O., 1994. Neurosecretory cells expressing the gene for common precursor for diapause hormone and pheromone biosynthesis-activating neuropeptide in the suboesophageal ganglion of the silkworm moth, *Bombyx mori*. General and Comparative Endocrinology. 96, 27-36.
- Schal, C., Ling, D., Blomquist, G.J., 1997. Neural and endocrine control of pheromone production and release in cockroaches. In: Carde, R.T., Minks, A.K. (Eds). Insect Pheromone Research: New Directions. Chapman and Hall, New York, pp. 3-20.
- Schoofs, L., Tips, A., Holman, G.M., Nachman, R.J., DeLoof, A., 1992. Distribution of locustamyotropin-like immunoreactivity in the nervous system of *Locusta migratoria*. Regulatory Peptides. 37, 237-254.
- Shichida, Y., Imai, H., 1998. Visual pigment: G-protein-coupled receptor for light signals. Cell. Mol. Life Sci. 54, 1299-1315.
- Shorey, H.H., Gaston, L.K., 1965. Sex pheromones of noctuid moths. VII. Quantitative aspect of the production and release of pheromone by females of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). Annals of the Entomological Society of America.. 58, 604-608.
- Simonet, G., Poels, J., Claeys, T., Van Loy T., Franssens, V., De Loof, A., Vanden Broeck, J., 2004. Neuroendocrinological and molecular aspects of insect reproduction. Journal of Neuroendocrinology. 16, 649-659.
- Soroker, V., Rafaeli, A., 1989. *In vitro* hormonal stimulation of [¹⁴C]acetate incorporation by *Heliothis armigera* pheromone glands. Insect Biochemistry. 19, 1-5.
- Soroker, V., Rafaeli, A., 1995. Multi-signal transduction of the pheromonotropic response by pheromone gland incubations of *Helicoverpa armigera*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 25, 1-9.
- Strader, C.D., Fong, T.M., Tota, M.R., Underwood, D., Dixon, R.A.F., 1994. Structure and function of G protein coupled receptors. Annual Review of Biochemistry. 63, 101-132.

- Strader, C.D., Fong, T.M., Graziano, M.P., Tota, M.R., 1995. The family of G-protein-coupled receptors. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 745-754.
- Sumi, S., Inoue, K., Kogire, M., Doi, R., Takaori, K., Suzuki, T., Yajima, H., Tobe, T., 1987. Effect of synthetic neuromedin U-8 and U-25, novel peptides identified in porcine spinal cord, on splanchnic circulation in dogs. *Life Science*. 41, 1585-1590.
- Swales, L.S., Evans, P.D., 1994. Distribution of myomodulin-like immunoreactivity in the adult and developing ventral nervous system of the locust *Schistocerca gregaria*. *The Journal of Comparative Neurology*. 343, 263-280.
- Szekeres, P.G., Muir, A.I., Spinage, L.D., Miller, J.E., Butler, S.I., Smith, A., Reenie, G.I., Murdock, P.R., Fitzgerald, L.R., Wu, H., et al., 2000. Neuromedin U is a potent agonist at the orphan G protein-coupled receptor FM3. *Journal of Biological Chemistry*. 275, 20247-20250.
- Tang, J.D., Charlton, R.E., Jurenka, R.A., Wolf, W.A., Phelan, P.L., Streng, L., Roelofs, W.L., 1989. Regulation of pheromone biosynthesis by a brain hormone in two moths species. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 86, 1806-1810.
- Teal, P.E.A., Nachman, R.J., 1997. Prolonged pheromonotropic activity of pseudopeptide mimics of insect pyrokinin neuropeptides after topical application or injection into a moth. *Regulatory Peptides*. 72, 161-167.
- Teal, P.E.A., Carlyle, T.C., Tumlinson, J.H., 1983. Epidermal glands in terminal abdominal segments of female *Heliothis*. *Annals of the Entomological Society of America*. 76, 242-247.
- Teal, P.E.A., Tumlinson, J.H., Oberlander, H., 1989. Neural regulation of sex pheromone biosynthesis in *Heliothis* moths. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 86, 2488-2492.
- Teal, P.E.A., Abernathy, R.L., Nachman, R.J., Fang, N., Meredith, J.A., Tumlinson, J.H., 1996. Pheromone biosynthesis activating neuropeptides: functions and chemistry. *Peptides*. 17, 337-344.

- Thyagaraja, B.S., Raina, A.K., 1994. Regulation of pheromone production in the gypsy moth, *Lymantria dispar*, and development of an *in vivo* bioassay. *Journal of Insect Physiology*. 40, 969-974.
- Tillman, J.A., Seybold, S.J., Jurenka, R.A., Blomquist, G.J., 1999. Insect pheromones- an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 29, 481-514.
- Tips, A., Schoofs, L., Paemen, L., Ma, M., Blackburn, M., Raina, A.K., De Loof, A., 1993. Colocalization of locustamyotropin- and pheromone biosynthesis activating neuropeptide-like immunoreactivity in the central nervous system of five insect species. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular & Integrative Physiology*. 106, 195-207.
- Tittiger, C., 2003. Molecular biology of bark beetle pheromone production and endocrine regulation. In: Blomquist, G.J., Vogt, R. (Eds.). *Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*. Academic Press, USA, pp. 201-230.
- Torfs, P., Nieto, J., Cerstiaens, A., Boon, D., Baggerman, G., Poulos, C., Waelkens, E., Derua, R., Calderon, J., De Loof, A., Schoofs, L., 2001. Pyrokinin neuropeptides in crustaceans. *European Journal of Biochemistry*. 268, 149-154.
- Tumlinson, J.H., Fang, N., Teal, P.E.A., 1997. The effect of PBAN on conversion of fatty acyls to pheromone aldehydes in female. In: Carde, R.T., Minks, K. (Eds.). *Insect Pheromone Research: New Directions*, Chapman & Hall, New York, pp. 54-55.
- Unger, V., Hargrave, P., Baldwin, J., Schertler, G., 1997. *Nature*. 389, 203-206.
- Van Roey, K., Derks, M., Poels, J., Vanden Broeck, J., 2004. Genomics and Evolution of Metazoan G proteins. In: *Focus on Genomes Research*. Nova Science, pp. 125-160.
- Vanden Broeck, J., 1996. G protein-coupled receptors in insect cells. *International Review of Cytology*. 164, 189-268.

- Weatherson, J., Percy, J.E., 1970. Studies of physiologically active arthropod secretions. IV. Topography of the sex pheromone producing gland of the eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). Canadian Journal of Zoology. 48, 569-571.
- Wedell, N., 2005. Female receptivity in butterflies and moths. Journal of Experimental Biology. 208, 3433-3440.
- Whim, M.D., Lloyd, P.E., 1990. Neuropeptide cotransmitters released from an identified cholinergic motor neuron modulate neuromuscular efficacy in *Aplysia*. Journal of Neuroscience. 10, 3313-3322.
- Wyatt, G.R., Davey, K.G., 1996. Cellular and molecular actions of juvenile hormone in adult insects. Advances in Insect Physiology 26, 1-155.
- Zdarek, J., Fraenkel, G., 1972. The mechanism of puparium formations in flies. Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology. 179, 315-324.
- Zdarek, J., Slama, K., Fraenkel, G., 1979. Changes in internal pressure during puparium formation in flies. Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology. 207, 187-196.
- Zdarek, J., Nachman, R.J., Hayes, T.K., 1997. Insect neuropeptides of the pyrokinin/ PBAN family accelerate pupariation in the fleshfly (*Sarcophaga bullata*) larve. Annals of the New York Academy of Sciences. 814, 67-72.
- Zdarek, J., Nachman, R.J., Hayes, T.K., 1998. Structure-activity relationships of insect neuropeptides of the pyrokinin/PBAN family and their selective action on pupariation in fleshfly (*Neobellera bulluata*) larve (Diptera: Sarcophagidae). Eur. J. Entomol. 95, 9-16.
- Zhu, J., Millar, J., Lofstedt, C., 1995. Hormonal regulation of sex pheromone biosynthesis in the turnip moth, *Agrotis segetum*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 30, 41-59.

Abstract

The moth *Helicoverpa armigera*, a model insect in the present study, belongs to the Noctuidae family, and is a pest of several crops all around the world. *H. armigera* is active during the night and utilizes chemical communication in order to reproduce. The female moths emit blends of sex pheromones to attract the males for mating. The production of Sex pheromones by the females of *H. armigera* occurs in the pheromone glands. Restriction of the pest's population is dependent mainly on the development of strategies to control sex pheromone release. Therefore, there is an importance to understand the molecular mechanisms responsible for sex pheromone production, in order to find strategies to disrupt mating.

In many moth species, sex pheromone synthesis is under a circadian control and is mediated by a neuropeptide produced in the subesophageal ganglion near the brain and termed PBAN (pheromone biosynthesis activating neuropeptide). PBAN belongs to a family of peptides with diverse functions- PBAN- pyrokinin family, that carry the sequence FxPRLamide (X=G, S or T) at the C terminal domain. This represents the minimal and essential sequence for pheromonotropic activity. The receptor for PBAN (PBAN-R) was identified in the sex pheromone gland of the female moth of *H. zea*. It is coupled to a G protein. Additional receptors were found in other species, including *H. armigera*. Using an analog to PBAN, which was labeled with a photo affinity group and with biotin, and pheromone glands of adult female moths of

H. armigera, specific binding of PBAN to a 50 kDa protein bound to the cell membrane was demonstrated.

The main target of the present study is the characterization of the PBAN-R in the *H. armigera* moth, at the protein and gene levels. The study, performed on female moths of *H. armigera*, examines the hypothesis, that there are receptors for PBAN in different tissues of the moth's body, in addition to the pheromone gland, and that those receptors are sites of action to additional activities of PBAN or PBAN-like peptides. In the first part of the thesis, the possible presence of the PBAN-R at the protein level was deduced in tissues other than the pheromone gland and in Sf9 cells expressing the gene of *H. zea* PBAN-R, which is similar to the receptor from *H. armigera*. Sf9 cells, expressing the PBAN-R were used as a positive control for the developed ligand-binding assay.

In the second part of the thesis, the presence of the gene encoding for the receptor was examined in the different tissues in order to confirm that the proteins identified in those tissues are indeed receptors for PBAN. In the third part, the involvement of second messengers in sex pheromone production was studied in order to clarify the PBAN-R's function in pheromone biosynthesis at the cellular level, in the pheromone gland. The last part of the thesis examined the pheromonotropic activity of peptides belonging to the PBAN- pyrokinin family and of PBAN-like peptides on the pheromone gland of *H. armigera* females.

In the attempt to identify the PBAN-R protein, a biological analysis, based on the binding of a PBAN ligand labeled with a photo affinity group and with biotin to membrane preparation from the tissues, was used. By SDS-PAGE and Western blot analysis the proteins to which the labeled ligand was bound were identified. In these experiments, specific binding to proteins (50 kDa) was identified in membranes prepared from the brains, thoracic ganglion, ventral nerve cord and in the pheromone glands, as well as in Sf9 cells expressing the *H. zea* PBAN-R gene. The results indicate the presence of receptors for PBAN or receptors similar to PBAN-R, with a specificity to PBAN in the neural tissues in the moth's body. Nevertheless, in two other tissues which were tested, the wing muscle and the bursa & spermatheca, the demonstration of the protein receptor was impossible by the Western blot

method due to interference by endogenous biotinylated proteins. In these two tissues, an *in vitro* test was performed in order to demonstrate the possible presence of PBAN-like activity. This cyclic-AMP (cAMP) test was based on the fact, that PBAN induces a rise in intracellular cAMP in the pheromone gland. In the wing muscle and the bursa & spermatheca, no significant effect of PBAN on the intracellular cAMP production was found, as opposed to the pheromone glands, in which a significant rise in the intracellular cAMP production was observed as a function of the concentration of PBAN in the physiological solution. Thus either the wing muscle and the bursa & spermatheca do not respond to stimulation by PBAN or PBAN induces a different second messenger pathway in these tissues.

The presence of a gene encoding for the PBAN-R or for a receptor similar to PBAN-R in the different tissues of *H. armigera* females was determined by testing the presence of mRNA, which is transcribed from a cDNA that encodes for PBAN-R (or for a similar receptor), in each tested tissue. Primers were designed specifically to code for an 81 bp amplicon of the PBAN-R. Using BLAST search that was performed on the cDNA sequences which were subsequently obtained from the tested tissues, a 96-100% homology was found to the sequence of the gene encoding the *H. armigera* PBAN-R. The conclusion from those results is that the gene encoding to PBAN-R (or a similar gene) indeed exists and is expressed in the tested tissues; the pheromone glands, the brain, the thoracic ganglion and the ventral nerve cord. Therefore, we can conclude that the 50 kDa proteins found in those tissues are indeed receptors for PBAN-R or similar receptors. Nevertheless, in the wing muscle, in which it was found that the tissue apparently do not contain receptors for PBAN, the cDNA's sequence was found to be homologous to the gene encoding for *H. armigera* PBAN-R, and therefore may represent another receptor, similar to the PBAN-R, which may use a different second messenger mechanism.

The third part of the thesis tested the involvement of Ca^{2+} in pheromone biosynthesis in order to determine the function of PBAN-R in that process at the cellular level. It was performed using *in vitro* bioassays, in which pheromone glands were incubated with calcium channel blockers of different modes of action. The results show that from the examined materials,

SKF 96365 and verapamil significantly inhibited pheromone production in the pheromone gland, whereas amiloride did not affect pheromone levels. Since SKF 96365 is known as an inhibitor of Ca^{2+} entry mediated by a receptor, the fact that it prevents pheromone production indicates that the entry of Ca^{2+} , which is essential to the pheromone biosynthesis, to the cell is mediated by the PBAN-R.

The last part of the thesis examined the pheromonotropic activity of peptides belonging to the PBAN- pyrokinin family and of PBAN-like peptides using *in vitro* bioassays, that examined the sex pheromone level produced as a function of the concentration of each peptide. The results indicated that most of the peptides related to PBAN, including those that are encoded by the same gene as PBAN (and termed PGNs), have a pheromonotropic activity in the pheromone glands of *H. armigera* females, but with different affinities. In conclusion, the present study demonstrated for the first time the presence of receptors for PBAN (or receptors similar to PBAN-R) in the neural tissues of the *H. armigera* female's body at the protein level and identified in those tissues and in the pheromone glands genes encoding the PBAN-R (or to similar receptors). It should be mentioned that in the present study, the genes encoding to the receptors, which were found in the tested tissues were not fully sequenced, and it has not yet been examined whether PBAN is the peptide with the highest affinity to these receptors, compared to other PBAN-like peptides. Therefore, it can not yet be determined with certainty whether those are PBAN receptors or receptors for other peptides, which are produced in *H. armigera*, such as the PGNs. Moreover, the present study indicated that most of the peptides related to PBAN, including the PGNs, have pheromonotropic activity in the pheromone glands of *H. armigera* females. The meaning of this is that PBAN may have a functional similarity to related peptides, which suggests that PBAN mimics activities in these tissues where the PBAN-like peptides work. Finally, the study demonstrated that the specific binding between PBAN and the PBAN-R in the cell membrane of the pheromone gland mediates sex pheromone biosynthesis by activating second messengers in the cell (cAMP), and that Ca^{2+} is essential for biosynthesis. The present study might help in our understanding of the molecular mechanisms responsible for sex pheromone production. This work, together

with additional studies on this subject, will contribute to development of an efficient and specific control of pest populations, which is based on the interruption of sex pheromone biosynthesis in female moths, a subject of large economic importance.

**Molecular Characterization of the Receptor for PBAN
in the female moth *Helicoverpa armigera***

M. Sc. Thesis

Submitted to the Graduate Biotechnology Program
of the Hebrew University of Jerusalem

For the degree of

"Master of Science in Biotechnology"

By

Liron Becker

November 2006