

יחסי טפיל-פונדקאי: אנליזה טרנסקריפטומית ופרוטאומית של תהליך

ה-Recovery במטודה האנטומופתוגנית

Heterorhabditis bacteriophora

חיבור לשם קבלת תואר דוקטור לפילוסופיה

מאת

ענת מושיוב

הוגש לסנט האוניברסיטה העברית, בירושלים

נובמבר 2010

יחסי טפיל-פונדקאי: אנליזה טרנסקריפטומית ופרוטאומית של תהליך
ה-Recovery בנמטודה האנטומופתוגנית
Heterorhabditis bacteriophora

חיבור לשם קבלת תואר דוקטור לפילוסופיה

מאת

ענת מושיוב

הוגש לסנט האוניברסיטה העברית, בירושלים

נובמבר 2010

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של

פרופ' איתמר גלזר

וד"ר חנינית קולטאי

תודה

לפרופ' איתמר גלזר ולדר' חנינית קולטאי
על ההנחיה, על התמיכה ועל הסבלנות הרבה.

לדר' נתן גולופ ז"ל
על העזרה הרבה וההבנה.

לליאורה סלמה
על העזרה במעבדה והחברה הנעימה.

לרינה גרניט
על תרומתה לעבודה בנושא החלבונים וחברתה הנעימה.

לחברי המחלקה לנמטולוגיה ומזכירות הגנת הצומח
שעזרו ותמכו תמיד.

ולכל חבריי שליוו אותי לאורך תקופה זו.

עבודה זו מוקדשת לאמי

תקציר

נמטודות אנטומופוטוגניות מהמשפחה *Heterorhabditis* הטפילות על חרקים משמשות להדברה ביולוגית של מזיקים. בנמטודה *Heterorhabditis bacteriophora* הדרגה המדביקה הוא זחל מדרגה שלישית המותאם להישרדות בקרקע ונמצא במצב של עצירת התפתחות; זחל זה נקרא זחל אינפקטיבי ("ז"). כאשר הוא מאתר פונדקאי וחודר אליו, הזחל האינפקטיבי מחדש את התפתחותו: הוא מתפתח לזחל דרגה רביעית ואחר כך לבוגר; תהליך זה נקרא "Recovery". תהליך ה-Recovery מאפיין את האינטראקציה טפיל-פונדקאי שכן הוא מתרחש בחשיפה של השלב האינפקטיבי לפונדקאי. הבנת המכאניזם המולקולארי של האינטראקציה טפיל-פונדקאי יכולה לעזור בהבנת המנגנונים השונים של אינטראקציה זו שהתפתחו בנמטודות טפילות.

מטרות המחקר העיקריות היו: זיהוי ובידוד גנים המתבטאים בתהליך ה-Recovery תוך השוואה למערכות אחרות, אפיון ביטוי גנים נבחרים בתהליך זה ועריכת מבחנים פונקציונאליים לגנים המתבטאים בתהליך ה-Recovery. כמו כן, זיהוי של חלבונים המתבטאים בתהליך.

בכדי לענות על מטרות המחקר ולאפיין את המנגנון המולקולארי של תהליך ה-Recovery, פותח ב- *H. bacteriophora* מבחן ביולוגי לזיהוי מוקדם של התהליך. מבחן זה כלל חשיפת ז"א להמולימפת חרק ובחינת מועד הפרשת החיידק הסימביוטי מהנמטודה. אירוע המצויין את תחילת התהליך. על סמך המבחן הביולוגי הוכנו ספריות cDNA מז"א שנחשפו לפונדקאי, לאחר שלוש שעות ולאחר שש שעות חשיפה להמולימפה של הפונדקאי, שהופחתו ע"י ספריות cDNA של ז"א שלא נחשפו לפונדקאי ולפיכך נמצאים בעצירת התפתחות (developmental arrest). שש מאות רצפי ESTs מספריות ההפחתה בשני המועדים רוצפו והשווה למאגרי מידע חלבוניים. נמצאו גנים בעלי הומולוגיות לאורגניזמים שונים; לאורגניזמים אאוקריוטים, בניהם לנמטודות טפילות על יונקים ורצפים הומולוגיים לחלבונים מהנמטודה החופשייה *Caenorhabditis elegans*, המשמשת כמודל למחקר ביולוגי נרחב. כמו כן נמצאו גנים ללא הומולוגיה לגנים ידועים.

על בסיס אנוטציית הגנים, נמצא כי הם השתייכו למספר קבוצות פונקציונאליות. מבין הגנים שנמצאו הומולוגיים ל- *C. elegans* ידועים רבים המעורבים במסלולים מטבוליים שונים, ממצא המצביע על רמת מטבוליזם גבוהה בז"א שעוברים Recovery לעומת ז"א שנמצאים בעצירת התפתחות. מתוך הגנים בשתי הספריות בחרנו עשרים ושלושה גנים להמשך אפיון, הבחירה נעשתה תוך השוואה למערכות אחרות: לנמטודות חופשיות, וכן לנמטודות טפילות אחרות. ביטויים של גנים אלו אופייין במהלך תהליך ה-Recovery בשיטת Real time qPCR. התוצאות מראות עליה משמעותית בביטוי גנים, לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה בגנים שבודדו מספריית שלוש השעות, וכך גם לגבי גנים שבודדו לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה. תוצאות אלו תומכות בתוצאות הספריות.

עשרים ושלושה גנים הושתקו בשיטת RNAi וכתוצאה מההשתקה התקבלו פנוטיפים שונים כגון: עצירת התפתחות, מוות עוברי, צאצאים עקרים ועוד. בשלב הבא נבדק שיעור ה-Recovery בז"א שהתפתחו מהנמטודות בהן הושתק הגן הרצוי. נמצאו שמונה גנים אשר השתקם פוגעת בתהליך ה-Recovery בנמטודה *H. bacteriophora*. עם השתקם חלה ירידה משמעותית באחוזי הזחלים האינפקטיביים היוצאים

משלב זה וממשיכים להתפתח לדרגה הבאה. על כן ככל הנראה גנים אלו חיוניים לתהליך ה-Recovery. הגנים הם: *akt-1*: המקודד לסרין טראונין קינאז טרנס ממברנלי; *gei-17*: (GEX Interacting protein) המקודד ל-SUMO-ligase E3; *glb-1*: (GLOBIN) המקודד לגלובין תוך תאי; *ttl-15*: (TransThyretin-like); *ahcy-1*: המקודד לאנזים S-adenosylhomocysteine hydrolase; *pinin*: (pnn) המקודד לחלבון SR-like; *ant-2*: (TropoNin T family member) המקודד לטרופונין-T; *itm-1*: Integral transmembrane protein-1. יתרה מכך, לפחות שניים מהגנים, *akt-1* ו-*glb-1*, קשורים ישירות למסלול insulin/IGFI, שהינו אחד המסלולים המווסתים כניסה ויציאה ממצב של זחל עמיד (המקביל לז"א) בנמטודה *C. elegans*. הקשר של שאר הגנים לתהליך ה-Recovery הינו פחות ידוע ומצריך מחקר פרטני יותר לכל גן. חיוניותם של גנים אלו לתהליך ה-Recovery בנמטודות אנטומופתוגניות לא הייתה ידועה לפני מחקר זה.

בנוסף לביטוי הגנים בדקנו גם את החלבונים המתבטאים בז"א הנמצאים בתהליך ה-Recovery בהשוואה לז"א שנמצאים בעצירת התפתחות. לשם כך הופקו חלבונים מזחלים אינפקטיביים שנחשפו להמולימפה לאחר שלוש שעות ולאחר שש שעות בהשוואה לחלבונים שהופקו מזחלים אינפקטיביים שלא נחשפו להמולימפה. בדיקת ביטוי החלבונים נעשתה ע"י 2D gels. התוצאות הראו שינויים בביטוי החלבונים בין הטיפולים השונים. החלבונים העיקריים אשר הופיעו רק בזחלים אינפקטיביים במהלך תהליך ה-Recovery, נשלחו לזיהוי ע"י LC/MS/MS. על בסיס התוצאות והשוואה למאגרי מידע זוהו מספר חלבונים הידועים כמעורבים בתהליך ה-Recovery בנמטודה *C. elegans* וכמה חלבונים הידועים כמעורבים באינטראקציה טפיל-פונדקאי בנמטודות טפילות. נראתה הקבלה בין החלבונים שהתבטאו בתהליך ה-Recovery וגנים שנמצאו בספריות ההפחתה.

לסיכום, בעבודה זו הראנו שמונה גנים של *H. bacteriophora* החיוניים לתהליך ה-Recovery. הגנים נחלקים לשתי קבוצות. בקבוצה הראשונה, גנים בעלי הומולוגיה לגנים של *C. elegans* הנמצאים במסלול ה-Recovery שלה. דמיון זה בין הנמטודה הטפילה על חרקים והנמטודה החופשייה מפתיע מאחר ואורח חייהן כה שונה: הנמטודה הטפילה מזהה את הפונדקאי, חודרת אליו באופן אקטיבי, מתחמקת ממערכת החיסון שלו, ולאור האינטראקציה הזו עם הפונדקאי מתחילה את תהליך ה-Recovery. בנמטודה החופשייה לעומת זאת הסיגנלים ל-Recovery הם אחרים וכוללים שינוי ברמות פרומון, ירידה בטמפרטורה ועליה ברמת המזון. בקבוצה השנייה של הגנים מצאנו גנים נוספים המשפיעים על תהליך ה-Recovery ואינם ידועים ככאלה ב-*C. elegans*, חלקם בעלי הומולוגיה גבוהה יותר לגנים של הנמטודות הטפיליות אחרות כגון *Brugia malayi*, הטפילה על בני אדם. הגנים בקבוצה הראשונה התומכים בהשערה כי ישנו מסלול של כניסה ויציאה ממצב של זחל אינפקטיבי המשותף ל-*C. elegans* ול-*H. bacteriophora*. הגנים בקבוצה השנייה תומכים בהשערה כי ישנם מסלולים נוספים לאלה הנמצאים בנמטודות חופשיות, המווסתים את התהליך בנמטודות אנטומופתוגניות בתגובה לחשיפה לפונדקאי.

ממצאים אלה מעידים על כך שישנם שני שלבים עיקריים בתהליך ה-Recovery בנמטודה *H. bacteriophora* ובכל שלב מופעל מסלול להעברת סיגנלים שונה, בתגובה לסיגנל חיצוני שונה. בשלב הראשון, בתגובה לסיגנלים מהפונדקאי מופעל מסלול העברת סיגנלים שנמצא רק בנמטודות טפילות ובו

סביר להניח שמעורבים גנים מהקבוצה השנייה. בשלב השני מופעלים מסלולי העברת סיגנלים המופעלים בתגובה לסיגנל מזון המשותפים לנמטודה החופשייה - *C. elegans* ולנמטודה הטפילה על חרקים - *H. bacteriophora*, השמור לאורך האבולוציה ובו מעורבים גנים מהקבוצה הראשונה. סביר להניח שבנמטודות טפיליות מסלולי העברת סיגנלים אלה חופפים בחלקם, אך הסיגנל המפעיל אותם שונה. ממצאי העבודה הנוכחית עשויים גם לסייע למצוא דרכים למניעת ה-Recovery בנמטודות פרזיטיות המזיקות בצמחים ובבעלי חיים. גישות אפשריות הן השתקת גנים חיוניים להשראת התהליך או פיתוח חומרים/תרופות המונעים את הפעילות של גנים אלו החיוניים לתהליך ה-Recovery בנמטודות טפילות.

תוכן עניינים

תקציר

I

1. מבוא

1	1.1 נמטודות אנטומופתוגניות
1	1.2 ביולוגיה ומחזור החיים של הנמטודה <i>H. bacteriophora</i>
2	1.2.1 מאפייניו של הזחל האינפקטיבי
4	1.3 יחסי הגומלין בין הנמטודות לחיידקים
5	1.4 תהליך הפתוגניות של הנמטודות וחיידק הסימביונטי
6	1.5 שימוש בנמטודות אנטומופתוגניות להדברה ביולוגית
7	1.6 מהו Recovery?
8	1.6.1 גורמים המשרים את תהליך ה-Recovery בנמטודות טפיליות שונות
9	1.6.2 תהליך ה-Recovery כמאפיין את האינטראקציה טפיל פונדקאי
10	1.6.3 תהליך ה-Recovery ב- <i>H. bacteriophora</i>
11	1.6.4 תהליך ה-Recovery ב- <i>C. elegans</i>
12	1.7 מסלולים גנטיים המבקרים כניסה ויציאה ממצב של זחל ב- <i>C. elegans</i> dauer
12	1.7.1 מסלול גואניליל ציקלאז (Guanylyl cyclase)
12	1.7.2 מסלול TGF β -like
13	1.7.3 מסלול Insulin-like
15	1.7.4 מסלול הורמון סטרואיד (steroid hormone)
16	1.8 מטרות המחקר

2. חומרים ושיטות המחקר

17	2.1 זני נמטודות ושיטות גידול
18	2.2 הכנת המולימפה למבחן השריית התפתחות - Recovery bioassay
18	2.3 מבחן להשראת התחדשות התפתחות ב- <i>H. bacteriophora</i>
18	2.4 הפקת RNA
19	2.5 הכנת ספריות הפחתה
19	2.6 אנליזה של ESTs
19	2.7 Real Time quantitative PCR
20	2.8 בידוד הגנים <i>unc-22</i> ו- <i>dpy-13</i> מ- <i>C. elegans</i> ו- <i>H. bacteriophora</i>
21	2.9 הכנת מקטעים ליניאריים כתבנית ל- dsRNAi
21	2.10 <i>In vitro</i> transcription ליצירת dsRNAi
22	2.11 השתקת גנים ע"י RNAi (RNA-mediated interference)
23	2.12 מבחן ביולוגי ל-Recovery לאחר השתקת הגן הרצוי ע"י RNAi
23	2.13 הפקת חלבונים מזחלים אינפקטיביים של <i>H. bacteriophora</i>
23	2.14 הפרדת חלבונים על 2D gels (ג'לים בשני ממדים) וקביעת רצף החלבון

3. תוצאות

25	3.1 פיתוח מבחן ביולוגי לתהליך ה-Recovery
28	3.2 ספריות הפחתה
28	3.2.1 אנליזה של הרצפים (ESTs) מספריית ההפחתה לאחר 6 שעות חשיפה להמולימפה
28	3.2.2 אנליזה של הרצפים (ESTs) מספריית ההפחתה לאחר 3 שעות חשיפה להמולימפה
29	3.3 טבלאות אנוטציה של ה-ESTs מספריית ההפחתה
29	3.3.1 אנוטציה של ה-ESTs מספריית ההפחתה של שלוש שעות
33	3.3.2 אנוטציה של ה-ESTs מספריית ההפחתה של שש שעות
38	3.4 חלוקת ה-ESTs לקבוצות על פי מסלולים מטאבוליים עפ"י KEGG
38	3.4.1 ESTs מספריית הפחתה של שלוש שעות

38	ESTs מספריית הפחתה של שש שעות	3.4.2
41	בחירת גנים להמשך אפיון	3.5
42	הגנים שנבחרו מספריית שלוש שעות	3.5.1
44	הגנים שנבחרו מספריית שש שעות	3.5.2
45	בדיקת שעתוק הגנים ע"י RT-qPCR	3.6
46	בידוד הגנים <i>dpy-13</i> ו- <i>unc-22</i> מ- <i>C. elegans</i> ומ- <i>H. bacteriophora</i>	3.7
47	השתקה של הגן <i>dpy-13</i> ב- <i>H. bacteriophora</i>	3.8
47	השתקת 23 הגנים שנבחרו ע"י dsRNAi ב- <i>H. bacteriophora</i>	3.9
48	פנוטיפים שנראו ב- <i>H. bacteriophora</i> לאחר השתקת הגן הרצוי ע"י dsRNAi	3.9.1
53	מבחן לתהליך ה-Recovery ב-IJs לאחר השתקת הגן הרצוי ע"י dsRNAi	3.9.2
55	בדיקת ביטוי הגנים לאחר השתקה ע"י RNAi ע"י Real Time qPCR	3.9.3
57	ביטוי חלבונים במהלך תהליך ה-Recovery	3.10
60	זיהוי החלבונים ע"י LC/MS/MS	3.10.1
61	פרוט החלבונים שהתבטאו בזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה	3.10.2
66	חלבונים שזוהו מג'ל לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה	3.10.3
66	פרוט החלבונים שהתבטאו בזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה	3.10.4

4. דיון ומסקנות

68	השריית תהליך ה-Recovery	4.1
70	שינויים טרנסקריפטומים בתהליך ה-Recovery	4.2
74	גנים החיוניים ל-Recovery	4.3
80	חלבונים המתבטאים בתהליך ה-Recovery	4.4
81	תהליך ה-Recovery בראי האבולוציה	4.5
84	סיכום	5.5

5. ביבליוגרפיה

87		
----	--	--

6. נספחים

1	תמיסות ומצעים	6.1
2	רשימת פריימרים	6.2
5	2D proteins gels של חלבונים מזחלים אינפקטיביים בתהליך ה-Recovery	6.3

7. תוכן עניינים באנגלית

VII		
-----	--	--

8. תקציר באנגלית

IV		
----	--	--

1. מבוא

נמטודות הן תולעים חוטיות הנמצאות במגוון רחב של בתי גידול ימיים ויבשתיים. יש נמטודות חופשיות, יש טפילות על צמחים ועל חרקים ויש נמטודות טפילות על יונקים ואף על בני אדם.

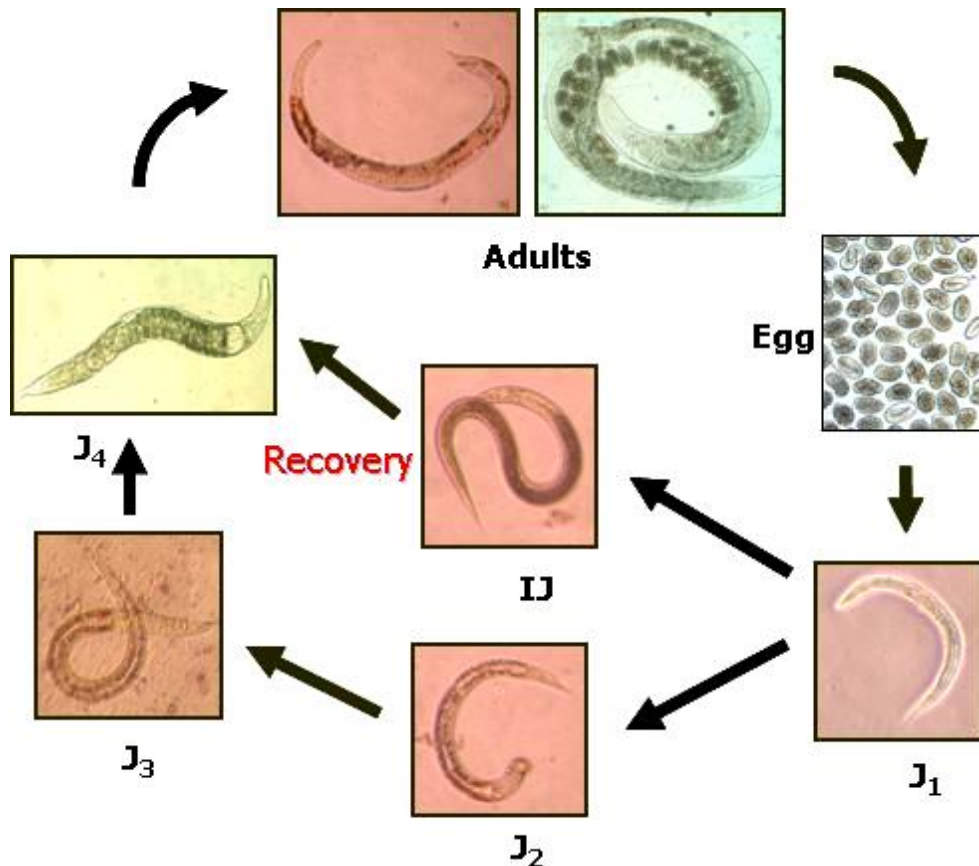
1.1 נמטודות אנטומופתוגניות

נמטודות אנטומופתוגניות (קוטלות חרקים) מהסוגים *Heterorhabditis* ו-*Steinernema* הן טפילות על זחלים של חרקים החיים בקרקע. נמטודות אלו הן טפילות מוחלטות הגורמות להרג הפונדקאי והן פתוגניות לטווח פונדקאים רחב מאוד הכולל כמעט את כל סדרות ומשפחות החרקים (Klein, 1990). נמטודות אלו חשובות מאוד כמדבירות ביולוגיות של חרקים מזיקים (Grewal et al., 2005) והן נמצאות בשימוש בקנה מידה מסחרי בארצות רבות, בגינות, בחממות ובגידולים בעלי ערך כלכלי גבוה (Johnigk et al., 2004). בעבודה הנוכחית עבדתי עם נמטודות מהמין *Heterorhabditis bacteriophora* הנמנית על הסוג – *Heterorhabditis*.

1.2 ביולוגיה ומחזור החיים של הנמטודה *H. bacteriophora*

מחזור החיים של נמטודות אלו כולל ארבע דרגות זחל (J1-J4), בוגרים (זכרים, נקבות ונקבות הרמפרודיטיות) וביצים. מחזור החיים הראשון בפונדקאי מתחיל כאשר זחל המקביל לזחל מדרגה שלישית, הנקרא זחל "מדביק" (infective juveniles) IJ, חודר להמולימפה של הפונדקאי. זחל זה מתפתח לזחל מדרגה רביעית ולאחר מכן לנקבה הרמפרודיטית המתרבה בהפריה עצמית. בדור ראשון הבוגרים הן נקבות הרמפרודיטיות בלבד. התפתחות הדור השני המתחילה מביצים של נקבות הרמפרודיטיות מדור ראשון, דרך ארבע דרגות זחלים (J1-J4), המתפתחים לבוגרים וכוללים זכרים, נקבות ונקבות הרמפרודיטיות המתרבים ברבייה עצמית או הזדית (Zioni Cohen-Nissan et al., 1992). מחזור חיים שלם של הנמטודה *H. bacteriophora* בפונדקאי, מביצה לביצה בדור הבא, נמשך 60-70 שעות ב-25°C (ראה תמונה מס' 1 בעמוד הבא). משך כל אחד מארבעת שלבי הזחלים הוא 10 עד 12 שעות (Kahel-Raifer and Glazer, 2000). לאחר שניים עד שלושה מחזורי חיים בגוויית זחל החרק, הנמשך כשבועיים, גוברת הצפיפות ופוחתים המזון והחמצן בגוויית החרק. במצב זה, זחלים מדרגה שנייה מתפתחים לזחלים אינפקטיביים במקום לזחלים מדרגה שלישית. הזחלים האינפקטיביים המכילים את החיידק הסימביונטי במעי שלהם, עוזבים את גוויית החרק ומחפשים פונדקאי חדש.

תמונה מספר 1: מחזור חיים של הנמטודה *H. bacteriophora* בתוך גויית החרק הפונדקאי

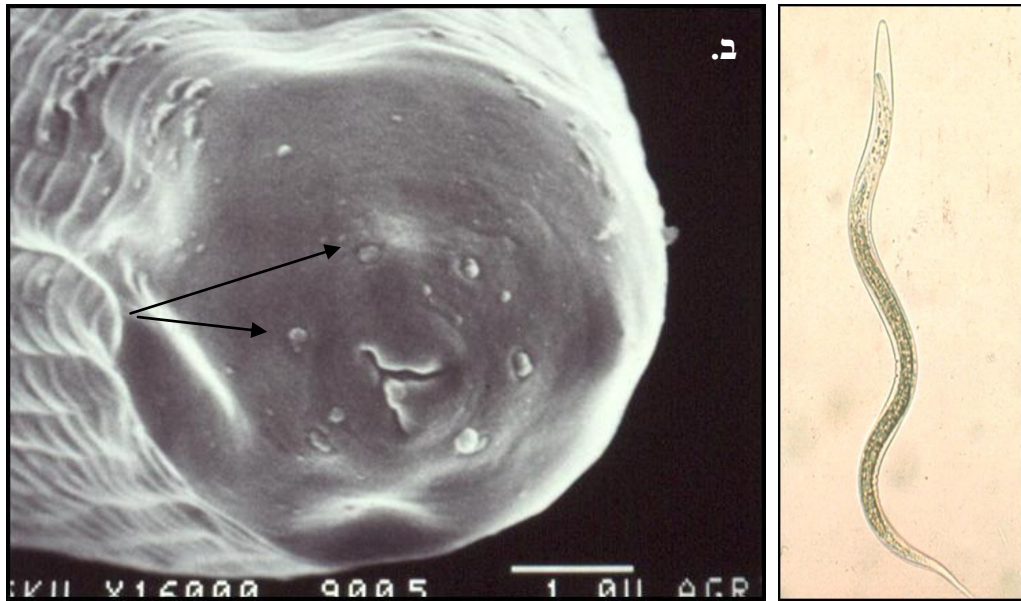


תמונה מס' 1: מחזור החיים של הנמטודה בתוך גויית החרק הפונדקאי, מתחיל מזחל אינפקטיבי (infective juvenile, IJ) הנכנס לפונדקאי, עובר Recovery ומתפתח לזחל מדרגה רביעית. זחל זה מתפתח לנקבה הרמפרודיטית אשר מתרבה ברבייה עצמית. מהביצים המופרות בוקעים זחלים מדרגה ראשונה J₁ המתפתחים לזחלים מדרגה שנייה J₂, שלישית J₃ ורביעית J₄ ואח"כ לבוגרים הכוללים בדור השני זכרים, נקבות ונקבות הרמפרודיטיות. לאחר 2-3 מחזורי חיים בתוך גויית החרק הפונדקאי, הופכים זחלים מדרגה ראשונה לזחלים אינפקטיביים IJs הנושאים את החידק הסימביונטי ופורצים מגויית הפונדקאי לקרקע לחפש פונדקאי חדש.

1.2.1 מאפייניו של הזחל האינפקטיבי

הזחל האינפקטיבי הינו הדרגה היחידה השורדת בקרקע (מחוץ לגוף החרק הפונדקאי) במשך מחזור חייהן של הנמטודות. הוא מותאם מבחינה מורפולוגית ופיזיולוגית לשהייה ארוכה בקרקע, לחיפוש אקטיבי של הפונדקאי ולהדבקתו. מבנה גופו צר ומותאם לתנועה מהירה (ראה תמונה 2א). והוא מסוגל לשרוד בקרקע יותר משלושה חודשים (Glazer, 2002). הזחל האינפקטיבי נמצא במצב של עצירת התפתחות (developmental arrest), הוא אינו ניזון, גפי פיו חסומים ורמת המטבוליזם שלו נמוכה מאוד. המטבוליזם של הזחל האינפקטיבי מותאם לניצול מאגרי אנרגיה פנימיים, בעיקר של ליפידים בצורה של טריגליצרידים, אך גם של גליקוגן, ומשום כך הוא מצויד במאגרי מזון בבלוטות היפודרמליות ובריבוי של מיטוכונדריות (Burnell, 2005). כמו כן, אברי החישה שלו מפותחים מאוד ביחס לדרגות האחרות (ראה תמונה 2ב), והוא בעל קוטיקולה כפולה המגינה עליו מלחצים אוסמוטיים משתנים, כגון יובש או מים חופשיים, בעודו מחפש את החרק הפונדקאי בקרקע (Glazer, 2002).

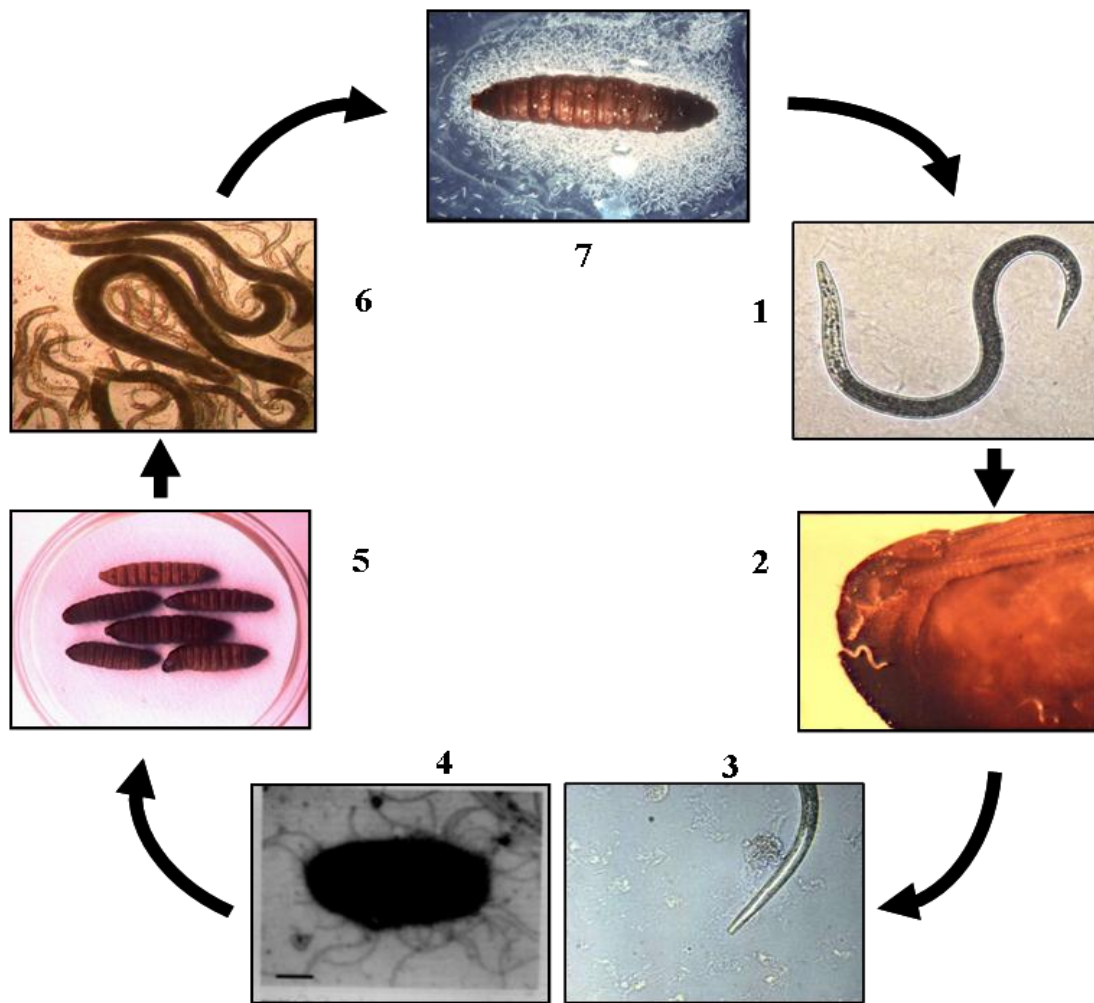
תמונה מספר 2: זחל אינפקטיבי



תמונה מס' 2: א. זחל אינפקטיבי של *H. bacteriophora* הינו בעל קוטיקולה כפולה, ומבנה צר המותאם לתנועה בקרקע והוא מכיל חומרי תשמורת בגופו. **ב.** צילום במיקרוסקופ אלקטרוני סורק של ראש הזחל האינפקטיבי, ניתן לראות את אברי החישה בקדמת הראש מסביב לפתח הלוע (החיצים מצביעים על שניים מאברי החישה) ואת פתח הלוע. צולם ע"י שלומית כהן-ניסן.

הזחל האינפקטיבי הנושא את החיידק הסימביונטי *Photorhabdus luminescens* במעי שלו (ראה פירוט לגבי יחסי הגומלין בין הנמטודה לחיידק בסעיף 1.3 בהמשך), מאתר זחל של חרק פונדקאי בקרקע ע"י כמוטקסיס ונכנס לתוכו דרך הפתחים הטבעיים (פה, פי הטבעת ופתחי הנשימה) או חודר להמוצל של זחל החרק בעזרת שן הקורעת את הקוטיקולה. מרגע שהזחל האינפקטיבי חודר להמוצל של הפונדקאי הוא מתחיל להתפתח: גפי הפה נפתחים, מערכת העיכול הופכת לפעילה, והוא מפריש באופן אקטיבי את החיידק הסימביונטי להמולימפה של החרק (Johnigk, 1999; Ciche and Ensign, 2003). החיידקים המופרשים מתחמקים מהתגובה החיסונית של החרק (ראה פירוט בסעיף 1.4 בהמשך), מתחילים להתרבות ומפרישים חומרים שונים כגון רעלנים ואנזימים פרוטאוליטיים, אשר הורגים את הפונדקאי תוך 24-48 שעות. הזחל האינפקטיבי המשתנה, ניזון, מחדש את התפתחותו וגדל לזחל מדרגה רביעית, אשר מתפתח לנקבה הרמפרודיטית המתרבה ברבייה עצמית. כך מתחיל מחזור החיים הראשון בגוף החרק (ראה תמונה מס' 3).

תמונה מספר 3: התהליך הפתוגני והתרבות הנמטודה *H. bacteriophora* והחיידק הסימביונטי



תמונה מס' 3: מחזור חיים זה מתחיל ונגמר בזחלים אינפקטיביים שהם בעלי היכולת לשרוד בקרקע ולחפש פונדקאי חדש. 1. הזחל האינפקטיבי מחפש פונדקאי בקרקע. 2. זחל אינפקטיבי זוחל על זחל פונדקאי במטרה להיכנס פנימה. 3. הפרשה של החיידק הסימביונטי המתרחשת בתוך הפונדקאי. 4. החיידק המופרש *Photorhabdus luminescens* מתרבה ומפריש חומרים ההורגים את הפונדקאי. 5. הזחל הפונדקאי מת תוך 48 שעות (צבעו הופך אדום בגלל החיידק). 6. הנמטודות משלימות 2-3 מחזורי חיים בגויית הזחל. 7. כאשר המזון מתדלדל והצפיפות גוברת נוצרים זחלים אינפקטיביים הנושאים את החיידק הסימביונטי במעי שלהם ויוצאים לחפש פונדקאי חדש. מחזור חיים זה, מהדבקת הפונדקאי ועד להגחת זחלים אינפקטיביים, נמשך 14 יום לערך בתנאי מעבדה.

1.3 יחסי הגומלין בין הנמטודות לחיידקים

החיידק הסימביונטי של הנמטודה *H. bacteriophora* הוא *Photorhabdus luminescens*, זהו חיידק גרם שלילי, אנאירובי פקולטטיבי, צורתו כצורת מקלון והוא שייך למשפחת ה-Enterobacteriaceae. למשפחה זו שייכים גם חיידקים פתוגניים חשובים של יונקים כגון *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella*, *Escherichia coli* ועוד. הסוג *Photorhabdus* מאופיין ביכולתו לייצר אור ע"י לוציפראז והוא החיידק היבשתי היחיד הידוע כבעל לומינציה (bioluminescence) (Boemare, 2002). בשנת 2003 הושלם ריצוף הגנום של החיידק הסימביונטי *P. luminescens* subsp. *Laumondii* TT01 של

הנמטודה *H. bacteriophora* שגודלו 5.68 מגה בסיסים, ונמצא כי הוא צפוי להכיל 4,839 גנים (Duchaud et al., 2003).

הקשר בין הנמטודה לחיידק הסימביוטי שהיא נושאת במעי הוא הדדיות מוחלטת (obligate mutualism), כאשר כל אחד מהצדדים זקוק לשני כדי להתרבות וכדי לגבור על הפונדקאי. החיידק מנצל את הנמטודה כווקטור המחפש את הפונדקאי באופן אקטיבי והמעביר אותו לתוך ההמוצל של החרק. הנמטודה זקוקה לחיידק כדי להתגבר על המערכת החיסונית של החרק הפונדקאי, וכדי להגן על גוויית החרק מספרופיטים שונים כגון חיידקים, נמטודות חופשיות וחרקים. החיידקים גם משמשים כמקור מזון לגדילה והתרבות. זחלים אינפקטיביים, ללא החיידק הסימביוטי, אינם מצליחים בדרך כלל לגרום להרג הפונדקאי, אך אם הם מצליחים, הם אינם מצליחים לגדול ולהתרבות (Han and Ehlers, 2000).

החיידק הסימביוטי יכול לשרוד שבועות רבים במעי של הזחל האינפקטיבי עד אשר הוא מופרש בתוך ההמוצל של זחל הפונדקאי והופך לפתוגני. הזחל האינפקטיבי של *H. bacteriophora* נושא כ-130-150 חיידקים סימביוטיים, בעיקר בחלק הקדמי של המעי (Ciche and Ensign 2003; Ciche, 2006). החיידק הסימביוטי מופרש דרך הפה בתהליך אקטיבי, המרמז על הקאה כחלק מתהליך ה-Recovery. ההפרשה האקטיבית מתרחשת בפולסים ויכולה להמשך עד 300 דקות, כאשר צברים של חיידקים או חיידקים בודדים מופרשים בקצב של סימביונט אחד בכל שתי דקות (Ciche and Ensign, 2003). האינטראקציה חיידק-נמטודה הינה ספציפית, הנמטודות מבחינות בין החיידק הסימביוטי לחיידק לא סימביוטי. בניסיון להבין את הגורמים לספציפיות זו, נמצאו כמה מוטנטים של חיידקי *P. luminescens* אשר אינם מועברים ע"י הנמטודות (Bennett and Clarke, 2005). אך המנגנון המאפשר את הזיהוי והספציפיות בין הנמטודה לחיידק עדיין אינו מובן. כמו כן עדיין לא ידוע איך החיידק אינו פתוגני לזחל האינפקטיבי או איך הוא אינו מעוכל במעי הזחל כאשר כל דרגות הנמטודה, למעט הזחל האינפקטיבי, ניזונות בעיקר מתאי החיידקים הסימביוטיים וממקרומוולקולות המסופקות ע"י החיידקים.

1.4 תהליך הפתוגניות של הנמטודות והחיידק הסימביוטי

הזחל האינפקטיבי של *H. bacteriophora* מסייר ותר אחר חרק פונדקאי מתאים בקרקע באופן אקטיבי. הוא חש רמות של CO₂ וחומרים נדיפים המשתחררים ע"י הפונדקאי, ונמשך גם לחומר E-beta-caryophyllene הנקרא טרפן המשתחרר משורשי צמחים כאשר הם נפגעים (Rasmann et al., 2005). כלומר, זחלים אינפקטיביים הם בעלי חישה כימית לא רק לגילוי הפונדקאי אלא גם למיקום שבו יש סבירות למצוא אותו.

כאשר הזחל האינפקטיבי נכנס לתוך ההמוצל של הפונדקאי, עליו להתמודד עם התגובה החיסונית של החרק (Li et al., 2007). התגובה החיסונית של החרק הפונדקאי מורכבת מתגובה תאית והומורלית. התגובה התאית כוללת פאגוציטוזה (בליעה ע"י המוציטים) ונודולציה (קשירה של המוציטים רבים לחיידק ליצירת צבר-aggregate). התגובה ההומורלית כוללת פפטידים אנטימיקרוביאליים כגון סקרופין (Cecropin) וכמו כן אנקפסולציה, ומלינזציה ע"י הפעלת מפל פנולאוקסידאז, (PPO) Prophenoloxidase cascade (Allen and MacDonald, 1998; Li et al., 2007), (ראה תמונה מס'

4). הנמטודה והחיידק הסימביונטי פועלים יחדיו כנגד המערכת החיסונית של החרק הפונדקאי. הנמטודה מונעת את תגובת השרשרת של פנולאוקסידאז, הדרושה לזיהוי של גורם זר ולמלניזציה וכמו כן את הפעילות האנטימיקרוביאלית של ההמולימפה (Jarosz, 1996) והחיידק הסימביונטי משפיע על המערכת החיסונית של הפונדקאי ע"י פעילות אנזימטית (Jarosz, 1998). *Photorhabdus* יכול למנוע פאגוציטוזה ע"י הפונדקאי, כנראה ע"י הריסת ההמוציטים של החרק או ע"י שיבוש יכולת הבליעה שלהם (Au et al., 2004).

על מנת להרוג את הפונדקאי וליצור סביבה אופטימאלית להתפתחות ולרביית הנמטודות בתוך זחל החרק, מפריש החיידק קומפלקס של רעלנים (Tcs) כנגד חרקים, RTX-like מתאלופרטאזות (Prt) ואנזימים שונים הכוללים ליפאזות, פרוטאזות, אנטיביוטיקות וליפופוליסכרידים (Bowen et al., 1998). החרק הפונדקאי מת תוך 24-48 שעות לאחר חדירת הנמטודות. כמו כן החיידק הסימביונטי מספק נישא מוגנת לו ולנמטודה ע"י ייצור חומרים אנטיביוטיים למניעת זיהומים ע"י חיידקים אחרים, נמטוצידים, המרחיקים נמטודות אחרות ואפילו חומרים המרתיעים נמלים המחפשות גויות חרקים (Ciche, 2007).

תמונה מספר 4: מלניזציה של זחלים אינפקטיביים שנמצאו בתוך פונדקאי



תמונה מס' 4: זחלים אינפקטיביים של *H. bacteriophora* אשר עברו מלניזציה ואנקפסולציה בתוך המולימפת החרק הפונדקאי. זחל של עש הדונג הגדול *Galleria mellonella*, ע"י פנול אוקסידאז (PPO). זהו אחד האנזימים החשובים במערכת החיסון של חרקים הגורם להיווצרות מלנין בהמולימפה, עוטף את הגורם הזר בקפסולה (encapsulation) ומונע ממנו להתפשט. צילום במיקרוסקופ אור הופכי (*inverted microscope*) הגדלה פי 10.

1.5 שימוש בנמטודות אנטומופתוגניות להדברה ביולוגית

בשני העשורים האחרונים מהווה הדברה ביולוגית חלופה סביבתית בטוחה יותר לקוטלי חרקים כימיים. הנמטודות מהסוגים *Heterorhabditis* ו-*Steinernema* הן בעלות תכונות רבות שהופכות אותן למדביר ביולוגי מצוין: הן פתוגניות לטווח רחב מאוד של חרקים אך לא מהוות איום לצמחים, לבעלי חוליות וליונקים.

(Kaya, 1993). הן מסוגלות לנוע בקרקע ולאתר באמצעות חישה כימית, ע"י קולטנים (כמורצפטורים) שעל פני גופן את הפונדקאי. אפשר לגדל נמטודות אלו *in-vitro* במצע מזון נוזלי, המכיל את החיידק הסימביונטי. הן בעלות יכולת רבייה גבוהה ואפשר לרבותן בביווראקטורים בתרבית נוזלית בנפחים גדולים של עשרות אלפי ליטרים. ניתן לאחסן את הזחלים האינפקטיביים למשך 3-4 חודשים וקל ליישם בשדה בשיטות פיזור וריסוס קונבנציונאליות (Ehlers, 2001) לשם הדברת מזיקים. טיפול בנמטודות אנטומופוטוגניות מיושם כיום בהדרים, בגידולי תות שדה, חמוציות, משתלות, ומשטחי דשא (Grewal et al., 2005).

בגידול של הנמטודות בביווראקטורים, התפתחות הזחלים בתרבית הראשונית וקצב הגידול אינם הדירים וקבועים; כתוצאה מכך, הגידול אינו סינכרוני, דבר הגורם להארכת זמן הגידול וליבולים לא יציבים, ומכאן לעלות גידול גבוהה (Ehlers, 1998). גורמים אלו מונעים שימוש רחב יותר בנמטודות אנטומופוטוגניות להדברה ביולוגית בגידולים מסחריים. הגורם העיקרי לחוסר היעילות בגידול הוא השיעור הנמוך יחסית (30%-50%) של הזחלים האינפקטיביים העוברים Recovery, המהווים את האינקולום הראשוני, לשלבי ההתפתחות הבאים בביווראקטור. לעומת זאת בחרק מתאים, כגון זחלי עש הדונג, נמצא בדרך כלל שכל הזחלים האינפקטיביים שחדרו לפונדקאי מתפתחים לבוגרים. הגדלת שיעור הזחלים האינפקטיביים שעוברים Recovery בביווראקטורים עשוי ליעל את תהליך הייצור של אורגניזם מועיל זה.

יש לציין שתהליך הגידול בחרק שונה מגידול בביווראקטור בכך שבראשון הזחלים האינפקטיביים נחשפים להמולימפת החרק ומפרישים לתוכה את החיידק מגופן, בעוד שבתהליך הגידול השני הזחלים האינפקטיביים נחשפים ישירות לתרחיף של חיידקים סימביונטיים הגדלים על גבי מצע מלאכותי.

במטרה ליעל את השימוש בנמטודות אנטומופוטוגניות ננקטות כמה גישות: השבחה בשיטות גנטיות לשיפור תכונות רצויות כגון שיפור ע"י סלקציה, השבחה ומוטגנזה, אך במקביל נעשות גם מניפולציות גנטיות. על מנת לנקוט בגישה של מניפולציה גנטית יש צורך בהבנת הבסיס המולקולארי של הגנים האחראים לתכונות אותם רוצים לשפר ולשנות. הדבר כולל בידוד ואפיון גנים המקודדים לתכונות רצויות, הבנת תפקידם והמנגנונים בהם הם מעורבים ולאחר מכן מניפולציה שלהם והחדרתם חזרה לזנים רצויים ע"י טרנספורמציה. כך ניתן ליצור נמטודות טרנסגניות המשופרות בתכונות רצויות.

1.6 מהו Recovery?

תהליך היציאה ממצב של זחל אינפקטיבי (הנמצא בעצירת התפתחות) וחידוש תהליך ההתפתחות נקרא "Recovery" או התחדשות ההתפתחות (Golden and Riddle, 1982). מרגע שהזחל האינפקטיבי חוזר לגוף זחל החרק מתחיל תהליך השראת התחדשות ההתפתחות וזחל הנמטודה מתחיל להתפתח לזחל מדרגה רביעית ובהמשך לבוגר (Dolan et al., 2002). התחדשות ההתפתחות בנמטודות פריזיות מושרה בכניסה לפונדקאי ע"י גורמים לא ידועים בהמולימפת הפונדקאי (Tissenbaum et al., 2000).

עצירת ההתפתחות, הינה מצב התפתחותי אלטרנטיבי של האטה מטבולית הקיים במגוון רחב של בעלי חיים, שפיתחו מצב זה על מנת להתמודד עם תנאי סביבה שאינם מאפשרים גדילה והתפתחות. עצירת התפתחות הינה מרכיב עקרי באסטרטגיה הפיזיולוגית להישרדות והיא תורמת לגמישות במחזור החיים,

בהתאמה לשינויים סביבתיים. כמו כן עצירת התפתחות ופיזור הן תכונות נפוצות במגוון רב של נמטודות חופשיות ופרזיטיות. בנמטודות פרזיטיות עצירת ההתפתחות היא שלב הכרחי במחזור החיים והיא מתרחשת לרוב בשלב הזחל האינפקטיבי, המקביל לזחל בדרגת dauer בנמטודה החופשייה *Caenorhabditis elegans* (ראה פירוט בהמשך 1.6.4) (Sommerville, 2002). בתהליך ה-Recovery מסתיימת תקופת עצירת ההתפתחות והזחל המדביק מתפתח ומשלים את מחזור החיים של הנמטודה בפונדקאי. היציאה ממצב של עצירת התפתחות מסמנת את החזרה לגדילה ולהתפתחות וכמו כן את המעבר מדרגה חופשית לטפילות.

עד היום ידועים מעט מאוד מחקרים על תהליך ה-Recovery (Dolan et al., 2002; Datu et al.,) (2008; Datu et al., 2009; Kikuta, 2009; Hao et al., 2010) בנמטודות טפיליות ועוד פחות על הגנים והמנגנונים המולקולאריים המוסתים את התהליך. מחקר זה הינו הראשון המתרכז בנושא זה בנמטודה האנטומופתוגנית *H. bacteriophora*.

1.6.1 גורמים המשרים את תהליך ה-Recovery בנמטודות טפיליות שונות

תהליך ה-Recovery בנמטודות הפרזיטיות השונות תלוי בגורמים שונים בפונדקאי, כגון מצב התפתחותי, מערכת החיסון, דרגה, מיקום בגוף הפונדקאי ועוד. האינטראקציה טפיל-פונדקאי היא לרוב ספציפית, הנמטודות חשות את סביבתו הפנימית של הפונדקאי, מצבו הפיזיולוגי, מתחמקות מתגובתו החיסונית ואם התנאים מתאימים הן מתפתחות ומתרבות. הזחל האינפקטיבי בנמטודות פרזיטיות שונה מורפולוגית, התנהגותית ופונקציונאלית מזחלים בדרגות אחרות. זוהי לרוב הדרגה השורדת מחוץ לפונדקאי ומתאמת לחיפוש פונדקאי חדש וזוהי גם הדרגה אשר בה מתרחש תהליך ה-Recovery. להלן כמה דוגמאות:

מיקום הטפיל בגוף הפונדקאי - בנמטודות טפילות על יונקים כגון *Ancylostoma caninum* השייכת לקבוצת ה-Hookworms והטפילה על כלבים ובני אדם, עצירת ההתפתחות מתרחשת בזחל המדביק, שהינו זחל מדרגה שלישית, המותאם לחיים בקרקע ולחזירה לפונדקאי. לאחר כניסתו לפונדקאי הזחל נודד בזרם הדם לריאות ומשם למערכת העיכול. רק לאחר שהזחל האינפקטיבי הגיע למערכת העיכול ונצמד לדופן המעי, מתחיל תהליך ה-Recovery שבמהלכו הזחל ניזון וממשיך את התפתחותו. כלומר, השראת ההתפתחות בנמטודה זו הינה תלויה מקום בתוך הפונדקאי, ורק בדופן המעי מצויה הסביבה מתאימה והסיגנלים הנכונים להשראת תהליך ה-Recovery ולהמשך ההתפתחות (Moser et al., 2005; Datu et al., 2008).

סוג הפונדקאי - בנמטודה *Toxocara canis*, שגם היא טפילה על כלבים, הכניסה לפונדקאי היא בשלב הביצה, באופן אורלי (Maizels et al., 2000). אם הביצה נאכלת ע"י פונדקאי שאינו ממשפחת הכלביים, הזחל בוקע, שומר על מטבוליזם פעיל אך אינו מתפתח, אינו משלים מחזור חיים ויכול להישאר במצב של עצירת התפתחות עד 9 שנים. אם החיה (עכבר, שועל) תאכל ע"י כלב אזי הזחל יעבור Recovery, יתפתח בתוך הכלב וישלים את מחזור חייו (Maizels et al., 2000). כלומר השראת ההתפתחות הינה תלויה בפונדקאי, רק בפונדקאי המתאים ישנם הסיגנלים הנכונים ל-Recovery ולהמשך ההתפתחות.

נמטודה נוספת הטפילה על בני אדם היא *Brugia malayi* הנושאת את החיידק הסימביוטי *Wuchereria bancrofti* וגורמת למחלת האלפנטיזיאזיס (דלקת חמורה בצינורות לימפטיים הגורמת להגדלת האיבר בצורה קיצונית). נמטודה זו נישאת ע"י יתוש ומועברת לדם הפונדקאי האנושי ע"י עקיצה. הדרגה המדביקה היא זחל מדרגה שלישית הנמצא בעצירת התפתחות ביתוש המשמש כווקטור. רק כאשר זחל זה נכנס לפונדקאי האנושי הוא עובר Recovery והנמטודה מתפתחת ומשלימה את מחזור חייה (Blaxter et al., 1996).

השפעת מצב מערכת החיסון - אחת מהנמטודות הטפילות על בני אדם ומהווה בעיה בריאותית היא *Strongyloides stercoralis*. מעריכים שכמאה עד מאתיים מיליון בני אדם נושאים אותה. לנמטודה זו מחזור חיים חופשי בקרקע ומחזור חיים טפילי. כאשר תנאי הסביבה טובים מתקיים מחזור החיים המלא בקרקע, אך כאשר תנאי הסביבה קשים נוצר זחל מדביק. זחל זה שאינו ניזון ומצוי בעצירת התפתחות חודר דרך העור וגורם להדבקה הראשונית. הזחל נודד למערכת העיכול, אך לא מתפתח ולפעמים סימפטומים של ההדבקה לא נראים גם לאחר שנים, אך כאשר מערכת החיסון נחלשת, הפרזיט מתבסס וגורם לדלקת חמורה במעי (Genta, 1992). רק כאשר מערכת החיסון נחלשת, נוצרים התנאים המתאימים לזחל המדביק לעבור Recovery ולהתפתח לנקבה, אשר מתרבה ברבייה לא מינית. כלומר, תהליך ה-Recovery של הזחל המדביק תלוי במצב בריאותו של הפונדקאי.

מקום ההזנה - בנמטודות הטפילות על צמחים עצירת ההתפתחות היא לרוב בדרגה שנייה, אשר נמצאת עדיין בביצה. כאשר תנאי הקרקע מתאימים, זחלים מדרגה שנייה בוקעים ומאתרים את הצמח הפונדקאי בקרקע. בנמטודה *Globodera rostochiensis* הטפילה על צמחים, הדרגה המדביקה הנמצאת בעצירת התפתחות היא זחל מדרגה שנייה אשר מתאפיין ביכולת תנועה. הזחל חודר לשורש הצמח ונודד לאתר ליד הרקמה הוסקולארית ליצירת אתר אכילה קבוע. רק לאחר שהאכילה החלה, הנמטודה הופכת לישובה ומתפתחת דרך שלוש דרגות זחל לבוגר (Williamson and Hussey, 1996). כלומר, לנמטודה זו דרושים שני סיגנלים לתהליך, האחד לבקיעה מהביצה שמגיע מהקרקע והשני להתיישבות ולהמשך ההתפתחות שמגיע לאחר הזנה מהצמח.

דוגמאות אלה ממחישות עד כמה האינטראקציה טפיל-פונדקאי הינה ספציפית ועד כמה האותות הנקלטים מהפונדקאי חשובים לתהליך ה-Recovery. רק כאשר התנאים בפונדקאי "נכונים", הנמטודה עוברת את תהליך ה-Recovery, יוצאת ממצב של עצירת התפתחות ומשלימה את מחזור חייה בפונדקאי.

1.6.2 תהליך ה-Recovery כמאפיין את האינטראקציה טפיל-פונדקאי

תהליך ה-Recovery מאפיין את המעבר מהשלב של זחל חופשי לצורה הטפילית של הנמטודה. האינטראקציה טפיל-פונדקאי בנמטודות אנטומופוטוגניות מאופיין בשני שלבים. בשלב הראשון הנמטודה חודרת לפונדקאי, חשה את סביבת הפונדקאי, מזהה את הסיגנל לתחילת תהליך ה-Recovery. בשלב השני הזחל האינפנטיבי מתפתח לזחל מדרגה רביעית.

כדי שתהליך ה-Recovery יתחיל יש צורך בסיגנל (שטיבו אינו ידוע) מהמולימפת החרק. האות או האותות אשר גורמים לתחילת התהליך ולהפרשת החיידק הסימביוטי נמצאים בהמולימפה של כל פרוקי

הרגליים ובכל הנוזלים של תרביות תאי חרקים שנבדקו, אך לא בדמם של בעלי חוליות או בנוזל תרבית חיידקים של *P. luminescens*. נמצא גם שחומר זה עמיד לחום ולפירוק ע"י פרוטאז ושמסקלו המולקולארי קטן מ-500 kDa (Ciche, 2007).

הנמטודה צריכה להתחמק או לגבור על מערכת החיסון של החרק ולהגן על החיידק הסימביוטי המופרש. כאשר הנמטודה חודרת לזחל של חרק שאינו רגיש היא אינה מצליחה לגבור על מערכת החיסון של החרק והוא אינו מוטפל. כדי לשרוד בפונדקאי, יש לטפיל שתי אסטרטגיות; האחת התחמקות ממערכת החיסון והשנייה דיכוי התגובה החיסונית (Blaxter et al., 1992). יכולת דיכוי התגובה החיסונית של הפונדקאי הינה תוצאה של האינטראקציה טפיל-פונדקאי וחושבים שהיא נעשית ע"י שחרור של סידרת מולקולות המשנות פקטורים של מערכת החיסון בפונדקאי (Allen and MacDonald, 1998). התחלתו והצלחתו של תהליך ה-Recovery תלוי באינטראקציה טפיל-פונדקאי. הסיגנל הנקלט מהפונדקאי משרה את התהליך באופן טבעי והתחמקות/התגברות ממערכות ההגנה של הפונדקאי מאפשרות את המשך התהליך עד להשלמת התפתחותה של הנמטודה.

1.6.3 תהליך ה-Recovery ב-*H. bacteriophora*

כפי שכבר תואר תהליך ה-Recovery ב-*H. bacteriophora* מתחיל לאחר איתור פונדקאי מתאים וכניסת הזחל האפקטיבי לפונדקאי. עם כניסתו לפונדקאי משיל הזחל האינפקטיבי קוטיקולה שנשארה מהדרגה הקודמת J2 ונשאר עם קוטיקולה אחת (Ciche, 2007). בהמולימפת החרק הזחל חש את הסביבה ע"י נוירונים כמוסנסוריים הנמצאים באיבר החישה שלו והחשופים לסביבה (Hallem et al., 2007). הזחל האינפקטיבי מגיב לפקטור לא ידוע המצוי בהמולימפת החרק ותהליך ה-Recovery מתחיל. גפי הפה נפתחים, מערכת העיכול הופכת פעילה והחיידק הסימביוטי מופרש לאחר 30 דקות מכניסת הזחל האינפקטיבי לחרק הפונדקאי, בזמן זה הנמטודה מתחמקת מהתגובה החיסונית של הפונדקאי. לאחר שהחיידק מתרבה, הזחל האינפקטיבי מחדש את התפתחותו, ניזון, מתפתח לזחל מדרגה רביעית ולאחר מכן לנקבה הרמפרודיטית.

מחקרים קודמים הראו שכמו ב-*C. elegans*, בזחל אינפקטיבי של הנמטודה הטפילה בבני אדם *Strongyloides stercoralis* ובזחל אינפקטיבי של *H. bacteriophora* תהליך ה-Recovery מתווך ע"י נוירונים כמוסנסוריים-ASJ הנמצאים באיברי חישה והחשופים לסביבה (Tissenbaum et al., 2000; Hallem et al., 2007). האותות מהסביבה (בנמטודות פרזיטיות מהפונדקאי) נקלטים ע"י הנוירונים הכמוסנסוריים והסיגנל להתחדשות ההתפתחות מועבר למסלולי הבקרה הגנטיים ולתאים וההתפתחות מתחדשת.

עוד נמצא כי הומולוג של cGMP משרה את תהליך ה-Recovery ב-*H. bacteriophora* ותהליך מבוקר גם ע"י רצפטורים מוסקרניניים של אצטיל כולין (muscarinic acetylcholine receptors). מוסקרניניים הם אגוניסטים (נקשרים לרצפטורים של אצטיל כולין) וגורמים להשראת תהליך ה-Recovery, כנראה דרך מסלול הומולגי למסלול גואניליל ציקלאז (Guanylyl ceclase) הידוע בנמטודה *C. elegans* (ראה 1.7.1 בהמשך) (Tissenbaum et al., 2000; Hallem et al., 2007).

למרות הראיות המצביעות על הדמיון במסלולי הבקרה של תהליך ה-Recovery, המסלולים המבקרים את התהליך לא נבדקו מבחינה מולקולארית והגנים המעורבים במסלולים אלה לא ידועים.

1.6.4. תהליך ה-Recovery ב-Caenorhabditis elegans

הנמטודה חופשייה *C. elegans* חיה בקרקעות עשירות בחיידקים וניזונה מהם. נמטודה זו שהינה אורגניזם רב-תאי, אאוקריוטי, שקוף ופשוט יחסית, הינה אחד היצורים הרב-תאיים הנחקרים ביותר בעולם והיא משמשת כאורגניזם מודל ללימוד אנטומיה, גנטיקה וביולוגיה התפתחותית ומולקולארית. רצף הגנום של נמטודה זו ידוע (*C. elegans* Consortium, 1998) נמטודות מהמינים *C. elegans* ו-*H. bacteriophora* קרובות יחסית מבחינה פילוגנטית ומשתייכות לאותה קבוצה (clade) בתוך משפחת ה-Rabditoida (Kiontke and Fitch, 2005).

כאשר תנאי הגידול טובים, *C. elegans* מתפתחת תוך שלושה ימים מביצים מופרות דרך ארבעה שלבי זחל (J1-J4) לנקבה הרמפרודיטית בוגרת המסוגלת ע"י הפריה עצמית להעמיד כ-300 צאצאים. כאשר תנאי הסביבה אינם מתאימים לרבייה, דהיינו צפיפות האוכלוסייה גבוהה, ואספקת המזון מוגבלת, משתנה התפתחות הנמטודה. זחל מדרגה שנייה מתפתח לזחל מדרגה שלישית שונה, שמבחינה התפתחותית נמצא בעצירת התפתחות ומותאם להישרדות לזמן ארוך ולפיזור. זחל זה נקרא dauer juvenile "זחל מתמיד/עמיד" (dauer מהמילה בגרמנית enduring) והוא שונה מורפולוגית והתנהגותית מזחל מדרגה שלישית, גופו צר ודמוי מחט, בעל קוטיקולה עבה, גפי הפה שלו חסומים והוא אינו ניזון (Riddle, 1997). שלושה גורמים סביבתיים משפיעים על היווצרות זחל ה-dauer; צפיפות האוכלוסייה, אספקת המזון והטמפרטורה. הגורם העיקרי המשפיע על עצירת ההתפתחות הוא צפיפות האוכלוסייה, והוא בא לידי ביטוי בפרומון המסוננת קונסטיטוטיבית ומשוחרר ע"י הנמטודות. ריכוז ההורמון משקף את צפיפות האוכלוסייה; כאשר צפיפות הנמטודות גבוהה ורמת הפרומון המופרש גבוהה הוא משרה יצירת זחל עמיד ומונע Recovery של זחלים אינפקטיביים הנמצאים בעצירת התפתחות. לעומת זאת, food signal המשוחרר ע"י חיידקים, משקף את זמינות המזון, מונע יצירת זחל dauer ומקדם Recovery של זחלים אינפקטיביים הנמצאים בעצירת התפתחות. הכמויות היחסיות של פרומון ו-food signal הן הקובעות אם זחל J1 יעבור למצב של עצירת התפתחות ויתפתח בסופו של דבר לזחל dauer (Golden and Riddle, 1982). הטמפרטורה מווסתת את התגובה למאזן הורמון/food signal, ולכן טמפרטורה גבוהה מגבירה את עצירת ההתפתחות התלויה בפרומון ולהיפך. ידוע כי התחלת תהליך ה-Recovery מווסת ע"י נויירונים כמוסנסוריים אשר חשופים לסביבה (Schackwitz et al., 1996). גם כניסה וגם יציאה ממצב של זחל אינפקטיבי הם תגובות התפתחותיות לגירויים ע"י אותות כמוסנסוריים, אותות אלה מיידעים את הזחל אם יש או אין מספיק מזון ותנאים סביבתיים המאפשרים רבייה (Riddle, 1997). האותות הסביבתיים הנקלטים ע"י הנוירונים הכמוסנסוריים שמוסטים שעתוק גנים המקודדים לליגנדים שונים, המפעילים את המסלולים הגנטיים המווסטים כניסה למצב של זחל dauer ויציאה ממנו (Liu et al., 2004).

1.7 מסלולים גנטיים המווסתים כניסה למצב של זחל dauer ויציאה ממנו ב-*C. elegans*

אנליזה גנטית ע"י מוטנטים הובילה למציאת גנים ומסלולים המווסתים עצירת התפתחות ויצירת זחל dauer בנמטודה *C. elegans*. מרכיבים ממסלולים אלה ששובטו ואופיינו, מגלים פעולה ותגובה הדדית מורכבת של לפחות ארבעה מסלולי העברת אותות המווסתים יצירת dauer (Hu, 2007). עד כה זוהו יותר משלושים גנים השולטים ביצירת זחל dauer ורובם מכונים *daf* genes (dauer formation) (Riddle, 1997). להלן ארבעת המסלולים העיקריים.

1.7.1 מסלול גואניליל ציקלאז (Guanylyl ceclase)

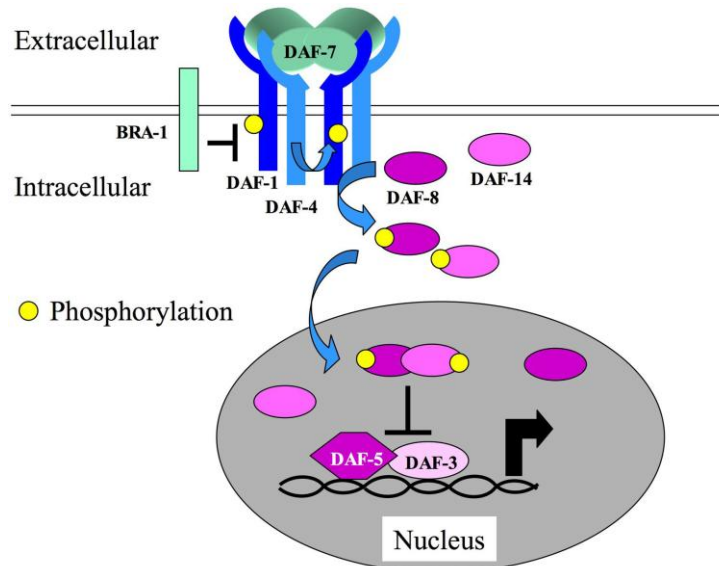
מסלול גואניליל ציקלאז (Guanylyl ceclase) מונע עצירת התפתחות ומקביל (לפחות בחלקו) למסלול TGF β -like שגם הוא מווסת עצירת התפתחות ו-Recovery. מסלול זה מתחיל בגן *daf-11* וכולל את הגנים: *daf-1*, *daf-4*, *daf-7*, *daf-8* ו-*daf-14* (ראה תמונה מס' 6 בעמ' 14). הגן *daf-11* מקודד לגואניליל ציקלאז טרנסממברנלי, זהו אנזים אשר מקטלז יצירה של cyclic GMP (cGMP) המתבטא בנירונים הכמוסנסוריים. Cyclic GMP הוא שליח משני הנפוץ בוויסות של קינאזות, נוקליאוטיד ציקלאזות, cyclic nucleotide phosphodiesterases ו-cGMP-gated ion channels המשחררות אצטיל כולין (Birnbay et al., 2000). שיחרור האצטיל כולין מהווה סיגנל שכנראה מפעיל סיגנל של מסלול ה-Insulin like המביא בסופו של דבר ל-Recovery של זחל dauer- (Tissenbaum et al., 2000). פגיעה בגן *daf-11* גורמת למצב של זחל dauer קונסטיטטיבי. החלבון DAF-11 מונע עצירת התפתחות ע"י אקטיבציה של החלבונים TAX-2 ו-TAX-4 דרך עלייה בסנתזה של cGMP. הגנים *tax-2* ו-*tax-4* מקודדים לתת יחידות של cGMP בשער של תעלות יונים, המווסתות חישת חום, חישת כימית, והתפתחות ניורונים תחושתיים באברי החישה (amphides). *daf-11* מפעיל כנראה תאים רבים בקצות העצבים, התורמים למניעת עצירת התפתחות ולמניעת היווצרות של זחל dauer (Birnbay et al., 2000). תפקידם של הגנים הנוספים במסלול יתוארו במסלול ה-TGF β -like בהמשך.

1.7.2 מסלול TGF β -like (Transforming Growth Factor- β)

מסלול TGF β -like, המווסת עצירת התפתחות ומוגדר ע"י הגנים *daf-1*, *daf-4*, *daf-7*, *daf-8* ו-*daf-14* אשר בפגיעתם מתקבל פנוטיפ של זחל dauer קונסטיטטיבי, וע"י הגנים *daf-3* ו-*daf-5* אשר פגיעה בהם גורמת להיווצרות זחל dauer פגוע. ליגנדים ממשפחת TGF β נקשרים ומפעילים רצפטורים בעלי פעילות של סרין/טראונין קינאז הנמצאים על פני שטח התא וגורמים לפוספורילציה והפעלה של פקטורי שעתוק SMAD המועברים לגרעין כדי לווסת שעתוק. תפקידו של הגן *daf-7* המקודד ל-TGF β ליגנד, הוא לקדם התפתחות רציפה ולמנוע היווצרות זחל dauer. כאשר תנאי הסביבה מתאימים להתפתחות, DAF-7 מתבטא בניורונים תחושתיים הנמצאים באברי החישה (amphid) שבקדמת ראש הנמטודה, שתפקידם הוא חישת אותות מהסביבה. ביטוי של DAF-7 מדוכא כאשר תנאי הסביבה אינם טובים להתפתחות, דבר המביא לאיבוד כל המסלול וליצירת זחל dauer. הגנים *daf-1* ו-*daf-4* מקודדים לרצפטורים של TGF β מסוג I ומסוג II

בהתאמה. הגנים *daf-8*, *daf-3* ו-*daf-14* מקודדים לפקטורי שעתוק SMAD. ליגנדים ממשפחת TGFβ נקשרים ומפעילים רצפטורים הטרומריים בעלי פעילות של סרין/טראונין קינאז הנמצאים על פני שטח התא. כתוצאה מכך פקטורי שעתוק SMAD עוברים פוספורילציה ואקטיבציה, מועברים לגרעין ומוסטים שעתוק. תפקידם של DAF-8 ו-DAF-14 הוא בהעברת הסיגנל של *daf-7* ואילו פעילות DAF-3 מווסתת באופן שלילי ע"י המסלול (ראה תמונה מספר 5). הגן *daf-5* הינו בעל הומולוגיה למשפחת אונקוגנים Sno/Ski, המווסת באופן שלילי מעבר סיגנלים של TGFβ בעלי חוליות. DAF-5 עובר אינטראקציה פיזית עם DAF-3 כדי לקדם התפתחות רציפה של הזחל. הגן *daf-12*, הנמצא בסוף המסלול והמושפע גם ממסלולים נוספים, מקודד לרצפטור להורמון בגרעין אשר דרוש לוויסות של אספקטים רבים, ספציפיים לדרגה, בהתפתחות הנמטודה. הלוקוס של הגן *daf-12* מורכב מאוד ומקודד לאיזופורמים רבים ע"י alternative splicing. (Liu et al., 2004; Savage-Dunn, 2005).

תמונה מספר 5: מסלול TGFβ-like



תמונה מס' 5. DAF-7 מקדם התפתחות רציפה ומונע היווצרות זחל dauer. סיגנל של DAF-7 מועבר ע"י DAF-1 שהוא רצפטור מסוג I, DAF-4 שהוא רצפטור מסוג II, וע"י DAF-8 ו-DAF-14 שהם פקטורי שעתוק Smad. כאשר רכיבים אלה מופעלים במסלול, הם מונעים את הפעילות של DAF-3 Smad ושל DAF-5 Sno/Ski, אשר מקדמים התפתחות זחל dauer. האיור נלקח מתוך (Savage-Dunn, 2005).

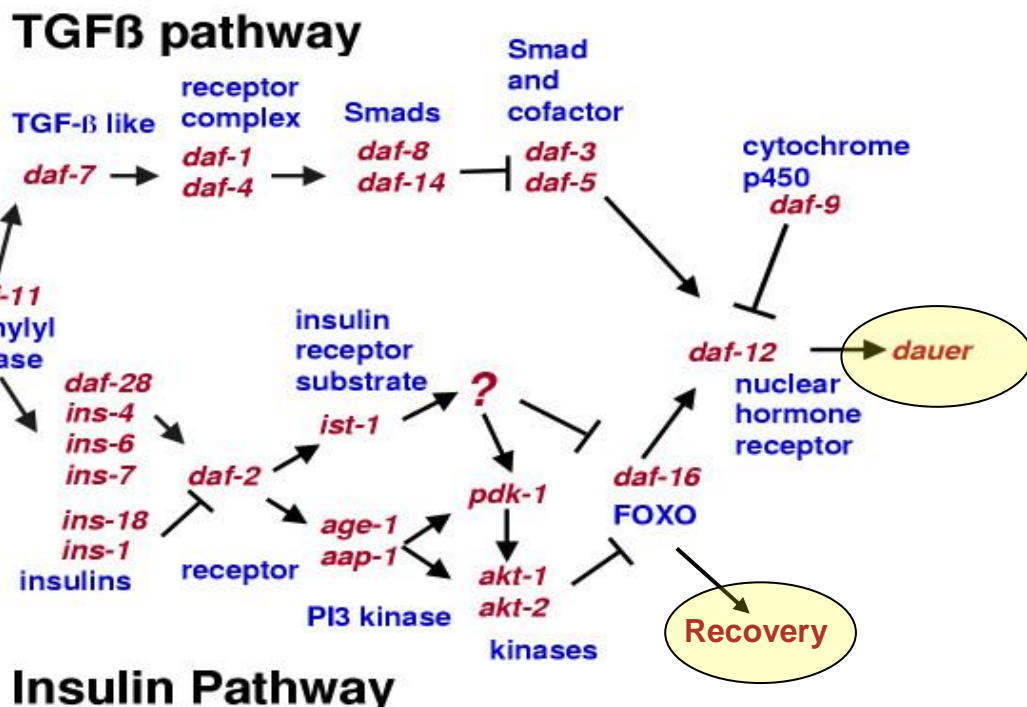
1.7.3 מסלול Insulin-like

במסלול insulin-like מעורבים הגנים: *daf-2*, *age-1*, *(daf-23)*, *pdk-1*, *ist-1*, *akt-1*, *akt-2* ו-*daf-16*. מסלול זה מקביל למסלולים גואניליל ציקלאז ו-TGFβ-like (ראה תמונה מס' 6 בעמוד הבא). מוטציות המשפיעות על מסלול זה שונות פנוטיפית ממוטציות הגורמות ל-*dauer* קונסטטוטובי, בכך שהן גורמות להיווצרות זחל dauer ללא התניות וללא אפשרות לצאת ממצב זה ולהמשיך להתפתח. בנוסף, מוטנטים במסלול *daf-2* הם בעלי תוחלת חיים ארוכה. הגנים במסלול זה מגדירים מסלול שמור, המונע עצירת התפתחות ע"י אקטיבציה של DAF-2 שהוא הומולוג לרצפטור אינסולין, אקטיבציה של AGE-1

שהוא פוספואינוזיד 3-קינאז (PI3K) ואקטיבציה של פרוטאין קינאזות; PDK-1, AKT-1 ו-AKT-2. שלושת הקינאזות הנ"ל מווסתות באופן שלילי את פעילותו של DAF-16, שהוא פקטור השעתוק FOXO. כאשר DAF-16 פעיל הוא עובר לגרעין ומתפקד כרפרסור לשעתוק גנים הדרושים להתפתחות הזחל, וכתוצאה מכך ההתפתחות נעצרת ונוצר זחל dauer. כאשר DAF-16 אינו פעיל הוא נשאר בציטופלזמה, וכתוצאה מכך גנים הדרושים להמשך התפתחות הזחל משועתקים, (לא נוצר זחל dauer) וההתפתחות ממשיכה משלבי הזחל לבוגר (Hu, 2007). ראה תמונה מספר 6.

ישנן עדויות משמעותיות שגם גנים ממשפחת *ins* (insulin) מווסתים עצירת התפתחות, למרות שמחקרים על גנים אלו מסובכים בגלל ריבויים ותפקידים החופף. הגן *ins-1* מקודד לחלבון INS הדומה ביותר מכל חלבוני ה-INS לאינסולין הומאני ב-*C. elegans*. ביטוי ביתר של חלבון זה או של *ins-18* גרם להגברת עצירת התפתחות, בעוד שביטוי ביתר של *ins-9*, *ins-22*, *ins-19* או *ins-31* לא היה בעל אותה השפעה. רבים מהגנים האלו מבוטאים בנוירונים הנמצאים באברי החישה, דבר המרמז כי תנאים סביבתיים המווסתים dauer יכולים לווסת גם ביטוי או/ו הפרשה של אינסולין. הגן *daf-28* מקודד ל-INS, המקדם מעבר סיגנלים במסלול האינסולין ומווסת שלילית ע"י פרומון והרעבה. חלבוני INS-4 ו-INS-6 מתפקדים באופן דומה ל-DAF-28, המקדם מעבר סיגנלים במסלול האינסולין. INS-7 מקדם כנראה את התפתחות הזחל. התפקיד הביולוגי של רוב החלבונים הנוספים הדומים לאינסולין עדיין לא ידוע (Hu, 2007).

תמונה מספר 6: מסלולים המווסתים dauer בנמטודה *C. elegans*



תמונה מס' 6: היחסים בין הגנים מבוססים על פנוטיפים של מוטנטים ואינטראקציות גנטיות, ביטוי גנים במוטנטים, והומולוגיה למסלולים באורגניזמים אחרים. האיור נלקח מתוך (Liu et al., 2004).

1.7.4 מסלול הורמון סטרואידי (steroid hormone)

במסלול זה משתתפים הגנים *daf-9* ו-*daf-12* הנמצאים במורד ביחס לשאר החלבונים המווסתים עצירת התפתחות והם נחשבים ליחידה נפרדת משאר שלושת המסלולים. ישנן עדויות התומכות בכך ש-*DAF-9* ו-*DAF-12* משתתפים במסלול הורמון סטרואידי המווסת עצירת התפתחות. *DAF-9* אינו עצמאי בתפקודו במניעת עצירת ההתפתחות, דבר זה מתיישב עם השפעותיו המתווכות ע"י הורמון. *daf-9* מקודד לציטוכרום P450 הדומה לסטרואיד הידרוקסילאז, ו-*daf-12* מקודד לרצפטור גרעיני עם אתר קישור לדנ"א, והוא בעל הומולוגיה גבוהה לרצפטורים: pregnane X ולוויטמין D מחולייתנים. כמו כן אתר הקישור של *daf-12* לליגנד, הינו בעל הומולוגיה גבוהה לרצפטורים של הורמון תירואיד בחולייתנים. באופן רגיל *DAF-9* מונע פעילות של *DAF-12* (תמונה מספר 6). לאחרונה זוהו סטרואידיים אנדוגניים שהם מטאבוליטים של *DAF-9* וליגנדים בעלי אפניות גבוהה ל-*DAF-12* (Hu, 2007).

לסיכום, כניסה למצב של זחל בעצירת התפתחות ויציאה ממצב זה תלויים באותות כמוסנסוריים הנקלטים מהסביבה ע"י נוירונים תחושתיים חשופים. נוירונים אלה מעבירים סיגנלים למסלולים גנטיים שונים המווסתים את ה-Recovery, ולבסוף לתאים מפרישים או לאברי מטרה, המשתנים ועוברים שינוי מטאבולי בהתפתחות הזחל (Tissenbaum et al., 2000). בנמטודות אנטומופתוגניות אות/אותות אלה נמצאים בהמולימפת החרק הפונדקאי וזהותם אינה ידועה.

המסלולים המווסתים את תהליך ה-Recovery הם מרובים וחופפים, ועדיין לא מובנים במלואם. ההחלטה של כניסה למצב או יציאה ממצב של זחל אינפקטיבי הינה הרת גורל מבחינת הנמטודה ואינה הפיכה. משום כך היא מבוקרת בכמה רמות וע"י כמה מסלולים ועדיין לא נבדקה בנמטודות אנטומופתוגניות. כמו כן, המחקרים שנעשו על זחל dauer בנמטודה *C. elegans* עוסקים יותר בגורמים לכניסה למצב של זחל זה ובעצירת ההתפתחות כמאריכה חיים ופחות בגורמים המווסתים את היציאה ממצב זה: תהליך ה-Recovery. הידע וההבנה של תהליך זה בנמטודות טפילות מועטים כיום ונדרש מחקר נוסף בנושא זה.

בעבודה שנעשתה ע"י Bai et al. נבדק הטרנסקריפטום של הנמטודה *H. bacteriophora* בדרגת הבוגרים. בעבודה זו נמצאו כמה גנים הומולוגיים לגנים הידועים כי מעורבים ב-Recovery בנמטודה *C. elegans* (Bai et al., 2009). ידוע כי ישנם מסלולים המווסתים את תהליך ה-Recovery השמורים לאורך האבולוציה ולכן הם צפויים להימצא גם ב-*H. bacteriophora* אך עד כה לא אומתה הימצאותם של מסלולים אלה בנמטודה זו. עד כה לא נעשו עבודות לבדיקת הגנים המבקרים או המשתתפים בתהליך ה-Recovery בנמטודה האנטומופתוגנית *H. bacteriophora*. ידוע כי יש דמיון בבקרת התהליך בהשוואה לנמטודות אחרות, אך לא ידוע עד כמה דומים המסלולים המווסתים תהליך זה בנמטודות השונות.

נמטודות פריזיות מונות משפחה גדולה של פתוגנים המדביקים פונדקאים שונים; מצמחים, חרקים, יונקים ועד בני אדם והן גורמות לנזק כלכלי ברחבי העולם ולסיכון בריאותי. תהליך ה-Recovery שמתרחש בכל הנמטודות הטפילות הינו שלב מכריע בהתפתחות הנמטודות בפונדקאי, ותלוי במצבו של

הפונדקאי. האינטראקציה בין הנמטודה לפונדקאי קובעת האם תהליך ה-Recovery יתרחש והאם הנמטודה תמשיך להתפתח ולהשלים את מחזור חייה בפונדקאי. לימוד מעמיק של שלב חיוני זה בנמטודות בעלות חשיבות רבה לאדם (הן כפתוגניות והן כמועילות) יאפשר מציאת דרכים להתמודדות עם התהליך, לעידודו או למניעתו.

מכיוון שנמטודות אנטומופתוגניות מהמין *H. bacteriophora* יכולות להשלים את מחזור חייהן כאשר הן ניזונות מהחיידק הסימביוטי שגדל על מצע מזון מלאכותי (*in vitro*) (בניגוד לאורגניזמים פרוזיטיים אחרים או לנמטודות טפילות על צמחים), הן קלות יחסית לגידול מעבדתי והן יכולות לשמש כמודל להבנת יחסי טפיל פונדקאי. הבנה של המנגנון המולקולארי של תהליך ה-Recovery המאפיין את האינטראקציה טפיל-פונדקאי בנמטודות אנטומופתוגניות, יכולה לעזור בהבנת מנגנונים דומים בנמטודות טפילות אחרות.

1.8 מטרות המחקר

H. bacteriophora הינה נמטודה אנטומופתוגנית חשובה הן מבחינה מדעית - ללימוד האינטראקציה טפיל-פונדקאי והן מבחינה כלכלית, שכן היא משמשת להדברה ביולוגית בגידולים רבים. תהליך ה-Recovery חשוב גם להבנת האינטראקציה טפיל פונדקאי וגם להבנת התפתחות הנמטודות בתהליך הגידול המסחרי. אפיון הגנים המתבטאים בדרגת הזחל האינפקטיבי, במהלך המעבר מדרגה חופשייה לדרגה טפילית, יכול לעזור גם במציאת גנים הקשורים בחזירה, נדידה, התיישבות והישרדות של נמטודות טפילות שונות. לימוד מעמיק של הגנים המעורבים בתהליך זה עשוי לאפשר להשפיע על התהליך ומתוך כך לשפר את יעול תהליכי הגידול. מטרתה של עבודה זו הייתה לזהות גנים וחלבונים המעורבים בתהליך ה-Recovery. מטרת המחקר הספציפיות הן:

1. זיהוי ובידוד גנים המשתתפים בתהליך ה-Recovery, בנמטודה *H. bacteriophora*.
2. אפיון השעתוק של גנים אלו בתהליך ה-Recovery.
3. עריכת מבחנים פונקציונאליים לגנים שנמצאו מתבטאים בתהליך ה-Recovery ע"י השתקתם במערכת של RNAi.
4. זיהוי חלבונים המשתתפים בתהליך זה.

לימוד האינטראקציה של נמטודות אנטומופתוגניות עם הפונדקאי, על ידי הבנת תהליך ה-Recovery, תביא להבנה רחבה יותר של יחסי טפיל-פונדקאי גם במערכות אחרות שהתפתחו לאורך האבולוציה כגון בנמטודות טפילות על יונקים. מההיבט היישומי הבנת מנגנון ה-Recovery והגורמים המשפיעים על תהליך זה, יעזרו בייעול הגידולים המסחריים של נמטודה זו, להורדת העלויות של ייצור הנמטודות וע"י כך להגברת השימוש במדביר ביולוגי זה ובסופו של דבר להקטנת השימוש בקוטלי חרקים כימיים.

2. חומרים ושיטות המחקר

2.1 זני נמטודות ושיטות גידול

הנמטודות במחקר הנוכחי הן *Heterorhabditis bacteriophora* מזן TTO1 והחיידק הסימביונטי הטבעי שלהן *Photorhabdus luminescens* subsp. *Laumondii* TT01. מקור האוכלוסייה במעבדתו של ד"ר D. Clark (אוניברסיטת Bath, אנגליה). זן נמטודות זה נבחר מאחר והוא גם משמש מקור לריצוף הגנום של הנמטודות ממין זה בפרוייקט שנערך עתה. ביוני 2005 הוחלט ע"י NHGRI (National Human Genome Research Institute) לרצף את הגנום של *H. bacteriophora* כמודל למחקרים נוספים בנמטודות אנטומופתוגניות. *H. bacteriophora* נבחרה כנמטודה אנטומופתוגנית המייצגת 45 מינים אחרים של מדבירים ביולוגים של חרקים. בנוסף, הגנום של החיידק הסימביוטי מהזן TTO1 כבר רוצף כולו ואופיין חלקית (Duchaud et al., 2003).

החיידק הסימביונטי של הנמטודות בודד מזחלים אינפקטיביים שעברו חיטוי ב-0.1% סודיום היפוכלוריד (Bio-lab, ירושלים, ישראל) למשך 10 דקות ולאחר מכן נשטפו 3 פעמים במים סטריליים. זחל אינפקטיבי בודד הועבר לטיפה של בופר PBS (Phosphate-buffered saline) (ראה פירוט תמיסות ומצעים בנספח עמ' 1) ונחתך בעזרת סכין מבעד בינוקולר. על מנת לשחרר את החיידק הסימביוטי הנמצא במעי הזחל, חלקי הנמטודה הורחפו בטיפת ה-PBS אשר נזרעה בצלחת עם מצע LB (ראה פירוט תמיסות ומצעים בנספח עמ' 1) והועברה לאינקובציה ב-25°C. לאחר יומיים נראו מושבות של החיידק, מושבה בודדת הועברה לזריעת בידוד במצע LB על מנת להימנע מזיהום ע"י חיידקים אחרים. חיידקים ממושבה בודדת גודלו ב-40ml של LB נוזלי למשך לילה בטמפ' של 28°C ובטלטול של 200rpm לתרבית נוזלית. גליצרוול סטוק 25% v/v גליצרוול סטרילי ו-75% v/v תרבית נוזלית) של החיידק נשמר ב-80°C.

גידול *in vivo* של הנמטודות נעשה בפונדקאי רגיש, זחלים של עש הדונג הגדול *Galleria mellonella* מדרגה האחרונה לפני ההתגלמות, שגודלו במעבדתנו על פי (Kaya, 1997). עשרה זחלים של עש הדונג הגדול *G. mellonella* הונחו בצלחת פטרי שקוטרה 9 ס"מ, על נייר פילטר ספוג במ"ל אחד של מים מזוקקים המכילים כ-1000 זחלים אינפקטיביים והושארו לאינקובציה ב-25°C על מנת לאפשר הדבקה של החרק הפונדקאי. לאחר 48 שעות זחלי עש הדונג המתים הועברו למלכודות מים, על מנת לאסוף את הזחלים האינפקטיביים של הנמטודות המגיחים מהזחלים המתים של עש הדונג (Shapiro-Ilan and Gaugler, 2002). זחלים אינפקטיביים שהגיחו למים שבמלכודות במהלך 7-14 ימים, נאספו בבקבוקי אגירה ונשמרו בטמפרטורה של 14°C למספר חודשים.

גידול *in vitro* של הנמטודות נעשה בצלחות פטרי בקוטר 9 ס"מ, על מצע מוצק- Lipid agar (ראה פירוט תמיסות ומצעים בנספח עמ' 1). מצע עשיר זה מאפשר קיומם של כשלושה דורות של נמטודות על גבי אותה צלחת. קודם לזריעת הנמטודות מהזן TTO1 *H. bacteriophora*, נזרעו על הצלחות החיידקים הסימביונטיים TTO1 *P. luminescens* שגודלו במשך יומיים ב-25°C ליצירת מרבד חיידקי. לאחר

התבססות החיידקים, נזרעו בכל צלחת, כ-400 זחלים אינפקטיביים שחוטאו ב-0.1% סודיום היפוכלוריד למשך 10 דקות ולאחר מכן נשטפו שלוש פעמים במים סטריליים.

2.2 הכנת המולימפה למבחן השראת התחדשות התפתחות- (Recovery bioassay)

המולימפה נאספה מזחלים בדרגה רביעית של *G. mellonella*, ע"י יצירת חתך לפני הרגל הקדמית של הזחל. ההמולימפה נאספה ישירות למבחנת אפנדורף ודוללה מיד פי 2 בבופר PBS סטרילי שהכיל 0.25µg/ml של (PTU) Phenylthiourea, חומר המעכב את פעילותו של האנזים Phenoloxidase (Allen and MacDonald, 1998) וכך מונע מלניזציה (Park et al., 2005). המבחנות המכילות את ההמולימפה מטופלת הוקפאו ב-20°C עד לשימוש.

2.3 מבחן להשראת התחדשות התפתחות (Recovery bioassay) ב- *H. bacteriophora*

המבחן הביולוגי להשראת התפתחות נעשה בצלחות פטרי בקוטר 9 ס"מ המכילות מצע אגר מים. זחלים אינפקטיביים בני שלושה שבועות חוטאו ב-0.1% סודיום היפוכלוריד למשך 10 דקות ולאחר נשטפו 3 פעמים במים סטריליים. על צלחות האגר-מים, טופטפו 5 טיפות (20µl כל אחת) של המולימפה מטופלת ובצלחות הביקורת טופטפו 5 טיפות (20µl כל אחת) של בופר PBS בלבד. הצלחות נזרעו ב-15,000 זחלים אינפקטיביים והודגרו ב-28°C עד שנראו החיידקים הסימביוטים מופרשים. לאחר 6-8 שעות מהחשיפה להמולימפה נראתה הפרשת החיידקים תחת מיקרוסקופ הופכי (Inverted Microscope). בשלב זה הזחלים שנאספו, נשטפו בתמיסה פיזיולוגית (0.7% NaCl) והוקפאו ב-80°C לצורך הפקת רנ"א. מאחר ותחילת התחדשות ההתפתחות זוהתה באמצעות הופעת החיידקים הסימביוטיים במצע, קשה היה לקבוע את שיעור הנמטודות שעברו Recovery והתחילו להתפתח. שיעור הנמטודות שהפרישו את החיידק הסימביוטי נקבע ע"י הערכת מספר הנמטודות שלאורך גופן נראו החיידקים שהופרשו, בצלחת הפטרי. בשלב מוקדם של הפרשת החיידקים (הנראים כמתגים), החיידקים שהופרשו נמצאים לאורך גופן של הנמטודות מכוח מתח הפנים של הנוזל המקיף את הנמטודות (לאחר שהחיידקים רוכשים יכולת תנועה הם מתפזרים במצע ומתחילים להתרבות). בשלב זה הוערך מספר הנמטודות שהפרישו את החיידק הסימביוטי.

2.4 הפקת RNA

Total RNA הופק בעזרת Tri reagent (סיגמה, רחובות, ישראל) והפקת mRNA לספריות ההפחתה נעשתה בעזרת: PolyA Tract mRNA isolation system (Promega, מדיסון, ארה"ב). הרנ"א הורץ על ג'ל אגרוז 2% על מנת לראות ולוודא את איכותו וכמותו נמדדה במכשיר ה-NanoDrop (A260) (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). הרנ"א טופל ב-DNaseI (Fermentas), הנובר, ארה"ב), על מנת להיפטר משאריות דנ"א גנומי בדגימת הרנ"א.

2.5 הכנת ספריית הפחתה (Subtraction library)

ספריית ההפחתה הוכנו מרנ"א שהופק מזחלים אינפקטיביים שנחשפו להמולימפה לשש ושלוש שעות (טיפול) וכן מזחלים אינפקטיביים שלא נחשפו להמולימפה (ביקורת), באמצעות PCR-Select cDNA subtraction kit (Clontech, קליפורניה, ארה"ב) לפי פרוטוקול ה-Kit.

- תערובת של פריימר רנדומאלי ופריימר oligo dT ביחס של 1:3 בהתאמה, שימשו להפיכת תוצרי mRNA מהטיפול והביקורת ל-cDNA.
 - ה-cDNA נחתך באנזים רסטריקציה RsaI לקבלת קצוות ישרים (blunt-ends).
 - יצירת שתי אוכלוסיות של זחלים שנחשפו להמולימפה (טיפול) ע"י ליגציה לשני אדפטורים שונים (לאוכלוסיית הביקורת אין אדפטורים).
 - היברידיזציה ראשונה: שתי אוכלוסיות הטיפול השונות, עברו היברידיזציה כל אחת בנפרד עם אוכלוסיית הביקורת לקבלת רצפים המתבטאים באופן שונה בין הטיפול לביקורת.
 - היברידיזציה שנייה: ערבוב שתי ההיברידיזציות הראשונות והוספת cDNA של אוכלוסיית הביקורת, במטרה לבדוד רצפים עם אדפטורים שונים בכל קצה.
 - הגברת הרצפים השונים ב-PCR שימוש בפריימר המגביר רק רצפים המכילים שני אדפטורים בקצוות (אלו הרצפים הנבדלים).
 - הגברה נוספת עם פריימרים פנימיים המתאימים לאדפטורים כדי להגביר רק את הרצפים הרצויים.
- תוצרי הספרייה שובטו לווקטור pGEM-T (Promega, מדיסון, ארה"ב) הוכנסו לתאי *E. coli* Top10 ונשלחו לריצוף לחברת Macrogen (סאול, קוריאה) או למרכז ריצוף גנומים באוניברסיטת וושינגטון Washington University Genome Sequencing Center (סנט לואיס, מיזורי, ארה"ב).

2.6 אנליזה של ESTs

הרצפים מספריית ההפחתה נוקו מרצפי הווקטור והושוו כנגד מאגרי מידע ע"י אלגוריתם BLASTX (Altschul et al., 1990). הרצפים הושוו כנגד שני מאגרי מידע: National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ונגד wormpep131 מאגר המידע של חלבוני *C. elegans* (The Wellcome Trust Sanger) (*C. elegans* protein database at The Wellcome Trust Sanger) (Institute, Cambridge, UK) (<http://www.wormbase.org>) (Apweiler et al., 2004). רצפים דומים עם e-value שווה או נמוך מ- 10^{-5} נחשבו בעלי הומולוגיה משמעותית.

2.7 Real Time quantitative PCR

תכנון הפריימרים הספציפיים נעשה באמצעות תוכנת Primer Express של חברת Applied Biosystems (קליפורניה, ארה"ב). להגברת מקטע בגודל של 100 בסיסים מכל גן שנבחר (ראה רשימת פריימרים בנספח עמ' 2). עקומת יעילות הפריימרים נעשתה לכל הגנים הנבחרים והשוותה ליעילות הגן המנרמל. הריאקציה בוצעה עם Absolute Blue QPCR SYBR Green Rox mix (ABgene), אפסום,

אנגליה) בהתאם להוראות היצרן, בשיטה של Relative quantification, על מנת להשוות את רמת שעתוק הגנים בזמנים שונים של תהליך ה-Recovery.

תערובת של פריימר רנדומאלי ופריימר oligo-dT ביחס של 1:3 בהתאמה, שימשו להפיכת 1µg של Total RNA שהופק מזחלים אינפקטיביים שנחשפו להמולימפה לשש ושלוש שעות (טיפול) וכן מזחלים אינפקטיביים שלא נחשפו להמולימפה (ביקורת), ל-cDNA ע"י Verso™ cDNA Kit (ABgene), אפסום, אנגליה) לפי הוראות היצרן.

תנאי ראקציית ה-PCR: 15 דקות ב-95°C על מנת לשפעל את הפולימראז, ולאחר מכן 45 מחזורים של הגברה, שבכל מחזור: 30 שניות ב-95°C, 30 שניות ב-60°C, ו-30 שניות ב-72°C. מחזור אחד נוסף של 95°C ל-30 שניות, 60°C ל-30 שניות ו-95°C ל-30 שניות, ליצירת עקומת דיסוציאציה בכדי לוודא יצירת תוצר יחיד בריאקציה. טמפרטורת ההצמדות לכל הפריימרים הייתה 60°C. הריאקציה כללה: 2µl של פריימרים בריכוז של 250nM או 350nM כל אחד, 1µl של cDNA ממיהול של 1:64, 10µl של Mx3000pT QPCR Systemes (Stratagene, סן דייגו, ארה"ב) והאנליזה של הניסויים נעשתה בתוכנת MxPro-QPCR™ (Stratagene, סן דייגו, ארה"ב). התוצאות נורמלו כנגד הגן 18SrRNA (Hoogewijs et al., 2008), מהנמטודה *H. bacteriophora*. לכל הגנים שנבדקו נעשו 4 ניסויים המהווים 4 חזרות ביולוגיות ולכל ריאקציה בכל ניסוי נעשו 3 חזרות טכניות. רמת השעתוק של הגנים חושבה בשיטת ΔΔCT (Livak and Schmittgen, 2001)

2.8 בידוד הגנים *dpy-13* ו-*unc-22* מ-*C. elegans* ומ-*H. bacteriophora*

על מנת לכייל את מערכת ה-RNAi ב-*H. bacteriophora* היה צורך בגנים אשר יהיו סמנים חיוביים לניסוי. לצורך זה נבחרו שני גנים בעלי פנוטיפ ידוע מהנמטודה *C. elegans* הגן *dpy-13* והגן *unc-22*. הפריימרים תוכננו לפי רצף הגן של *C. elegans* (ראה רצפי פריימרים בנספח עמ' 2) וריאקציית ה-PCR נעשתה על cDNA של הנמטודה *C. elegans* ועל cDNA של הנמטודה *H. bacteriophora*.

תנאי ריאקציית ה-PCR:

הריאקציה כללה 30 מחזורים שכל אחד מהם מורכב מארבעת השלבים הבאים:

- דנטורציה: 30 שניות ב-94°C
- אנילינג: 30 שניות ב-45°C
- אלונגציה: 30 שניות ב-68°C

לאחר 30 המחזורים, נעשה מחזור אחד נוסף ארוך של אלונגציה לסיום הסינתזה של כל גדילי ה-DNA שכבר עברו אינציאציה, מחזור זה ארך 5 דקות בטמפ' של 72°C. לאחר מכן נבדקו הפרגמנטים ב-PCR חוזר עם פריימרים פנימיים (nested: NR, NF) (ראה רצפי פריימרים בנספח עמ' 2) בטמפרטורת אנילינג של 60°C על מנת לוודא את אמיתות התוצר. תוצרי ה-PCR הורצו בג'ל 1.2% והפרגמנטים הרלוונטיים

נוקו מהג'ל ע"י HiYield™ gel/PCR DNA fragment extraction kit של חברת RBC Bioscience (צ'אנג הו, טיוואן) בהתאם להוראות היצרן. לאחר שתוצרי ה-PCR נוקו הם נשלחו לריצוף ושובטו לוקטור pGEM בריאקציית ליגציה שבה היחס המולרי בין הווקטור וה-insert הוא: 1:3 בהתאמה. הליגציה נעשתה על פי פרוטוקול ה-Kit. לאחר מכן תוצרי הליגציה הוכנסו בטרנספורמציה לתאי *E. Coli* Top10, אלקטרו-קומפטנטים של חברת Invitrogen (קליפורניה, ארה"ב) לפי הוראות היצרן.

2.9 הכנת מקטעים ליניאריים ליצירת dsRNAi:

על מנת ליצור מקטעי DNA ליניאריים שישמשו כתבנית ליצירת dsRNA, רצפים נבחרים מספרית ההפחתה המשובטים בווקטור pGEM עברו הגברה עם פריימרים המתאימים לרצף הפלסמיד. הפריימרים תוכננו כך שבהגברה ע"י PCR יכללו בנוסף לרצף הרצוי את רצפי הפרומוטורים ל-RNA פולימראזות T7 ו-SP6 הנמצאים על גבי הפלסמיד.

הפריימרים:

pGEMF: 5' AGGGTTTTCCCAGTCACGACG 3'

pGEMR: 5' TCCGGCTCGTATGTTGTGTGG 3'

ריאקציית ה-PCR:

הראקציה הכילה: 5-10ng של פלסמיד המכיל את הרצף הרצוי להגברה, 10pmol של כל פריימר, 12.5µl של 2x Reddy Mix PCR Master Mix (ABgene, אפסום, אנגליה), המכיל 10mM dNTPs, mix, בופר המותאם לאנזים, ואנזים - Thermoprime Plus DNA Polymerase (ABgene, אפסום, אנגליה). הריאקציה נעשתה בנפח של 25µl, הנפח החסר הושלם ע"י מים מזוקקים סטריליים.

תנאי הריאקציה: 30 מחזורים שכל אחד מהם מורכב משלושת השלבים הבאים:

- דנטורציה: 30 שניות ב- 94°C
- אנילניג: 30 שניות ב- 60°C
- אלונגציה: 30 שניות ב- 72°C

לאחר מכן, נעשה עוד שלב נוסף של אלונגציה לסיום הסינתזה של כל גדילי ה-DNA שעברו כבר אינציאציה, מחזור זה ארך 5 דקות בטמפ' של 72°C.

2.10 In vitro transcription ליצירת dsRNAi:

תעתוק במבחנה (*in vitro* transcription) נעשה משני צדדי מחדר הדנ"א, בשתי מבחנות נפרדות ע"י פולימראזות T7 ו-SP6 אשר הפרומוטורים להם, נכללו במקטע הליניארי הרצוי בעזרת ריאקציית ה-PCR. הריאקציה נעשתה ע"י: RiboMaxYM Large Scale RNA Production System-SP6 and T7 (Promega, מדיסון, ארה"ב).

הרכב הריאקציה:

- 4µl בופר טרנסקריפציה 5X
- 4µl rNTPs 25mM (ATP, CTP, GTP, UTP)
- 5µl דנ"א ליניארי (תוצר PCR)
- 5µl מים סטריליים
- 2µl אנזים SP6/T7

הנפח הסופי של הריאקציה 20µl.

הריאקציות הודגרו למשך שש שעות ב-37°C. לאחר מכן על מנת להפטר מהדנ"א ששימש כתבנית ליצירת הרנ"א, הוסף לכל ריאקציה 1µl של RQ1 RNase-Free DNase, והריאקציה הודגרה למשך 15 דקות נוספות ב-37°C. נפחים שווים של ריאקציות ה-T7 וה-SP6 של אותו מחדר עורבבו ועברו היברידיזציה (10 דקות אינקובציה ב-70°C ו-20 דקות קירור איטי לטמפרטורת החדר) על מנת ליצור רנ"א דו גדילי. הרנ"א הדו גדילי שוקע: הנפח הושלם ל-100µl עם מים סטריליים, הוספו 10µl של 5M אמוניום אצטט ו-250µl של אתנול 100%. המבחנות הועברו לאינקובציה למשך שעה ב-4°C, ולאחר מכן סורכזו 30 דקות במהירות 14,000 rpm בטמפרטורת החדר. הפלט נשטף פעמיים ב-70% אתנול, יובש והורחף ב-50µl מים סטריליים. 1µl מהרנ"א הדו גדילי הורץ על ג'ל אגרוז 2%, על מנת לראות ולוודא את תקינותו של הרנ"א. כמותו נמדדה במכשיר (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) NanoDrop של הרנ"א. כמותו נמדדה במכשיר (A260). (וילמינטון, ארה"ב).

2.11 השתקת גנים ע"י dsRNA-mediated interference) dsRNAi

זחלים אינפקטיביים סטריליים גודלו על מצע LP (ראה פירוט תמיסות מצעים בנספח עמ' 1) שעליו גודל החיידק הסימביונטי במשך 48 שעות, במשך 4 ימים בטמפ' של 28°C, עד לשלב של נקבות הרמפרודיטיות מלאות ביצים, הנמטודות נאספו מהצלחת ונשטפו ע"י תמיסה פיזיולוגית. הנקבות ההרמפרודיטיות מלאות הביצים ששהו בתמיסה פיזיולוגית נדקרו בעזרת מחט סטרילית באזור הולווה להוצאת הביצים. תערובת הביצים והנמטודות הועברו דרך נפה של 60µm לצורך הפרדת הביצים מהנמטודות, הביצים עוברות את הנפה והנמטודות לא. לאחר מכן הביצים נשטפו היטב בתמיסה פיזיולוגית בעזרת נפה של 20µm שבה נשארות ביצים בשלות יחסית לפי גודלן. הביצים נשטפו שלוש פעמים בתמיסת רינגר (ראה פירוט תמיסות מצעים בנספח עמ' 1) להגברת הסינכרוניזציה. 50-75 ביצים הועברו לכל באר (בפלטה של 96 בארות), שהכילה 5µg של רנ"א דו גדילי ובופר רינגר לנפח סופי של 20µl. הפלטה הודגרה בטמפרטורה של 28°C למשך 25-26 שעות (Cicche and Sternberg, 2007). הזחלים שבקעו (J1) בתמיסת ה-RNAi הועברו לפלטה של 24 בארות למצע NA (nutrient agar) המכיל כולסטרול (ראה פירוט תמיסות מצעים בנספח עמ' 1) המכוסה בחיידק הסימביונטי שגדל במשך 24 שעות, להמשך התפתחות ומעקב אחר הפנוטיפים השונים. הפנוטיפים נראו לאחר 4-5 ימים ולאחר 7-10 ימים הופיעו זחלים אינפקטיביים שנאספו לניסויי Recovery.

2.12 מבחן ביולוגי ל-Recovery לאחר השתקת הגן הרצוי ע"י dsRNAi

המבחן הביולוגי ל-Recovery לאחר השתקת הגנים ע"י dsRNAi, נעשה בפלטה של 12 בארות על מצע Nutrient agar (ראה פירוט תמיסות מצעים בנספח עמ' 1) המכיל 10mg/ml כולסטרול ועליו החיידק הסימביונטי שגדל במשך 48 שעות, בטמפרטורה של 28°C. מספר ידוע (20-30) של זחלים אינפקטיביים מניסוי RNAi הונחו בכל באר ולאחר 48 שעות נספרו הזחלים שעברו Recovery והפכו לנקבות הרמפרודיטיות. אחוז ה-Recovery חושב ביחס לביקורת שבה לא הושקת אף גן.

2.13 הפקת חלבונים מזחלים אינפקטיביים של *H. bacteriophora*

לכל גרם אחד של נמטודות קפואות הוספו 0.4gr של כדורי זכוכית והדוגמאות נכתשו בעזרת חנקן נוזלי לאבקה דקה. לאבקה הנמטודות הוספו 2ml של בופר מיצוי, והדוגמאות הודגרו 10 דקות בקרח. לאחר מכן הדוגמאות סורכזו למשך 30 דקות במהירות של 10,000rpm, בתום הסירכוז, הנוזל העליון הועבר למבחנות חדשות. לנוזל הוספו 2ml של פנול רווי במים והמבחנות הודגרו 10 דקות בקרח. לאחר מכן הדוגמאות סורכזו למשך 30 דקות במהירות של 10,000rpm בטמפ' של 4°C. פאזת הפנול התחתונה הועברה למבחנה חדשה, ו-2ml של בופר מיצוי הוספו לכל דוגמה, הדוגמאות עורבבו והודגרו למשך 10 דקות בקרח. לאחר מכן הדוגמאות סורכזו שוב למשך 30 דקות במהירות של 10,000rpm בטמפ' של 4°C. פאזת הפנול הועברה למבחנה חדשה והוספו 10ml של 0.1M אמוניום אצטט מומס במתנול קר. הדוגמאות הודגרו ב-20°C למשך לילה. למחרת, הדוגמאות סורכזו למשך 30 דקות במהירות של 10,000rpm בטמפ' של 4°C והפלט נשטף שלוש פעמים ב-4ml של 0.1M אמוניום אצטט מומס במתנול קר. שטיפה סופית של הפלט נעשתה ב-4ml של אצטון קר. הפלט יובש באוויר במשך 30-60 דקות והומס ב-200µl של בופר IPG re-swelling (המכיל: 7M urea, 2M thiourea, 4% w/v CHAPS, 0.3% w/v DTT, 1% v/v 3-10 IPG Buffer (GE Healthcare)). הדוגמאות נשמרו ב-20°C. כמות החלבון נבדקה בשיטת ברדפורד (Bradford, 1976).

2.14 הפרדת חלבונים על ג'ל בשני ממדים (2D gels) וקביעת רצף

הרצת ג'ל חלבונים דו מימדי נעשה על פי עקרונות immobilized pH gradient (IPGs) של חברת Amersham Biosciences (ניו-ג'רזי, ארה"ב). רצועות של IPG עם טווח pH של 3.0-10.0 הוספגו במשך לילה ב-250µl של בופר re-swelling המכיל 50µg חלבונים בטמפרטורת החדר. הרצת ה-Isoelectric focusing (IEF) לאורך רצועת ה-pH נעשתה במכשיר Multiphor II של חברת: Amersham (Amersham Biosciences, ניו ג'רזי, ארה"ב). הרצת המימד הראשון לפי pH נעשתה בצורה מדורגת. תנאי ההרצה: 300V למשך 15 דקות, 800V למשך 15 דקות, 1300V למשך 15 דקות, 1800V למשך 15 דקות, 2300V למשך 15 דקות, 2800V למשך 15 דקות, 3300V למשך 15 דקות ו-3500V למשך 4 שעות.

בסיום הרצת החלבונים על גבי רצועת ה-pH, הרצועה הושרתה ב-5ml של בופר equilibration שהרכבו: (0.002% , 75mM Tris-Hcl pH 8.8, 30% v/v glycerol, 2% v/v SDS, 6M Urea

5ml של Bromophenol blue (40mg/ml) המכיל DDT למשך 30 דקות, ולאחר מכן הושרה שוב ב-5ml בופר equilibration המכיל 80mg Iodouacetamide למשך 30 דקות נוספות. לאחר מכן הרצועה הונחה על ג'ל 12.5% SDS-PAGE להפרדה על פי גודל וכוסתה ב-1.5ml של ג'ל אגרוז 0.5% למניעת תזוזה. ההרצה נעשתה ב-59V למשך 20 שעות במכשיר (Hoepfer) SE600, סן-פרנסיסקו, ארה"ב). לאחר ההרצה הג'לים נצבעו ע"י Pierce protein) G-250 Coomassi Blue, אילינוי, ארה"ב). ניתוח תוצאות הג'לים נעשה בעזרת תוכנת (Compugen) Z3, 2D gel image analysis system (רחובות, ישראל). על ידי השוואת ג'ל הטיפול לג'ל הביקורת. מספר חלבונים שהופיעו רק בטיפול נשלחו לזיהוי על ידי ספקטרומטריית מסות (mass spectrometry) במרכז סמולר לפרוטאומיקה הטכניון ישראל. ניתוח תוצאות LC/MS/MS נעשה ע"י תוכנת SEQUEST (Pendarvis et al., 2009)

3. תוצאות

מטרת העבודה הייתה זיהוי גנים וחלבונים המשתתפים בתהליך ה-Recovery בנמטודות אנטומופתוגניות, והוכחת מעורבותם של הגנים בתהליך ע"י מבחנים פונקציונאליים. כדי להשיג את מטרת העבודה הוכנו ספריות הפחתה, אשר הכילו מספר רב של ESTs המתבטאים בתגובה להמולימפת חרק, המשרה את תהליך ה-Recovery. מתוכם נבחרו 25 להמשך אפיון ע"י בדיקת דגם שעתוקם לאחר שלוש שעות ושש שעות חשיפה להמולימפה. הגנים שנבחרו הושתקו ע"י RNAi וכתוצאה מכך נראו פנוטיפים שונים. מידת השפעת השתקתם של הגנים על תהליך ה-Recovery נבדקה ע"י מבחן ביולוגי. נמצאו שמונה גנים אשר השתקתם משפיעה על אחוז הזחלים האינפקטיביים העוברים Recovery באופן מובהק ביחס לביקורת. ההבדלים בביטוי חלבונים בין זחלים אינפקטיביים הנמצאים בתהליך ה-Recovery לזחלים אינפקטיביים שנמצאים בעצירת התפתחות נבדקו ע"י 2D gels. מספר חלבונים שהתבטאו בזחלים אינפקטיביים בתהליך ה-Recovery נשלחו לזיהוי. נמצאו מספר חלבונים אשר הופיעו בספריות ההפחתה ומספר חלבונים אשר רלוונטיים לדרגת הזחל האינפקטיבי, לפונקציות בתהליך ה-Recovery לאינטראקציה טפיל-פונדקאי ולתהליך הביולוגי של התפתחות הזחל האינפקטיבי לזחל מדרגה רביעית.

3.1 פיתוח מבחן ביולוגי לאפיון תהליך ה-Recovery

על מנת לאפיין את תהליך ה-Recovery נדרש היה לייסד מבחן ביולוגי מתאים. המבחן הביולוגי ענה על כמה דרישות: 1. השראת תהליך ה-Recovery מחוץ לפונדקאי כלומר *in-vitro* בתגובה להמולימפה של חרק. 2. אפשרות לבדוד את הנמטודות לאחר השראת התהליך ללא ההמולימפה של החרק. 3. עבודה בקנה מידה גדול על מנת להפיק mRNA ליצירת ספריות, לבדיקת שעתוק הגנים ע"י Real-Time qPCR ולהפקת חלבונים ל-2D protein gels.

כדי לקבל השראת התפתחות הנובעת מהמולימפת החרק בלבד ולא מגורמים אחרים בדקתי טווח רחב של תנאים המוצגים בטבלה 1א ו-1ב; המצע עליו נערך המבחן, טיפולי ההמולימפה שונים, צפיפות הנמטודות, טמפרטורה וזמן חשיפה להמולימפה. הפרשת החיידק הסימביונטי היוותה סמן לתהליך ה-Recovery במבחן הביולוגי שערכתי. הפרשת החיידק זוהתה בהסתכלות במיקרוסקופ הופכי (Inverted Microscope) על צלחות הניסוי בהן זחלים אינפקטיביים נחשפו להמולימפה של זחלי עש הדונג *Galleria mellonella*. כדי לבצע את המבחן הביולוגי בקנה מידה גדול נבדקה צפיפות הנמטודות לצלחת ומצאתי כי בצפיפות גבוהה מעל 20,000 זחלים אינפקטיביים לצלחת פטרי בקוטר של 9 ס"מ, הפרשת החיידק הסימביונטי מעוכבת מאוד, ואחוז הזחלים האינפקטיביים העוברים Recovery נמוך. לפיכך במבחן הביולוגי נזרעו 15,000 זחלים אינפקטיביים לצלחת, בצפיפות זו נראתה הפרשת חיידק לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה - טיפול, לעומת הביקורת - ללא המולימפה, בה לא הופרש החיידק לאחר זמן זה.

טבלה מספר 1א: בדיקת מצעים שונים לביסוס המבחן הביולוגי לתהליך ה-Recovery, עם וכלי המולימפת חרק, בטמפרטורה של 25°C.

מצע	ללא המולימפה				עם המולימפה			
	3h	6h	12h	24h	3h	6h	12h	24h
PBS buffer	-	-	-	+	-	-	+	+
Water agar	-	-	-	+	-	-	+	+
T7 agar	-	-	-	+	-	-	+	+
Lipid agar	-	-	+	+	-	-	+	+
MGN	-	-	-	+	-	-	+	+

טבלה 1 א. בדיקת מצעים שונים עם וכלי המולימפת חרק להפרשת החיידק הסימביונטי. + נראתה הפרשה, - לא נראתה הפרשה של החיידק הסימביונטי. המבחן נעשה בפלטת 12 בארות, על מצעים שונים ובטמפרטורת אינקובציה של 25°C.

טבלה מספר 1ב: בדיקת מצעים שונים לביסוס המבחן הביולוגי לתהליך ה-Recovery, עם וכלי המולימפת חרק, בטמפרטורה של 28°C.

מצע	ללא המולימפה				עם המולימפה			
	3h	6h	12h	24h	3h	6h	12h	24h
PBS buffer	-	-	-	+	-	+	+	+
Water agar	-	-	-	+	-	+	+	+
T7 agar	-	+	+	+	+	+	+	+
Lipid agar	-	+	+	+	+	+	+	+
MGN	-	+	+	+	+	+	+	+

טבלה 1 ב. בדיקת מצעים שונים עם וכלי המולימפת חרק להפרשת החיידק הסימביונטי. + נראתה הפרשה, - לא נראתה הפרשה של החיידק הסימביונטי. המבחן נעשה בפלטת 12 בארות, על מצעים שונים ובטמפרטורת אינקובציה של 28°C. התנאים שנבחרו סומנו בעיגול.

בטבלה מספר 1א. הניסוי נעשה בטמפרטורה של 25°C, אפשר לראות שללא המולימפה, נראתה הפרשת חיידק לאחר 12 שעות על מצע Lipid agar בלבד ולאחר 24 שעות על יתר המצעים. עם המולימפה נראתה הפרשת חיידק לאחר 12 שעות בכל המצעים.

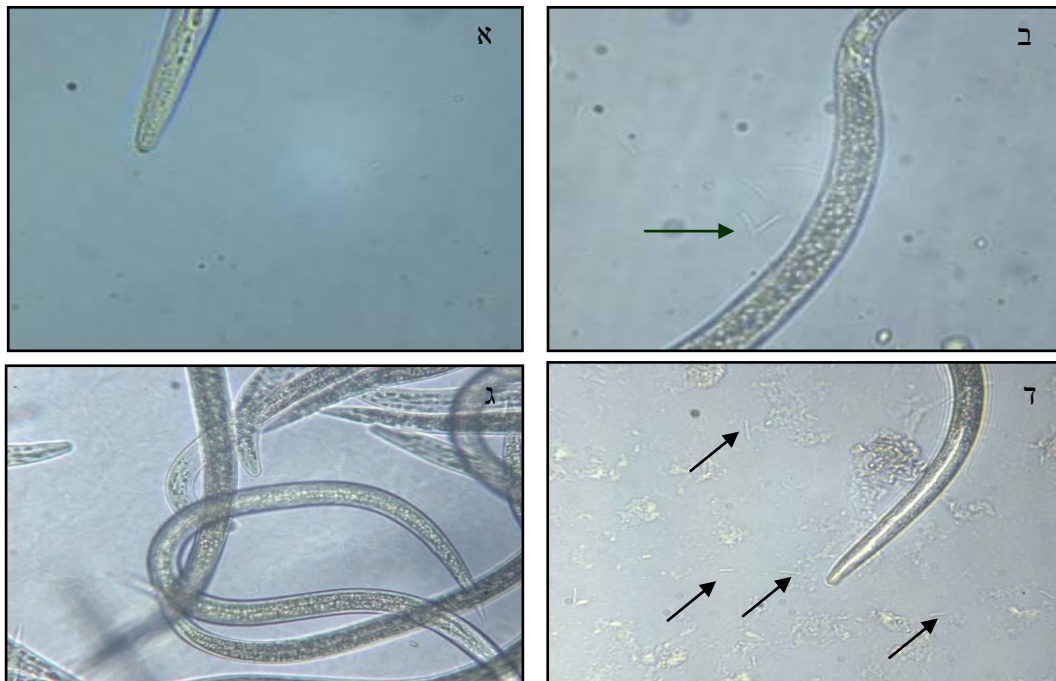
בטבלה מספר 1ב. הניסוי נעשה בטמפרטורה של 28°C, אפשר לראות שללא המולימפה נראתה הפרשת חיידק לאחר שש שעות במצעים T7 agar, Lipid agar ו-NGM ורק לאחר 24 שעות במצע האגר-מים

ובבופר PBS. עם המולימפה נראתה הפרשת חיידק לאחר שלוש שעות במצעים Lipid agar, T7 agar ו-NGM ולאחר שש שעות בשאר המצעים.

במבחן הביולוגי מצאתי שבמצעים בהם החיידק הסימביונטי לא הצליח להתבסס לא נראה מעבר לזחל דרגה רבעית. המשך תהליך ה-Recovery, דהיינו המעבר לדרגה הבאה נראה רק על מצעים בו הצליחו החיידקים הסימביונטיים לגדול ולהתרבות: Lipid agar, T7 agar ומצע ה-NGM. לאור התוצאות נבחר מצע האגר מים עם ובלי המולימפה לאחר שש שעות בטמפרטורה של 28°C. (התנאים שנבחרו מסומנים בעיגול אדום בטבלה ב1).

בוסס מבחן ביולוגי המאפשר השראת תהליך ה-*in-vitro* Recovery ובקנה מידה גדול כתוצאה מחשיפה להמולימפה של חרק. במערך הניסוי שנבחר נראה ששיעור הזחלים האינפקטיביים שעברו Recovery הוא כ-70%, לאחר 6-8 שעות חשיפתם להמולימפה על מצע אגר מים בטמפרטורה של 28°C (תמונה א7, ב7), בניגוד לזחלים אינפקטיביים שלא נחשפו להמולימפה ולא הפרישו את החיידק הסימביונטי באותם זמנים (תמונה ג7, ד7). בנקודת זמן זו הנמטודות נאספו, נשטפו והוקפאו להכנת mRNA שממנו הוכנה ספריית הפחתה הראשונה המבטאת גנים שהתבטאו כתוצאה מהשראת התפתחות ע"י המולימפה של חרק לאחר שש שעות. ספריית ההפחתה השנייה הוכנה מזחלים אינפקטיביים שנחשפו להמולימפה במשך שלוש שעות בלבד במטרה לאתר גנים המתבטאים מוקדם יותר בתהליך וגנים המווסתים את התהליך ה-Recovery.

תמונה מספר 7: הפרשה של החיידק הסימביונטי בתגובה להמולימפה של חרק



תמונה א7, ג7: זחלים אינפקטיביים של *H. bacteriophora* שנחשפו להמולימפה של חרק למשך שש שעות, החצים מצביעים על חיידקי *P. luminescens* שהופרשו ע"י הזחלים אינפקטיביים כתוצאה מהחשיפה להמולימפה. ב7, ד7: זחלים אינפקטיביים של *H. bacteriophora* שלא נחשפו להמולימפה ולא הפרישו את החיידק הסימביונטי על מצע אגר-מים לאחר שש שעות. (א2, ב2, הגדלה פי 40, ג2, ד2, הגדלה פי 10).

3.2 ספריות הפחתה

ספריות ההפחתה נעשו על מנת למצוא שעתוקם של אלו גנים עולה בזחלים אינפקטיביים בתהליך ה-Recovery כתוצאה מהשראת ההתפתחות ע"י חשיפה להמולימפה של חרק. ספריית ההפחתה מאפשרת לזהות גנים אשר עלו בתגובה לאינדוקציה כאשר ההפחתה היא ישירה (מצב מושרה לעומת לא מושרה). הספריות נעשו בשני זמנים: לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה (במטרה למצוא גנים המתבטאים בשלב מוקדם יותר בתהליך) וכשש שעות לאחר חשיפה להמולימפה (זמן הפרשת החיידק הסימביוטי).

3.2.1 אנליזה של הרצפים Expressed Sequence Tags (ESTs) מספריית ההפחתה שנעשתה שש

שעות לאחר חשיפה להמולימפה.

220 מושבות המכילות מקטעי רצף (ESTs) מהספריית ההפחתה נשלחו לריצוף. הרצפים שהתקבלו נוקו מרצפי הווקטור ורצפים המכילים פחות מ-50 נוקליאוטידים הוצאו ממאגר הנתונים. לאחר הניקוי נשארו 183 רצפים באורך 300 ± 100 נוקליאוטידים. רצפים אלו הושוו למאגרי נתונים ברשת: NCBI (Altschul et al., 1990) ו-wormbase (Chen et al., 2005) ע"י BLASTX אלגוריתם. תוצאות החיפוש העלו כי 29 רצפים (16% מכלל הרצפים) לא התאימו לאף חלבון ממאגרי המידע בהם נערך החיפוש ולכן נחשבים חדשים. 165 רצפים (90% מכלל הרצפים) נמצאו תואמים לרצף אחד או יותר ממאגרי המידע, מתוכם ל-78 רצפים יש דמיון משמעותי לחלבונים של *C. elegans* ולנותרים דמיון גבוה יותר לרצפים של נמטודות אחרות ואורגניזמים אאוקריוטים אחרים כגון *Danio rerio* - דג הזברה ו-*Drosophila melanogaster* - זבוב הפירות. רשימת ה-ESTs והאנוטציה שלהם, שבודדו מספריית ההפחתה זו מופיעים בטבלה מספר 2 בעמוד 29.

3.2.2 אנליזה של הרצפים Expressed Sequence Tags (ESTs) מספריית ההפחתה שנעשתה שלוש שעות לאחר חשיפה להמולימפה.

שלוש שעות לאחר חשיפה להמולימפה.

384 מושבות המכילות מקטעי רצף (ESTs) מהספריית ההפחתה השנייה נשלחו לריצוף. הרצפים שהתקבלו נוקו מרצפי הווקטור ורצפים המכילים פחות מ-50 נוקליאוטידים הוצאו ממאגר הנתונים. לאחר הניקוי נשארו 202 רצפים באורך 200 ± 100 נוקליאוטידים. רצפים אלו הושוו למאגרי נתונים ברשת: NCBI (Chen et al., 2005) ע"י BLASTX אלגוריתם. תוצאות החיפוש העלו כי 33 רצפים (17% מכלל הרצפים) לא התאימו לאף חלבון ממאגרי המידע בהם נערך החיפוש ולכן נחשבים חדשים. 169 רצפים (83% מכלל הרצפים) נמצאו תואמים לרצף אחד או יותר ממאגרי המידע, מתוכם ל-55 רצפים יש דמיון משמעותי לחלבונים של *C. elegans* ולנותרים דמיון גבוה יותר לרצפים של נמטודות טפילות על יונקים כגון *Brugia malayi* ואורגניזמים אאוקריוטים אחרים. 87 רצפים נמצאו תואמים לרצפי *H. bacteriophora* שפורסמו (Bai et al., 2007). רשימת ה-ESTs והאנוטציה שלהם, שבודדו מספריית ההפחתה זו מופיעים בטבלה מספר 3 בעמוד 33.

3.3 טבלאות אנוטציה של ה-ESTs מספריית ההפחתה

3.3.1 אנוטציה של ה-ESTs מספריית ההפחתה של שלוש שעות

טבלה מספר 2 : רשימת ESTs והאנוטציה שלהם מספריית ההפחתה של זחלים אינפקטיביים של *H. Bacteriophora* לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה

clone no.	annotation	no.	genebank no.	e-value	organism
Hb3HAa1	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2 (<i>iftb-1</i>)		EDP37332	2.00E-34	<i>Brugia malayi</i> (human parasitic nematode)
Hb3HAa6	40S ribosomal protein S19S.		P39698	4.00E-13	<i>Ascaris suum</i> (pig roundworm)
Hb3HAa8	Cytochrome c oxidase subunit I	38	YP_817454	7.00E-18	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
Hb3HAa10	Cytochrome oxidase subunit I		AAV64066	9.00E-44	<i>Bactrocera cucurbitae</i> (melon fruit fly)
Hb3HAa12	TYRosinase family member (<i>tyr-4</i>)		NP_491709	9.00E-12	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HAc5	Zinc finger transcription factor		AJ535757	3.00E-07	<i>Bactrocera oleae</i> (olive fruit fly)
Hb3HAD2	NADH dehydrogenase subunit 1	11	YP_817451	2.00E-09	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
Hb3HAD3	Mitochondrial ribosomal protein MRP17		CAE66739	9.00E-07	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
Hb3HAD5	<i>fis-1</i> -related protein		EDP34346	3.00E-23	<i>Brugia malayi</i> (human parasitic nematode)
Hb3HAD9	NADH dehydrogenase subunit 5	7	YP_817460	2.00E-39	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
Hb3HAe2	Meiotic recombination protein (<i>spo-11</i>)		CAA92974	2.00E-05	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HAe4	Hypothetical protein CBG00994		XP_001678153	2.00E-25	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
Hb3HAe10	Trehalose 6-Phosphate Synthase protein 1 (<i>tps-1</i>) / <i>tag-25</i>		EDP32297	1.00E-29	<i>Brugia malayi</i>
Hb3HAf8	Cytochrome c oxidase subunit II	3	YP_817455	1.00E-37	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
Hb3HAg5	AQuaPorin or aquaglyceroporin related family member (<i>aqp-7</i>)		NP_508515	1.00E-45	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HAh2	HIStone family member (<i>his-35</i>)		NP_505463	4.00E-10	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HAh9	Hypothetical protein CBG11890		XP_001667415	5.00E-16	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
Hb3HBa1	DNA replication licensing factor MCM5, putative		EDP34804	7.00E-51	<i>Brugia malayi</i>
Hb3HBa3	NADH dehydrogenase subunit 2	4	YP_817453	8.00E-13	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
Hb3HBa5	Hypothetical protein CBG13298		XP_001665020	2.00E-13	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
Hb3HBa6	AKT kinase family member (<i>akt-1</i>)		NP_001023646	4.00E-45	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HBa7	AMmonium Transporter homolog family member (<i>amt-1</i>)		NP_508784	6.00E-14	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HBa8	Ribosomal Protein, Small subunit family member (<i>rps-30</i>)		AAV46303	7.00E-20	<i>Caenorhabditis remanei</i>
Hb3HBa9	F01G12.6		NP_510666	4.00E-05	<i>Caenorhabditis elegans</i>

Hb3HBA10	Predicted short chain-type dehydrogenase		NP_506406	5.00E-07	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HBA11	Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase type I (<i>ipp-5</i>)		AAL72637	6.00E-09	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HBA12	F35C11.5 gene		XP_001678628	4.00E-05	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
Hb3HBB5	Cytochrome b (<i>ctb-1</i>)	12	YP_817457	6.00E-41	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
Hb3HBB7	Intracellular GLoBin (<i>glb-1</i>)		AAL56427	8.00E-27	<i>Syngamus trachea</i> (gapeworm)
Hb3HBB9	NADH dehydrogenase subunit 4	5	AAN38918	4.00E-07	<i>Longistriata blarinae</i> (shrew parasitic nematode)
Hb3HBD6	MAP kinase activating protein C22orf5 / F40E10.6 gene		EDP32424	1.00E-10	<i>Brugia malayi</i>
Hb3HBD9	F53F4.16		NP_001023963	1.00E-09	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HBD10	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> satellite sequence		U19928	4.00E-55	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
Hb3HBE2	5' nucleotidase family IMP-GMP specific 5'-nucleotidase		EDP31758	1.00E-18	<i>Brugia malayi</i>
Hb3HBE4	PH domain containing protein PH (pleckstrin homology) domain		NP_505929	5.00E-34	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HBE6	RNA polymerase III transcription factor (<i>tag-315</i>)		NP_505626	2.00E-20	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HBE10	Glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase		NP_496469	3.00E-69	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HBF4	Uncharacterized conserved protein (contains TPR repeat) ZK20.4		NP_496487	8.00E-06	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HBF8	Paralysed Arrest at Two-fold family member (<i>pat-10</i>),		NP_491501	2.00E-75	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HBF11	Integral TransMembrane protein 1 - ITM1 protein, putative		EDP32911	3.00E-06	<i>Brugia malayi</i>
Hb3HBF12	Autophagocytosis associated protein		EDP30311	3.00E-08	<i>Brugia malayi</i>
Hb3HBG7	Ribosomal Protein, Small subunit (<i>rps-4</i>)		ABP52061	6.00E-12	<i>Ancylostoma caninum</i> (dog hookworm)
Hb3HBG8	Ancient conserved domain protein 4,		EDP32873	7.00E-08	<i>Brugia malayi</i>
Hb3HBG11	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6.		NP_001017993	4.00E-04	<i>Danio rerio</i> (zebra fish)
Hb3HBH3	Partial gene for TRaNsposase (<i>trn-7</i>)		AM402994	5.00E-08	<i>Listonella anguillarum serovar</i> (g-proteobacteria)
Bb3HCA1	Protein kinase domain containing protein		EDP37422	9.00E-05	<i>Brugia malayi</i>
Hb3HCA2	<i>Caenorhabditis elegans</i> Cosmid C29F7		Z92827	8.00E-29	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCA3	Elongation factor 1 alpha		ABX79382	6.00E-49	<i>Dictyocaulus viviparus</i> (bovine lungworm)
Hb3HCA5	Serpentine Receptor, class AB family member (<i>srab-14</i>)		NP_001022279	7.00E-23	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCA7	Chaperonin Containing TCP-1 family member (<i>cct-5</i>)		NP_497915	2.00E-32	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCA9	Hypothetical protein M02B7.4		AAB09129.2	4.00E-10	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCA12	Dephospho-CoA kinase family protein		EDP35901	3.00E-25	<i>Brugia malayi</i>
Hb3HCB9	CHoline transporter family member (<i>cho-1</i>)		NP_502539	1.00E-32	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCC3	Hypothetical protein K09H9.8		AAB97572	5.00E-06	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCC6	Ribosomal Protein, Large subunit family member (<i>rpl-22</i>)		NP_494932	1.00E-10	<i>Caenorhabditis elegans</i>

Hb3HCc11	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> satellite sequence		U19928	4.00E-45	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
Hb3HCd3	EGg Laying defective family member (<i>egl-3</i>)= <i>kpc-2</i>		NP_505614	2.00E-35	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCd8	Protein Disulfide Isomerase (<i>pdi-2</i>)		AAS84454	2.00E-66	<i>Ancylostoma caninum</i> (dog hookworm)
Hb3HCd9	Heavy chain, Unconventional Myosin family member (<i>hum-4</i>)		NP_509914	2.00E-13	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCe2	Tyrosine aminotransferase		NP_510454	9.00E-21	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCe3	DeHydrogenase Short chain family member (<i>dhs-6</i>)		NP_001021972	3.00E-23	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCe4	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase family member 10		XP_588758	6.00E-05	<i>Taeniopygia guttata</i> (bird, zebra finch)
Hb3HCf3	Hypothetical protein T25G3.1		NP_492112	2.00E-34	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCf4	Y43F8C.7		NP_507807	7.00E-20	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCf6	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase		XP_001203904	2.00E-11	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (sea urchin)
Hb3HCf8	RhoGAP domain containing protein		EDP36063	8.00E-14	<i>Brugia malayi</i>
Hb3HCf10	Tapt1 protein		NP_507972	7.00E-40	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCf11	Amino acid transporter H32K16.1		NP_492453	3.00E-05	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCf12	Vesicle trafficking protein SEC22b		NP_508198.1	2.00E-32	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCg4	GEx Interacting protein family member (<i>gei-17</i>)		NP_001021679	4.00E-06	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCg5	AdaPtin, Mu/medium chain (clathrin associated complex) (<i>apm-1</i>)		NP_491572	1.00E-13	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCg11	Proteasome Regulatory Particle (<i>rpn-9</i>)		NP_496405	7.00E-20	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HCh7	Sodium-independent organic anion transporter family protein		NP_508394	2.00E-14	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HDa2	TransThyretin-like protein 2 precursor (<i>ttl-15</i>)		NP_499285	9.00E-18	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HDa5	C15C8.7		NP_506186	1.00E-06	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HDb5	ATPase, AAA family protein /(<i>figl-1</i>)		NP_504197.1	4.00E-15	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HDb6	Peptidase M16 inactive domain containing protein / <i>mppa-1</i>		EDP36925	5.00E-19	<i>Brugia malayi</i>
Hb3HDb7	ATP-dependent helicase DDX48		XM_001894333.1	7.00E-62	<i>Brugia malayi</i>
Hb3HDb9	Y40B1B.8 gene Mitochondrial carrier protein		AAB06575	7.00E-05	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HDC4	Malate DeHydrogenase family member (<i>mdh-1</i>)	2	NP_498457	3.00E-29	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HDC8	Elongation FacTor family member (<i>eft-3</i>)		NP_498520	2.00E-55	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HDC10	DeHydrogenases, Short chain family member (<i>dhs-14</i>)		NP_503752	5.00E-08	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HDD9	Coatomer alpha subunit / Vesicle coat complex COPI		EDP38481	5.00E-13	<i>Brugia malayi</i>
Hb3HDE9	Chaperonin Containing TCP-1(<i>cct-3</i>)		EDP35087	2.00E-63	<i>Brugia malayi</i>
Hb3HDE12	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> satellite sequence		U19928	4.00E-60	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
Hb3HDF4	Hypothetical protein CBG20487		CAE73107	8.00E-14	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
Hb3HDF6	Phosphate carrier protein, mitochondrial precursor,	3	EDP32118	1.00E-57	<i>Brugia malayi</i>
Hb3HDF8	N-6 adenine-specific DNA methyltransferase 2		NP_080802	8.00E-21	<i>Caenorhabditis briggsae</i>

Hb3HDh1	ATP-dependent helicase DDX1,	NP_500004	6.00E-17	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HDh2	Methionyl tRNA Synthetase family member (<i>mrs-1</i>)	NP_502196	2.00E-35	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HDh6	Y105C5A.15	NP_502883	3.00E-11	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HDh11	D1022.5	NP_495562	5.00E-05	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb3HDh12	Barrier to Auto integration Factor family member (<i>baf-1</i>)	NP_499085	4.00E-31	<i>Caenorhabditis elegans</i>

טבלה מס' 2: ESTs אשר נמצאו תואמים לרצף ידוע ממאגרי מידע (NCBI, Wormbase) והאנוטציה שלהם. הטור ה-No. מתייחס למספר הפעמים בהם הגן הופיע בספרייה.

3.3.2 אנוטציה של ה-ESTs מספריית ההפחתה של שש שעות

טבלה מספר 3 : רשימת ESTs והאנוטציה שלהם מספריית ההפחתה של זחלים אינפקטיביים של *H. Bacteriophora* לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה

clone no.	annotation	no.	genebank no.	e-value	organism
Hb6HA1	C-type lectin		Y25C1A.3	1.10E-34	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA2	Ribosomal Protein, Large subunit family member (<i>rpl-13</i>)	2	NP_001021017	4.00E-77	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA4	Temporarily Assigned Gene name family member (<i>tag-210</i>)		EAT46673	1.00E-49	<i>Aedes aegypti</i> (yellow fever mosquito)
Hb6HA5	Na/Ca eXchangers family member (<i>ncx-4</i>)		NP_492604	3.00E-58	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA6	ADP Ribosylation Factor 79F CG8385-PB, isoform B (<i>arf-1.2</i>)	2	NP_476955	3.00E-77	<i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly)
Hb6HA7	TropoNin T family member (<i>tnt-2</i>)		NP_001024704	1.00E-59	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA8	Hypothetical protein F08F3.4		T29433	2.00E-05	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA11	GROund-Like (<i>grl-25</i>)		ZK643.8	5.20E-24	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA12	Ran-binding protein 7	3	XP_001898051.1	4.00E-05	<i>Brugia malayi</i> (human parasitic nematode)
Hb6HA15	Splicing factor, arginine/serine-rich 5 (<i>rsp-1</i>)	2	NP_957161	7.00E-24	<i>Danio rerio</i> (zebra fish)
Hb6HA17	GLYcosylation related family member (<i>gly-20</i>)		NP_505864	6.00E-28	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA18	CYClophyliN family member (<i>cyn-3</i>)	2	XP_002638373.1	9.00E-19	<i>Caenorhabditis briggsae</i> (free-living nematode)
Hb6HA19	Glutamate/leucine/phenylalanine/valine dehydrogenases		AAC19750	3.00E-07	<i>Haemonchus contortus</i> (sheep parasitic nematode)
Hb6HA20	Ribosomal Protein, Large subunit family member (<i>rpl-14</i>)	3	XP_002639221.1	5.00E-50	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
Hb6HA21	CBR-SEC-10 protein		XP_002634328.1	2.00E-47	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
Hb6HA22	Elongation Factor family member (<i>eft-2</i>)		AAD03339	7.00E-61	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA23	Inorganic PYroPhosphatase family member (<i>pyp-1</i>)		NP_001023073	3.00E-63	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA24	Ribosomal Protein, Large subunit family member (<i>rpl-14</i>)		NP_492576	6.00E-14	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA25	Similar to SNARE-associated protein Snapin		XP_001897610.1	2.00E-11	<i>Brugia malayi</i> (agent of lymphatic filariasis)
Hb6HA26	85 kda calcium-independent phospholipase A2		EAT34967	4.00E-16	<i>Aedes aegypti</i>
Hb6HA27	Kinesin Light Chain family member (<i>klc-2</i>)	2	NP_001023664	2.00E-67	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA28	Immunogenic protein 3		AAR28033	2.00E-20	<i>Brugia malayi</i>
Hb6HA30	similar to catalase (Q59296)		BE240836	5.40E-51	<i>Meloidogyne incognita</i> (plant parasitic nematode)

Hb6HA31	Similar to PABP1-dependent poly A-specific ribonuclease		XP_001900534.1	7.00E-10	<i>Brugia malayi</i>
Hb6HA32	Hypothetical protein Bm1_32495	2	XP_001897944	4.00E-11	<i>Brugia malayi</i>
Hb6HA33	Thioredoxin		AAS78778	2.00E-13	<i>Ascaris suum</i> (pig roundworm)
Hb6HA34	PAttern of reporter Gene expression abnormal (<i>pag-3</i>)		NP_510480	2.00E-80	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA35	Moleskin CG7935-PA		NP_524780	7.00E-05	<i>Drosophila melanogaster</i>
Hb6HA36	NuDiX family member (<i>ndx-4</i>)		NP_493413	8.00E-56	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA41	Glutamate decarboxylase/sphingosine phosphate lyase		NP_500051	1.00E-09	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA42	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase		XP_001941001.1	1.00E-65	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> (Fungus)
Hb6HA43	NADH Ubiquinone Oxidoreductase family member (<i>nuo-3</i>)		NP_502790	2.00E-27	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA44	Gamma-glutamyl transpeptidase precursor		AAS18673	8.00E-45	<i>Brugia pahangi</i>
Hb6HA45	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase		AAF08341	4.00E-19	<i>Brugia malayi</i>
Hb6HA46	Hypothetical protein C45E1.4		NP_491104	6.00E-14	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA47	Yeast SEC homolog family member (<i>sec-3</i>)		NP_508530	1.00E-21	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA49	Splicing factor, arginine/serine-rich 4		XP_001902042.1	3.00E-35	<i>Brugia malayi</i>
Hb6HA50	<i>Steinernema feltiae</i> IS6 - desiccation stress related ESTs		BQ580369	2.00E-10	<i>Steinernema feltiae</i> (entomopathogenic nematode)
Hb6HD1	Myosin Light Chain family member (<i>mhc-3</i>)		NP_741146	2.00E-05	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HD2	DVA-1 polyprotein precursor	2	Q24702	2.00E-47	<i>Dictyocaulus viviparus</i> (bovine lungworm)
Hb6HD3	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 6		XP_698615	2.00E-14	<i>Danio rerio</i>
Hb6HD4	Glycine-rich protein		EEY60363.1	2.00E-05	<i>Phytophthora infestans</i> (pathogen potato oomycetes)
Hb6HD5	Ribosomal Protein, Large subunit family member (<i>rpl-19</i>)		NP_491608	5.00E-17	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HD6	Fatty Acid CoA Synthetase family (<i>acs-14</i>)		NP_499799.1	1.00E-26	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HD7	Ribosomal Protein, Large subunit family member (<i>rpl-9</i>)		NP_498660	3.00E-12	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HD9	Similar to RRN3 RNA polymerase I transcription factor homolog	2	NP_497803	3.00E-27	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HE2	Protein disulfide-isomerase A4 precursor		NP_498775	1.00E-08	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HE5	Hypothetical protein C36E8.1		NP_497803.1	3.00E-27	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HE6	Heat shock protein 16-1 (<i>hsp-16-1</i>)		AAN05752	1.00E-19	<i>Haemonchus contortus</i>
Hb6HE8	Nematode polyprotein allergen related post-translationally (<i>npa-1</i>)		Q24702	3.00E-47	<i>Dictyocaulus viviparus</i> (bovine lungworm)
Hb6HE9	Hypothetical protein R08C7.2		NP_001023333	2.00E-10	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA54	DnaJ chaperonine DnaJ (<i>Hsp40</i>) homolog, subfamily A	2	XM_001891527.1	3.00E-38	<i>Brugia malayi</i>
Hb6HA56	Ribosomal Protein, Small subunit family member (<i>rps-20</i>)		NP_740944	2.00E-50	<i>Caenorhabditis elegans</i>

Hb6HA63	Phosphatidylethanolamine binding protein isoform 1		XP_001662795.1	2.00E-05	<i>Aedes aegypti</i>
Hb6HA64	Temporarily Assigned Gene name family member (<i>tag-308</i>)	2	NP_495625	2.00E-05	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA67	Similar to Probable ubiquitin carboxyl-terminal (Ubiquitin-specific protease 9)		XP_982908	2.00E-67	<i>Mus musculus</i> (house mouse)
Hb6HA68	Aldose reductase		AAP41124	4.00E-31	<i>Pristionchus pacificus</i> (free-living nematode)
Hb6HA71	Cytochrome c type-1		P92504	2.00E-21	<i>Ascaris suum</i>
Hb6HA76	DnaJ (<i>Hsp40</i>) homolog, subfamily A member		XM_002666751.1	4.00E-16	<i>Danio rerio</i>
Hb6HA78	Ribosomal Protein, Large subunit family member (<i>rpl-4</i>)		NP_491416	1.00E-87	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA79	Ribosomal Protein, Small subunit family member (<i>rps-9</i>)	2	NP_496384	6.00E-45	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA80	Methyltransferase, subunit GCD14		NP_493229	1.00E-05	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA81	ALdehyde deHydrogenase family member (<i>alh-4</i>)	2	NP_741553	1.00E-07	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA82	Vacuolar H ATPase family member (<i>vha-15</i>)		NP_508412	2.00E-37	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA83	NADH Ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein (<i>nduf-5</i>)	2	NM_058684.3	3.00E-38	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA84	Manganese superoxide dismutase		CAD42938.2	4.00E-06	<i>Taiwanofungus camphoratus</i> (rot fungus)
Hb6HA85	Hypothetical protein F01F1.11		T15949	5.00E-13	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA86	Isocitrate dehydrogenase gamma subunit		AAD55084	3.00E-28	<i>Strongyloides stercoralis</i>
Hb6HA89	Kinesin Light Chain family member (<i>klc-2</i>)		CAA82752	4.00E-68	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA90	Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 1		NP_001003727	7.00E-14	<i>Danio rerio</i>
Hb6HA93	C15C7.5		NP_508542	6.00E-28	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA94	S-adenosylhomocysteine hydrolase		NP_491955	1.00E-17	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA95	Isoleucyl tRNA Synthetase family member (<i>irs-1</i>)		NP_501914	4.00E-09	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HA96	ELongator complex Protein Component (<i>elpc-2</i>)		NP_499648	4.00E-14	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB1	Proteasome Beta Subunit family member (<i>pbs-7</i>)		NP_492354.	5.00E-36	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB2	Allatotropin neuropeptide precursor		CAD98809	7.00E-05	<i>Spodoptera frugiperda</i> (fall armyworm)
Hb6HB5	IS10 transposase, putative		AC160095.1	6.00E-702	<i>Solanum lycopersicum</i> (tomato)
Hb6HB8	Ribosomal Protein, Large subunit family member (<i>rpl-5</i>)		ACZ13335.1	5.00E-23	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i> (pine wood nematode)
Hb6HB9	ALdehyde deHydrogenase family member (<i>alh-4</i>)		NP_741553	9.00E-08	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB10	3-oxoacid CoA transferase 1		NP_001007292	7.00E-24	<i>Danio rerio</i>
Hb6HB11	Proteasome Alpha Subunit family member (<i>pas-4</i>)		NP_492360	4.00E-50	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB12	Ribosomal Protein, Small subunit family member (<i>rps-9</i>)		NP_496384	6.00E-11	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB14	Succinate DeHydrogenase complex subunit A (<i>sdha-1</i>)		NP_509446	2.00E-111	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB16	Pinin (desmosome-associated protein) R186.7	3	XP_001902332.1	5.00E-18	<i>Brugia malayi</i>

Hb6HB18	Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein (<i>pqn-19</i>)		XP_002639433.1	5.00E-49	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
Hb6HB19	T22C8.6		NP_495834	9.00E-44	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB20	Adenosylhomocysteinase		NP_491955	1.30E-29	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB25	Hypothetical protein C18A3.1		NP_495127.1	6.00E-08	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB27	Fructose-bisphosphate aldolase 1 (Aldolase CE-1) (CE1).		NP_741281	8.00E-41	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB28	Mediator complex subunit (<i>rgr-1</i>)		XP_001898423.1	3.00E-14	<i>Brugia malayi</i>
Hb6HB32	Lipid Binding Protein family member (<i>lbp-1</i>)		NP_508557	1.00E-37	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB33	Hypothetical protein Bm1_32495. Similar to immediate early response 5-like	2	XP_001897944.1	9.00E-42	<i>Brugia malayi</i>
Hb6HB34	LYSozyme family member (<i>lys-7</i>)		NP_503972	1.00E-14	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB35	Similar to Kynureninase (L-kynurenine hydrolase)		XP_001895030.1	5.00E-42	<i>Brugia malayi</i>
Hb6HB36	MECHanosensory abnormality family member (<i>mec-5</i>)		NP_741941	5.00E-106	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB40	Arginine kinase		AAP41028	2.00E-19	<i>Heterodera glycines</i> (plant parasitic cyst nematode)
Hb6HB42	Nuclear pre-mRNA splicing factor		XP_001700562.1	6.00E-05	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (single celled green alga)
Hb6HB45	CYclophyliN family member (<i>cyn-3</i>)		NP_506751	1.00E-19	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB46	Hypothetical protein B0491.5		NP_496424.1	9.00E-39	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB47	Hypothetical protein CBG01646	2	XP_002634096.1	5.00E-12	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
Hb6HB48	Guanylate kinase 1		NP_491243.1	4.00E-40	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB51	Hypothetical protein Bm1_32495	2	XP_001897944.1	6.00E-11	<i>Brugia malayi</i>
Hb6HB53	Rnu3ip2 protein: RNA, U3 small nuclear interacting protein 2		XP_001894479.1	3.00E-21	<i>Brugia malayi</i>
Hb6HB58	CHiTinase family member (<i>cht-1</i>)		NP_508588	5.00E-38	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB59	Tropomyosin isoforms a/b/d/f (Levamisole resistant protein 11)		Q22866	2.00E-06	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB60	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]		P29190	1.00E-34	<i>Haemonchus contortus</i> (barber pole worm)
Hb6HB62	ACTin family member (<i>act-4</i>)	2	CAA34718	1.00E-76	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB64	Hypothetical protein CBG05695		XP_002638641.1	3.00E-30	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
Hb6HB65	Nol5a protein		XP_001900200.1	5.00E-29	<i>Brugia malayi</i>
Hb6HB74	Heat Shock Protein 20 (<i>hsp-20</i>)		AAN05752	1.00E-38	<i>Haemonchus contortus</i>
Hb6HB75	Similar to Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X		XP_982908	7.00E-69	<i>Mus musculus</i>
Hb6HB79	TnpA transposase of IS10		ABG56859	7.00E-122	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (bacteria)
Hb6HB80	Hypothetical protein CBG13067		CBG13067	2.00E-18	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
Hb6HB81	Identified as bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter		AAA82423.2	3.10E-07	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB83	SyNapTotagmin family member (<i>snt-4</i>)		NP_491853	9.00E-103	<i>Caenorhabditis elegans</i>

Hb6HB88	SNARE-associated protein Snapin	XP_001897610.1	3.00E-09	<i>Brugia malayi</i>
Hb6HB90	Actin (<i>act-1</i>)	CAB04678	8.90E-36	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HB91	IMportin Beta family member (<i>imb-3</i>)	XP_001898232.1	3.00E-06	<i>Brugia malayi</i>
Hb6HB92	Hypothetical protein Y77E11A.14	NP_500075.1	3.00E-06	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HC2	SMA-9 class B (<i>sma-9</i>)	AY390537	2.80E-20	<i>Burkholderia pseudomallei 1710b</i> (bacteria)
Hb6HC3	Cytochrome oxidase subunit II	YP_817455.1	6.00E-19	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
Hb6HC4	Hypothetical protein CBG09543	NP_505622	3.00E-11	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
Hb6HC5	HMG CoA synthase.	AAA92672	2.00E-14	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HC8	GRound-Like (grd related) <i>grl-23</i>	Z81053	1.60E-25	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HC12	Heat shock protein 20	CAG25499.1	2.00E-30	<i>Ostertagia ostertagi</i> (cattle parasitic nematode)
Hb6HC13	Adp-ribosylation factor related protein 1.2 (<i>arf-1</i>)	AAK18851	4.00E-43	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Hb6HC15	Mitochondrial ribosomal protein, S9, putative	EAT36525	5.00E-06	<i>Aedes aegypti</i>

טבלה מס' 3: ESTs אשר נמצאו תואמים לרצף ידוע ממאגרי מידע (NCBI, Wormbase) והאנוטציה שלהם. טור ה-No. מתייחס למספר הפעמים בהם הגן הופיע בספרייה.

3.4 חלוקה של ה- ESTs לקבוצות על פי מסלולים מטאבוליים עפ"י KEGG

על מנת לקבל פרופיל ביטוי של הרצפים שהתקבלו מספריית ההפחתה על פי תפקידם, הרצפים הושוו ומוינו למסלולים מטאבוליים על ידי מאגר הנתונים- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) ע"י (Kanehisa and Goto, 2000) Automatic Annotation Server.

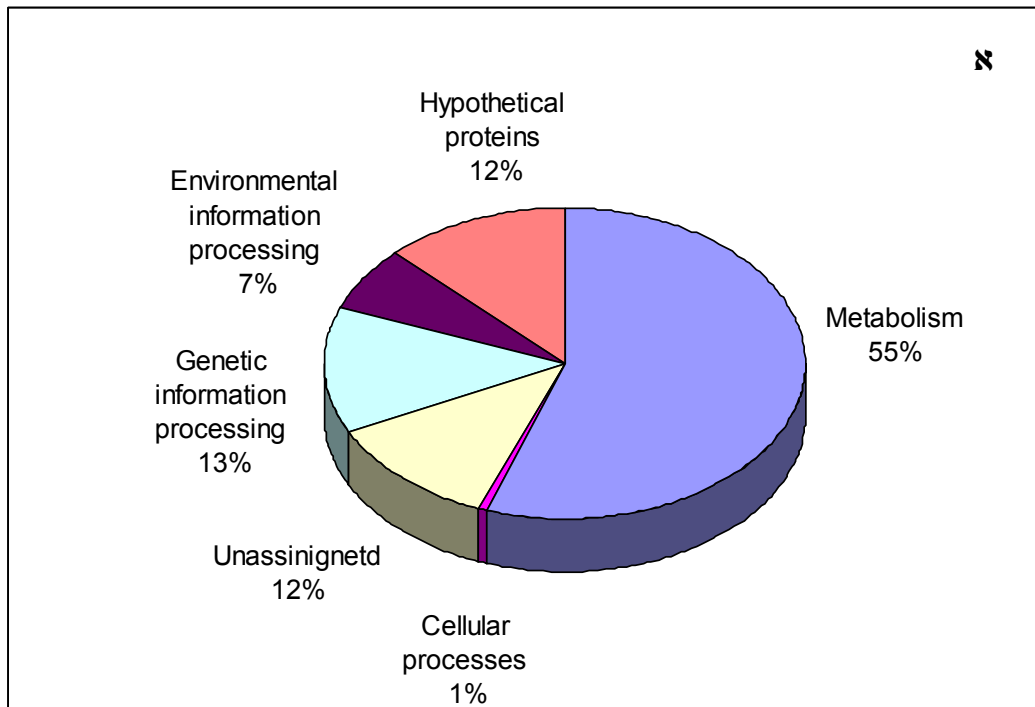
3.4.1 ESTs מספריית הפחתה של שלוש שעות

מאה שבעים רצפים בעלי הומולוגיה לגנים מהנמטודה *C. elegans* מספריית הפחתה של שלוש שעות מוינו לקבוצות על פי KEGG (איור מספר 1א). מרבית הגנים בספרייה זו (98 כ-58%) שייכים לקטגוריה של מטאבוליזם, כאשר מתוכם הרוב (85 כ-50%) שייך לתת קטגוריה של מטאבוליזם של אנרגיה. הקטגוריה השנייה בגודלה היא הקטגוריה של עיבוד מידע גנטי בה נמצאים 23 גנים כ-14% מכלל הגנים בספרייה. בקטגוריה זו רוב הגנים מתחלקים באופן שווה יחסית בין שתי תת קטגוריות שונות האחת- תרגום והשנייה- קיפול מיון ודגרדציה של חלבונים. בקטגוריה של עיבוד מידע מהסביבה רב הגנים (7 כ-5%) שייכים לתת קטגוריה של העברת סיגנלים. עשרים ושניים ESTs כ-15% מכלל הגנים לא מוינו לקבוצה מסוימת ושניים עשר ESTs כ-7% מכלל הגנים הם חלבונים משוערים. התוצאות מוצגות באיור מספר 1א. בעמוד הבא ובטבלה מספר 4 בעמוד 40.

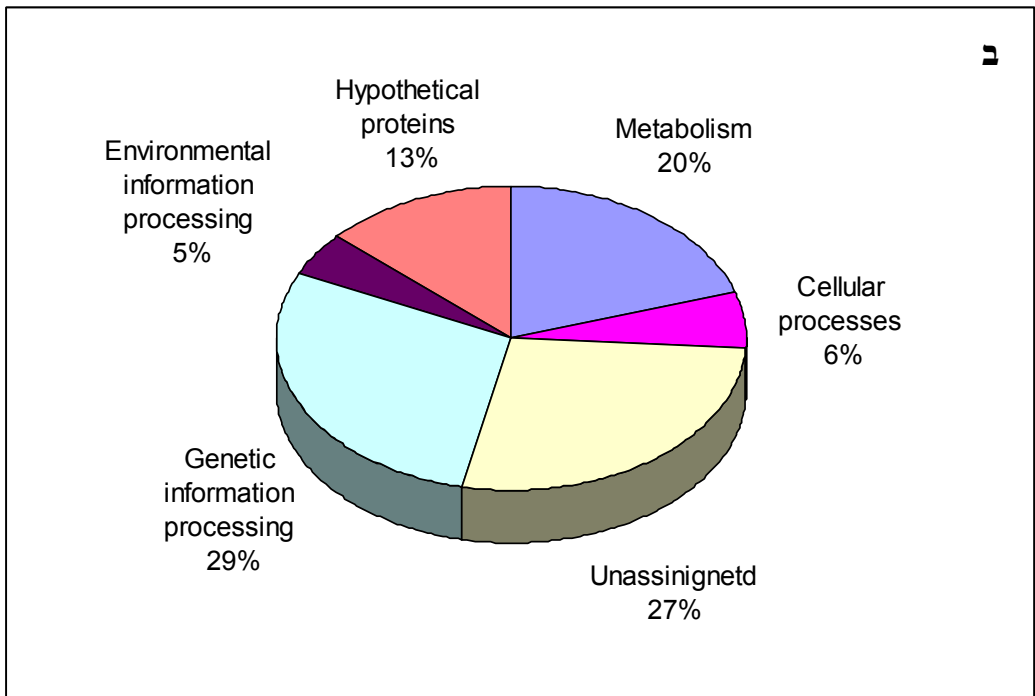
3.4.2 ESTs מספריית הפחתה של שש שעות

מאה חמישים הרצפים בעלי הומולוגיה לגנים מהנמטודה *C. elegans* מספריית הפחתה של שש שעות, מוינו לקבוצות על פי KEGG (איור מספר 1ב). מרבית הרצפים (43 כ-28%) שייכים לקטגוריה של עיבוד מידע גנטי, רובם (20 כ-13%) שייכים לתת קטגוריה של תרגום ולתת קטגוריה של קיפול מיון ודגרדציה של חלבונים (12 כ-8%). כמו כן מספר גדול יחסית של רצפים (30 כ-20%) מופיע בקטגוריה של מטאבוליזם כאשר לרובם תפקיד במטאבוליזם של פחמימנים, במטאבוליזם של אנרגיה וחומצות אמינו. בקטגוריה של עיבוד מידע מהסביבה (7 כ-5%) הגנים משתייכים לתתי קטגוריות של העברת סיגנלים, איטראקציה ליגנד-רצפטור ולחלבונים קושרי GTP. בקטגוריה של תהליכים תאיים (9 כ-8%) מכלל הגנים בספרייה, רוב הגנים (7 כ-5%) שייכים לתת קטגוריה של תנועת התא. ארבעים ואחד ESTs כ-27% מכלל הגנים לא מוינו לקבוצה מסוימת ועשרים ESTs כ-14% מכלל הגנים הם חלבונים משוערים. התוצאות מוצגות באיור מספר 1ב. בעמוד הבא ובטבלה מספר 4 בעמוד 40.

איור מספר 1: חלוקת ה-ESTs מספריות ההפחתה לקבוצות על פי מסלולים מטאבוליים עפ"י KEGG



איור 1.א: ביטוי באחוזים של חלוקת ה-ESTs מספריות הפחתה לאחר שלוש שעות, לקבוצות על פי מסלולים מטאבוליים על פי KEGG.



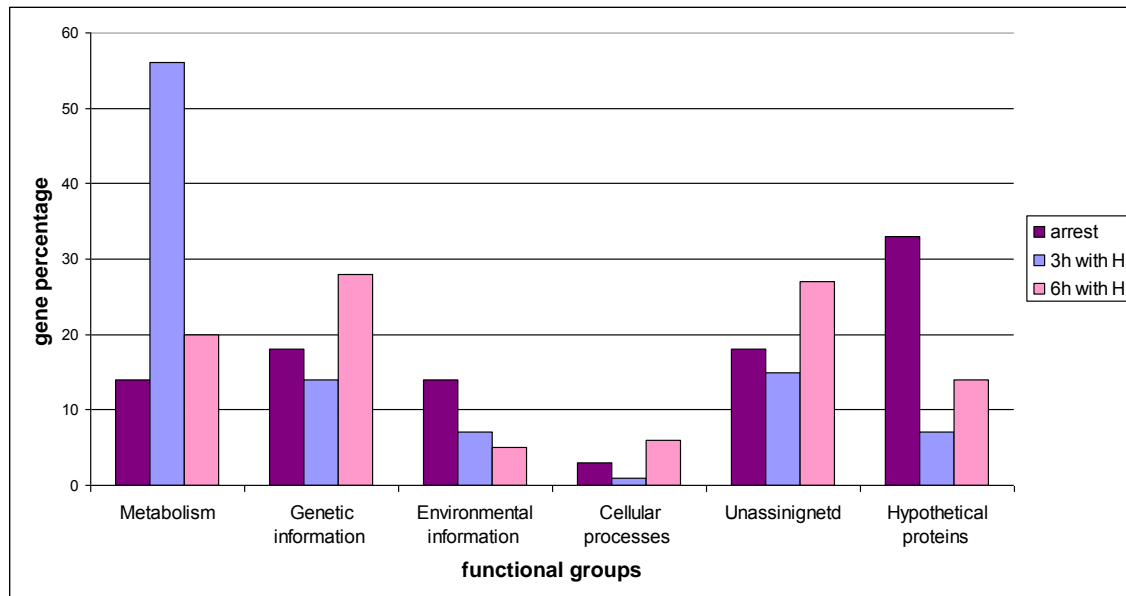
איור 1.ב: ביטוי באחוזים של חלוקת ה-ESTs מספריות ההפחתה לאחר שש שעות, לקבוצות על פי מסלולים מטאבוליים על פי KEGG.

טבלה מספר 4: חלוקה לקטגוריות פונקציונאליות של רצפי *H. bacteriophora* משתי ספריות ההפחה עפ"י KEGG

Regulatory pathway	Number of ESTs 3h	Number of ESTs 6h	Percentage of ESTs 3h	Percentage of ESTs 6h
1. Metabolism	98	30	56	20
1.1. Carbohydrate metabolism	3	7	1.8	4.6
1.2. Energy metabolism	85	7	50	4.6
1.3. Lipid metabolism	2	4	1.2	2.6
1.4. Nucleotide metabolism	1	2	0.6	1.4
1.5. Amino acid metabolism	3	6	1.8	4
1.6. Metabolism of other amino acids	1	0	0.6	0
1.7. Glycan biosynthesis and metabolism	2	1	1.2	0.7
1.8. Metabolism of Cofactors and Vitamins	1	1	0.6	0.7
1.9. Metabolism of Terpenoids and Polyketides	0	0	0	0
1.10. Biosynthesis of secondary metabolites	1	0	0.6	0
1.11. Steroid biosynthetic process	0	2	0	1.4
2. Genetic information processing	23	43	14	28
2.1. Transcription	4	8	2.4	5.3
2.2. Translation	7	20	4	13.3
2.3. Folding, Sorting and Degradation	8	12	5	8
2.4. Replication and repair	4	3	2.4	2
3. Environmental information processing	12	7	7	5
3.1 Membrane transport	0	0	0	0
3.2. Signal transduction	7	2	4	1.4
3.3. Ligand-receptor interaction	1	2	0.6	1.4
3.4. Immune system	0	0	0	0
3.5. Signaling Molecules and Interaction	4	3	2.4	2.2
4. Cellular processes	1	9	1	6
4.1 Transport and Catabolism	1	2	0.6	1.4
4.2 Cell motility	0	7	0	4.6
4.3 Cell growth and death	0	0	0	0
4.4 Cell communication	0	0	0	0
5. Unassigned	21	41	15	27
6. Hypothetical proteins	22	20	7	14
Total	170	150	100%	100%

טבלה מס' 4: מיון של 270 ESTs הומולוגיים לגנים מ-*C. elegans* למסלולים מטאבוליים וביטוי כמות הגנים באחוזים מכלל הגנים בספרייה. המיון נעשה עפ"י Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).

גרף מספר 1: השוואת ESTs של *H. bacteriophora* מזחלים אינפקטיביים בתהליך ה-Recovery לאחר שלוש ושש שעות, ל- ESTs מזחלים אינפקטיביים של *H. bacteriophora* הנמצאים בעצירת התפתחות על פי Sandu et al.



גרף מס' 1: על ידי מיון הגנים לקטגוריות פונקציונאליות ע"י Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) וביטוי מספר הגנים בכל קטגוריה באחוזים מכלל הגנים בספריה, ניתן להשוות בין ESTs משתי הספריות בעבודה הנוכחית ל- ESTs מספריה שהוכנה מזחלים אינפקטיביים הנמצאים בעצירת התפתחות (Sandhu et al., 2006). ההבדלים המשמעותיים ביותר נראים בקטגוריית המטאבוליזם, לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה נראית עלייה ניכרת בשעתוק של גנים המעורבים במטאבוליזם. בקטגוריית מידע גנטי יש עלייה במספר הגנים המתבטאים לאחר שש שעות לעומת שלוש שעות לאחר חשיפה להמולימפה של חרק. בקטגוריית עיבוד מידע מהסביבה אחוז הגנים הגבוה ביותר הוא בזחלים אינפקטיביים הנמצאים בעצירת התפתחות. בקטגוריית תהליכים תאיים מספר הגנים המתבטאים בזחלים אינפקטיביים בתהליך ה-Recovery לאחר שש שעות הוא הגבוה ביותר.

3.5 בחירת גנים להמשך אפיון

הגנים שנבחרו, מתוך הגנים שעלו בספריות ההפחתה, להמשך אפיון נבחרו לפי כמה קריטריונים: (1). על פי מספר הפעמים שהגן הופיע בספריה, בהנחה שגן המופיע בשכיחות גבוהה, משתתף ואף הכרחי לתהליך ה-Recovery. (2). לפי פנוטיפ השתקת הגן ע"י RNAi בנמטודה *C. elegans*, בהנחה כי ישנו מסלול משותף של כניסה ויציאה ממצב של זחל אינפקטיבי המשותף ל-*C. elegans* ולנמטודות אנטומופתוגניות. (3). על פי מידע על שעתוק הגנים בניסויי microarray והאינטראקציות שלהם עם חלבונים אחרים, המצויים במאגר מידע של *C. elegans* wormbase (<http://www.wormbase.org>). (4). גנים הידועים בנמטודה *Brugia malayi* שהיא נמטודה טפילית ואינם ידועים בנמטודה *C. elegans* שהיא נמטודה חופשייה. (5). גנים המעורבים בתהליכי העברת סיגנלים.

מתוך 320 הרצפים בעלי ההומולוגיה של שתי ספריות ההפחתה, נבחרו 23 גנים להמשך אפיון ביוטיים בתהליך ה-Recovery, ע"י RT-qPCR והשתקתם ע"י RNAi לבדיקת מעורבותם בתהליך ה-Recovery.

3.5.1 הגנים שנבחרו מספריית שלוש שעות

- **הגן *akt-1***: הינו גן מקודד לסרין טראונין קינאז. גן זה נבחר מכיוון שהוא אורטולוגי לגן *daf-4* בנמטודה *C. elegans*, הידוע כמעורב בכניסה למצב של זחל dauer ויציאה ממנו ב-*C. elegans* (Paradis and Ruvkun, 1998).
- **הגן *aqp-7***: (AQuaPorin) גן המקודד לחלבון אקווה-גליצרופורין, השייך למשפחת האקווה פורינים. זהו חלבון קטן, הידרופובי, היוצר תעלה בממברנה ותפקידו הוא העברת מים, גליצרול וכנראה מלחים קטנים אחרים (Huang et al., 2007). גן זה נבחר משום שבניסויי microarray בנמטודה *C. elegans* (Liu et al., 2004) WBpaper00024393: strongly regulated dauer genes: לקבוצה: הגן השתייך לקבוצה: (2004).
- **גן המכיל *PH domain***: ('pleckstrin homology') זהו אתר הנמצא בדרך כלל בחלבונים המעורבים בהעברת סיגנלים תוך תאיים. תפקיד האתר הוא בקישור פוספואינוזידים ואינוזיטול פוספט, בחלבוני G, קישור לליפידים, קישור לשיירים מפוספרים של סרין טראונין, והכוונה של חלבונים לממברנת התא (Lemmon and Ferguson, 2000). גן המכיל אתר זה נבחר על שום מעורבותו בהעברת סיגנלים גם בתהליך ה-Recovery.
- **הגן *pdi-2***: (Protein disulfide isomerase) מקודד לאנזים דיסולפידי איזומראז שתפקידו יצירה, שבירה וארגון מחדש של קשרים דיסולפידים בחלבונים. ע"י כך הוא מאפשר את קיפולם הנכון ב-ER (endoplasmic reticulum) והפרשתם (Winter et al., 2007). גן זה נבחר משום שהופיע פעמיים בספריית ההפחתה.
- **הגן *amp-1***: (AdaPtin, Mu/medium) מקודד לאדפטין. ספציפית מקודד לתת יחידה mu1-II של adaptor protein complex-1 (AP-1). קומפלקס זה ממלא תפקיד במיון חלבונים לואזיקולות המעבירות אותם ליעד ספציפי בממברנת התא הנורוני (Boehm and Bonifacino, 2002). גן זה נבחר כי פנוטיפ השתקת הגן ב-*C. elegans* ע"י RNAi הינו: עצירת התפתחות זחל ועצירה מוקדמת של התפתחות זחל (Maeda et al., 2001).
- **גן המכיל *Rho-Gap domain***: אתר המצוי בחלבונים השייכים למשפחת חלבוני Rho שהם חלק מחלבוני G קטנים. חלבונים אלה הינם מעבירים סיגנלים מרצפטורים בממברנת הפלזמה ושולטים בהצמדות תאים, תנועתם וצורתם ע"י יצירת אקטין בציטו-סקלאטון. חלבוני Rho משמשים כמתגים מולקולאריים (switches) המשתתפים בוויסות תהליכים תאיים רבים (Vlahou and Rivero, 2006). גן זה נבחר בגלל מעורבותו בהעברת סיגנלים.
- **הגן *gei-17***: (GEX Interacting protein) מקודד ל-E3 SUMO-ligase. תפקידו הוא בבקרת האנזים *polh-1* (DNA polymerase pol η) המשכפל דנ"א הפגום (Seeler and Dejean, 2003). גן זה נבחר בשל מעורבותו בהתפתחות זחל ה-dauer ב-*C. elegans*.
- **הגן *C15C8.7***: גן ספציפי לנמטודות שאינו ידוע. גן זה נבחר בשל יחודו לנמטודות ותפקידו שאינו ידוע.

- **הגן *glb-1***: (GLOBIN) מקודד לגלובין תוך תאי. חלבונים אלה הם בעלי תכונות ותפקידים מגוונים בחסרי חוליות הכוללים: הישת חמצן, אחסון או טיהור ריאקציות עם פעילות סולפט, אוקסידאז ופראוקסידאז (Hoogewijs et al., 2008a; Vinogradov and Moens, 2008). גן זה נבחר כי ידוע שביטוי מווסת ע"י מסלול insulin/IGF-1. כמו כן בניסויי microarray ב-*C. elegans* גן זה משתייך לקבוצה: WBpaper00024393: strongly regulated dauer genes (Liu et al., 2004).
- **הגן *ttl-15***: (TransThyretin-like) שייך למשפחת חלבונים הספציפיים לנמטודות ודומה לחלבון המעביר את הורמון התירואיד ורטינול (ויטמין A). גן זה נבחר בגלל היותו ספציפי לנמטודות, היותו נפוץ יותר בנמטודות טפילות והתבטאותו בעיקר בדרגות הטפילות (Saverwyns et al., 2008).
- **הגן *itm-1***: (Integral transmembrane protein 1) המקודד לחלבון טרנס ממברנאלי אוליגוסכריל-טראספראז. אנזים זה משתתף בביוסינתזה של N-גליקן. גליקנים מעורבים בתהליכים ביולוגיים רבים מקיפול חלבונים, אוליגומריזציה, יציבות ועד תגובות חיסוניות ואינטראקציה טפיל-פונדקאי. כמו כן הם מעורבים בגליקוזילציה, הממלאת תפקיד חשוב גם בתהליכים התפתחותיים (Berninsone, 2006). הגן נבחר כי ההומולוג לגן נמצא בנמטודה *Brugia malayai* שהיא נמטודה טפילית ולא נמצא לו הומולוג ב-*C. elegans* שהיא נמטודה חופשייה.
- **הגן *srab-14***: (Serpentine Receptor) גן המקודד לכמורצפטור סרפטינין. כמורצפטור זה קושר חלבוני G המעורבים בהעברת סיגנלים בתא. תפקידו מתבטא בחישה של גירויים כימיים חיצוניים והעברת סיגנלים לתא (Bourne, 1997). גן זה נבחר בשל מעורבותו בחישה גירויים חיצוניים ובהעברת סיגנלים לתא.
- **הגן *cct-5***: (Chaperonin Containing TCP-1) מקודד לצ'פרונין אאוקריוטי אשר תפקידו הוא בקיפול חלבוני אקטין וטובולין. תפקידי משפחת גנים זו קשורים לתהליכים תאיים רבים כגון: ריבוי תאים וגדילתם (Lundin et al., 2008). גן זה נבחר כי פנוטיפ השתקת הגן ב-*C. elegans* ע"י RNAi הינו: עצירת התפתחות זחל (larval arrest) (Rual et al., 2004).
- **הגן *ipp-5***: (Inositol polyphosphate 5-phosphatase type I) מקודד לחלבון הומולוג לאינוזיטול 5 פוספט הפועל במורד הגן *let-23* לוויסות שלילי של סיגנלים PI₃ המעורבים במסלול האינסולין לוויסות תהליך ה-Recovery ומעורב ביצירת spermatheca (Bui and Sternberg, 2002). גן זה נבחר כי צפוי להשתתף במסלול העברת סיגנלים של מסלול האינסולין ושל פקטורי גידול ברצפטורים באפידרמיס.
- **הגן *F35C11.5***: צפוי לקודד לחלבון פוספוליפאז A2. זהו אנזים קטן העושה הידרוליזה לפוספוליפידים ומשחרר חומצות שומן וכנראה מעורב בעיצוב מחדש של הפוספוליפידים בממבראנת התא (Tatulian, 2001). גן זה נבחר משום שצפוי לקודד לרצפטור טירוזין פוספטאז הידוע כמעורב בהעברת סיגנלים.

3.5.2 הגנים שנבחרו מספריית שיש שעות

- **הגן *tnt-2***: (TropoNin T family member) מקודד לטרופונין T הנמצא בשריר בבעלי וחסרי חוליות. טרופונין T יוצר קומפלקס עם טרופומיוזין (Allen, 2000). גן זה נבחר כי פנוטיפ השתקת הגן ב-*C. elegans* ע"י RNAi הינו: תנועתיות לא תקינה, ועצירת התפתחות בזחל (Kamath et al., 2003).
- **הגן *rsp-1***: Serine/arginine-rich proteins (SR proteins) חלבון המשמש כ-splicing factor, השייך למשפחה של חלבונים קושרי RNA ובעלי תפקיד חיוני בוויסות של שיחבור pre-mRNA (Kawano, Fujita et al. 2000). גן זה נבחר כי בניסויי microarray ב-*C. elegans* גן זה משתייך לקבוצה: WBpaper00024393 strongly regulated dauer genes (Liu et al., 2004).
- **הגן *rpl-19***: (Ribosomal Protein, Large subunit family member) מקודד לחלבון תת היחידה הגדולה של הריבוזום L-19 (Chen et al., 2007). גן זה נבחר כי בניסויי microarray ב-*C. elegans*, גן זה משתייך לקבוצת גנים: WBpaper00024393 strongly regulated dauer genes (Liu et al., 2004).
- **הגן **F01F.11****: (Hypothetical protein) צפוי לקודד לחלבון טרנס ממברנלי, המכיל רצף SA מסוג II, (רצף המעגן את הצד ה-N טרמינלי של החלבון לצד החיצוני של הציטוזול), (wormbase: <http://www.wormbase.org>). גן זה נבחר כי תפקידו אינו ידוע.
- **הגן *ahcy-1***: (S-adenosylhomocysteine hydrolase) מקודד ל-S אדנוזיל-הומוציסטאין הידרולאז. גן זה נבחר כי בניסויי microarray ב-*C. elegans* גן זה משתייך לקבוצת גנים: WBpaper00024393 strongly regulated dauer genes (Liu et al., 2004).
- **הגן *sdha-1***: (Succinate DeHydrogenase complex subunit A) מקודד לתת יחידה הגדולה (תת יחידה A) או פלבופרוטאין של האנזים סוקינאט דהידרוגנאז השייך לקומפלקס הנשימה II, במיטוכונדריה. אנזים זה מחמצן סוקינאט בתנאים אירוביים ובתנאים אנאירוביים מחזר פומראט (Behm, 2003). גן זה נבחר כי פנוטיפ השתקת הגן ב-*C. elegans* ע"י RNAi כולל מוות עוברי ועצירת התפתחות הזחל (Piano et al., 2002).
- **הגן *pinin***: (pnn) מקודד לחלבון SR-like השייך לקבוצת חלבונים פקטורי שיחבור חיוניים בשחבור של pre-mRNA ב-spliceosom (Wang et al., 2002). גן זה נבחר כי הופיע 3 פעמים בספריית ההפחתה.
- **הגן *ibp-1***: (Lipid Binding Protein family member) מקודד לחלבון מופרש, הקושר חומצת שומן (FABP), הדומה לחלבון מופרש מהנמטודה הטפילה *Ascaris suum* על פי הומולוגיה תפקידו הצפוי הוא להרחיק או להעביר מולקולות הידרופוביות קטנות כגון ליפידים או הורמונים סטרואידים. (Plenefisch et al., 2000). גן זה נבחר בשל מעורבותו בהעברת הורמונים סטרואידים.

- הגן *Rnu3ip2*: (RNA, U3 small nuclear interacting protein 2) הם מולקולות קטנות של RNA החיוניות לעיבוד של RNA ריבוזומלי ליצירת 18S rRNA (Sasano et al., 2008). גן זה נבחר משום שתפקידו הצפוי הוא בהעברת סיגנלים.
- הגן *ier-5* (Immediate early response-5) מקודד לחלבון הצפוי להיות בגרעין. אקטיבציה של גנים ממשפחה זו היא צעד ראשוני חשוב בוויסות של תגובות גנומיות ותאיות לגירויים חיצוניים. (Williams et al., 1999) נחשב כממלא תפקיד בתיווך תגובות תאיות לסיגנלים חוץ תאיים ומופיע בספריה פעמיים.
- הגן *glycoprotein*: צפוי לקודד לחלבון הקושר RNA חד גדילי, ושייך למשפחת חלבונים בעלי RNA recognition motif (RRM). תפקידו של הגן הספציפי הנ"ל אינו ידוע, אך חלבונים ממשפחה זו הם בעלי העדפות מגוונות לקישור RNA ותפקידים שונים כגון: מעורבות בוויסות alternative splicing, בייצוב RNA ובתרגום (Birney et al., 1993). גן זה נבחר בגלל מעורבותו בוויסות שעתוק גנים.

3.6 בדיקת רמת שעתוק הגנים ע"י Real Time quantitative PCR

על מנת לבחון את רמת השעתוק של הגנים שנבחרו ולוודא את תוצאות הספריות, עשרים ושלושה גנים אופיינו במדויק יותר ונבדקה רמת שעתוקם בשני מועדים: לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה ולאחר שש שעות בהשוואה לזחלים אינפקטיביים שלא נחשפו להמולימפה, ע"י Real Time qPCR. תוצאות שיעתוק הגנים נורמלו ביחס לגן 18S שנבחר על סמך עבודות קודמות ולאחר בדיקה של כמה גנים (Ciche, 2007; Hoogewijs et al., 2008b).

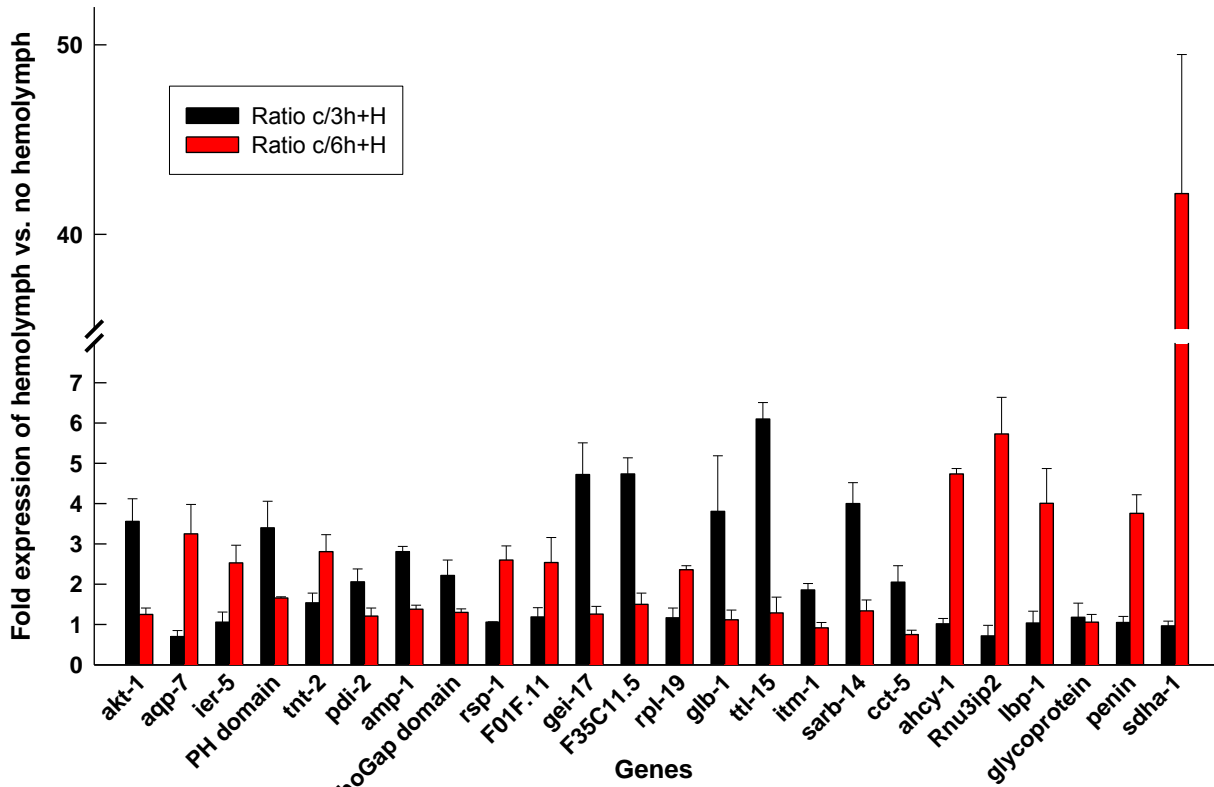
גרף מספר 2 מתאר את ממוצע רמת השעתוק של הגנים לעומת הביקורת מארבע חזרות ביולוגיות ובשלוש חזרות טכניות לכל חזרה ביולוגית. בגרף זה נראית עליה משמעותית ברמת שעתוק הגנים, לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה בגנים שבודדו מספריית שש שעות, וכמו כן עליה בשעתוק של גנים לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה בגנים שבודדו מספריה של שלוש שעות, תוצאות אלו תומכות בתוצאות הספריות ההפחתה. נראית שונות בין רמת שעתוק הגנים לאחר שלוש שעות ושש שעות של חשיפה להמולימפה, דבר המסביר מדוע קיבלתי מעט מאוד גנים המשותפים לשתי הספריות.

בתוצאות שקיבלתי ניתן לראות (גרף מספר 2) עלייה בשעתוק הגנים בזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה בגנים: *akt-1* פי 3.5, בגן המכיל PH domain עלייה ברמת השעתוק פי 3.4, בגן *pdi-2* עלייה פי 2, בגן *amp-1* עלייה פי 2.8, בגן המכיל Rho-Gap domain עלייה פי 2.2, בגן *gei-17* עלייה פי 4.7 לעומת הביקורת, גם בגן C15C8.7 עלייה פי 4.7. בגן *glb-1* עלייה פי 3.8, בגן *itm-1* עלייה פי 1.8, בגן *sarb-14* השעתוק עלה פי 4, בגן *cct-5* פי 2.5, בגן *glycoprotein* עלייה קטנה של שעתוק פי 1.8 ובגן *tlt-15* עלייה פי 6 בשעתוק לעומת זחלי הביקורת שלא נחשפו להמולימפת חרק. כל הגנים הנ"ל בודדו מספריית ההפחתה שנעשתה מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה.

הגנים שבהם נראתה עליה ברמת השעתוק לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה: הגן *aqp-7* עלייה פי 3.5 לעומת הביקורת, בגן *ier-5* עלייה פי 2.5, בגן *tnt-2* עלייה פי 2.8, בגן *rsp-1* עלייה פי 2.6, בגן *sdha-1* עלייה פי 42, ביחס לביקורת. בגן *ahcy-1* נראית עלייה בשעתוק פי 4.7, בגן *Rnu3ip2* עלייה של

פי 5.7, בגן *ibp-1* עלייה פי 4 ובגן *pinin* עליה פי 3.7 בשעתוק לעומת הביקורת. כל הגנים הנ"ל למעט הגן *aqp-7* בודדו מספרית הפחתה ההפחתה שנעשתה מזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה.

גרף מספר 2: רמת השעתוק של 23 גנים שנבדקה ע"י Real Time qPCR לאחר שלוש ושש שעות חשיפת הנמטודות להמולימפה



גרף מס' 2: רמות השעתוק של 23 גנים מהנמטודה *H. bacteriophora* לאחר שלוש ושש שעות חשיפה להמולימפה מיוצגים ע"י עמודות שחורות ואדומות בהתאמה. הערכים הינם ממוצעים של 4 חזרות ביולוגיות של כל חזרה ביולוגית שלוש חזרות טכניות. שגיאת התקן מוצגת על גבי העמודה וחושבה מ-4 החזרות ביולוגיות לכל גן.

3.7 בידוד הגנים *dpy-13* ו-*unc-22* מהנמטודה *C. elegans* ומהנמטודה *H. bacteriophora*

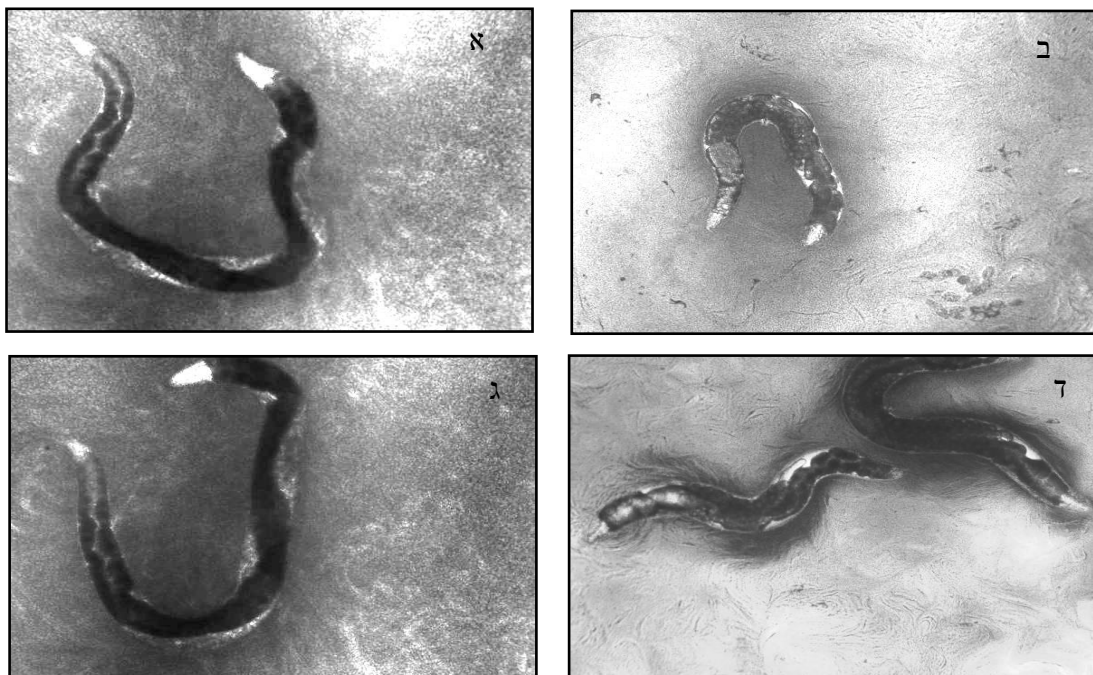
על מנת להעמיד מערכת של השתקת גנים ע"י dsRNAi בנמטודה *H. bacteriophora* היה צורך בסמנים לבדיקת הצלחת התהליך, דהיינו למציאת גנים שהשתקתם מביאה לפנוטיפים ברורים וידועים שישמשו כביקורת חיובית. נבחרו שני גנים אשר השתקתם גורמת לפנוטיפ ידוע ב-*C. elegans* ומקטעי שני הגנים הומולוגיים להם בודדו מ-*H. bacteriophora*. האחד הגן *dpy-13* שהוא גן המקודד לחלבון הקולגן ובהשתקתו מתקבל אפקט ברור על צורת גוף הנמטודה גוף עבה וקצר- גוף הנקרא (Mende et al., 1988). הגן השני *unc-22* (UNCoordinated), הינו גן המקודד לחלבון תוך תאי ענק הדרוש בוויסות של כיווץ והרפיית שרירים. בהשתקתו של גן זה מתקבל אפקט ברור על מורפולוגיית הנמטודות ועל תנועתן

שאינה תקינה ותזזיתית (Kamath et al., 2001). גנים אלו שימשו כסמנים לכיול מערכת השתקת הגנים ע"י dsRNAi בנמטודה *H. bacteriophora*.

3.8 השתקת הגן *dpy-13* ב-*H. bacteriophora*

לאחר כיול המערכת של השתקת גנים ע"י טבילת הנמטודות ב-dsRNA, התקבלה השתקה של הגן *dpy-13* ב-*H. bacteriophora* וכתוצאה מכך ביטוי פנוטיפ של *dumpy*: *dpy-13*, נמטודה גוצה בעלת גוף עבה וקצר (תמונה מס' 8). בהשתקת הגן *unc-22* ב-*H. bacteriophora* לא נראה כל פנוטיפ.

תמונה מספר 8: פנוטיפ השתקת הגן *dpy-13* ע"י dsRNAi ב-*H. bacteriophora*



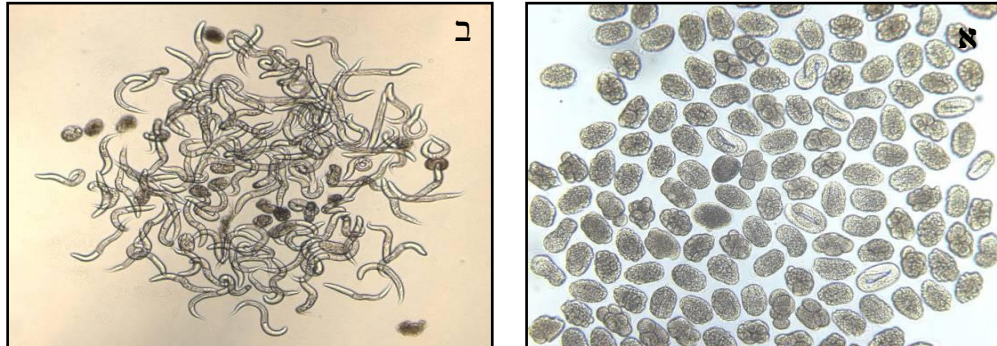
תמונה מס' 8. א ו-ג: נקבות הרמפרודיטיות של *H. bacteriophora* מטיפוס הבר (WT). ב ו-ד: נקבות הרמפרודיטיות של *H. bacteriophora* המבטאות פנוטיפ המתקבל בהשתקת הגן *dpy-13* ע"י dsRNAi. גוף עבה וקצר - גוץ (*dumpy*)

3.9 השתקת 23 הגנים שנבחרו להמשך איפיון ע"י dsRNAi ב-*H. bacteriophora*

RNAi (RNA-mediated interference) בנמטודות מושרה ע"י מקטעי רנ"א דו גדילי ארוכים (dsRNA), מקטעים אלה חודרים לנמטודות ומתפשטים לכל תאי גוף הנמטודה כולל לתאי ה-germline. בנמטודות, RNAi עובר בתורשה לפחות שלושה דורות וגורם לפנוטיפ knock down של הגן שהושתק (Fraser et al., 2000; Grishok, 2005). על מנת לבדוק את 23 הגנים שנבחרו ומעורבותם בהליך ה-Recovery ע"י מבחנים פונקציונאליים, הושתקו הגנים ע"י dsRNAi. השתקת הגנים הרצויים נעשתה ע"י השריית ביצי נמטודות (תמונה 9 א.) בתמיסת dsRNAi למשך 26 שעות, שבה בקעו זחלים מדרגה ראשונה (תמונה 9 ב.). הזחלים שבקעו (J1) הועברו למצע מזון להמשך התפתחות, הפנוטיפים השונים נראו לאחר

4-3 ימים בדור ההורים, לאחר 5-6 ימים בדור שני F1 ולאחר 10-12 ימים הופיעו זחלים אינפקטיביים שנאספו למבחן ביולוגי של Recovery.

תמונה מספר 9: ביצי נמטודות וזחלי J1 בתמיסת dsRNAi



תמונה מס' 9: א. ביצי נמטודות בתמיסת dsRNAi, הגדלה פי 40. ב. זחלים מדרגה ראשונה שבקעו בתמיסת dsRNAi, לאחר 26 שעות, 90% אחוזי בקיעה, הגדלה פי 10.

3.9.1 פנוטיפים שנראו ב- *H. bacteriophora* לאחר השתקת הגן הרצוי ע"י dsRNAi

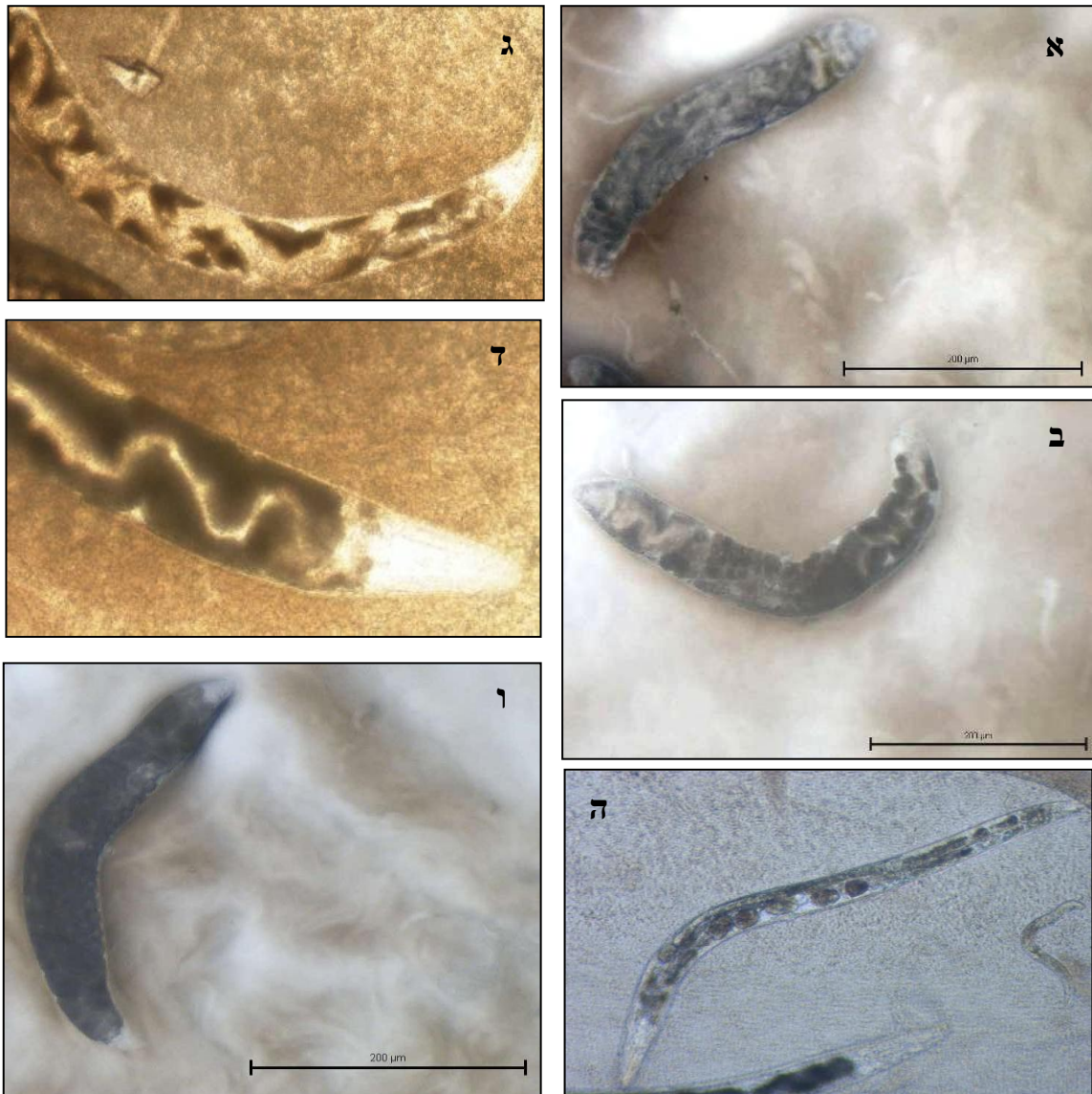
לאחר השתקת הגנים ע"י השרייה בתמיסת dsRNAi נבדקו הפנוטיפים בנמטודות. הפנוטיפים שנגרמו מהשתקת הגנים ע"י dsRNAi נראו ברוב המקרים בצאצאי דור שני, בחלקם בדור ראשון ובחלקם לא נראו פנוטיפים בכלל. הפנוטיפים נראו לרוב 4-5 ימים לאחר זריעה של זחלי J1 על גבי המצע. גנים בהם לא נראו פנוטיפ בכלל: *aqp-7*, *itm-1*, PH-domain, *sarb-14* ו-M-16. גנים בהם לא היו צאצאים: *rpl-19* ו-*rsp-1* ולכן לנמטודות בהן הושקו גנים אלו לא נערך מבחן ביולוגי לתהליך ה-Recovery. הגנים בהם נראו פנוטיפים והפנוטיפים השונים מפורטים בטבלה מספר 5 בעמוד הבא. הפנוטיפים השונים מוצגים בתמונות: 10, 11, 12 בעמודים 50-52.

טבלה מס' 5: פנוטיפים שהתקבלו כתוצאה מהשתקת הגנים ע"י dsRNAi

gene	Predicted function	פנוטיפ ב- <i>H. bacteriophora</i>
<i>aqp-7</i>	AQuaPorin	לא נראה פנוטיפ
<i>akt-1</i>	Serine/threonine protein kinase	מעט מאוד זחלים אינפקטיביים, גידול איטי, Daf, Gro, dauer arrest abnormal
<i>glb-1</i>	Intracellular globin	זחלים צעירים דרגה J1, J2 מעוותים, מעט זחלים דרגה J1, J2. התפתחות לאחר עוברית לא תקינה Postembryonic development abnormal.
PH-domain	PH domain containing protein	לא נראה פנוטיפ
<i>itm-1</i>	Integral transmembrane protein	לא נראה פנוטיפ
<i>srab-14</i>	Serpentine Receptor	לא נראה פנוטיפ
<i>pdi-2</i>	Protein disulfide isomerase	20% מהנקבות מעוותות, רועדות לחלק אין ביצים, או מעט ביצים גוף לא מלא, שקוף, נמומר, נקבות קצרות. Emb, Unc, Let, Pvl, Ste, Adl, Sck.
RhoGAP-domain	Protein that contains a RhoGAP domain	נקבות גדולות מאוד, ארוכות. Long
<i>gei-17</i>	E3 SUMO-ligase	נקבות גוציות, נקבות קטנות, קצרות, איחור בהתפתחות, מורפולוגיה חלק אחורי מוזרה, ולוה בולטת Pvl, Gro, Dpy, Bmd, small
<i>ttl-15</i>	TransThyretin-like family domain	התפתחות לאחר עוברית לא תקינה ב-80% מהזחלים, J2, J3 ו-IJs, מתים. Postembryonic development abnormal, Lvl.
C15C8.7	Un named protein	נקבות ללא ביצים, או מעט מאוד, קצרות ושמןות, מורפולוגיית גוף לא תקינה. Sck, Ste, Bmd.
<i>tnt-2</i>	TropoNin T family member	תנועה תזזיתית, נראים חולים נגררים ומעוותים, J4 מתים, נקבות סטריליות. Ste, Gro, Slu, Unc, Sck.
<i>rsp-1</i>	Alternative splicing factor SRp55/B52/SRp75	גוציות בדרגות שונות, יש נקבות ללא ביצים, או מעט ביצים, ולוה בולטת מאוד, אין זחלים J1, J2 בכלל. שתי ולוות. Emb, Dpy, Rup, Pvl, Ste, Stp, Muv, Lvl
<i>rpl-19</i>	Ribosomal Protein, Large subunit	מעט מאוד זחלים, הזחלים שבקעו לא שרדו. Lvl, Ste.
F01F1.11	Predicted membrane protein	בדור I 20% מהנקבות ללא ביצים, בדור II 90% שקופות וללא ביצים. מעט גוצים Postembryonic development abnormal, Ste, Clr, Dpy.
<i>ahcy-1</i>	S-adenosylhomocysteine hydrolase	איחור בהתפתחות, שמנות, מורפולוגיית גוף לא תקינה, גוף שקוף עם מורפולוגיה מעוותת, תנועה מאוד מאוד נמרצת, מנומרות. Gro, Bmd, Clr, Lvl, Unc, Pch.
<i>sdha-1</i>	Succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit	נקבות מלאות ביצים, שמנות עם מורפולוגיית גוף מעוותת. Emb, Egl.
<i>pinin</i>	Desmosome-associated protein	נקבות קצרות, שמנות, מעט זחלים צעירים מדרגות J1, J2. Small, Lvl.
<i>lbp-1</i>	Fatty acid binding protein (FABP)	70% סטריליות ללא ביצים בכלל, מעט מאוד זחלים J1, J2 קצת מעוותים. Ste Bmd, Lvl.
<i>ier-5</i>	Immediate early response 5-like.	הרבה זחלים J1 מתים, עוברים מתים, גידול איטי. Emb, Gro, Lvl.
Rnu3ip2	RNA, U3 small nuclear interacting protein	10% מהזחלים בדרגת J4 מתים, נראה שההתפתחות לא תקינה, נקבות עם מעט ביצים (3-4). Bmd, Lvl, Ste.
<i>ipp-5</i>	Inositol polyphosphate 5-phosphatase, type I	לא נראה פנוטיפ
F35C11.5	Unnamed protein	הרבה זחלים בדרגות J2-J3 מתים, שתי ולוות. Lvl, Muv.
<i>dpy-13</i>	Collagens (type IV and type XIII),	בדור I 30% מהנקבות עם פנוטיפ dumpy ו-20% בעלות מורפולוגיה לא תקינה Dpy, Bmd, Unc.

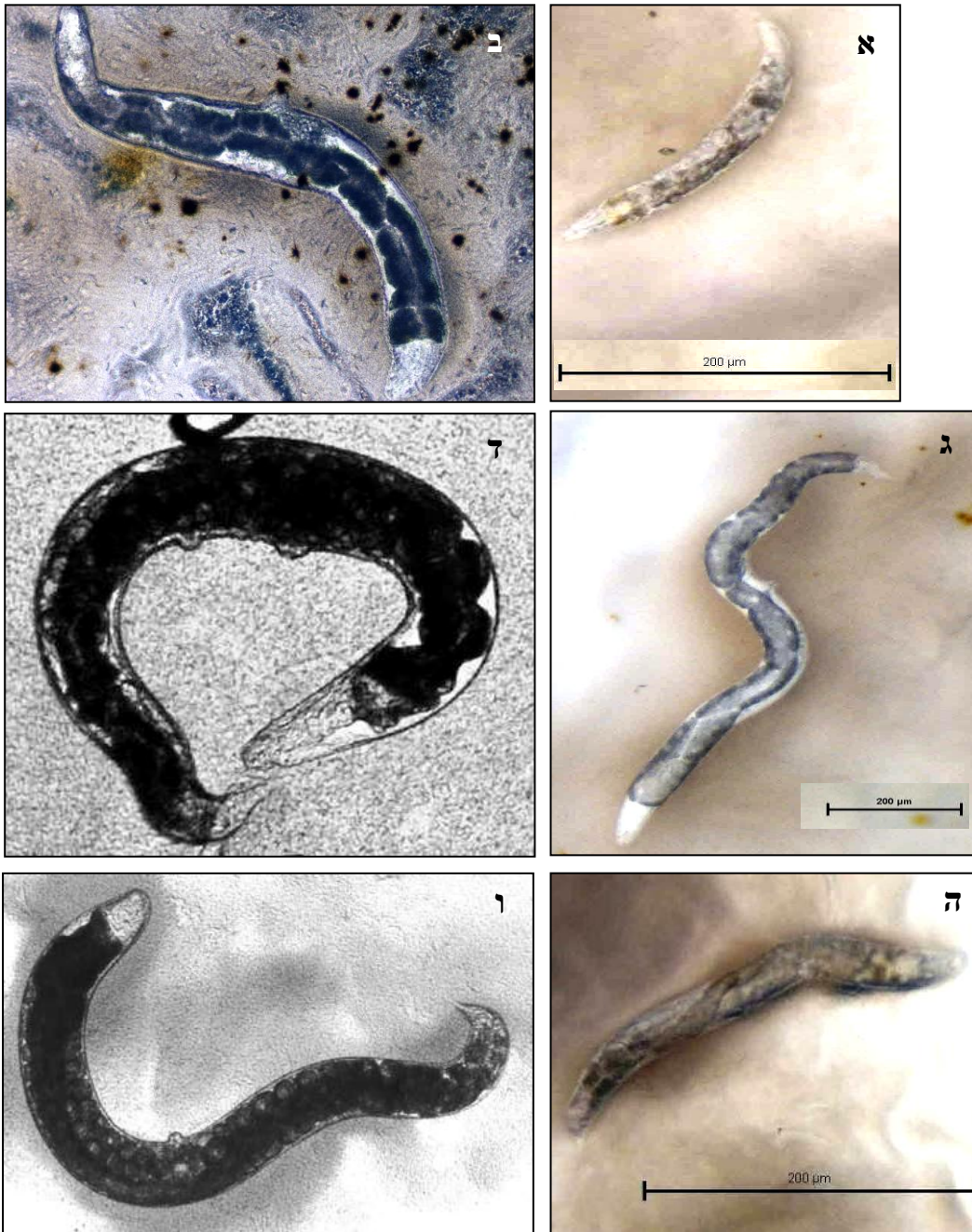
טבלה מס' 5: פירוט פנוטיפים שהתקבלו כתוצאה מהשתקת גנים ע"י dsRNAi. הקיצורים הינם: **Gro** - גדילה איטי, **Sck** - חולה, **Slu** - התפתחות עוברית איטי, **Slu** - נרפה איטי, **Ste** - עקרים, **Stp** - צאצאים עקרים, **Unc** - תנועה לא מתואמת, **Bmd** - מורפולוגיית גוף לא תקינה, **Clr** - שקוף, **Egl** - הטלת ביצים לקויה, **Emb** - מוות עוברי, **Muv** - ולוות מרובות, **Pch** - צביעת תלאים, **Pvl** - ולוה בולטת, **Rup** - התפרצות דרך הולוה, **dpy** - גוץ, **Lva** - עיכוב זחלי, **Lvl** - מוות זחלי, **Age** - הארכת תוחלת חיים, **Daf** - יצירת זחל dauer שאינה תקינה.

תמונה מספר 10: הפנוטיפים השונים שהתקבלו כתוצאה מהשתקת גן רצוי ע"י dsRNAi



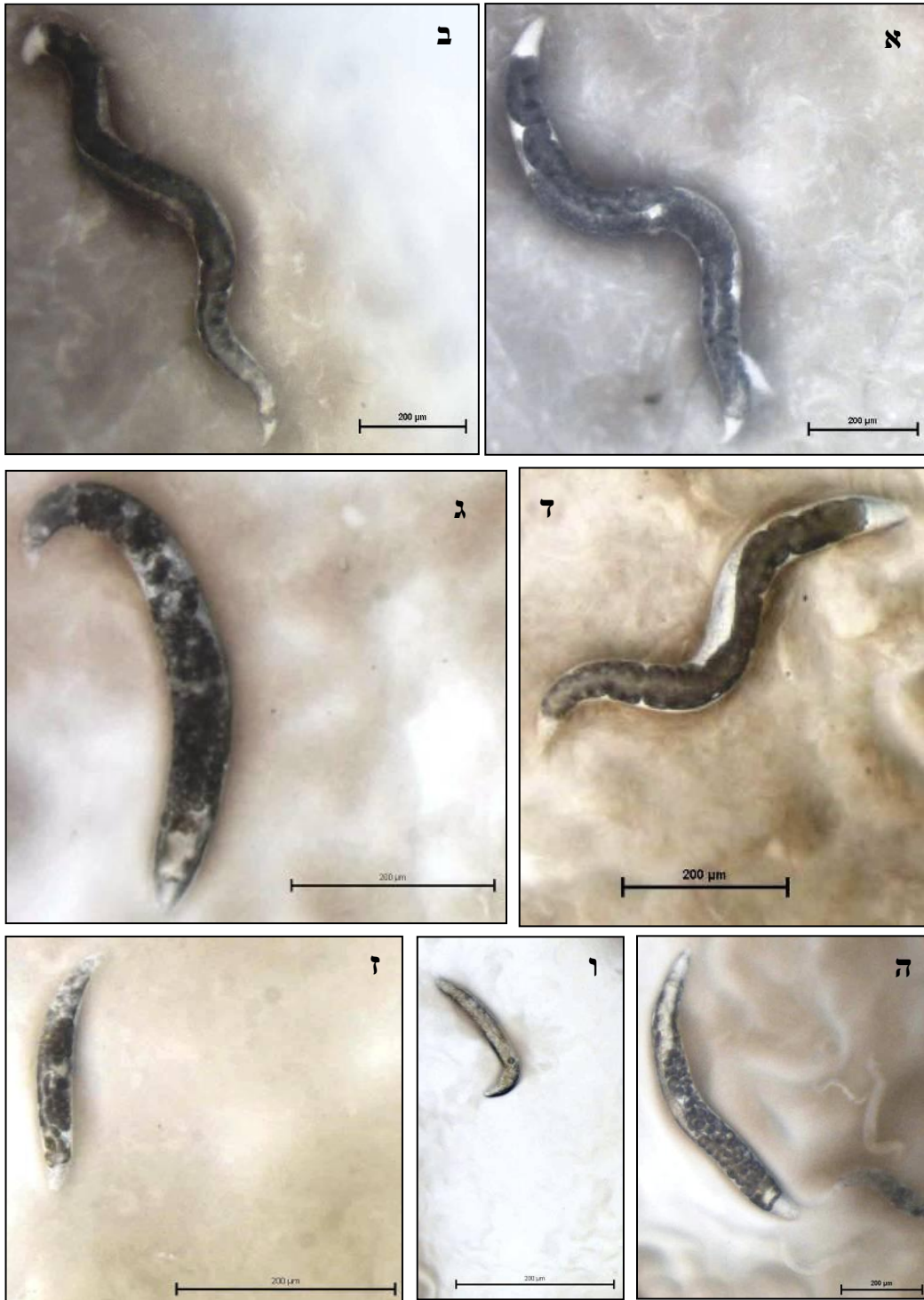
תמונה מס' 10: א. ב. בוגרים בעלי פנוטיפ של מורפולוגיית גוף לא תקינה-Bmd, הפנוטיפ התקבל בהשתקת הגן *pdi-2*. ג. ד. נקבות הרמפרודיטיות בעלות פנוטיפ של צביעת תלאים-Pch, שהתקבל בהשתקת הגן *ahcy-1*. ה. זחל דרגה רביעית בעל פנוטיפ של התפתחות לא תקינה וסטריליות שהתקבל בהשתקת הגן *Rnu32*. ו. נקבה הרמפרודיטית בעלת פנוטיפ גוף-dpy, שהתקבל בהשתקת הגן *tnt-2*.

תמונה מספר 11: הפנוטיפים השונים שהתקבלו כתוצאה מהשתקת גן רצוי ע"י dsRNAi



תמונה מס' 11: א. זחל דרגה שנייה בעל פנוטיפ התפתחות לאחר עוברית לא תקינה (Postembryonic development) *ahcy-1* הגן *Rup* שהתקבל בהשתקת הגן *abnormal*, התקבל בהשתקת הגן F35C.11. ב. בוגר בעל פנוטיפ התפרצות דרך הולווה- *Rup* שהתקבל בהשתקת הגן *ahcy-1*. ג. נקבה הרמפרודיטית בעלת פנוטיפ ולווה בולטת Pvl- וסטריליות Ste- שהתקבלו בהשתקת הגן *rsp-1*. ד. נקבה הרמפרודיטית בעלת פנוטיפ ולוות מרובות Muv- שהתקבל בהשתקת הגן F35C.11. ה. זחל דרגה רביעית בעל פנוטיפ מורפולוגיית גוף לא תקינה- Bmd-התקבל בהשתקת הגן F01F.11. ו. נקבה הרמפרודיטית בעלת פנוטיפ ולווה בולטת- Pvl שהתקבל בהשתקת הגן *lbp-1*.

תמונה מספר 12: הפנוטיפים השונים שהתקבלו כתוצאה מהשתקת גן רצוי ע"י dsRNAi



תמונה מס' 12: א. נקבה הרמפרודיטית מטיפוס הבר-WT. ב. נקבה הרמפרודיטית בעלת פנוטיפ של נמטודה ארוכה- Long התקבל בהשתקת הגן המכיל RhoGap domain. ג. נקבה הרמפרודיטית בעלת פנוטיפ סטריליות Ste- שהתקבל בהשתקת הגן *sdha-1*. ד. נקבה הרמפרודיטית בעלת פנוטיפ מורפולוגיית גוף לא תקינה-Bmd שהתקבל בהשתקת הגן C15C8.7. ה. זחל דרגה רביעית בעל פנוטיפ מורפולוגיית גוף לא תקינה-Bmd שהתקבל בהשתקת הגן *akt-1*. ו. זחל דרגה ראשונה בעל פנוטיפ של התפתחות לאחר עוברית לא תקינה (Postembryonic development abnormal) שהתקבל בהשתקת הגן F35C.11. ז. זחל דרגה שלישית בעל פנוטיפ מורפולוגיית גוף לא תקינה-Bmd שהתקבל בהשתקת הגן *sdha-1*.

3.9.2 מבחן ביולוגי ל-Recovery לאחר השתקת הגן הרצוי ע"י RNAi

על מנת לבדוק איזה מהגנים המושתקים אכן מעכב את תהליך ה-Recovery בנמטודות נערך מבחן ביולוגי. לקבלת זחלים אינפקטיביים לאחר השתקת הגנים, זחלים המטופלים מדרגה ראשונה J1 נזרעו על מצע מזון עני יחסית (NA+cholesterol) (ראה פירוט תמיסות ומצעים עמ' 1 בנספח), המעודד היווצרות של זחלים אינפקטיביים. זחלי ה-J1 התפתחו לנקבות הרמפרודיטיות, ומהן התפתחו זכרים ונקבות או שוב נקבות הרמפרודיטיות של דור שני (F1) ומהם התקבלו זחלים אינפקטיביים בדור הבא (F2). לצורך המבחן הביולוגי נאספו הזחלים האינפקטיביים שהם צאצאי הנמטודות בהן הושקת הגן הרצוי, ונזרעו במספרים ידועים על מצע טרי המעודד Recovery מצע Lipid agar (ראה פירוט בנספח תמיסות ומצעים עמ' 1 בנספח) ועליו מרבד של החיידק הסימביונטי *P. luminescens* שגדל במשך 48 שעות. מספר הזחלים שעברו Recovery והפכו לנקבות הרמפרודיטיות נספר וחושב ביחס לביקורת; זחלים אינפקטיביים שבהם לא הושקת אף גן. מספר הזחלים האינפקטיביים אשר נבדקו לכל גן שהושקת נע בין 250-630. התוצאות מוצגות בטבלה מספר 6 בעמוד הבא.

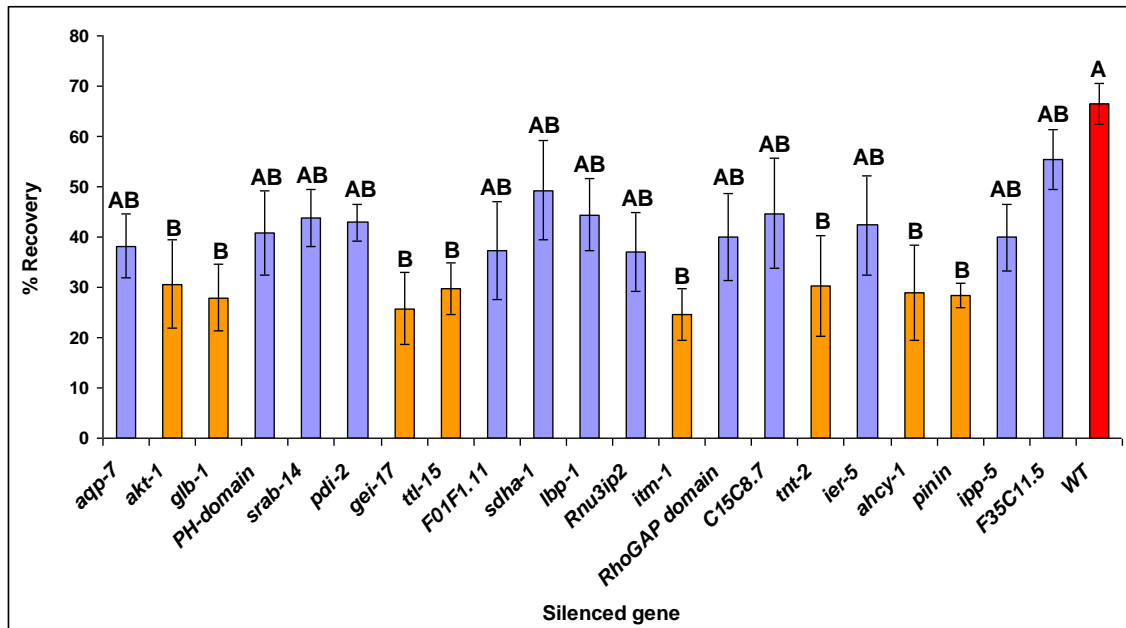
ניתן לראות שאחוזי ה-Recovery בזחלים אינפקטיביים שלא הושקת בהם אף גן, כלומר הביקורת הוא כ-65% בתנאי הניסוי הנוכחיים. ואחוזי ה-Recovery של זחלים אינפקטיביים בהם הושקת גן רצוי, נע בין 25% ל-55%. כלומר כל הגנים שהושקו השפיעו במידת מה על התהליך הנבדק. במבחן סטטיסטי Tukey HSD שנערך, נמצאו הבדלים מובהקים בין שמונה גנים והביקורת, הגנים הם: *itm-1* עם 24.6 אחוזי Recovery, *gei-17* -25.75%, *glb-1* -28%, *pinin* עם 28.3%, *ahcy-1* -28.9%, *tll-15* 29.65%, *tnt-2* 30.26% ו-*akt-1* עם 30.62 אחוזים. במבחן הסטטיסטי נמצא כי ההבדלים הם ברמת מובהקות של 0.05. (ראה גרף מס' 3 עמ' 56).

טבלה מספר 6: אחוזי Recovery של זחלים אינפקטיביים לאחר השתקת גן רצוי

Gene that was silenced	% Recovery in IJs							No. of recovered IJs out of total No. of IJs checked
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	Exp.6	Average± SEM	
<i>aqp-7</i>	33.3	37.5	50.0	18.6	41.8	48.0	38.2±6.3	119/300
<i>akt-1</i>	14.3	-----	11.1	44.4	33.3	50.0	30.6±8.8	100/351
<i>glb-1</i>	-----	-----	30.7	15.1	23.9	42.0	27.9±6.5	84/274
PH domain	-----	21.0	60.9	41.0	28.3	53.1	40.9±8.3	177/457
<i>srab-14</i>	-----	37.2	35.4	35.5	49.5	61.5	43.8±5.7	193/429
<i>pdi-2</i>	-----	46.8	30.1	43.9	49.0	44.4	42.9±3.7	123/293
<i>gei-17</i>	-----	-----	8.6	38.2	29.2	27.0	25.7±7.2	82/294
<i>ttl-15</i>	-----	23.8	-----	21.0	35.7	38.1	29.6±5.1	160/460
F01F1.11	-----	25.0	68.4	25.0	24.1	44.2	37.3±9.6	123/323
<i>sdha-1</i>	-----	50.0	81.3	50.0	34.2	31.1	49.3±9.9	115/292
<i>lbp-1</i>	35.7	17.5	44.2	54.5	61.6	52.9	44.4±7.1	183/388
<i>Rnu3ip2</i>	30.0	24.0	66.7	20.0	32.1	49.0	36.9±7.9	139/373
<i>itm-1</i>	-----	19.3	20.7	38.2	32.0	12.8	24.6±5.1	102/406
RhoGAP domain	-----	26.9	47.9	-----	69.1	44.8	47.2±8.6	176/420
C15C8.7	-----	20.5	68.4	23.5	48.9	62.1	44.7±10.9	111/234
<i>tnt-2</i>	-----	22.8	51.0	10.0	52.0	15.5	30.2±9.9	134/375
<i>ier-5</i>	-----	31.8	-----	32.7	37.3	67.7	42.4±9.8	165/378
<i>ahcy-1</i>	12.1	7.9	47.3	28.6	-----	48.6	28.9±9.5	82/314
<i>pinin</i>	26.2	27.1	35.3	22.2	30.7	-----	28.3±2.5	116/406
<i>Ipp-5</i>	50.0	31.0	-----	21.3	40.4	57.1	40.0±6.6	96/229
F35C11.5	58.3	50.0	72.0	-----	39.7	57.6	55.5±5.9	145/299
WT	62.0	60.7	72.6	81.4	54.5	67.9	66.5±3.9	414/654

טבלה מס' 6: אחוזי Recovery של זחלים אינפקטיביים שהם צאצאי הנמטודות בהן הושקת גן רצוי, בשישה ניסויים והמוצע שלהם עם שגיאת התקן (SEM). בטור האחרון מצויינים סך כל מספר הזחלים האינפקטיביים שעברו Recovery מתוך סך כל הזחלים שנבדקו לכל גן.

גרף מספר 3: אחוזי Recovery-ה בזחלים אינפקטיביים בהם הושק הגן הרצוי



גרף מס' 3: אחוזי Recovery בזחלים אינפקטיביים בהם הושק גן החשוד כמעורב בתהליך, ביחס לזחלים אינפקטיביים של הביקורת בהם לא הושק אף גן. העמודות הצבועות בכתום ומסומנות באות B מסמנות את הגנים אשר השתקם גרמה לשינוי מובהק באחוזי Recovery-ה לביקורת המוצגת באדום ומסומנת באות A לפי מבחן סטטיסטי Tukey test $\alpha=0.05$. שגיאת התקן מוצגת על העמודה וחושבה מכל הניסויים.

3.9.3 בדיקת רמת שעתוק הגנים ב-RT-qPCR לאחר השתקם ע"י dsRNAi

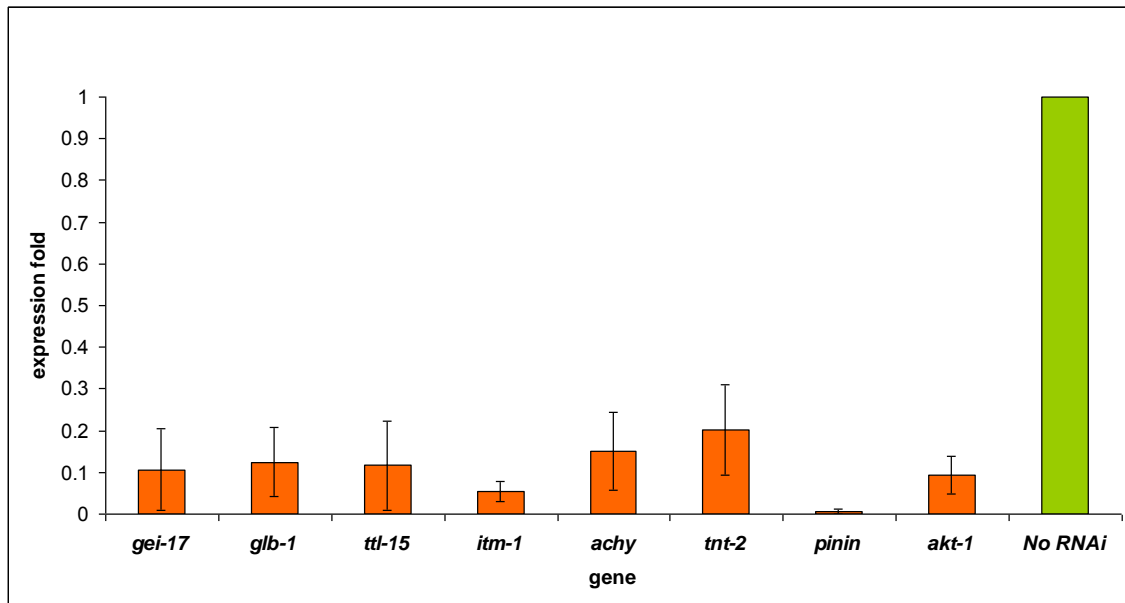
על מנת לוודא את השתקת השעתוק של גן המטרה ע"י dsRNAi בשמונת הגנים בהם נמצא הבדל מובהק ב-Recovery ביחס לביקורת, נבדקה רמת שעתוקם בעזרת RT-qPCR. בדיקת רמת שעתוק הגנים המושקתם נעשתה על רנ"א שהופק מזחלים אינפקטיביים שהם צאצאי הנמטודות בהן הושק הגן הרצוי, (F2). בדיקת רמת שעתוק של הגן המושקת, נעשתה ביחס לרמת שעתוק של אותו הגן בזחלים אינפקטיביים WT, כאשר רמת שעתוקו של כל גן בביקורת מחושב כערך של 1. בדיקת השעתוק נעשתה בשלושה ניסויים שונים המהווים שלוש חזרות ביולוגיות נפרדות ובשלוש חזרות טכניות לכל חזרה ביולוגית. התוצאות מובאות בטבלה מספר 7 ובגרף מספר 4 בעמוד הבא.

טבלה מספר 7: בדיקת רמת השעתוק של הגנים המושתקים בזחלים אינפקטיביים, ע"י RT qPCR

Gene	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Average	SEM
<i>gei-17</i>	1.60E-02	2.37E-04	3.01E-01	1.06E-01	0.097
<i>glb-1</i>	1.74E-03	2.81E-01	9.02E-02	1.24E-01	0.082
<i>tll-15</i>	1.38E-03	3.28E-01	1.99E-02	1.16E-01	0.105
<i>Itm-1</i>	9.04E-03	7.23E-02	8.13E-02	5.42E-02	0.022
<i>ahcy-1</i>	5.95E-02	5.52E-02	3.37E-01	1.51E-01	0.093
<i>tnt-2</i>	6.00E-03	3.82E-01	2.21E-01	2.03E-01	0.108
<i>pinin</i>	9.70E-04	6.40E-04	1.60E-02	5.85E-03	0.005
<i>akt-1</i>	1.86E-03	1.48E-01	1.29E-01	9.30E-02	0.045
No RNAi	1	1	1	1.00E+00	0

טבלה מס' 7: בדיקת השעתוק נעשתה ביחס לביקורת בה לא הושתק אף גן כאשר ערך השעתוק של גן הביקורת מחושב כאחד. הניסוי נעשה בשלוש חזרות ביולוגיות, שכל חזרה ביולוגית היא הממוצע של 3 חזרות הטכניות.

גרף מספר 4: רמת שעתוק הגנים אשר הושתקו ע"י dsRNAi, בזחלים אינפקטיביים



גרף מס' 4: בדיקת רמת השעתוק של הגנים המושתקים ע"י dsRNAi בזחלים אינפקטיביים. הבדיקה נעשתה בזחלים אינפקטיביים בהם הושתקו שמונת הגנים אשר נמצאו שונים באופן מובהק במבחן הביולוגי באחוזי ה-Recovery לעומת הביקורת. הערכים הינם ממוצעים של 3 חזרות ביולוגיות. שגיאת התקן מוצגת על העמודה וחושבה משלוש חזרות לכל ניסוי. התוצאות מובהקות סטטיסטית במבחן Student's *t*-test, $p \text{ value} \leq 0.05$.

בבדיקת רמת השעתוק של הגנים שהושתקו ע"י RNAi בזחלים אינפקטיביים תוצאות ה- Real Time qPCR מראות שישנה ירידה משמעותי בשעתוק של הגנים המושתקים, בזחלים אינפקטיביים שהינם דור שלישי של הנמטודות בהם הושתק הגן הרצוי. בגנים *gei-17*, *glb-1*, *tll-15* ו-*akt-1* ישנה ירידה בשעתוק בממוצע של פי 10 מהביקורת, בגן *itm-1* הירידה בשעתוק הינה פי 20, בגן *ahcy-1* הירידה בשעתוק הינה

פי 6.5 ובגן *pinin* ההשתקה כמעט מלאה והגן כמעט ואינו משועתק בכלל. התוצאות נמצאו מובהקות סטטיסטית במבחן Student's *t*-test ברמת מובהקות של 0.05.

3.10 ביטוי חלבונים במהלך תהליך ה-Recovery

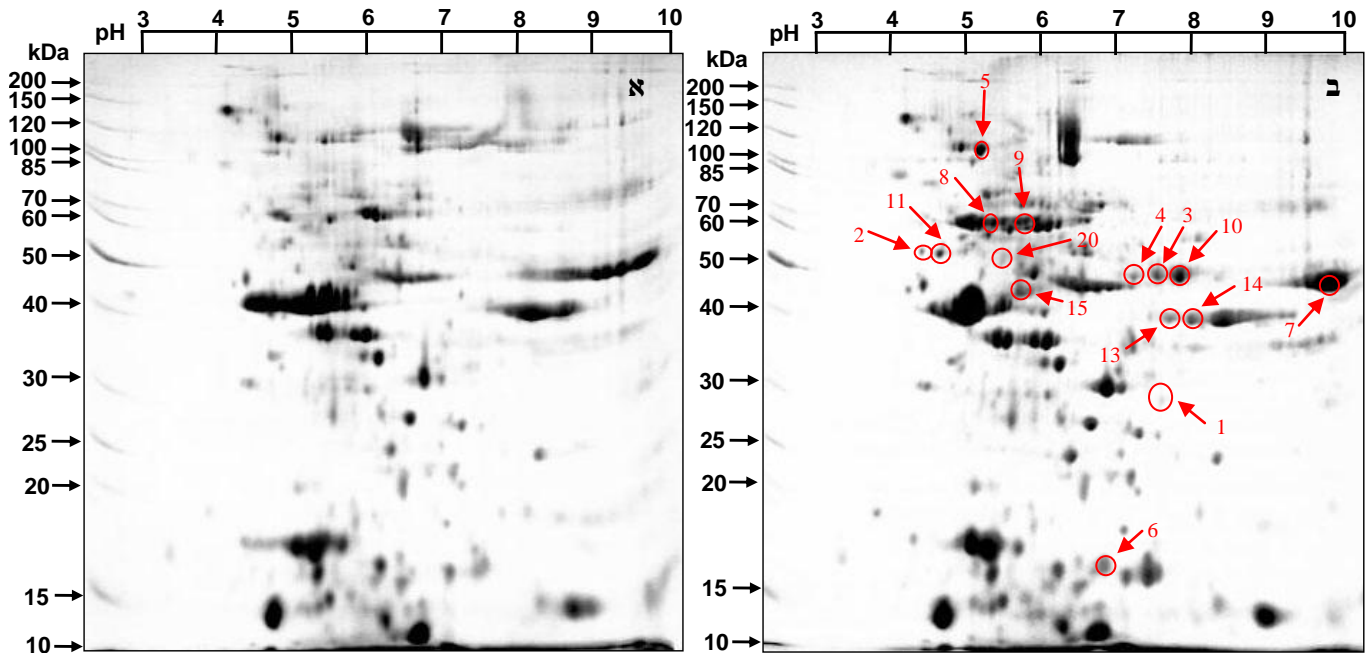
על מנת לראות את ההבדלים גם ברמת ביטוי החלבונים בין זחלים אינפקטיביים הנמצאים בתהליך ה-Recovery לזחלים אינפקטיביים שנמצאים בעצירת התפתחות, הופקו חלבונים מזחלים אינפקטיביים שנחשפו להמולימפה לאחר שלוש שעות ולאחר שש שעות בהשוואה לחלבונים שהופקו מזחלים אינפקטיביים שלא נחשפו להמולימפה של חרק. ה-bioassay לזחלים האינפקטיביים נעשה באותו אופן שנעשה ה-bioassay במטרה להפיק RNA לספריות ההפחה (ראה סעיף 2.3 עמ' 18).

החלבונים הורצו על ג'ל חלבונים והופרדו לפי pH וגודל של כל חלבון. כדי לראות את השינוי בביטוי החלבונים בין הביקורת לטיפול, נעשתה אנליזה לזוגות הגלים בתוכנת Z3, 2D gel image analysis system מתוך כוונה למצוא חלבונים שמתבטאים כתוצאה מהשראת ההתפתחות ע"י המולימפה והמשתתפים בתהליך ה-Recovery. נמצאו שינויים בדגם הביטוי של החלבונים בין הטיפול לביקורת. נראו חלבונים שהתבטאו עלתה או ירדה, כאלה שביטויים לא השתנה וחלבונים שהופיעו רק בזחלים אינפקטיביים שנחשפו להמולימפה. התייחסתי לאחרונים, שכן לדעתי הם מבטאים את השינוי המשמעותי ביותר בחשיפה להמולימפה ומתוך כך אני מסיקה שהם משמעותיים בתהליך ה-Recovery.

בכל נקודת זמן שלוש שעות או שש חשיפה להמולימפה, נעשו שלושה ניסויים נפרדים המהווים שלוש חזרות ביולוגיות (תמונות הגלים הנוספים מובאות בנספח התוצאות עמ' 5-9). החלבונים שנדגמו ונשלחו לזיהוי ע"י MS/MS מסומנים על הגלים. החלבונים שנשלחו לזיהוי הם כאלה המופיעים רק בטיפול ולא בביקורת ומתוך כאן אני מסיקה שהם מופיעים בתגובה לטיפול ההמולימפה וקשורים לתהליך ה-Recovery. בתמונה 13 ניתן לראות את הפרדת החלבונים על ג'ל בשני מימדים של חלבונים מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה ובתמונה 14 את האנליזה של גלים אלו. החלבונים שהוצאו ונשלחו לזיהוי מסומנים בעיגולים אדומים וממוספרים (תמונה 13).

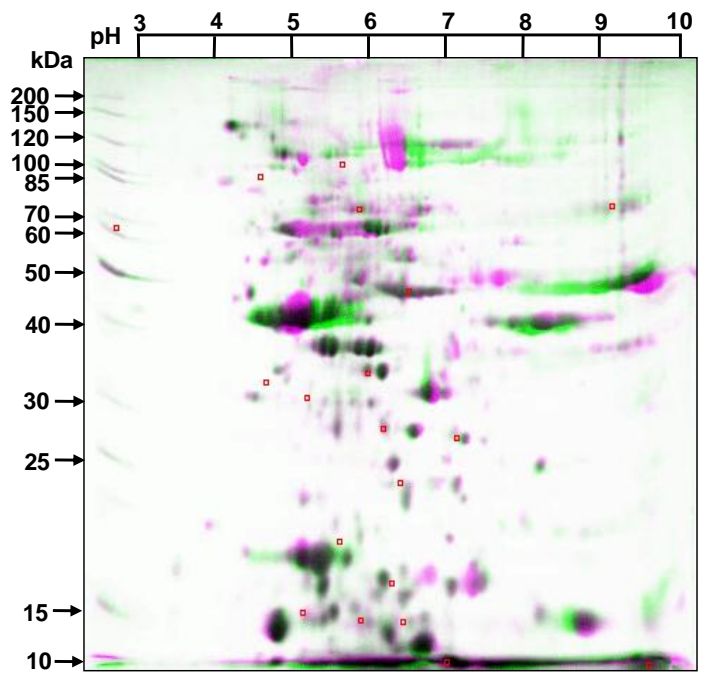
בתמונה 15 ניתן לראות את הפרדת החלבונים על ג'ל בשני מימדים של חלבונים מזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה ובתמונה 16 את האנליזה של גלים אלו. החלבונים שהוצאו ונשלחו לזיהוי מסומנים בעיגולים אדומים וממוספרים (תמונה 15). ניתן לראות שבשני המועדים בהם הופקו החלבונים שלוש שעות ושש שעות, נראו שינויים בביטוי בזחלים אינפקטיביים שנחשפו להמולימפה.

תמונה מספר 13: ג'ל חלבונים I, שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות עם ובלי המולימפה



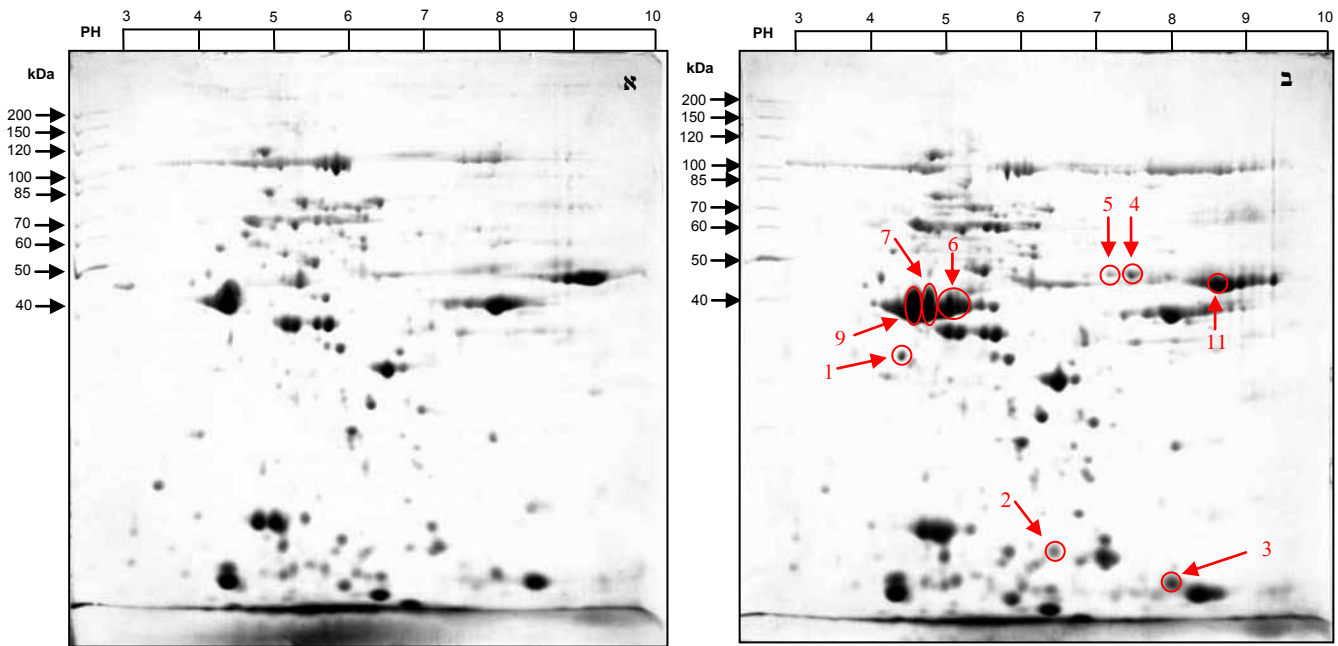
תמונה מס' 13: א. חלבונים שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות- ביקורת ב. חלבונים שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה - טיפול. החלבונים שהוצאו ונשלחו לזיהוי מסומנים בעיגולים אדומים וממוספרים.

תמונה מספר 14: אנליזה ג'ל חלבונים I שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות עם ובלי המולימפה.



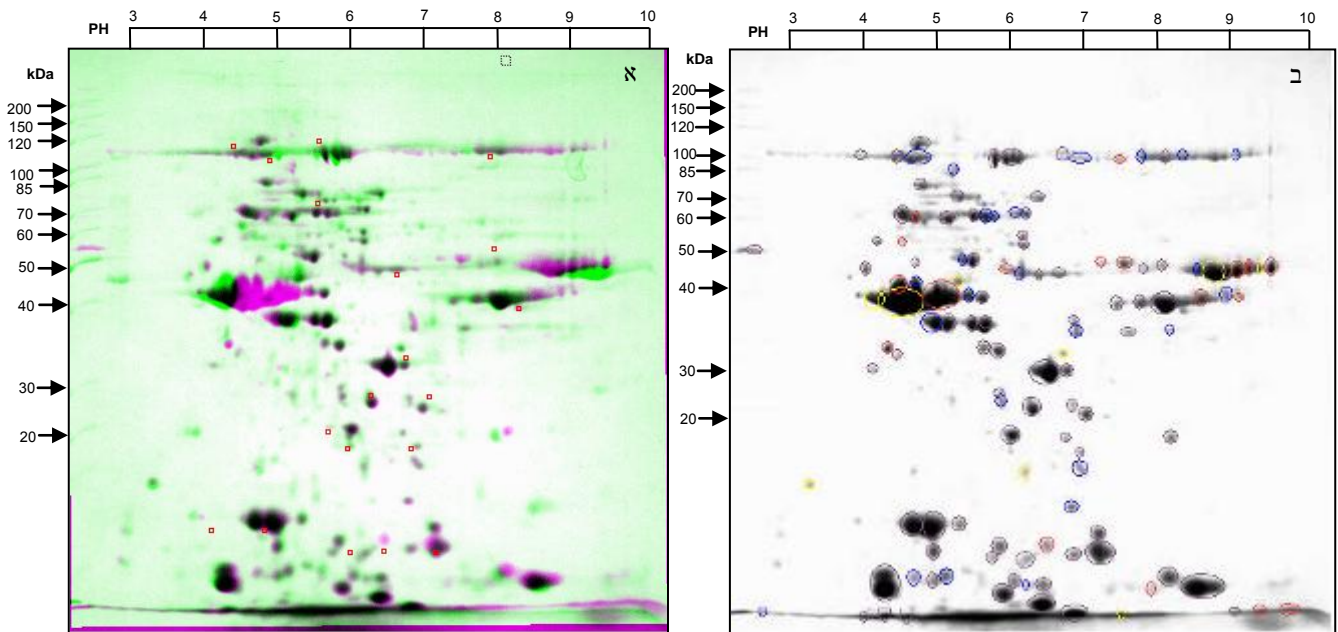
תמונה מס' 14: א. אנליזה של ג'ל חלבונים בשני מימדים כאשר שני הגלים מונחים האחד על השני. הג'ל הצבוע בירוק הוא ג'ל הביקורת והג'ל הצבוע בורוד הוא הטיפול, האזורים הצבועים בורוד הם חלבונים המופיעים רק בג'ל הטיפול ואזורים הצבועים בירוק הם חלבונים המופיעים רק בביקורת.

תמונה מספר 15: ג'ל חלבונים I שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות עם ובלי המולימפה



תמונה מס' 15: א. חלבונים שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות - ביקורת. ב. חלבונים שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה - טיפול. החלבונים שהוצאו ונשלחו לזיהוי מסומנים בעיגולים אדומים וממוספרים.

תמונה מספר 16: אנליזה ג'ל חלבונים I שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות עם ובלי המולימפה



תמונה מס' 16: א. אנליזה כאשר שני הגלים מונחים האחד על השני, הג'ל הצבוע בירוק הוא ג'ל הביקורת והג'ל הצבוע בורוד הוא הטיפול, האזורים הצבועים בורוד הם חלבונים המופיעים רק בג'ל הטיפול ואזורים הצבועים בירוק הם חלבונים המופיעים רק בביקורת. ב. ניתוח ממוחשב חלבונים המסומנים בכחול: מידת ביטויים עלתה בטיפול לעומת הביקורת, חלבונים המסומנים בצהוב: מידת ביטויים ירדה בטיפול לעומת הביקורת, חלבונים המסומנים באדום: הופיעו רק בטיפול ולא בביקורת וחלבונים המסומנים באפור לא השתנו בין הביקורת לטיפול.

3.10.1 זיהוי החלבונים מהג'לים ע"י LC/MS/MS

Liquid chromatography-mass) LC/MS/MS נעשה ע"י (spectrometry) והאנליזה לתוצאות נעשתה ע"י תוכנת SEQUEST ומול מאגר מידע של חלבוני נמטודות בלבד. טווח ה-pH בג'לים הינו 3-10 זהו טווח רחב מאוד ובו צפוי שנקודה אחת תכיל יותר מחלבון אחד. זיהוי החלבונים שהתבטאו בזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה מובאים בטבלה מספר 8.

טבלה מספר 8: חלבונים שהתבטאו בזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה

Spot no.	Reference	Probability	Score	Accession no.	expected	in gel
					Protein MW (Kda)/PI	Protein MW (Kda)/PI
1	RACK1 (mammalian Receptor of Activated C Kinase) (<i>rack-1</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	4.92E-07	30.18	17541222	35.8/6.4	30/7.6
	Malate DeHydrogenase family member (<i>mdh-1</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	2.12E-06	30.18	17554310	35.1/9.4	30/7.6
2	Calreticulin-like protein [<i>Haemonchus contortus</i>] (barber pole worm)	2.70E-06	30.14	41176449	43.6/4.8	52/4.4
3	UDP-glucose pyrophosphorylase [<i>Brugia malayi</i>]	3.75E-08	30.26	157755675	58.9/6.9	48/7.6
	Glutamate dehydrogenase, mitochondrial precursor, putative [<i>Brugia malayi</i>]	1.55E-06	50.18	157775599	56.8/6.7	48/7.6
	UNCoordinated family member (<i>unc-87</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>].	7.51E-05	40.15	157764130	44.2/5.3	48/7.6
4	Arginine kinase [<i>Caenorhabditis briggsae AF16</i>]	6.31E-07	30.22	157770444	41.8/6	48/7.2
5	UBiQuitin family member (<i>ubq-1</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	2.10E-06	20.11	25151716	93.9/6.9	105/5.2
6	Nucleoside diphosphate kinase [<i>Brugia malayi</i>].	1.26E-07	20.21	17506807	17.1/7	16/6.9
	Major Sperm Protein family member (<i>msp-10</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	1.45E-05	30.19	17541624	14.2/7.8	16/6.9
7	Putative calponin [<i>Meloidogyne incognita</i>]	1.33E-12	60.19	12697208	39.9/8.93	46/9.6
	ACTin family member (<i>act-4</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	1.57E-06	90.15	17568985	41.7/5.3	46/9.6
9	Heat Shock Protein family member (<i>hsp-60</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	1.06E-10	110.28	17555558	60/5.3	60/ 5.4
	ATP synthase subunit family member (<i>atp-2</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	1.68E-10	120.26	25144756	57.5/5.5	60/ 5.4

	Propionyl Coenzyme A Carboxylase Beta subunit family member (<i>pccb-1</i>) [<i>Caenorhabditis briggsae</i>]	4.11E-09	30.21	268578677	58.5/6.1	60/ 5.4
10	ATP synthase beta subunit [<i>Stylochus</i> sp. KJP-2004]	4.50E-07	3.95	46909255	46.1/5.12	45/7.8
	Fructose-bisphosphate aldolase [<i>Caenorhabditis briggsae</i>]	7.69E-08	50.22	268576316	39.2/6.2	38/7.6
13	Arginine kinase [<i>Caenorhabditis briggsae</i>]	1.61E-10	90.26	268580051	41.7/6	38/7.6
	Malate DeHydrogenase family member (<i>mdh-1</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	9.98E-07	60.21	17554310	35.1/9.9	38/8
14	Hypothetical protein F01F1.12 (aldolase) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	1.75E-13	30.26	71983985	38.8/7.7	38/8
	Temporarily Assigned Gene name family member (<i>tag-210</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	4.18E-10	30.21	17509631	44.3/6.4	44/5.8
	Proteasome Regulatory Particle, ATPase-like family member (<i>rpt-6</i>) [<i>Caenorhabditis briggsae</i>]	3.64E-09	30.26	268561690	46.5/8.95	44/5.8
15	UNCoordinated family member (<i>unc-87</i>) [<i>Caenorhabditis briggsae</i>]	1.98E-11	70.23	268558662	44.2/5.3	44/5.8
	ACTin family member (<i>act-4</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	1.11E-15	278.32	71994099	40.4/5.83	44/5.8
	Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble [<i>Caenorhabditis briggsae</i>]	7.06E-08	30.19	268535544	48.5/6.65	48/5.8
20	CBR-UNC-57 protein [<i>Caenorhabditis briggsae</i>]	2.46E-05	38.18	268564197	49.9/5.9	48/5.8
	Necepsin II [<i>Necator americanus</i>]	1.79E-06	30.17	9581805	49.5/6.67	48/5.8

טבלה מס' 8: אנוטיציה של חלבונים שהוצאו מג'ל החלבונים של זחלים אינפקטיביים שנחשפו להמולימפה במשך שלוש שעות וזוהו ע"י LC/MS/MS-Probability. ההסתברות של מציאת התאמה במקרה. ככל שערך ההתאמה נמוך יותר ההתאמה טובה יותר, **Score** - ניתן ע"י תוכנת ה-SEQUEST לתוצאה שהתקבלה. ככל שהניקוד יותר גבוה כך ההתאמה טובה יותר של הרצף לחלבון.

3.10.2. פירוט החלבונים שהתבטאו בזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה

- **RACK1** (Mammalian receptor of activated C kinase): רצפטור חלבוני ל-C kinase, המעורב בהעברת סיגנלים ובתקשורת בין תאית, כנראה מעורב גם בהצמדות תאים ובתיווך סיגנלים המועברים לרצפטור לפקטור גידול (IGF-I) (Kiely et al., 2005).
- **MDH-1** (Malat dehydrogenase): זהו האנזים האחרון במעגל החומצה הציטרית. אנזים זה צפוי להיות מטוכונדריאלי. מעורב מטאבוליזם, בייצור אנרגיה ושימורה (Tabuse et al., 2005). הגן המקודד לחלבון זה *mdh-1* הופיע פעמיים גם בספריית ההפחתה לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה.

- **Calreticulin**: חלבון זה הוא צ'פרון הקושר מולקולות של קלציום וע"י כך שומר על מאזן הקלציום בתא. בנמטודות חלבון זה מופרש מדרגת הזחל המדביק וכנראה מעורב בהתחמקות ממערכת החיסון של הפונדקאי. חלבון זה חיוני לאינטראקציה טפיל פונדקאי (Rzepecka et al., 2009). ההומולוג לחלבון זה בנמטודה *Haemonchus contortus* גודלו 43kD ואילו בנמטודה *Meloidogyne incognita* גודלו הוא 48kD מכאן שלא מן הנמנע שב-*H. bacteriophora* משקלו גדול יותר.
- **UDP-glucose pyrophosphorylase**: אנזים המשתתף במטבוליזם של פחממות, בבייסינטיזה של גלוקוז ומקטלז את התגובה: $\text{UDP-glucose} \leftarrow \text{UTP and glucose-1-phosphate}$ (Jiang et al., 2010).
- **UNC-87 (UNCoordinated)**: חלבון שריר דופן הגוף. חלבון הדרוש לשמירה על מבנה של סיבי השריר בתאים הבונים את דופן גוף הנמטודה. חלבון זה דוחס אקטין (Kranewitter et al., 2001).
- **Arginin kinase**: אנזים זה משמש כ-phosphogene בנמטודות ומזרז ע"י טרנס-פוספורילציה את התגובה: $\text{N-phospho-L-arginine} + \text{ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{L-arginine}$. אנזים זה משמש כמוסט ATP למאזן האנרגיה המקומי (Wickramasinghe et al., 2007). כמו כן ידוע כי אנזים זה מתבטא בתהליך ה-Recovery ב-*C. elegans* (Wang and Kim, 2003).
- **UBQ-1 (UBiQuitin)**: פוליפפטיד אשר נקשר לחלבוני מטרה ומסמן אותם לפרוק ע"י פרוטאזום-26S. לפחות ארבעה חלבוני יוביקיטין צריכים להקשר לחלבון המטרה בכדי שיוכר על ידי הפרוטאזום. אם רק חלבון יוביקיטין אחד או פחות מארבעה נקשרים לחלבון המטרה, הדבר יכול להוביל לשינוי בפעילות החלבון כולל שינוי בבקרה ע"י שעתוק, שינוי ביעוד החלבון ושינוי באנדוציטוזיס (Kipreos, 2005).
- **NDP kinase (Nucleoside diphosphate kinase)**: אנזים המקטלז פוספורילציה של נוקלאוזיד 5' דיפוספט לנוקלאוזיד 5' טריפוספט. הוא שומר על רמות מאוזנות של dNTPs ו-NTPs בתא. משמש גם כ-housekeeping enzyme בסנתזה של RNA ו-DNA. לחלבונים ממשחה זו תפקידים נוספים בבקרה של גדילה והתפתחות, העברת סיגנלים, שעתוק ושפעול של חלבונים קושרי GTP. חלבון זה נמצא מופרש בדרגת הזחל המדביק בנמטודה הטפילה על יונקים (*Trichinella spiralis*) (Gounaris, et al., 2001).
- **MSP-10 (Major Sperm Protein)**: חלבון זה שייך למשפחת חלבונים Major Sperm Protein השמורה בנמטודות. חלבונים ממשחה זו מעורבים בסיגנלים חוץ תאיים ובתפקידים תוך תאיים בציטוסקלטון לצורך רבייה (Miller et al., 2001).
- **Calponin**: חלבון הקשור לפילמנט הדק המעורב בוויסות וכיוון של כיווץ שריר. חלבון זה מסוגל להקשר לאקטין, קלמודולין, טרופונין C ולטרופומיוזין. בנמטודה *C. elegans* חלבון זה הוא UNC-87 (Winder and Walsh, 1993). חלבון זה נמצא מתבטא גם בנמטודה הטפילה על צמחים *Meloidogyne incognita* בדרגה שנייה שהיא הדרגה המדביקה, אשר מתאפיינת ביכולת תנועה וחודרת לשורש הצמח (Castagnone-Sereno et al., 2001).

- **ACT-4 (Actin)**: סיבי חלבון האקטין המרכיבים את מיקרופילמנט בתאים. תפקידו במבנה השלד בתא ובצורת תאים נודדים. ב-*C. elegans* חלבון זה מתבטא בדופן הגוף, בשרירי הולווה ובספרמטקה (Krause et al., 1989). הגן המקודד לחלבון זה *act-4* הופיע גם בספריית ההפחתה לאחר ששעות חשיפה להמולימפה.
- **HSP 60 (Heat shock protein)**: הוא צ'פרון ספציפי למיטוכונדריה והוא משתייך למשפחת הצ'פרונים GroE/Hsp10/60. חלבון זה כנראה מעורב בתגובת החלבונים שאינם מקופלים במיטוכונדריה ובוויסות הביטוי של צ'פרונים בתגובה לשינוי סביבת קיפול החלבונים באיבר. השתקה של הגן ע"י RNAi בנמטודה *C. elegans* גרמה לפנוטיפ של פגמים קשים בגידול וכמו כן לעצירת התפתחות בשלבי התפתחות הזחל המוקדמים (Yoneda et al., 2004).
- **ATP-2 (ATP synthase subunit)**: תת יחידה של האתר הפעיל של קומפלקס V, של האנזים ATP-synthase. אנזים זה הוא חלק ממערך השרשרת הנשימתית במיטוכונדריה (MRC) המשמשת מקור עיקרי ל-ATP (Tsang et al., 2001).
- **PCCB-1 (Propionyl Coenzyme A Carboxylase Beta subunit family member)**: זהו אנזים המזרוז את השלב הראשון בקטבוליזם של propionyl-CoA. פרופיוניל CoA הינו תוצר ביניים במטאבוליזם של כמה חומצות אמינו ונוצר גם ע"י חימצון של חומצות שומן מסוימות (Chandler et al., 2006).
- **ATP synthase**: אנזים זה הוא חלק ממערך השרשרת הנשימתית במיטוכונדריה (MRC) המשמשת מקור עיקרי ל-ATP. בנמטודה *C. elegans* אנזים זה נחוץ להתפתחות עוברית ולהתפתחות הזחל לאחר דרגה שלשית, כמו כן הוא דרוש לניידות, לשאיבת מזון ע"י הלוע, להפרשה דרך האנוס, לקצב גידול, ולתוחלת החיים בזחלים (Gonczy et al., 2000; Tsang et al., 2001).
- **FBP (Fructose-bisphosphate aldolase)**: זהו אנזים מפתח בתהליך הגליקוליזה האחראי על התגובה ההפיכה של פרוק פרוקטוז 6,1-ביפוספט לגילצראלדהיד 3-פוספט ולדיהידרואוקסיאצטון 3-פוספט (Kovaleva et al., 2005) הגן לחלבון זה הופיע בספריית ההפחתה לאחר ששעות.
- **Temporarily Assigned Gene (tag-210)**: חלבון הצפוי לקשור GTP ושייך למשפחת חלבוני OBG. חלבונים ממשפחה זו הם חלבונים קטנים קושרי GTP שתפקידם אינו ידוע והם שמורים באבולוציה מחיידקים ועד בני אדם. הם מעורבים בתגובות לעקות שונות, חלוקת כרומוזומים, תחילת תרגום ומשמשים כמתגים ביולוגיים בתהליכים תאיים כגון בהעברת סיגנלים, בהעברת חלבונים והכוונתם ובוויסות מחזור התא (Buglino et al., 2002). תפקידו של חלבון זה אינו ידוע, אך ייתכן וכי הוא קשור לוויסות של תרגום (Mori and Ohshima, 1995).
- **RPT-6 (ATPase-like family member)**: אנזים זה הינו תת יחידה של הקומפלקס המווסת את פרוטאזום 26S ודרוש להתפתחות עוברית ולהתפתחות הזחל. תפקידו הצפוי הוא בקישור לסובסטרטים של חלבונים לא מקופלים ובהעברתם לליבת יחידה הפרוטאוליטית (CP) proteolytic particle של הפרטאזום (Takahashi et al., 2002).

- **IDH-1** (Isocitrate Dehydrogenase): מזרז את תגובה התלויה ב-NAD/NAD של הסובסטרטים: מלאט ↔ אוקסלואצטט. תגובה זו בעלת תפקיד במעבר מלאט/אספרטט בממברנת המיטוכונדריה. כמו כן לאנזים תפקיד במעגל החומצה הטריקרבוקסילית בתוך המיטוכונדריה (Minarik et al., 2002).
- **UNC-57** (UNCoordinated) זהו חלבון האורטולוג לחלבון אנדופילין A (endophilin A). זהו חלבון הקשור לממברנה והדרוש לחידוש של הוויקולות הסינפטיות הנמצאות בקצות תאי העצב. במהלך גירוי עצבי הוויקולות הסינפטיות מתאחות עם ממברנה ומשחררות מולקולות המשמשות כנויירורנסמיטרים (neurotransmitter). לאחר שיחרור הנויירורנסמיטרים הוויקולות צריכות להתחדש, תהליך זה נעשה ע"י אנדוציטוזיס המבוצע ע"י קומפלקס של חלבונים הממוקמים בסינפסה של תא העצב. אנדופילין A הינו אחד החלבונים המרכיב קומפלקס זה (Schuske et al., 2003).
- **Necepsin II**: פרוטאז אספרטי שייך למשפחת של פרוטאזות בעלי שייר אספרטי קטליטי באתר הפעיל. אנזימים אלה הספציפיים לנמטודות, מתחילים דגרדציה של הומוגלובינים בפונדקאי. חלבונים אלה ידועים כמתבטאים ומופרשים בנמטודות פרזיטיות על יונקים בשלב הזחל המדביק (Williamson et al., 2003).

3.10.3 חלבונים שזוהו מג'ל לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה

זיהוי החלבונים שהתבטאו בזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה מובאים בטבלה

מספר 9.

טבלה מספר 9: חלבונים שהתבטאו בזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה

Spot no.	Reference	Probability	Score	Accession no.	expected	in gel
					Protein MW (Kda)/PI	Protein MW (Kda)/PI
1	LEVamisole resistant family member (<i>lev-11</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	2.50E-12	186.25	71992941	33/4.7	35/4.5
	Tropomyosin [<i>Anisakis simplex</i>]	9.95E-08	116.18	14423976	33.2/4.7	35/4.5
2	Major Sperm Protein family member (<i>mSP-10</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	1.49E-04	30.16	17541624	14.2/7.8	13/6.5
3	Fatty acid and retinol-binding protein 1 FABP-1 [<i>Ancylostoma caninum</i>]	7.54E-07	40.22	22164324	20.5/8.4	14/8
4	UNCoordinated family member (<i>unc-87</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>].	4.28E-08	90.19	157764130	44.2/7.5	48/7.69
	FUMarase family member (<i>fum-1</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	8.93E-07	40.22	17553882	53.6/7.8	48/7.69
	Heat Shock Protein family member (<i>hsp-43</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>].	5.55E-04	50.13	157770107	43.3/8.5	48/7.69
5	FUMarase family member (<i>fum-1</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	9.50E-04	40.18	17553882	53.6/7.8	48/7.4
	MUScle Positioning family member (<i>mup-2</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	1.20E-05	30.17	17569083	47/5	48/7.4
6	ACTin family member (<i>act-4</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	1.73E-07	80.16	17568985	41.8/5.3	40/5.2
	DISorganized Muscle family member (<i>dim-1</i>) As37 [<i>Ascaris suum</i>]	2.79E-07	86.18	22036079	35.5/5	40/5.2
7	ACTin family member (<i>act-4</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	1.02E-10	60.22	17568985	41.8/5.3	40/4.8
	DISorganized Muscle family member (<i>dim-1</i>) As37 [<i>Ascaris suum</i>]	1.20E-06	96.18	22036079	35.5/5	40/4.8
9	LEVamisole resistant family member (<i>lev-11</i>) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	2.66E-14	394.32	71992941	33/4.7	38/4.8
	Tropomyosin, muscle [<i>Trichostrongylus colubriformis</i>]	2.84E-08	108.25	136098	33/4.64	38/4.8

טבלה מס' 9: אנוטציה של חלבונים שהוצאו מג'ל החלבונים של זחלים אינפקטיביים שנחשפו להמולימפה למשך שש שעות וזוהו ע"י LC/MS/MS. **Probability** – ההסתברות של מציאת התאמה במקרה. ככל שערך ההתאמה נמוך יותר ההתאמה טובה יותר. **Score** – ניתן ע"י תוכנת ה-SEQUEST לתוצאה שהתקבלה. ככל שהניקוד יותר גבוה כך ההתאמה של הרצף לחלבון טובה יותר.

3.10.4 פירוט החלבונים שהתבטאו בזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה

- **LEV-11** (LEVamisole resistant family member): Tropomyosin, הוא חלבון בעל מבנה המסוגל להתכווץ והקושר אקטין. בשריר מפוספס טרופומיוזין ממוקם בסיבים הדקים ומתפקד יחד עם קומפלקס הטרופונין לויסות אינטראקציות הרגישות לקלציום, עם אקטין ומיוזין. בשריר חלק ובתאים לא שרירים אשר בהם אין טרופונין, טרופומיוזין קשור למיקרו סיבים ונראה עוזר ברגולציה של צורת תאים ותנועה. חלבון זה דרוש להתפתחות עוברית, למורפולוגיית גוף תקינה ולתנועה (Anyanful et al., 2001). הגן המקודד לחלבון זה *lev-11* הופיע גם בספריית ההפחתה לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה.
- **MSP-10** (Major Sperm Protein): חלבון זה שייך למשפחת חלבונים Major Sperm Protein השמורה בנמטודות. חלבונים ממשפחה זו מעורבים בסיגנלים חוץ תאיים ובתפקידים תוך תאיים בציטוסקלטון לצורך רבייה (Miller et al., 2001). חלבון זה הופיע גם לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה.
- **FABP-1** (Fatty acid and retinol-binding protein 1) הוא חלבון מפרש הקושר חומצות שומן, צפוי להשתתף בהרחקה והעברה של מולקולות הידרופוביות קטנות כגון ליפידים והורמונים סטרואידים (Plenefisch et al., 2000). הגן המקודד לחלבון זה *lbp-1* הופיע גם בספריית ההפחתה לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה.
- **UNC-87** (UNCoordinated) **calponin**: זוהי מולקולה הדומה לטרופונין הקשור לאקטין וטרופומיוזין, חלבון זה מצוי בכל חסרי החוליות בסיבי שריר חלק. חלבון הדרוש לשמירה על מבנה של סיבי השריר בתאים הבונים את דופן גוף הנמטודה. חלבון זה דוחס אקטין (Kranewitter et al., 2001). חלבון זה הופיע גם לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה.
- **HSP-43** (Heat shock protein): שייך למשפחת חלבוני *small heat shock*, המשמשים כצ'פרונים מולקולאריים. תפקידם הוא במניעת היווצרות אגריגטים גדולים ולא מססים של חלבונים, בנוסף הם נקשרים לחלבונים שאינם יציבים וכך מגנים על התא בזמן עקות שונות (Van Montfort, et al., 2001).
- **FUMarase**: אנזים המזרז הידרציה הפיכה של פומראט ל-L מלאט במעגל החומצה הציטרית. בהעדר חומצה ציטרית אנזים זה מעורב בדיסמוטציה של מלאט במיטוכונדריה (Kulkarni et al., 2004). ידוע כמתבטא בתהליך ה-Recovery ב-*C. elegans* (Wang and Kim, 2003).
- **MUP-2** (MUscle Positioning): חלבון טרופונין (TnT), חלבון שריר המסוגל להתכווץ. חלבון זה משפיע על התכווצות תאי שריר דופן הגוף עובריים, ארגון הסרקומר, מיקום תאים, ויסות התכווצות שריר דופן הגוף בזחל ובבוגר, מורפוגנזה אפידרמלית וכמו כן דרוש לתפקוד נכון של שריר השחלה, גדילה ופוריות בהרמפרודיט (McArdle et al., 1998). גן המקודד לטרופונין *tnt-2* הופיע בספריית ההפחתה לאחר שש שעות.

- **DIM-1** (DIorganized Muscle): פוליפפטיד המכיל 3 רצפים חוזרים של Ig-like. חלבון זה דרוש לארגון מלא ונכון של השרירים ולעיגון רשת המיופילמנט לממברנת תאי השריר (Rogalski et al.,) (2003).
- **Tropomyosin**: ראה LEV-11 עמוד 66.
- **HSP-1** (Heat shock protein): חלבון HSP-70A מתפקד במגוון תהליכים ביוכימיים, כולל קיפול חלבונים, העברת חלבונים בין ממברנות וויסות התגובה לעקת חום (Hartl and Hayer-Hartl, 2002).

4. דיון

עבודה זו עסקה בזיהוי ובאפיון גנים וחלבונים המשתתפים בתהליך של שינוי התפתחותי כתוצאה מגירוי חיצוני באורגניזם. שינוי התפתחותי בנמטודה האנטומופתוגנית *H. bacteriophora* בתגובה לחשיפה להמולימפה של חרק פונדקאי בתהליך הנקרא Recovery (השראת התפתחות). בידוד וזיהוי הגנים השונים המעורבים בתהליך, איפשר הסתכלות רחבה יותר על המסלולים הביולוגיים השונים המתבטאים בתהליך זה ובעקבותיו. למרות שנמצא כי בתהליך מעורבים גנים רבים, עבודה זו התמקדה במספר גנים שנבחרו על פי הערכה ומידע הקיים לגביהם במאגרי מידע שונים. המידע מצביע על כך שגנים אלו עשויים להיות מעורבים בתהליך ה-Recovery ב-*H. bacteriophora*. במבחנים פונקציונאליים שנערכו לגנים אלו נמצאו גנים אשר השתקתם פוגעת באופן ישיר בתהליך ה-Recovery ומעורבותם חיונית להצלחתו. כמו כן נבדקה השאלה אלו חלבונים מתבטאים במהלך תהליך ה-Recovery. בין החלבונים שזוהו נמצאו חלבונים המעורבים בהעברת סיגנלים, חלבונים המעורבים באינטראקציה טפיל-פונדקאי וחלבונים המעורבים במעבר לדרגה הבאה.

4.1 השראת תהליך ה-Recovery

כפי שתואר, תהליך ה-Recovery מתחיל כאשר זחל אינפקטיבי, הנמצא בעצירת התפתחות, נכנס לתוך ההמולימפה של זחל הפונדקאי, וכתוצאה מגירוי/סיגנל (שטיבו אינו ידוע) הנקלט מהסביבה בה הוא נמצא, הזחל פותח את פתחי הגוף (פה ואנוס), מערכת העיכול הופכת לפעילה והחיידק הסימביונטי מופרש להמולימפת החרק (Cliche, 2007) לאחר מכן מתחיל תהליך ההתפתחות, הזחל האינפקטיבי מתפתח לזחל דרגה רביעית ובהמשך לנקבה הרמפרודיטית בוגרת היכולה להתרבות ברבייה עצמית. כדי שהתהליך ימשיך ושהזחל האינפקטיבי יתפתח בסופו של דבר לנקבה הרמפרודיטית בוגרת ומתרבה, דרושה נוכחותו של החיידק הסימביונטי המתרבה בתוך הפונדקאי, והמייצר חומרי הזנה (food signals) המהווים את הגירוי התזונתי להתפתחות הזחל (Strauch, 1998; Han and Ehlers, 2000). נראה שבתהליך ה-Recovery מתרחשים למעשה שני שלבים עיקריים: 1. פתיחת פתחי הגוף והפרשת החיידק ו-2. תחילת ההתפתחות לדרגת זחל רביעית.

על מנת לבודד גנים המעורבים בוויסות תהליך ה-Recovery ולהימנע, עד כמה שאפשר, מגנים המעורבים בתהליכים פיזיולוגיים במעבר לדרגת הזחל הבאה, ניסיתי להפריד בין התהליכים ההתחלתיים של ה-Recovery לבין המעבר לדרגה הרביעית. כדי לענות על מטרות אלו נערך המבחן הביולוגי על מצע אשר לא תומך בהתפתחות החיידק הסימביונטי: מצע אגר-מים, ועליו המולימפת חרק, להשראת התהליך. בתנאים אלו ה-Recovery מתחיל ונראית הפרשת החיידק הסימביונטי אך הזחל האינפקטיבי אינו ממשיך להתפתח לזחל מדרגה רביעית.

בתנאי המבחן הביולוגי שנערך המעבר לדרגה הרביעית לא התרחש במצע אשר בו החיידקים לא יכלו להתבסס ולהתרבות, ולכן אני מסיקה כי ההחלטה האם להמשיך בתהליך ההתפתחות תלויה בשלב כלשהו

בסיגנל מהחידק הסימביונטי. כנראה שמעבר זה מתרחש מאוחר יותר בתהליך ה-Recovery, כאשר נקלטים סיגנלים נוספים המעידים כי כל התנאים אכן מתאימים לרבייה ויש מספיק מזון.

ידוע שסיגנל מזון, הנובע מתרבית החידקים מעודד Recovery במידה חלקית. לראיה, בגידול תעשייתי תהליך ה-Recovery מושרה באופן מלאכותי ע"י הכנסת הזחלים האינפקטיביים לתרבית נוזלית של החידק הסימביוטי. למרות שזחלים האינפקטיביים אלו אינם נחשפים להמולימפה של חרק פונדקאי הם עוברים Recovery, אך באחוזים נמוכים והתהליך אורך מספר ימים (Strauch, 1998; Johnigk et al., 2004). לעומת זאת, בחרק פונדקאי, הזחל האינפקטיבי שחודר לפונדקאי "נפגש" בתחילה עם המולימפת החרק. לאחר הפרשת החידק עליו "להכות" שהוא יתרבה, ורק אז מתקבל סיגנל מזון שמאפשר לזחל האינפקטיבי להמשיך בשינוי ההתפתחותי.

במחקר שנעשה ע"י Kikuta et al. (2009) בנמטודה *Steinernema carpocapsae*, נמטודה הטפילה על חרקים ונושאת חידק סימביונטי, נמצא כי זחלים אינפקטיביים אשר לא הכילו את החידק הסימביונטי לא עברו Recovery בתרבית תאים של חרקים, בניגוד לזחלים אינפקטיביים שהכילו את החידק הסימביונטי באותם תנאים ועברו Recovery (Kikuta, 2009). תוצאות אלו מחזקות את הטענה שלתהליך ההתפתחות לדרגות מתקדמות במחזור החיים של הנמטודה דרוש סיגנל שמקורו מהחידק הסימביונטי.

מתוך נתונים אלה אני מניחה שישנם שני גורמים עיקריים בויסות תהליך ה-Recovery בנמטודות אנטומופוגניות. הראשון הוא בכניסת הזחל האינפקטיבי לפונדקאי והוא חישה של סיגנל מהמולימפת החרק, המורה על תחילת התהליך. השני, החישה של סיגנל מזון מהחידק הסימביונטי לאחר התבססותו, המורה על המשך התהליך (ראה איור מספר 2 בעמ' 85). לפיכך, אני מניחה שקיימים לפחות שני מסלולים גנטיים המופעלים ע"י גנים שונים, אשר חופפים בחלקם כאשר הסיגנל הראשוני המפעיל אותם שונה: מסלול שבו הסיגנל מגיע מהפונדקאי הצפוי להיות מצוי בנמטודות טפילות למיניהן ואינו נמצא ב-*C. elegans*, ומסלול או המסלולים שבהם הסיגנל מגיע מהמזון והוא בודאי שמור לאורך האבולוציה בכל הנמטודות.

היפותזה זו על קיומם של שני מסלולים בעלי סיגנל התחלתי שונה להשראת תהליך ה-Recovery נתמכת גם ע"י מחקר שנערך בנמטודה *Ancylostoma caninum* הטפילה על כלבים, ע"י Datu et al. במחקר זה הושרה תהליך ה-Recovery של הזחל המדביק ע"י סרום של הפונדקאי. נמצא כי תרכובות כימיות של מוסקרין המתחרות על נוירוטרנסמיטורים משרות את תחילת תהליך ה-Recovery ע"י הפעלת מסלול האינסולין, אך ללא עלייה בטרנסקריפטים האופייניים לתהליך (Datu et al., 2008). המסקנה ממחקר זה היא שישנם שני מסלולים, שכנראה חופפים ברובם, בתהליך ה-Recovery, אך הסיגנלים לתחילת התהליך שונה בהם ויש צורך בשניהם.

במעבדתו של ד"ר רלף הלרס מאוניברסיטת קייל בגרמניה מנסים מזה שנים למצוא את ה"גורם התזונתי" להשראת תהליך ה-Recovery בתרבית נוזלית המכילה תרחיף של חידקים במצע מזון מלאכותי (Johnigk et al., 2004; Hirao and Ehlers, 2009). על בסיס ההיפותזה המתוארת לעיל ניתן להבין מדוע נכשלו החוקרים בניסיונותיהם. מאחר שתהליך זה אינו תואם את המתרחש ב"טבע" (חשיפה להמולימפה ושחרור חידקים), לא הצליחו החוקרים למצוא את אותו גורם עד כה. יש למקד את המאמצים בזיהוי הגורם לשלב

הראשון בתהליך בהמולימפת חרקים. כך יהיה אפשר ליעל את תהליך ה-Recovery בגידול תעשייתי במתססים.

4.2 שינויים טרנסקריפטומים בתהליך ה-Recovery

כדי למצוא את הגנים המעורבים במסלולים המוסתים את תהליך ה-Recovery יצרתי שתי ספריות הפחתה בשתי נקודות זמן בתהליך (שלוש ושש שעות לאחר חשיפה להמולימפה). נמצאו 385 ESTs אשר שעתוקם עלה לאחר חשיפה להמולימפה של הפונדקאי. נקטתי בגישה של יצירת ספריות הפחתה, מכיוון שבשיטה זו ניתן למצוא גנים המתבטאים ספציפית באוכלוסיה בתגובה לטיפול, לעומת אוכלוסיית הביקורת. יתרון נוסף בשימוש בספריות הפחתה לעומת שיטות אחרות כגון microarray, הוא כאשר רצף הגנום של האורגניזם הנחקר אינו ידוע וכתוצאה מכך גנים הספציפיים למין זה אינם ידועים, ויכולים לבוא לידי ביטוי בספריות הפחתה. גנום הנמטודה *H. bacteriophora* נמצא בתהליך ריצוף ומתוך כך אין מידע רב על הגנים השונים הקשורים לתהליך ה-Recovery הקיימים בנמטודה זו בהשוואה לנמטודות אחרות.

שלוש מאות ועשרים רצפים בעלי ההומולוגיה לרצפים ידועים, משתי ספריות הפחתה, מוינו לקבוצות על פי Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes KEGG (ראה טבלה מס' 4 עמ' 40). מיון הגנים לקבוצות פונקציונאליות מאפשר לראות את השינויים הטרנסקריפטומים המתרחשים בתהליך, דהיינו אילו גנים שועתקו בתגובה להמולימפה של חרק.

מרבית הגנים בספרייה של שלוש שעות שייכים לקטגוריה של מטאבוליזם, כאשר רובם שייכים לתת-קטגוריה של מטאבוליזם של אנרגיה. עלייה זו נובעת בעיקר משעתוק של גנים מיטוכונדריאליים כגון Cytochrome c oxidase subunit I, המופיע 38 פעמים ו-NADH dehydrogenase subunit 1-11 המופיע 11 פעמים בספרייה זו. גנים אלו משתתפים בשרשרת העברת האלקטרונים כחלק מתהליך הנשימה במיטוכונדריה וייתכן שרמתם הגבוהה מורה על פעילות מוגברת של יצירת אנרגיה לצורך תהליך ה-Recovery. סיבה נוספת לכמות הרבה היא, שרבים מה-ESTs אלו מתאימים לגדיל ה-antisense של הגנים המיטוכונדריאליים ויתכן שהם מבוטאים לצורך וויסות שלילי של התרגום במיטוכונדריה (Jones et al., 2001). תוצאות דומות התקבלו במחקר שנעשה ע"י Datu et al. בנמטודה *A. caninum*, הטפילה על בני אדם שבו נבדקו השינויים בשעתוק הגנים במעבר מהדרגה החופשייה לדרגה הטפילית בתגובה לסרום הומאני. גם התוצאות של מחקר זה הראו רמת שעתוק גבוהה של הגנים: Cytochrome c oxidase subunit I ו-Cytochrome c oxidase subunit III בתגובה לסרום ויציאה ממצב של עצירת התפתחות (Datu et al., 2008). דבר זה מחזק את ההשערה כי אכן יש פעילות מוגברת של מערכת הנשימה במיטוכונדריה, כנראה כהכנה לשינויים ההתפתחותיים העתידיים לבוא.

מצאתי בשתי הספריות מספר גדול יחסית של רצפים המופיעים בקטגוריה של מטאבוליזם, כאשר לרובם תפקיד במטאבוליזם של פחמימנים ובמטאבוליזם של אנרגיה. תוצאות אלה תומכות בעובדה שזחלים אינפקטיביים אשר היו חשופים להמולימפה של חרק פונדקאי אכן עוברים תהליך של Recovery ומחדשים את התפתחותם. לצורך זה רמת המטבוליזם שלהם עולה והמסלולים המטאבוליים הפעילים ביותר הם

גליקוליזה, גלוקונאוגנזה ומעגל הציטראט. בניגוד לזחלים אינפקטיביים הנמצאים בעצירת התפתחות, שאינם ניזונים וצריכים להסתמך על מאגרים פנימיים לאנרגיה וביוסינתזה (Selvan, 1993), בזחלים אינפקטיביים הנמצאים בעצירת התפתחות, מאגרי שומן שנצברו הם המקור העיקרי לאנרגיה ולתהליכי ביוסינתזה כאשר הם מחפשים פונדקאי בקרקע. מכאן, שהמסלול הביוכימי הפעיל ביותר הוא מטבוליזם של פירוק שומנים (Burnell et al., 2005). ציפיתי לראות עלייה זו בשעתוק גנים המעורבים בתהליכים מטבוליים שונים בתהליך ה-Recovery כסימן לציאה מעצירת ההתפתחות ומעבר לחידוש ההתפתחות. התוצאות שהתקבלו נתמכות גם ע"י תוצאות עבודה קודמת שנעשתה על ידי Wang and Kim (2003) שהראו ע"י שימוש ב-microarray עלייה בשעתוק גנים השייכים למטבוליזם בזחלים שעוברים Recovery לעומת זחלים הנמצאים בעצירת התפתחות ב-*C. elegans* (Wang and Kim, 2003).

על פי חלוקת הגנים לקטגוריות פונקציונאליות נמצא גם שגנים רבים בשתי הספריות משתייכים לקטגוריה של עיבוד מידע גנטי, כאשר רב הגנים בקטגוריה זו שייכים לתת קטגוריות של תרגום, קיפול, מיון ודגרדציה של חלבונים. נראה כי ייצור החלבונים מוגבר כחלק ממעבר מדרגה חופשייה לדרגה טפילית. הזחל האינפקטיבי מייצר ומפריש חלבונים פרוטאוליטיים שונים כנגד מערכת החיסון של הפונדקאי, להגנה על החיידק הסימביונטי וכהכנה למעבר לדרגה רביעית (Hao et al., 2010).

להלן כמה דוגמאות לגנים שנמצאו בעבודה זו בספריות ההפחה, המקודדים לחלבונים שעשויים למלא תפקיד במנגנון הטפילות. גן המקודד ל-C-type lectin, שעלה בספריית ההפחה לאחר שש שעות, נמצא בנמטודות טפילות רבות וידוע כי הוא מעורב באינטראקציה טפיל-פונדקאי ובעל תפקיד במנגנון ההגנה של נמטודות מהתגובה החיסונית של הפונדקאי (Loukas and Maizels, 2000). גן המקודד לאנזים Catalase, שעלה בספריית ההפחה לאחר שש שעות. נמצא כי אנזים זה מופרש בנמטודות טפילות שונות בשלב ה-Recovery ותפקידו המשוער הוא בהגנה מרדיקלים חופשיים של הפונדקאי (Henkle-Duhrsen and Kampkotter, 2001).

אפשר להשוות בין ספריות שונות כאשר מבטאים את מספר הגנים שנמצאו בכל קטגוריה באחוזים. בעבודה שנעשתה ע"י Sandhu, et al. (2006) הוכנה ספריית cDNA מזחלים אינפקטיביים של *H. bacteriophora* הנמצאים בעצירת התפתחות. ניתן להשוות בין גנים המתבטאים בזחלים אינפקטיביים שעוברים Recovery מנתוני עבודתי, לגנים המתבטאים בזחלים אינפקטיביים הנמצאים בעצירת התפתחות בנתוני העבודה של Sandhu, et al. (2006) (ראה גרף מספר 1 בתוצאות, עמ' 41).

בזחלים אינפקטיביים שנמצאים בעצירת התפתחות (לא נחשפו לגירוי המשרה Recovery), נראה שמרבית הרצפים מתחלקים בין שלוש קטגוריות עיקריות: (18%) בקטגוריית עיבוד מידע גנטי, (14%) בקטגוריית המטבוליזם ו-(15%) בעיבוד מידע מהסביבה (Sandhu et al., 2006). תוצאות אלה הגיוניות לנוכח העובדה שהזחל האינפקטיבי התר אחר פונדקאי בקרקע הינו בעל אברי חישה מפותחים וקולט אותות כמוסנסוריים הקשורים לחיפוש הפונדקאי ולסביבתו וכמו כן הוא מבטא גנים הקולטים ומעבדים את המידע מהסביבה. רמת המטבוליזם של זחלים אינפקטיביים שאינם ניזונים, נמוכה יחסית ומותאמת לניצול מאגרי אנרגיה פנימיים, ואילו בזחלים אינפקטיביים הנמצאים בתהליך ה-Recovery צפוי שרמת המטבוליזם תהיה

גבוהה במעבר מעצירת התפתחות להתפתחות. כצפוי, בנתונים מעבודתי נראית עלייה במספר הגנים השייכים לקטגוריה של מטאבוליזם לאחר שלוש שעות (57%). בקטגוריית עיבוד מידע גנטי נצפה מספר הגנים הגבוהה ביותר בזחלים אינפקטיביים שנחשפו להמולימפה לאחר שש שעות. גנים רבים המשתייכים לקטגוריה של עיבוד מידע גנטי שייכים לתת קטגוריות של תרגום, קיפול, מיון ודגרדציה של חלבונים. נראה כי ייצור החלבונים מוגבר כחלק ממעבר מדרגה חופשייה לדרגה טפילית. הזחל האינפקטיבי מייצר ומפריש חלבונים פרוטאוליטיים שונים כנגד מערכת החיסון של הפונדקאי, להגנה על החיידק הסימביונטי וכהכנה למעבר לדרגה רביעית. בקטגוריה של תהליכים תאיים מספר הגנים הגבוהה ביותר נצפה בזחלים אינפקטיביים בתהליך ה-Recovery לאחר שש שעות. ייתכן כי מספר הגנים הגבוהה בקטגוריה זו, לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה, נובע מגנים המעורבים בהתניידות ובתזוזה של תאים, כהכנה למעבר לדרגת ההתפתחות הבאה שהיא זחל מדרגה רביעית. המשך ההתפתחות והמעבר לדרגה הבאה הינו חלק מאוחר יותר המתרחש בתהליך ה-Recovery.

בנתוני עבודתי נמצא כי מספר גנים של *H. bacteriophora* שעלו בספריות ההפחה דומים לגנים במסלול ה-Recovery ב-*C. elegans*, למרות שנמטודות אלו נבדלות באורח חייהן: טפילות על חרקים מול נמטודות חופשיות, בהתאמה. הימצאותם של גנים אלו תומכת בהשערה כי ישנם מסלולים משותפים של בכניסה וביציאה ממצב של זחל אינפקטיבי המשותפים ל-*C. elegans* ולנמטודות אנטומופתוגניות. לדוגמה, הגן *akt-1* המקודד לסריין טראונין קינאז, במסלול *insulin-like* המווסת כניסה ויציאה ממצב של זחל אינפקטיבי. הגן *hsp-90* הינו *daf-21* ונמצא שרמתו יורדת לאחר שש שעות (נתונים מספריית הפחה הופכית, שלא הוכנסו). ב-*C. elegans* נמצא כי ביטוי של הגן *hsp-90* יורד במהלך תהליך ה-Recovery (Dalley and Golomb, 1992). *daf-21* מקודד לאחד ממשפחת חלבוני ה-*Hsp-90* המשמשים כצ'פרונים מולקולאריים. פעילותו של DAF-21 דרושה להתפתחות הזחל, לוויסות יצירת זחל dauer ולכמה התנהגויות כמוסנסוריות ספציפיות כגון תגובה לכימיקלים ותגובה לריחות הנקלטים ע"י הנוירונים התחושתיים ASE ו-AWC (Birnbay et al., 2000; Morley and Morimoto, 2004). הגן *hsp-1* הופיע בספרייה של שלוש שעות וידוע כמעורב בוויסות של אורך חיים ב-*C. elegans* ובאינטראקציות עם הגנים *daf-2* ו-*daf-21*, המעורבים בוויסות Recovery ב-*C. elegans*. בתקופת המחקר של עבודה זו נמצאו גנים נוספים מ-*H. bacteriophora* המחזקים טענה זו: *daf-7* שהינו חלק ממסלול TGF β -like והגנים *akt-1*, *pdk-1* שהינם חלק ממסלול *insulin-like* (Sandhu et al., 2006).

ציפיתי למצוא יותר גנים, המעורבים במסלולים השמורים לאורך האבולוציה, שמווסתים את תהליך ה-Recovery כגון גנים השייכים למסלול האינסולין. לדוגמה גנים ממשפחת *ins* (Insulin) המווסתים עצירת התפתחות ומשתתפים במסלול האינסולין. כמו כן ציפיתי למצוא גנים השייכים למסלול ה-TGF- β שגם הוא מסלול שמור באבולוציה מחסרי חוליות ועד יונקים (Savage-Dunn, 2005). צפוי היה שעוד גנים השמורים במסלולים אלה ימצאו בספריות ההפחה של זחלים אינפקטיביים בתהליך ה-Recovery. הסיבה

למיעוט גנים אלו יכולה להיות נעוצה בכך שלא כל המושבות שהתקבלו מספריות ההפחתה נשלחו לריצוף, אלא רק מדגם של שש מאות מושבות שהכילו ESTs המייצגים את הגנים המתבטאים בתהליך. ייתכן שישנם גנים נוספים השייכים למסלול זה שהתקבלו בספריות ההפחתה אך לא נדגמו. סיבה נוספת היא התזמון של דגימת הגנים שהשתתפו בתהליך, בעבודה זו נדגמו רק שתי נקודות זמן לאורך תהליך ה-Recovery, לאחר שלוש ושש שעות השיפה להמולימפה. קרוב לוודאי שגנים נוספים מהמסלולים המבקרים את התהליך התבטאו בשלב מוקדם יותר. ידוע ב-*C. elegans* שתוך 50-60 דקות מחשיפת זחל ה-dauer למזון יש התחייבות התפתחותית לתהליך ה-Recovery (Riddle, 1997). צפוי שגם ב-*H. bacteriophora* יתבטאו גנים במסלולים השמורים המבקרים את תהליך ה-Recovery בשעה הראשונה לאחר החשיפה להמולימפה.

בנוסף, ציפיתי למצוא גנים ספציפיים לנמטודות אנטומופוטוגניות, שאינם נמצאים ב-*C. elegans* או שנמצאים אך תפקידם שונה, גנים הספציפיים לאינטראקציה טפיל-פונדקאי או לסימביוזה בין החיידק לנמטודה. מצאתי עשרים ושניים גנים אשר אין להם הומולוגיים ב-*C. elegans*, אך הומולוגיים לגנים מנמטודות טפיליות אחרות כגון *Brugia malayi*, *Haemonchus contortus* ועוד. בגלל שלגנים אלו לא נמצאו גנים הומולוגיים מנמטודות חופשיות ורובם אינם מוכרים, אני מניחה כי גנים אלה כנראה מעורבים באינטראקציה טפיל-פונדקאי או בסימביוזה עם החיידק הסימביונטי *P. luminescens*. סביר להניח שבין גנים אלו נמצאים גנים המעורבים בקבלת הסיגנל ל-Recovery מהפונדקאי וגנים המהווים חלק ממסלול בקרה לתהליך ה-Recovery הייחודי לנמטודות טפיליות. לדוגמה, כמה רצפים אשר לא נמצאו להם גנים הומולוגיים בנמטודה החופשייה *C. elegans*. הרצף HB3HCa1 הומולוגי לחלבון המכיל אזור בעל פעילות של קינאז (Protein kinase domain containing protein) מהנמטודה *Brugia malayi*, יכול להיות שחלבון זה מעורב בהעברת סיגנלים במסלולים שונים ואולי בהעברת הסיגנל במסלול הייחודי לנמטודות טפיליות. הרצף HB6HAc5 הומולוגי לפקטור שיעתוק (zinc finger transcription factor) מ-*Bactrocera oleae* (זבוב פירות), הרצף HB6HA29 הומולוגי לגן המקודד ל-Catalase בנמטודה הטפילה על צמחים *Meloidogyne incognita*; ידוע שחלבון זה מופרש בנמטודות טפיליות לתוך הפונדקאי על מנת להתמודד עם רדיקלים חופשיים של הפונדקאי, והוא חלק ממערך ההגנה של הטפיל מהפונדקאי (Henkle-Duhrsen and Kampkotter, 2001). הרצף HB6HA12 הומולוגי לגן Ran binding protein 7, מהנמטודה *Brugia malayi*. הרצף HB6HD8 הומולוגי ל-DVA-1 precursor מ-*lungworm Dictyocaulus viviparous* שהינו טפיל ריאות של צאן ובקר. חלבון זה קושר חומצות שומן ורטניול ומעביר אותם בתוך הנמטודה, ומופרש בנמטודות טפיליות (McDermott et al., 2001). רצף נוסף הוא HB6HA32 הומולוגי לגן המשוער hypothetical protein Bm1_32495 בנמטודה *Brugia malayi* שתפקידו אינו ידוע.

בעבודה שנעשתה ע"י Bai et al. ובה נערכה אנליזה של טרנסקריפטום של *H. bacteriophora*, המיוצג ע"י 31,485 ESTs מדרגת בוגר, נמצאו, ע"י השוואה לנמטודות אחרות, 554 גנים הספציפיים לנמטודות טפיליות שאינם נמצאים בנמטודות חופשיות (Bai et al., 2009). בנתוני העבודה הנוכחית נמצאו

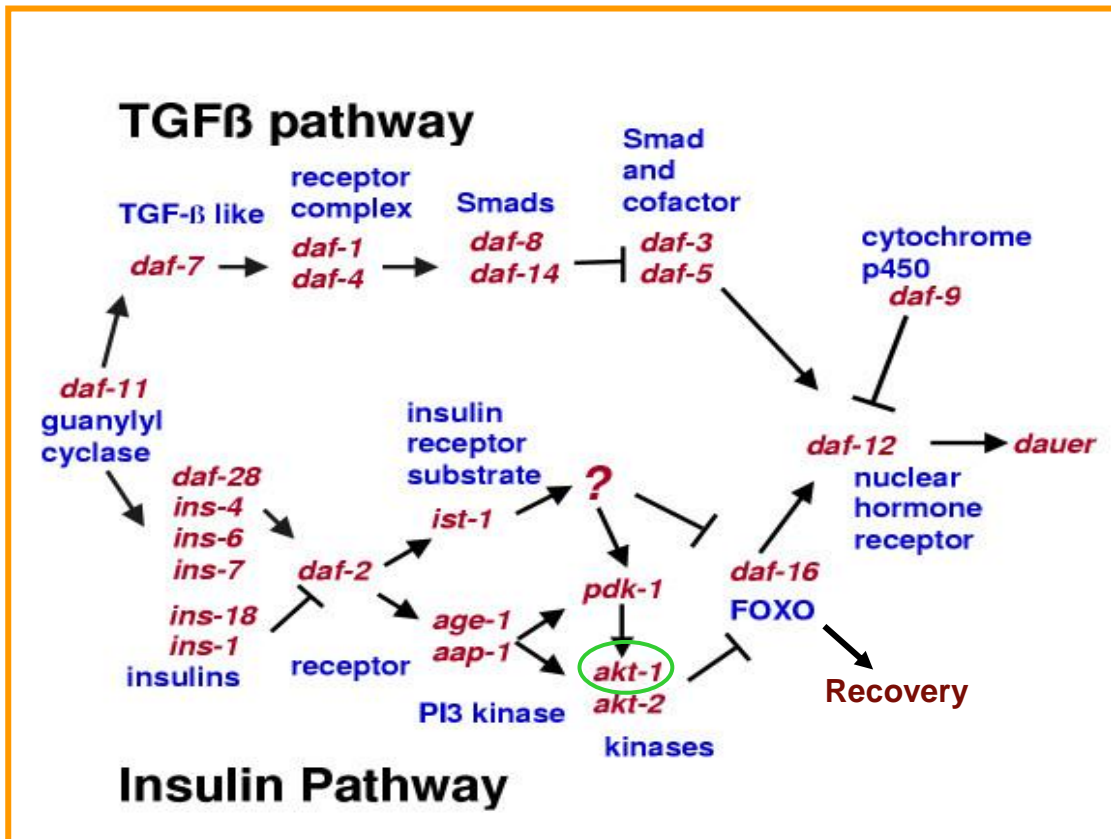
22 גנים ללא הומולוגים לנמטודות חופשיות ו-65 (17%) רצפים אשר לא נמצאה להם הומולוגיה במאגרי המידע והמייצגים גנים חדשים, בניהם ייתכנו כמה בעלי תפקיד בתהליך ה-Recovery, בתגובה לסינגל מהחרק מהפונדקאי במסלול הייחודי לנמטודות אנטומופתוגניות.

מתוך 320 הרצפים בעלי ההומולוגיה בשתי ספריות ההפחתה נבחרו 23 גנים (ראה פירוט לבחירת כל גן בתוצאות, עמ' 42-45) להמשך אפיון שעתוקם בתהליך ה-Recovery ע"י RT-qPCR (ראה בתוצאות גרף מספר 2 עמ' 46). פרופיל שעתוק הגנים תומך בתוצאות מספריות ההפחתה. פרופיל השעתוק היה שונה בשתי נקודות הזמן שנבדקו, גנים אשר שעתוקם עלה לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה, רמת שעתוקם ירדה לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה ולהיפך. לא נצפו גנים אשר רמת השעתוק שלהם גבוהה בשתי נקודות הזמן. דגם פרופיל שעתוק הגנים מציע כי תהליך ה-Recovery הוא תהליך דינמי כלומר, רמת שעתוקם של הגנים המתבטאים בתהליך משתנה עם הזמן.

4.3 גנים החיוניים לתהליך ה-Recovery

מתוך 23 הגנים שנבחרו לאפיון דגם השעתוק שלהם והשתקתם ע"י RNAi, מצאתי שמונה גנים אשר השתקתם גרמה לירידה משמעותית באחוזי ה-Recovery של הזחלים האינפקטיביים. הגן *akt-1* ידוע כחלק ממסלול האינסולין המווסת Recovery, ביטויו של הגן *glb-1* ידוע כמווסת ע"י המסלול *insulin/IGF-1*, המווסת כניסה למצב של זחל dauer ויציאה ממנו ב-*C. elegans*. תפקידם של הגנים הנותרים בתהליך ה-Recovery עדיין לא ברור ומצריך מחקר נוסף. על מנת לנסות ולהבין את מעורבותם של גנים אלו בתהליך ה-Recovery, ליקטתי את הידוע בספרות ומתוך כך העליתי השערות לגבי מעורבות כל אחד מהגנים אשר השתקתו גרמה לירידה משמעותית באחוזי הזחלים האינפקטיביים שעברו Recovery.

הגן *akt-1*: מקודד לסרין טראונין קינאז, טרנס ממברנלי ואורטולוגי לגן *daf-4* בנמטודה *C. elegans*. גן זה מהווה חלק ממסלול האינסולין הדרוש לגדילה, רבייה ומטאבוליזם תקין וכמו כן הוא מווסת התפתחות, יצירת זחל dauer ואת תהליך ה-Recovery. בתוך מסלול האינסולין AKT-1 מווסת את פעילותו של DAF-16, שהוא פקטור השעתוק FOXO, ע"י פוספורילציה בציטופלסמה וכך הוא מונע את פעילותו ואת מעברו לגרעין. כאשר DAF-16 אינו פעיל הוא נשאר בציטופלזמה, כתוצאה מכך הגנים הדרושים להמשך התפתחות הזחל משועתקים בגרעין ותהליך ה-Recovery מתרחש. כאשר DAF-16 פעיל, הוא עובר לגרעין ומתפקד כרפרסור לשעתוק גנים הדרושים להתפתחות הזחל, וכתוצאה מכך ההתפתחות נעצרת ונוצר זחל dauer (ראה תמונה 17 בעמ' 75). בזמן תהליך ה-Recovery רמת הביטוי של *akt-1* גבוהה (Paradis and Ruvkun, 1998). עוד ידוע ש-*akt-1* עובר אינטראקציות עם גנים נוספים הקשורים לתהליך כגון: *daf-2*, *age-1*, *daf-18* ועוד, המעורבים גם הם במסלולים המשתתפים בתהליכי כניסה למצב של זחל dauer ויציאה ממנו (Riddle, 1997).



תמונה מס' 17: יחסים בין הגנים מבוססים על פנוטיפים של מוטנטים ואינטראקציות גנטיות, ביטוי גנים במוטנטים, והומולוגיה למסלולים באורגניזמים אחרים (האיור נלקח מתוך Liu et al., 2004).

בהשתקת הגן *akt-1* ב-*H. bacteriophora* נראו מעט מאוד זחלים אינפקטיביים, גידול איטי, וזחלים אינפקטיביים שלא עברו Recovery ונשארו במצב זה לאורך זמן (זחל אינפקטיבי קונסטיטויטיבי). במבחן הביולוגי ל-Recovery, שנערך לזחלים אינפקטיביים בהם הושקת הגן, נראתה ירידה משמעותית באחוז הזחלים שיצאו מעצירת ההתפתחות והפכו לבוגרים - כשליש בהשוואה לזחלי הביקורת. ההנחה היא שתפקידו של גן זה דומה לתפקידו במסלול האינסולין ב-*C. elegans* מכיוון שמסלול האנסולין שמור באבולוציה. השתקה של הגן *akt-1* גרמה למניעת/הפחתת הפוספורילציה ל-DAF-16 (פקטור השיעתוק FOXO) ופקטור השיעתוק עבר לגרעין ופעל שם כרפרסור לשיעתוק גנים הדרושים להתפתחות הזחל וכתוצאה מכך לירידה ביעילות התהליך ה-Recovery.

כשליש מהזחלים האינפקטיביים עברו Recovery. עובדה זו יכולה לנבוע משתי סיבות האחת שהשתקת הגן לא נעשתה בפרט בודד אלא על אוכלוסייה של זחלים אינפקטיביים. לפי בדיקת השיעתוק (ראה תוצאות טבלה מס' 7 עמ' 56) שגם היא נערכה באוכלוסיה בה הושקת גן, נראה שלא בכל החזרות מידת יעילות ההשתקה הייתה זהה. במוצע, שעתוק הגן *akt-1* לאחר ההשתקה היה נמוך פי 10 לעומת הביקורת. הסיבה השנייה שלמרות השתקת הגן כשליש מהזחלים האינפקטיביים בהם הושקת הגן עברו Recovery היא שישנם גנים בעלי תפקידים חופפים. במסלול האינסולין לגן-*akt-1* חופפים הגנים *akt-2* ו-*pdk-1* שהינם בעלי תפקיד זהה בפוספורילציה של *daf-16*. חפיפת גנים קיימת בכל המסלולים המבקרים את התהליך

וקיימת גם חפיפה של כמה מסלולים לוויסות תהליך ה-Recovery. דבר זה מעיד על מורכבות הוויסות של התהליך ועל חשיבות הצלחת התהליך לשרידות הנמטודה.

תוצאות עבודתי תומכות בטענה שאכן *akt-1* ב-*H. bacteriophora* משתתף בבקרה של תהליך ה-Recovery, כנראה דרך מסלול האינסולין, שהינו מסלול שמור לאורך האבולוציה ואפשר למוצאו בשמרים, בתולעים, בעכברים ובבני אדם. שיבוש מסלול זה גורם להארכת תוחלת החיים באורגניזמים אלה. למרות שמסלול זה אינו מובן במלואו, ידוע שמוטציות בגנים בעלי דמיון לגנים מבני אדם, הידועים במעורבותם במסלול תגובת הסיגנלים Insulin/IGF-I, יכולות להאריך את תוחלת החיים באופן משמעותי ב-*C. elegans* (Barbieri et al., 2003). מסלול זה צפוי להימצא גם בנמטודה *H. bacteriophora*. בעבודה הנוכחית אכן נמצא גן אחד, הידוע כמשתתף במסלול זה, מספריית ההפחתה לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה. במהלך עבודה זו נמצאו גנים נוספים המשתתפים במסלול זה בנמטודה *H. bacteriophora*, דבר המחזק את הטענה שמסלול זה שמור גם בנמטודה זו וסביר להניח שהוא ממלא את אותו התפקיד בבקרה של כניסה ויציאה ממצב של זחל אינפקטיבי.

הגן *gei-17* (GEX Interacting protein): מקודד ל-SUMO-ligase E3 (SUMO-small ubiquitin-like modifier). חלבונים ממשפחה זו מעורבים במודיפיקציות שלאחר תרגום ע"י SUMOylation בתהליך של היצמדות קוולנטית של כמה חלבונים לשייר ליזין, בחלבוני המטרה דרך שרשרת של אנזימים האנלוגיים למסלול היוביקוטיין. חלבונים אלה משפיעים על תפקידי חלבונים אחרים ע"י הכוונתם למקומות ספציפיים בתא, או ע"י מניעת מודיפיקציות אחרות לחלבון והם גם מווסתים ביטוי גנים (Seeler and Dejean, 2003).

במחקר שנערך בעוברים של *C. elegans* ע"י Kim & Michael נמצא כי הגן *gei-17* חיוני להכפלת כרומוזומים פגועים ובכך מונע מדנ"א פגום להאט את מחזור חלוקת התא בשלב המוקדם. תפקידו הספציפי של *gei-17* הוא בבקרת האנזים *polh-1* (DNA polymerase pol η) המשכפל את הדנ"א הפגום. מסלול זה של וויסות פעולת האנזים *pol- η* שמור לאורך האבולוציה ומרכיבים שמורים ממסלול זה נמצאו גם בתאי אדם (Kim and Michael, 2008). ברוב התאים האאוקריוטים הכפלת הדנ"א ומשך מחזור התא מופרעים ע"י גורמים הפוגעים בדנ"א. כאשר כרומוזומים נפגעים הכפלתם מואטת וגורמת להפעלת נקודות בקרה אשר מעכבות את התקדמות מחזור התא (Holway et al., 2006). במספר אורגניזמים אאוקריוטים הכוללים: *C. elegans*, *Xenopus laevis* ו-*Drosophila melanogaster* התפתחות עוברית מוקדמת מאופיינת בהתקדמות מהירה של מחזור התא ובחלוקת תאים ללא גידול התא וללא שלב ה-G (Gap) במחזור התא. מאפיין נוסף שנמצא הוא השתקה אקטיבית של נקודות בקרה בתגובה לנזקי דנ"א. נמצא שהפעלה של נקודות בקרה לנזקי דנ"א אינה תגובה הכרחית ושישנם מסלולים אשר עוקפים את נקודות הבקרה, כאשר ההישרדות תלויה בהתקדמות מחזור התא ללא הפרעות. כאשר הכפלת הדנ"א בעוברים מעוכבת, מופעלות נקודות הבקרה והדבר גורם לחוסר סינכרוניזציה של התאים המתחלקים ובסופו של דבר למותו של האורגניזם (Holway et al., 2006).

תוצאות עבודה זו מראות על עלייה של פי 5 בשעתוק הגן *gei-17* בתהליך ה-Recovery ב-*H. bacteriophora* לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה. אחוזי הזחלים האינפקטיביים שבהם הושקו הגן ושעבר Recovery היה נמוך משמעותית לעומת זחלי הביקורת. נתונים אלו מצביעים על כך שהגן *gei-17* אכן חיוני לתהליך ה-Recovery וכנראה שישנה הימנעות מעיכובים במחזור התא בזמן תהליך ה-Recovery, במטרה למנוע חוסר סינכרוניזציה של התאים המתחלקים ולזרז את תהליך המעבר לדרגה הבאה, אפילו על חשבון תדירות גבוהה של מוטציות. השתקה של הגן גרמה כנראה להאטה במחזור התא, ולחוסר סינכרוניזציה של ההתפתחות, וכתוצאה מכך לאחוז נמוך של זחלים אינפקטיביים שעברו את תהליך ה-Recovery. עוד נמצא כי *gei-17* מגיב עם *lin-12* המקודד לרצפטור Notch. רצפטור זה חובר למסלול העברת הסיגנלים insulin-like המווסת את תהליך ה-Recovery (Greenwald, 2005). אינטראקציה זו מלמדת על מעורבות גן זה בבקרת תהליך ה-Recovery.

הגן *glb-1* (GLOBin) מקודד לגלובין תוך תאי. חלבונים ממשפחה זו הם כדוריים ובעלי קבוצת HEME הקושרת ברזל, ומלבד תפקידם המקובל כקושרי חמצן והעברתו למיטוכונדריה, הם בעלי תכונות ותפקידים מגוונים בחסרי חוליות. תפקידם של גלובינים בחסרי חוליות כוללים: חישת חמצן, אחסון או טיהור ריאקציות עם פעילות סולפט, אוקסידאז ופראוקסידאז (Vinogradov and Moens, 2008). נמטודות מבטאות איזופורם ייחודי של גלובין בנוזל הגוף, בדופן הגוף ובקוטיקולה (Hoogewijs et al., 2008; Geuens et al., 2010). ב-*C. elegans* ידועים 33 גנים שמתבטאים ממשפחה זו, למרות שרמת ביטויים הנמוכה מצביעה כנראה על ביטוי ספציפי לתא. ב-*C. elegans* נמצא כי ביטוי של הגן *glb-1* אינו מושרה ע"י חוסר חמצן (אנוקסיה) אלא מווסת ע"י המסלול insulin/IGF-1, שהינו אחד המסלולים המווסתים כניסה ויציאה ממצב של זחל dauer. החוקרים Hoogewijs et al. מצאו ש-DAF-2 מווסת ביטוי של *glb-1* ע"י DAF-16 (Hoogewijs et al., 2007). בתוצאות העבודה הנוכחית נראתה לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה עלייה של פי 4 בשעתוק הגן *glb-1* בזחלים אינפקטיביים הנמצאים בתהליך ה-Recovery, לעומת זחלים אינפקטיביים המצויים בעצירת התפתחות.

סביר להניח כי גם ב-*H. bacteriophora* הגן *glb-1* מווסת ע"י מסלול Insulin/IGF-1, אך לא רק על ידו, שכן רמת השעתוק שלו עולה בזמן תהליך ה-Recovery ויכול להיות שתפקידו הוא חישת חמצן לאחר חדירת הזחל האינפקטיבי לתוך הפונדקאי. חישת סיגנלים מן הסביבה הינה אחד הגורמים הראשונים המווסתים את תהליך ה-Recovery.

הגן *ttl-15* (TransThyretin-like) שייך למשפחת חלבונים שמורים הגדולה ביותר הספציפית לנמטודות TTL, הוא מכיל סיגנל חלבוני (signal peptide) וצפוי להיות מופרש. Transthyretin הוא חלבון המעביר את הורמון התירוואיד וויטמין A בקומפלקס עם חלבון הקושר רטינול ומצוי בנוזלים חוץ תאיים. חלבוני TTL זהו לראשונה בנמטודה *C. elegans* ולאחר מכן גם בנמטודות טפילות על צמחים ובנמטודות הטפילות על יונקים. הם נפוצים יותר בנמטודות טפילות ומתבטאים בעיקר בדרגות הטפילות. תפקידם של חלבונים

אלה בנמטודות והקשר שלהם לטפילות אינם ידועים (Saverwyns et al., 2008). חלבוני TTL הינם בעלי אתר הצפוי לקשור ליגנד, שכמעט כולו שמור כמו ב-transthyretin, ולכן משערים שיש להם תפקיד בהעברת מולקולות ליפופיליות – הורמונים, או בקליטה של נוטריאנטים, או תפקיד כלשהו במערכת העצבים (McElwee, 2004). ביטוי הגנים ממשפחת *ttl* נמצא בעליה בתהליך ה-Recovery בנמטודות טפילות שונות (Saverwyns et al., 2008).

ידוע שב-*C. elegans* הגורם העיקרי המשפיע על עצירת ההתפתחות הוא צפיפות האוכלוסייה, הבא לידי ביטוי בפרומון, המתבטא קונסטיטוטית ומשוחרר ע"י הנמטודות. ריכוז ההורמון משקף את צפיפות האוכלוסייה, כאשר צפיפות הנמטודות גבוהה ורמת הפרומון המופרש גבוהה הוא משרה יצירת זחל עמיד ומונע Recovery. לעומת זאת, food signal המשוחרר ע"י חיידקים, משקף את זמינות המזון, מונע יצירת זחל dauer ומקדם Recovery. הכמויות היחסיות של פרומון ו-food signal הן הקובעות אם זחל מדרגה ראשונה J1 יעבור למצב של עצירת התפתחות ויתפתח בסופו של דבר לזחל dauer או ימשיך בהתפתחותו הרגילה (Golden and Riddle, 1982).

תוצאות עבודתי מראות כי שעתוק הגן בתהליך ה-Recovery עלה פי 6 לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה לעומת זחלי הביקורת. סביר להניח כי *ttl-15* מעביר סיגנלים ממערכת העצבים, שבה נמצאים רצפטורים כמוסנסוריים הקולטים אותות מהסביבה המעידים על התנאים להתפתחות כגון צפיפות נמטודות או זמינות מזון, ומעבירים אותם למסלולים המווסתים את תהליך ה-Recovery. אני מניחה שהשתקתו של הגן בזחלים אינפקטיביים גרמה לכך שהסיגנל לא הועבר והתהליך נפגע. אחוז הזחלים האינפקטיביים שבהם הושק הגן ושעברו Recovery היה 29.65%, לעומת 65% בזחלי הביקורת. נתונים אלו מצביעים על כך שהגן *ttl-15* אכן מעורב בתהליך ה-Recovery ואולי אף ממלא תפקיד בבקרת התהליך.

הגן *itm-1* (integral transmembrane protein 1) מקודד לחלבון טרנס ממברנאלי אוליגוסכריל-טראספראז (oligosaccharyltransferase) OT. האנזים OT מקטלז העברת שרשראות אוליגו-סכרידים מליפידים, לחלבונים חדשים, כאשר הם מסונתזים ומועברים לרשת האנדופלסמית (ER) (Yan and Lennarz, 1999). OT הוא אנזים מפתח בתהליך N-גליקוזילציה, שהינה מודיפיקציה המתרחשת בזמן תרגום החלבון בכל האורגניזמים האאוקריוטים. אנזים זה משתתף בביוסינתזה של N-גליקן. גליקנים הם חלבונים אשר אליהם מחוברות שרשראות של סוכרים, והם מעורבים בתהליכים ביולוגיים רבים מקיפול חלבונים, אוליגומריזציה ויציבות ועד תגובות חיסוניות ואינטראקציה טפיל-פונדקאי. היצמדות סוכרים - גליקוזילציה, ממלאת תפקיד חשוב גם בתהליכים התפתחותיים (Berninsone, 2006). מכיוון שההומולוג לחלבון זה אינו נמצא בנמטודה *C. elegans* ומכיוון שהשתקתו של גן זה פוגעת בתהליך ה-Recovery ב-*H. bacteriophora* ויעילותו יורדת מאוד, אני מניחה שלאנזים אוליגוסכריל-טראספראז יש תפקיד ביצירת N-גליקנים המעורבים בתהליך ותפקידם הוא בהעברת הסיגנלים במסלול הייחודי לנמטודות טפילות. אחוז הזחלים האינפקטיביים שבהם הושק הגן ושעברו Recovery היה 24%, לעומת 65% בזחלי הביקורת. הקשר של *itm-1* לתהליך ה-Recovery אינו ישיר וברור, אך מוכח ומצריך לימוד נוסף.

הגן *tnt-2* (TropoNin T family member) מקודד לטרופונין T איזופורם שהוא חלבון דופן הגוף העיקרי בזחל ובבוגר ב-*C. elegans* (Amin et al., 2007). נמצא כי חלבון זה מופרש בנמטודות טפילות שונות בשלב הזחל המדביק (Jaubert et al., 2002). במחקר שנעשה ב-*C. elegans* נמצא כי הגן *tnt-2* מתבטא בתגובה לקרינה וחיוני לתגובה לשברים בדנ"א דו-גדילי (Van Haaften et al., 2006). יתכן שגן זה מעורב בהגנה מפני עקות שונות בשלב המוקדם של חישת העקה ומתבטא גם בכניסה לפונדקאי בתגובה לעקה הנגרמת ע"י מערכות ההגנה של הפונדקאי. עוד נמצא כי *tnt-2* מגיב עם *lev-11* ועם *unc-27* ברמת החלבון (Amin et al., 2007). השערה נוספת כי הגן מעורב בתגובת היזון חוזר בתגובה לסיגנלים המועברים במסלולים לוויסות תהליך ה-Recovery להמשך התהליך. בעבודה הנוכחית נראתה עלייה בשעתוק של הגן לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה. שיעור הזחלים האינפקטיביים שבהם הושק הגן ושעברו Recovery היה 30%, לעומת 65% בזחלי הביקורת, מכאן שהוא חיוני לתהליך ה-Recovery ב-*H. bacteriophora*.

הגן *ahcy-1* (*S*-adenosylhomocysteine hydrolase) מקודד לאנזים ציטופלסמטי אדנוזיל-הומוציסטאין S הידרולאז, המזרוז פירוק של אדנוזיל-הומוציסטאין S, לאדנוזין והמוציסטאין והינו בעל תפקיד חשוב בויסות תהליכים כגון טרנסמתילציה, טרנס-סולפוריזציה ומטבוליזם של פורין. לאחרונה דווח על קישור של cAMP לאנזים. cAMP הינו שליח משני, המתווך במגוון רחב של תגובות תאיות לסיגנלים הורמונליים הכוללים שינויים במטאבוליזם ביניים, בהתרבות תאים ובתנועת תאים. קישור זה המגביר את פעילותו של האנזים אדנוזיל-הומוציסטאין S הידרולאז, וגורם לשינויים, לדוגמה במתילציה של הפרומוטור וכתוצאה מכך לשינוי בשעתוק הגן (Kloor and Osswald, 2004). תפקידו של אנזים זה בתהליך ה-Recovery בנמטודות אחרות אינו ידוע, אך יכול להיות שהוא מעורב בקבלת סיגנל בתהליך ה-Recovery ומשפיע על שעתוק וביטוי של גנים הדרושים להתפתחות הזחל. בעבודתי נראתה עלייה בשעתוק לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה. שיעור הזחלים האינפקטיביים שבהם הושק הגן ושעברו Recovery היה 29%, לעומת 65% בזחלי הביקורת, מכאן שהינו חיוני לתהליך ה-Recovery ב-*H. bacteriophora*.

הגן *pinin* (*pnn*) מקודד לחלבון SR-like השייך לקבוצת חלבונים שהם פקטורי שחבור החיוניים בשחבור של pre-mRNA ב-spliceosome. נמצא ש-*pinin* ממוקם בצמתי תאי אפיתל ספציפיים, ובקומפלקס של desmosomes- הפילמנט האמצעי ונראה שהוא ממלא תפקיד בייצוב הקומפלקס, בהיצמדות תאים ובנדידתם (Wang et al., 2002). בנוסף נמצא ש-*pinin* ממוקם בתוך הגרעין בקומפלקס EJC (exon-exon junction complex) הנמצא ליד צמתי אקסונים. משערים כי תפקיד ה-EJC לשמש פלטפורמה המספקת קישור בין שחבור pre-mRNA ומאורעות רבים המתרחשים לאחר תרגום כגון הובלה, מיקום, פירוק של mRNA שגוי ויעילות התרגום. תפקידו בגרעין הוא בוויסות שחבור אלטרנטיבי. הוא משתתף בשחבור באופן ישיר או באופן עקיף ע"י רכיבים אחרים של מנגנון השחבור (Lin et al., 2004). בגרעין *pinin* עובר אינטראקציה עם SR-cyp, SR-cyp, השייך למשפחה גדולה מאוד ושמורה של חלבונים הנקראים cyclophilins, המקטלזים מעבר בין cis-prolin ל-trans-prolin בשרשרת החלבונית. חלבונים

אלה יכולים למלא תפקיד בקיפול חלבונים, או לגרום לשינוי בקונפורמציה החלבון. תפקידם הספציפי אינו ידוע, אך משערים כי הם מהווים את החיבור בין שיחבור של pre-mRNA לתרגום וכנראה מווסתים ומפיצים את פקטורי השעתוק SR-like (Alpatov et al., 2004). מעורבותו והשפעתו של הגן *pinin* על תהליך ה-Recovery אינה ברורה, אך הוא מעורב כנראה בבקרת שעתוקו ביטוי של גנים הדרושים לתהליך וניכר ברור שהינו חיוני לתהליך. בעבודה הנוכחית נראתה עלייה בשעתוק לאחר ששעות חשיפה להמולימפה. שיעור הזחלים האינפקטיביים שבהם הושקו הגן ושעברו Recovery היה 28%, לעומת 65% בזחלי הביקורת.

4.4 חלבונים המתבטאים בתהליך ה-Recovery

גישה נוספת שננקטה על מנת לאפיין את תהליך ה-Recovery הינה בדיקת החלבונים המתבטאים בתהליך ע"י ג'לים בשני מימדים. רוב העבודות על חלבונים בנמטודות טפיליות נעשו בהתמקדות בחלבונים מופרשים, ובעבודה זו נבחנו חלבונים המתבטאים בזחל האינפקטיבי בתגובה להמולימפה של החרק. בין החלבונים שנשלחו לזיהוי זיהיתי חלבונים אשר הופיעו בספריות ההפחתה וכאלה שלא הופיעו בהן (פירוט בתוצאות 3.9.3 ו-3.9.5). זיהיתי מספר חלבונים אשר ידועים כמעורבים בתהליך ה-Recovery בנמטודה *C. elegans* כגון Arginin kinase (Wang and Kim, 2003) והחלבון RACK1 שהינו רצפטור לקינאז C (Receptor of activated C kinase). זיהיתי גם מספר חלבונים הידועים כמעורבים באינטראקציה טפיל-פונדקאי בנמטודות טפילות כגון Necepsin II שהינו פרוטאז אספרטי, NDP kinas (Nucleoside diphosphate kinase) ו-Calreticulin (ראה פירוט בהמשך). כמו כן מצאתי מספר גדול של HSPs heat shock proteins (HSP) הכוללים: *hsp-40*, *hsp-60*, *hsp-70*, *hsp-90* ו-*hsp-20*. ידוע כי חלבוני HSPs כמתבטאים בתגובה לתנאי עקה, כולל אלה הנוצרים ע"י הפונדקאי לטפיל. עלייה בביטוי חלבונים אלו בתגובה להמולימפה של חרק פונדקאי נמצאה גם בנמטודה האנטומופתוגנית *Steinernema carpocapsae* (Hao et al., 2010).

מצאתי חלבונים אשר מעורבים בהתפתחות וארגון שרירים, כהכנה למעבר לדרגה הבאה, שזוהו בעיקר מתוך החלבונים שבוטאו ששעות לאחר חשיפה להמולימפת חרק. לדוגמה: UNC-87 (UNCoordinated), MUP-2 (MUscle Positioning) והחלבון DIM-1 (DIsoorganized Muscle) (פירוט בתוצאות בסעיפים 3.10.3 ו-3.10.5 בתוצאות). מתוך כל החלבונים שזוהו, בחרתי לדון בשני חלבונים שלהם קשר ברור לתהליך ה-Recovery ולהתחמקות ממערכת החיסון של הפונדקאי, שהם תהליכים המאפיינים את האינטראקציה טפיל-פונדקאי.

RACK1 (Receptor of activated C kinase) הוא רצפטור חלבוני ל-C kinase מאוקטב, המעורב בהעברת סיגנלים ובתקשורת בין תאית. חלבון זה מעורב כנראה גם בהיצמדות תאים ובתיווך סיגנלים המועברים לרצפטור לפקטור הגידול (IGF-I) Insulin Growth Factor-I. פקטור הגידול IGF-I דרוש לגדילה והתפתחות, לשרידות תאים, להתמיינות ולנדידת תאים (Kiely et al., 2005). כמו כן ידוע כי פקטור הגידול IGF-I מעורב בתהליך ה-Recovery במסלול ה-IGF-I/insulin (Barbieri et al., 2003).

פגיעה ברצפטור זה גורמת לאיבוד סיגנלים להיצמדות, הדרושים לוויסות פעילותו של החלבון AKT, וכתוצאה מכך לפוספורילציה מוגברת שלו. ביטוי ביתר של RACK1 גורם למניעת פעילותו של AKT. AKT הינו קינאז המווסת באופן שלילי את פעילות הגן *daf-16*, שהינו גן מרכזי במסלול ה-insulin like והמשפיע ישירות על תהליך ה-Recovery (Kiely et al., 2005). מסלול ה-insulin-like צפוי להימצא בנמטודה *H. bacteriophora*, ומציאתו של החלבון RACK1, מחזקת את ההנחה כי מסלול ה-insulin-like אכן קיים ופעיל בנמטודה זו. מעבודות חדשות שנעשו על נמטודות, זבובים ועכברים מתברר שמסלול ה-insulin/IGF-I הוא מרכיב של מסלול נוירו-סקרטורי השמור לאורך האבולוציה, המווסת התפתחות והזדקנות בתגובה לזמינות מזון (Gems and Partridge, 2001).

Calreticulin (CRT), הוא חלבון שמור ביותר הממלא תפקידים שונים בוויסות תהליכים תאיים. לחלבון זה שני תפקידים עיקריים האחד צ'פרון והשני קישור של מולקולות סידן לשמירת מאזן הסידן בתא. חלבון זה זוהה במספר רב של נמטודות טפילות מקבוצות שונות. בנמטודות טפילות חלבון זה מופרש מדרגת הזחל המדביק ומעורב כנראה בהתחמקות ממערכת החיסון של הפונדקאי. ישנן עדויות שחלבון זה חיוני לאינטראקציה טפיל פונדקאי. לדוגמה: CTR בנמטודה *Haemonchus contortus*, הטפילה על כבשים, כנראה מאפשר לנמטודה הזנה רציפה מדם הפונדקאי בגלל תכונותיו המונעות קרישת דם. בנמטודה *Necator americanus*, הטפילה על בני אדם CTR מוכר ע"י נוגדני IgE שבודדו מחולים הנגועים בטפיל וגרם לשחרור היסטמין. חלבון ה-CRT נקשר לחלבון C-reactive של הפונדקאי וע"י כך מגביר את התחמקות הזחל האינפקטיבי מהתגובה החיסונית של הפונדקאי (Rzepecka et al., 2009).

C-reactive הינו חלבון המעורב במנגנון ההגנה של הפונדקאי ומהווה חלק מתגובת מערכת החיסון. ידוע שהוא מגן מפני מגוון רב של זיהומים חיידקיים ומעורר דלקות ביונקים (Black et al., 2004). מנגנון ההתחמקות של נמטודות טפילות מהתגובה החיסונית של הפונדקאי עדיין לא מובן ברובו. חלבון ה-CRT נמצא ב-*H. bacteriophora* בזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפת חרק. אני מניחה כי חלבון זה מעורב בהתחמקות של הטפיל מהתגובה החיסונית של הפונדקאי, כנראה בהגנה על החיידק הסימביונטי המופרש ובהתבססות הזחל האינפקטיבי והחיידק הסימביונטי בתוך המולימפת הפונדקאי.

4.5 תהליך ה-Recovery בראי האבולוציה

מנקודת מבט אבולוציונית נמטודות הן מערכת (phyla) מגוונת מאוד של אורגניזמים. טפילות על חיות הופיעה לפחות ארבע פעמים ועל צמחים שלוש פעמים, במשך האבולוציה של הנמטודות (Parkinson et al., 2004). נמטודות טפילות נמצאות בכל הקבוצות הטקסונומיות של הנמטודות. נמטודות מהסוגים *Heterorhabditis* ו-*Steinernema* הן נמטודות אנטומופתוגניות הנמצאות בנישה ביולוגית דומה בקרקע והן בעלות אסטרטגיה דומה מאוד של טפילות על חרקים. לשתייהן חיידק סימביוטי שלאחר הדבקת הפונדקאי מופרש ועוזר בהריגתו (הזחל האינפקטיבי של *S. carpocapsa* נושא את החיידק הסימביונטי *Xenorhabdus nematophila*), אך הן אינן חולקות מוצא משותף ומוצאן משני אירועים שונים בהם הופיעו נמטודות טפילות באבולוציה. ההסבר לתופעה ניתן ע"י אבולוציה מכנסת (Blaxter, et al., 1998;)

(Parkinson et al., 2004). אבולוציה מכנסת הינה התופעה של התפתחות באופן בלתי תלוי של אותם מנגנונים במינים שונים, כדי לענות על אותו צורך ביולוגי.

סביר להניח שאבולוציה מכנסת פועלת גם בתהליך ה-Recovery בנמטודות טפילות. בעבודה שנעשתה ע"י Hao et al. (2010) נערכה אנליזה של גנים ששועתקו בזחלים אינפקטיביים בעקבות חשיפה להמולימפה של חרק בנמטודה *Steinernema carpocapsae* (Hao et al., 2010). בהשוואה של תוצאות עבודתי לעבודה זו נמצאו גנים דומים המשועתקים בשתי הנמטודות בתגובה להמולימפה של חרק. לדוגמה: בשתי הנמטודות היה מספר ה-ESTs ההומולוגיים ל-Cytochrome c oxidase subunit I גבוה ביותר. גנים נוספים שהתבטאו בתגובה להמולימפה בשתי הנמטודות הם: *Transthyretin-like protein (ttl)*, *Saposin-like*, *Lectin C-type*, *Cytochrom-b*, *Fatty acid-binding protein homolog* עלייה בביטויים של חלבוני *heat shock* בשתי הנמטודות *S. carpocapsae* ו-*H. bacteriophora*. בתגובה להמולימפה של חרק. בניגוד לפפטידאזות ולמעכבי פרוטאזות רבים שנמצאו ב-*S. carpocapsae* ושחשודים כמעורבים באינטראקציה טפיל-פונדקאי, בעבודה הנוכחית נמצאו מעט פפטידאזות ופרוטאזות ולא נמצאו מעכבי פרוטאזות (ראה בתוצאות טבלאות גנים עמ' 29-37). על פי השוואה זו של אנזימים המתבטאים בתהליך ה-Recovery יתכן שמנגנון ההתחמקות של *H. bacteriophora* מהתגובה החיסונית של הפונדקאי שונה מאסטרטגיית ההתחמקות של *S. carpocapsae* ממערך ההגנה של הפונדקאי. הסבר נוסף להבדלים באנזימים הפרוטאוליטיים המתבטאים בשתי נמטודות אלו בתהליך ה-Recovery הוא שבעבודתי נקטי בגישה של ספריות הפחתה. בספריות ההפחתה מיוצגים רק ESTs שביטויים עולה בזחלים אינפקטיביים שעוברים Recovery, בעוד שבעבודות אחרות נבדקו כל ה-ESTs המתבטאים בזחלים האינפקטיביים בתהליך. ייתכן שפפטידאזות רבות מתבטאות בזחלים אינפקטיביים ללא קשר לתהליך ה-Recovery, אלא כחלק ממערך ההגנה של הזחל מפני חיידקים ופטירות הנמצאים בקרקע בעודו תר אחר פונדקאי מתאים. בעבודה שנעשתה ע"י Hao et al. (2010) נבדקו 2180 ESTs, למרות הקושי להשוות בין העבודות בגלל גודל מדגם הספריות השונה וגם כי העבודה בנמטודה *S. carpocapsae* התרכזה בגנים המקודדים לחלבונים מופרשים ולמרות ההבדלים בביטוי פרוטאזות של הזחל האינפקטיבי, יש דמיון רב בגנים האחרים המבטאים בשתי הנמטודות בתהליך ה-Recovery ומכאן אני מניחה כי תהליך ה-Recovery בנמטודות אלו דומה.

נמטודות נמצאות כמעט בכל נישה אקולוגית והצלחתן ושגשוגן משקפות הצלחה בביטוי תכונות גנטיות שונות, שחלקן נובע מאב קדמון משותף (Parkinson et al., 2004). גנים ספציפיים יכולים להיות בעלי תפקיד שונה לגמרי או בעלי תפקיד דומה לגנים באורגניזמים אחרים, אך להשתמש במכאניזם שונה. ישנם גנים רבים של נמטודות הנמצאים בכל סידרת הנמטודות אך חסרים ב-*C. elegans* (Mitreva et al., 2004). לפיכך, יש לבחון ולהרחיב את הידע הספציפי לנמטודות טפילות ולתפקידי גנים אלו.

העברה אופקית של גנים (Horizontal gene transfer) בין מינים שונים היא כוח חשוב באבולוציה של אורגניזמים אאוקריוטים. בעבודתי נמצאו בנמטודה *H. bacteriophora* גנים בעלי הומולוגיה לגנים ממקורות שונים, חלקם מפטריות, ויכול להיות שגנים אלו עברו בהעברה אופקית. לדוגמה: הומולוג לגן

המקודד ל-Glycine-rich protein מ-*Phytophthora infestans* - פטריה פתוגנית בתפוחי אדמה. פפטיד מסוג זה נמצא גם בחרקים ומשמש כפפטיד אנטימיקרוביאלי כנגד חיידקים גרם שליליים (Otvos, 2000). ייתכן שמקורו של גן זה בנמטודות הוא מחרקים, אך מכיוון שלא כל החרקים הפונדקאים של נמטודות אלו רוצפו, ההומולוגיה הקרובה ביותר שנמצאה היא ממקור פטרייתי. דוגמה נוספת היא הומולוג לגן המקודד לאנזים Manganese superoxide dismutase מהפטריה *Taiwanofungus camphorates* (rot fungus). גן זה הוא מתאלופרוטאז המצוי בכל הנמטודות (*sod-3*) ותפקידו בנטרול רדיקליים חופשיים הנוצרים בתא ע"י ריאקציית דיסמוטציה (Suzuky et al., 1996). לטרנסקריפט זה מ-*H. bacteriophora* לא נמצאה הומולוגיה של גן כלשהו מנמטודות. לא ברור האם ואיך התבצעה ההעברה האופקית של גן זה לנמטודות, אך ייתכן שמכיוון שפטריית אלה נמצאות בקרקע הזחל האינפקטיבי בחיפושיו אחר פונדקאי בקרקע "הכניס" אותו על גופו לפונדקאי ובמהלך ההזנה של הנמטודות בפונדקאי הועבר גם גן זה. בנמטודות ידועות כמה דוגמאות להעברה אופקית של גנים בין חיידקים פתוגניים לצמחים לנמטודות הטפילות על צמחים. אחת הדוגמאות הידועות ביותר להעברה אופקית היא גן ממקור חיידקי המקודד לצלולאז שמעורב בפירוק דופן התא בצמח. גן זה ממקור חיידקי וזהה לראשונה בנמטודות עפצים (Smant et al., 1998), ולאחר מכן זוהה גם בקבוצות אחרות של נמטודות טפילות על צמחים כגון *Meloidogyne incognita* ו-*Globodera tabacum* וגם בכמה חרקים (Jones, 2005).

טרנספוזומים הניחנים ביכולת התניידות והתרבות בתוך הגנום, נוטים במיוחד להעברה אופקית (Gilbert et al., 2010). בתוצאות עבודה זו נמצאו שני גנים שונים המקודדים לטרנספוזאז. הראשון - גן המקודד לאנזים טרנספוזאז IS630 transposase ממקור בקטריאלי עם הומולוגיה ל-*Listonella anguillarum*, שהוא חיידק פתוגני לדגים ושייך למשפחת Vibrionaceae (Jones, 2005; Mizuki, 2006). הגן השני שנמצא הינו גן המקודד לאנזים IS10 transposase עם הומולוגיה גבוהה לטרנספוזאז מ-*Solanum lycopersicum* (עגבניית שרי). ייתכן שהגן לטרנספוזאז עבר בהעברה אופקית מהחיידק הפתוגני לדגים, לחיידק הסימביונטי של הנמטודה שמוצאו הקדום הינו ימי ואח"כ עבר לנמטודות מהחיידק הסימביונטי, אך עד כה לא נמצאו ראיות של העברת גנים אופקית מהחיידק הסימביונטי *P. luminescens* לנמטודה *H. bacteriophora* (Bai et al., 2009). ייתכן גם הסבר אחר, לדוגמה, גן מנמטודות בעל הומולוגיה לגן צמחי נמצא בנמטודה *Aphelenchus avenae*. בנמטודה זו הניזונה מפטריית נמצא גן המקודד להומולוג לחלבון LEA. חלבון זה מתבטא בעקת יובש והומולוג לחלבון זה נמצא מתבטא בשלב עוברי בצמחים ומגן מפני עקת יובש. כנראה שמקורו של גן זה בשני האורגניזמים השונים, הוא מסוג תאים קדום מאוד שנחשף לעקת יובש ונשמר באורגניזמים מסוימים לאורך האבולוציה (Brunell et al., 2002). ידועים מספר מקרים שאינטראקציה טפיל-פונדקאי תרמה להעברת גנים אופקית בין הפונדקאי והטפיל ע"י טרנספוזומים. לדוגמה: מעבר של טרנספוזומים ל-*Rhodnius prolixus* - פשפש מוצץ דם, מבעלי חיים הנמנים על הפונדקאים שלו. בגנום שלו נמצאו טרנספוזומים בעלי 98% זהות לאלה של אופוסום ושל קוף סנאי שהם הפונדקאים המועדפים עליו (Gilbert et al., 2010). על כן, הייתי מצפה למצוא ב-*H. bacteriophora* טרנספוזומים בעלי הומולוגיה לטרנספוזומים מחרקים, שהם הפונדקאים של נמטודה זו שעברו בהעברה אופקית בין הפונדקאי לטפיל. בתוצאות עבודתי לא מצאתי טרנספוזומים בעלי הומולוגיה

לטרנספוזומים מחרקים. אירועים אלה הם נדירים יחסית ולכן הסיכוי למצוא לכך ראיות ב-385 רצפים הוא קטן. אני מניחה כי כאשר יתפרסם רצף הגנום של *H. bacteriophora* ימצאו ראיות לאירועים אלה של העברה אופקית של גנים בין הפונדקאי לנמטודה.

5.5 לסיכום

בעבודה זו בדקתי את תהליך ה-Recovery, שהינו תהליך ייחודי בנמטודות. בנמטודות טפילות רבות, עצירת התפתחות ויצירת זחל מדביק כגון זחל ה-dauer, העמיד, הינו שלב המאפשר הישרדות. יציאה ממצב זה (Recovery) המתרחש בפונדקאי מסמן את החזרה לגדילה, להתפתחות ולפוריות וכמו כן את המעבר לטפילות. במעבר לטפילות מעורבים תהליכים כגון גילוי ועיבוד פקטורים ספציפיים מהפונדקאי, חדירה לפונדקאי, התחמקות מהתגובה החיסונית של הפונדקאי, חידוש אכילה והתפתחות. על סמך מחקר זה אני מניחה שישנם מסלולי העברת סיגנלים המווסתים את תהליך ה-Recovery המופעלים בתגובה לסיגנל מזון, המשותפים לנמטודה החופשייה - *C. elegans* ולנמטודה הטפילה על חרקים - *H. bacteriophora*, אך גם כי ישנו מסלול שונה הייחודי לנמטודות טפילות המופעל בתגובה לסיגנלים מהפונדקאי שאינו נמצא בנמטודה *C. elegans*. סביר להניח שמסלולים אלה חופפים בחלקם או ברובם, אך הסיגנל המפעיל אותם שונה.

מבחינה אבולוציונית חלק ממחזור החיים בנמטודות טפילות רבות, הוא מחוץ לפונדקאי או שהן טפילות על כמה פונדקאים השונים זה מזה בפילוגנטיקה ובמטבוליזם שלהם. מתוך כך ישנו לחץ אבולוציוני לשמור או אפילו להרחיב תפקודים מטבוליים ורגולאטוריים (Parkinson et al., 2004). כלומר, גם לשמור תפקודים של נמטודות חופשיות כגון כושר תנועה וחיפוש אחר מזון/פונדקאי וגם לשמור על תפקודים של טפילות כגון התחמקות מהתגובה החיסונית של הפונדקאי. על כן אני מניחה כי במהלך האבולוציה, יחד עם הופעת הטפילות, התפתח מסלול המבקר את תהליך ה-Recovery בתגובה לפקטורים מהפונדקאי בנמטודות טפילות, בנוסף למסלולים השמורים המבקרים את התהליך והנמצאים גם בנמטודות חופשיות.

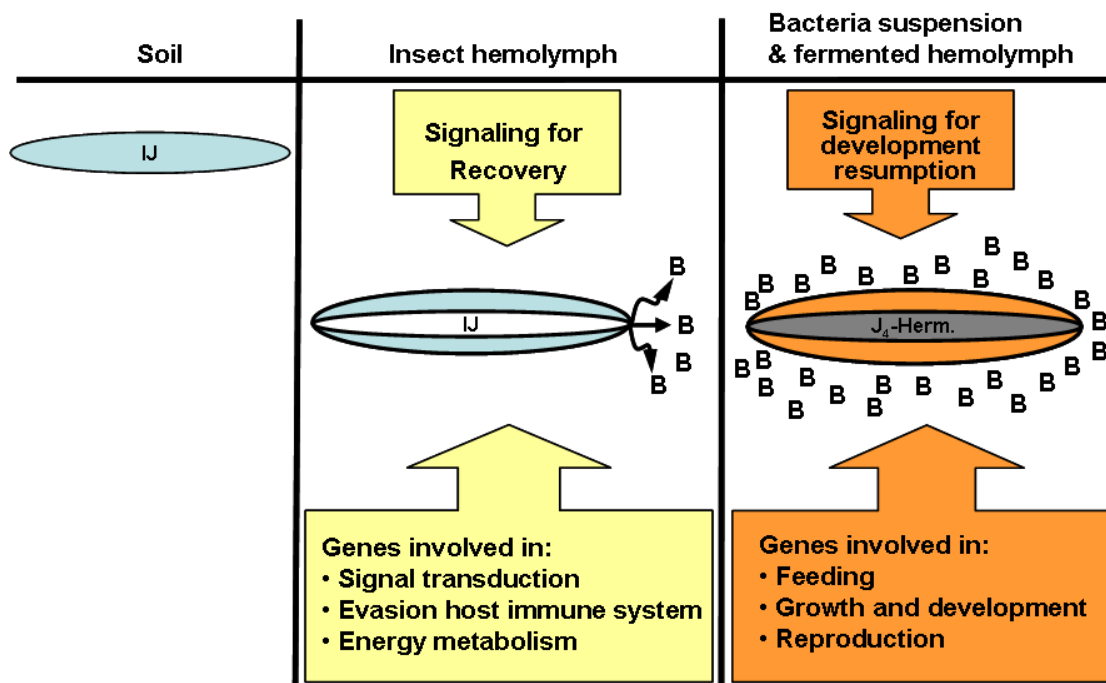
בעבודתי מצאתי שמונה גנים אשר מעורבותם בתהליך ה-Recovery הוכחה ע"י מבחנים פונקציונאליים, כאשר לשניים מהם קשר ברור לתהליך ובאחרים ההקשר עדיין לא ידוע, אך השתקתם פגעה ביעילות התהליך. גנים אלו מעורבים בהעברת סיגנלים, בוויסות שעתוק, בבקרת מחזור חלוקת התא, בקליטת נוטריאנטים, בהעברת הורמונים ובגליקוזילציה. מעורבותם של גנים אלו מעידה על מורכבות התהליך ועל רמות הבקרה שלו. חיוניותם של גנים אלו לתהליך ה-Recovery בנמטודות אנטומופוגניות לא הייתה ידועה לפני מחקר זה.

זיהיתי מספר חלבונים הידועים כמעורבים בתהליך ה-Recovery בנמטודה *C. elegans* וכמה חלבונים הידועים כמעורבים באינטראקציה טפיל-פונדקאי בנמטודות טפילות. כמו כן מצאתי הקבלה בין החלבונים שהתבטאו בתהליך ה-Recovery וגנים שנמצאו בספריות ההפחתה.

ישנו מספר גדול של רצפים בעלי הומולוגיה לטרנסקריפטים המקודדים לחלבונים כגון קינאזות, פוספטאזות של חלבונים, רצפטורים שונים וחלבונים המווסתים העברת סיגנלים שעלו בספריות ההפחתה ושלא נבדקו. צפוי שגם גנים אלו ממלאים תפקידים בתהליכים המתרחשים בדרגת הזחל האינפקטיבי, ביציאה ממצב של זחל אינפקטיבי להמשך התפתחות ובאינטראקציה טפיל-פונדקאי ויש צורך בבדיקתם.

מספר הגנים שנדגמו מספריות ההפחתה קטן יחסית למספר המושבות שהתקבלו ורצוי להגדילו ולהמשיך את המחקר גם בכיוון זה. מדגם גדול יותר היה נותן תמונה רחבה יותר של פרופיל השעתוק של הגנים המתבטאים בתהליך ה-Recovery. כמו כן, זיהוי מספר גדול יותר של חלבונים בתהליך ה-Recovery היה מאפשר השוואה רחבה יותר בין שעתוק גנים לבין ביטוי חלבונים כתוצאה מחשיפה של המולימפת חרק. השתקת גנים ע"י RNAi בקנה מידה גדול אפשרית בנמטודות אלו ותעזור בהבנת תפקידי גנים אלו בתהליכים שונים ואף תאפשר מציאת גנים נוספים השייכים למסלול המתחיל את תהליך ה-Recovery בתגובה לאינטראקציה עם פונדקאי או גנים נוספים המתבטאים בתגובה להפעלת מסלול זה בנמטודות אנטומופתוגניות.

איור מספר 2: סכמת השראת-Recovery והתפתחות הזחל האינפקטיבי, הסיגנלים המעורבים בשלבים השונים והגנים הצפויים להתבטא בתגובה לסיגנלים אלו



איור מס' 2: הסיגנל הראשון ל-Recovery מגיע מהמוליפת החרק הפונדקאי לאחר כניסתו של הזחל האינפקטיבי. בעקבות סיגנל זה גפי הפה נפתחים, מערכת העיכול הופכת לפעילה, החיידק הסימביוטי מופרש. הגנים הצפויים להיות מעורבים בתהליכים אלו הם גנים המעורבים בהעברת סיגנלים, גנים המעורבים בהתחמקות ממערכת החיסון של הפונדקאי וגנים המעורבים במטאבוליזם של אנרגיה. לאחר שהחיידק התבסס והתרבה בהמולימפה הוא מייצר חומרי הזנה (food signals) המהווים את הגירוי התזונתי להתפתחות הזחל האינפקטיבי לזחל מדרגה רביעית ולאחר מכן לנקבה הרמפרודיטית. הגנים הצפויים להיות מעורבים בתהליכים אלו הם גנים המעורבים באכילה, גדילה והתפתחות רבייה.

על מנת לאמת בוודאות את ההנחה כי מסלול ה-insulin-like קיים ב-*H. bacteriophora* יש לחפש ספציפית את הגנים הנוספים במסלול לפי ידע הרצפים הקיים מ-*C. elegans* או לחילופין להשתק מספר גנים שונים במסלול ע"י RNAi. אפשרות נוספת היא לעכב את המסלול ע"י חומרים כימיים כגון 4,7-phenanthroline שהוא מעכב של Phosphoinositide-3 kinase (PI3K) שמיוצג במסלול כ-*age-1* ולבדוק האם תהליך ה-Recovery אכן מעוכב.

בכדי לשפר את הגידול המסחרי להדברה ביולוגית של נמטודות אנטומופתוגניות, יש להעלות את אחוז הזחלים האינפקטיביים אשר עוברים בהצלחה את תהליך ה-Recovery בפרמנטורים. ממצאי העבודה הנוכחית מדגישים את הצורך להתמקד בגורמים שמשרים את השלב הראשוני של התהליך. אחת הדרכים לעקוף צורך זה ולמרות זאת להגדיל את מספר הזחלים האינפקטיביים העוברים Recovery בהצלחה, היא ע"י יצירת נמטודות טרנסגניות. בעבודה שנעשתה ע"י Hashmi et al. הראו החוקרים כי ניתן ליצור נמטודות אנטומופתוגניות-טרנסגניות (Hashmi et al., 1995). התערבות במסלול insulin-like המווסת את תהליך ה-Recovery והטייתו לכיוון הרצוי יכולה להיעשות ע"י נמטודות טרנסגניות אשר יבטאו עותקים נוספים של הגן *akt-1* תחת פרומטר מושרה. עותקים נוספים של *akt-1* יגבירו את רמת הפוספורילציה של *daf-16*, ימנעו את פעולתו כרפרסור לגנים הדרושים לתהליך וע"י כך יגבירו את ה-Recovery. ביטוי הגן יושרה ע"י חומר אשר לא מצוי באופן טבעי בקרקע או בפונדקאי והשראת ביטוי הגן תעשה רק בשלב גידול הנמטודות בפרמנטורים. מכיוון שהגן המוחדר לנמטודות הינו גן אנדוגני המתבטא בתהליך ה-Recovery באופן טבעי וביטוי מוגבר רק לזמן מוגדר, סביר להניח שנצליח להטות את התהליך בהצלחה. נקודה נוספת היא שהכנסת גן אנדוגני והגברת ביטוי לא תיצור התנגדות רבה לפיזור נמטודות טרנסגניות אלה בשדה. ממצאי העבודה הנוכחית עשויים גם לסייע למצוא פתרונות למניעת ה-Recovery בנמטודות פרזיטיות המזיקות בצמחים ובבעלי חיים. גישות אפשריות הן השתקת גנים חיוניים להשראת התהליך או פיתוח חומרים/תרופות המונעים את הפעילות של גנים אלו החיוניים לתהליך ה-Recovery בנמטודות טפילות.

- Allen, J.E. and MacDonald, A.S. (1998) Profound suppression of cellular proliferation mediated by the secretions of nematodes. *Parasite Immunol*, 20, 241-247.
- Allen, T., Hong, L., Ward, J., Burkeen, A., Bucher, EA. (2000) *In vivo* Studies of Troponin T Functions.
- Alpatov, R., Munguba, G.C., Caton, P., Joo, J.H., Shi, Y., Shi, Y., Hunt, M.E. and Sugrue, S.P. (2004) Nuclear speckle-associated protein Pnn/DRS binds to the transcriptional corepressor CtBP and relieves CtBP-mediated repression of the E-cadherin gene. *Mol Cell Biol*, 24, 10223-10235.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-410.
- Amin, M.Z., Bando, T., Ruksana, R., Anokye-Danso, F., Takashima, Y., Sakube, Y. and Kagawa, H. (2007) Tissue-specific interactions of TNI isoforms with other TN subunits and tropomyosins in *C. elegans*: the role of the C- and N-terminal extensions. *Biochim Biophys Acta*, 1774, 456-465.
- Anyanful, A., Sakube, Y., Takuwa, K. and Kagawa, H. (2001) The third and fourth tropomyosin isoforms of *Caenorhabditis elegans* are expressed in the pharynx and intestines and are essential for development and morphology. *J Mol Biol*, 313, 525-537.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.H., Barker, W.C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M.J., Natale, D.A., O'Donovan, C., Redaschi, N. and Yeh, L.S. (2004) UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*, 32, D115-119.
- Ashton, F.T., Zhu, X., Boston, R., Lok, J.B. and Schad, G.A. (2007) *Strongyloides stercoralis*: Amphidial neuron pair ASJ triggers significant resumption of development by infective larvae under host-mimicking *in vitro* conditions. *Exp Parasitol*, 115, 92-97.
- Au, C., Dean, P., Reynolds, S.E. and French-Constant, R.H. (2004) Effect of the insect pathogenic bacterium *Photorhabdus* on insect phagocytes. *Cell Microbiol*, 6, 89-95.
- Bai, X., Adams, B.J., Ciche, T.A., Clifton, S., Gaugler, R., Hogenhout, S.A., Spieth, J., Sternberg, P.W., Wilson, R.K. and Grewal, P.S. (2009) Transcriptomic analysis of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* TTO1. *BMC Genomics*, 10, 205.
- Bai, X., Grewal, P.S., Hogenhout, S.A., Adams, B.J., Ciche, T.A., Gaugler, R. and Sternberg, P.W. (2007) Expressed sequence tag analysis of gene representation in insect parasitic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *J Parasitol*, 93, 1343-1349.
- Barbieri, M., Bonafe, M., Franceschi, C. and Paolisso, G. (2003) Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285, E1064-1071.

Bennett, H.P. and Clarke, D.J. (2005) The pbgPE operon in *Photorhabdus luminescens* is required for pathogenicity and symbiosis. *J Bacteriol*, 187, 77-84.

Berninsone, P.M. (2006) Carbohydrates and glycosylation. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.125.1, <http://www.wormbook.org>.

Birnby, D.A., Link, E.M., Vowels, J.J., Tian, H., Colacurcio, P.L. and Thomas, J.H. (2000) A transmembrane guanylyl cyclase (DAF-11) and *Hsp90* (DAF-21) regulate a common set of chemosensory behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 155, 85-104.

Birney, E., Kumar, S. and Krainer, A.R. (1993) Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res*, 21, 5803-5816.

Black, S., Kushner, I. and Samols, D. (2004) C-reactive Protein. *J Biol Chem*, 279, 48487-48490.

Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T. and Thomas, W.K. (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392, 71-75.

Blaxter, M.L., Page, A.P., Rudin, W. and Maizels, R.M. (1992) Nematode surface coats: actively evading immunity. *Parasitol Today*, 8, 243-247.

Blaxter, M.L., Raghavan, N., Ghosh, I., Guiliano, D., Lu, W., Williams, S.A., Slatko, B. and Scott, A.L. (1996) Genes expressed in *Brugia malayi* infective third stage larvae. *Mol Biochem Parasitol*, 77, 77-93.

Boehm, M. and Bonifacino, J.S. (2002) Genetic analyses of adaptin function from yeast to mammals. *Gene*, 286, 175-186.

Boemare, N. (2002) Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In *Entomopathogenic Nematology*, Gaugler, R. (ed.), CABI publishing, UK, p. 35-65.

Bourne, H.R. (1997) How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 134-142.

Bowen, D., Rocheleau, T.A., Blackburn, M., Andreev, O., Golubeva, E., Bhartia, R. and French-Constant, R.H. (1998) Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science*, 280, 2129-2132.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.

- Buglino, J., Shen, V., Hakimian, P. and Lima, C.D. (2002) Structural and biochemical analysis of the Obg GTP binding protein. *Structure*, 10, 1581-1592.
- Bui, Y.K. and Sternberg, P.W. (2002) *Caenorhabditis elegans* inositol 5-phosphatase homolog negatively regulates inositol 1,4,5-triphosphate signaling in ovulation. *Mol Biol Cell*, 13, 1641-1651.
- Burnell, A. (2002) Genetic and genetic improvement. *In* Entomopathogenic nematology. Gaugler, R. (ed.), CBI publishing, Oxon, UK, p. 241-246.
- Burnell, A.M., Houthoofd, K., O'Hanlon, K. and Vanfleteren, J.R. (2005) Alternate metabolism during the dauer stage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*, 40, 850-856.
- Carberry, K., Wiesenfahrt, T., Windoffer, R., Bossinger, O. and Leube, R.E. (2009) Intermediate filaments in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66, 852-864.
- Castagnone-Sereno, P., Leroy, F. and Abad, P. (2001) cDNA cloning and expression analysis of a calponin gene from the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Mol Biochem Parasitol*, 112, 149-152.
- Chandler, R.J., Aswani, V., Tsai, M.S., Falk, M., Wehrli, N., Stabler, S., Allen, R., Sedensky, M., Kazazian, H.H. and Venditti, C.P. (2006) Propionyl-CoA and adenosylcobalamin metabolism in *Caenorhabditis elegans*: evidence for a role of methylmalonyl-CoA epimerase in intermediary metabolism. *Mol Genet Metab*, 89, 64-73.
- Chen, D., Pan, K.Z., Palter, J.E. and Kapahi, P. (2007) Longevity determined by developmental arrest genes in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 6, 525-533.
- Chen, N., Harris, T.W., Antoshechkin, I., Bastiani, C., Bieri, T., Blasiar, D., Bradnam, K., Canaran, P., Chan, J., Chen, C.K., Chen, W.J., Cunningham, F., Davis, P., Kenny, E., Kishore, R., Lawson, D., Lee, R., Muller, H.M., Nakamura, C., Pai, S., Ozersky, P., Petcherski, A., Rogers, A., Sabo, A., Schwarz, E.M., Van Auken, K., Wang, Q., Durbin, R., Spieth, J., Sternberg, P.W. and Stein, L.D. (2005) WormBase: a comprehensive data resource for *Caenorhabditis* biology and genomics. *Nucleic Acids Res*, 33, D383-389.
- Ciche, T. (2007) The biology and genome of *Heterorhabditis bacteriophora*, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.135.1, <http://www.wormbook.org>.
- Ciche, T.A. and Ensign, J.C. (2003) For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Appl Environ Microbiol*, 69, 1890-1897.
- Ciche, T.A. and Sternberg, P.W. (2007) Postembryonic RNAi in *Heterorhabditis bacteriophora*: a nematode insect parasite and host for insect pathogenic symbionts. *BMC Dev Biol*, 7, 101.

Ciche, T.A., Darby, C., Ehlers, R.U., Forst, S., and Goodrich-Blair, H. (2006) Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. *Biol. Control*, 38, no. 1, 22-46.

Caenorhabditis elegans Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 282, 2012-2018.

Dalley, B.K. and Golomb, M. (1992) Gene expression in the *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental regulation of *Hsp90* and other genes. *Dev Biol*, 151, 80-90.

Datu, B.J., Gasser, R.B., Nagaraj, S.H., Ong, E.K., O'Donoghue, P., McInnes, R., Ranganathan, S. and Loukas, A. (2008) Transcriptional changes in the hookworm, *Ancylostoma caninum*, during the transition from a free-living to a parasitic larva. *PLoS Negl Trop Dis*, 2, e130.

Datu, B.J., Loukas, A., Cantacessi, C., O'Donoghue, P. and Gasser, R.B. (2009) Investigation of the regulation of transcriptional changes in *Ancylostoma caninum* larvae following serum activation, with a focus on the insulin-like signalling pathway. *Vet Parasitol*, 159, 139-148.

Dolan, K.M., Jones, J.T. and Burnell, A.M. (2002) Detection of changes occurring during recovery from the dauer stage in *Heterorhabditis bacteriophora*. *Parasitology*, 125, 71-81.

Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., Bocs, S., Boursaux-Eude, C., Chandler, M., Charles, J.F., Dassa, E., Derose, R., Derzelle, S., Freyssinet, G., Gaudriault, S., Medigue, C., Lanois, A., Powell, K., Siguier, P., Vincent, R., Wingate, V., Zouine, M., Glaser, P., Boemare, N., Danchin, A. and Kunst, F. (2003) The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nat Biotechnol*, 21, 1307-1313.

Ehlers, R.U. (2001) Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, 623-633.

Ehlers, R.U., Lunau S., Krasomil-Osterfeld K. and Osterfeld K.H. (1998) Liquid culture of the entomopathogenic nematode bacterium complex *Heterorhabditis megidis*/*Photorhabdus luminescens*. *Bio Control*, 43, 77-86.

Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M. and Ahringer, J. (2000) Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*, 408, 325-330.

Gems, D. and Partridge, L. (2001) Insulin/IGF signalling and ageing: seeing the bigger picture. *Curr Opin Genet Dev*, 11, 287-292.

Genta, R.M. (1992) Dysregulation of *Strongyloidiasis*: a new hypothesis. *Clin Microbiol Rev*, 5, 345-355.

Geuens, E., Hoogewijs, D., Nardini, M., Vinck, E., Pesce, A., Kiger, L., Fago, A., Tilleman, L., De Henau, S., Marden, M.C., Weber, R.E., Van Doorslaer, S., Vanfleteren,

- J., Moens, L., Bolognesi, M. and Dewilde, S. (2010) Globin-like proteins in *Caenorhabditis elegans*: *in vivo* localization, ligand binding and structural properties. BMC Biochem, 11, 17.
- Gilbert, C., Schaack, S., Pace, J.K., 2nd, Brindley, P.J. and Feschotte, C. (2010) A role for host-parasite interactions in the horizontal transfer of transposons across phyla. Nature, 464, 1347-1350.
- Glazer, I. (2002) Survival biology. In Entomopathogenic nematology, Gaugler R. (ed.). CABI Publishing, UK, p. 169-187.
- Golden, J.W. and Riddle, D.L. (1982) A pheromone influences larval development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Science, 218, 578-580.
- Gounaris, K., Thomas, S., Najarro, P. and Selkirk, M.E. (2001) Secreted variant of nucleoside diphosphate kinase from the intracellular parasitic nematode *Trichinella spiralis*. Infect Immun, 69, 3658-3662.
- Greenwald, I. (2005) LIN-12/Notch signaling in *C. elegans*. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.10.1, <http://www.wormbook.org>.
- Grewal, P.S., Ehlers R.U. and Shapiro-Ilan D. (2005) Nematodes as biocontrol agents. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Grishok, A. (2005) RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. FEBS Lett, 579, 5932-5939.
- Hallem, E.A., Rengarajan, M., Ciche, T.A. and Sternberg, P.W. (2007) Nematodes, bacteria, and flies: a tripartite model for nematode parasitism. Curr Biol, 17, 898-904.
- Han, R. and Ehlers, R.U. (2000) Pathogenicity, development, and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic *in vivo* conditions. J Invertebr Pathol, 75, 55-58.
- Hao, Y.J., Montiel, R., Abubucker, S., Mitreva, M. and Simoes, N. (2010) Transcripts analysis of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* induced *in vitro* with insect haemolymph. Mol Biochem Parasitol, 169, 79-86.
- Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science, 295, 1852-1858.
- Hashmi, S., Hashmi, G. and Gaugler, R. (1995) Genetic transformation of an entomopathogenic nematode by microinjection. J Invertebr Pathol, 66, 293-296.
- Hashmi, S., Hashmi, G., Glazer, I. and Gaugler, R. (1998) Thermal response of *Heterorhabditis bacteriophora* transformed with the *Caenorhabditis elegans hsp70* encoding gene. J Exp Zool, 281, 164-170.

Henkle-Duhrsen, K. and Kampkotter, A. (2001) Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol*, 114, 129-142.

Hodgkin, J. (2005) Genetic suppression. *Wormbook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.125.1 <http://www.wormbook.org>.

Holway, A.H., Kim, S.H., La Volpe, A. and Michael, W.M. (2006) Checkpoint silencing during the DNA damage response in *Caenorhabditis elegans* embryos. *J Cell Biol*, 172, 999-1008.

Hoogewijs, D., De Henau, S., Dewilde, S., Moens, L., Couvreur, M., Borgonie, G., Vinogradov, S.N., Roy, S.W. and Vanfleteren, J.R. (2008a) The *Caenorhabditis* globin gene family reveals extensive nematode-specific radiation and diversification. *BMC Evol Biol*, 8, 279.

Hoogewijs, D., Geuens, E., Dewilde, S., Vierstraete, A., Moens, L., Vinogradov, S. and Vanfleteren, J.R. (2007) Wide diversity in structure and expression profiles among members of the *Caenorhabditis elegans* globin protein family. *BMC Genomics*, 8, 356.

Hoogewijs, D., Houthoofd, K., Matthijssens, F., Vandesompele, J. and Vanfleteren, J.R. (2008b) Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in *C. elegans*. *BMC Mol Biol*, 9, 9.

Hu, P.J. (2007) Dauer. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.144.1, <http://www.wormbook.org>.

Huang, C.G., Lamitina, T., Agre, P. and Strange, K. (2007) Functional analysis of the aquaporin gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, C1867-1873.

Jarosz, J. (1996) Ecology of anti-microbials produced by bacterial associates of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Parasitology*, 112 (Pt 6), 545-552.

Jarosz, J. (1998) Active resistance of entomophagous rhabditid *Heterorhabditis bacteriophora* to insect immunity. *Parasitology*, 117 (Pt 3), 201-208.

Jiang, S.S., Lin, T.Y., Wang, W.B., Liu, M.C., Hsueh, P.R. and Liaw, S.J. (2010) Characterization of UDP-glucose dehydrogenase and UDP-glucose pyrophosphorylase mutants of *Proteus mirabilis*: defectiveness in polymyxin B resistance, swarming and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*.

Johnigk, S.A., Ecke, F., Poehling, M. and Ehlers, R.U. (2004) Liquid culture mass production of biocontrol nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida): improved timing of dauer juvenile inoculation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64, 651-658.

Johnigk, S.A., Ehlers, R.U. (1999) Juvenile development and life cycle of *Heterorhabditis bacteriophora* and *H. indica* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematology*, 1, 251-260.

Jones, J.T., Furlanetto, C. and Kikuchi, T. (2005) Horizontal gene transfer from bacteria and fungi as a driving force in the evolution of plant parasitism in nematodes. *Nematology*, 7, pp. 641-646.

Jones, S.J., Riddle, D.L., Pouzyrev, A.T., Velculescu, V.E., Hillier, L., Eddy, S.R., Stricklin, S.L., Baillie, D.L., Waterston, R. and Marra, M.A. (2001) Changes in gene expression associated with developmental arrest and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res*, 11, 1346-1352.

Julie-Anne, F. and Behm, C.A. (2003) Assessing the functions of succinate dehydrogenase and fumarate reductase by RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *International Worm Meeting*: 715.

Kahel-Raifer, H. and Glazer, I. (2000) Environmental factors affecting sexual differentiation in the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *J Exp Zool*, 287, 158-166.

Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D.P., Zipperlen, P. and Ahringer, J. (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, 421, 231-237.

Kamath, R.S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A.G. and Ahringer, J. (2001) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol*, 2, (1).

Kanehisa, M. and Goto, S. (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 28, 27-30.

Kawano, T., Fujita, M. and Sakamoto, H. (2000) Unique and redundant functions of SR proteins, a conserved family of splicing factors, in *Caenorhabditis elegans* development. *Mech Dev*, 95, 67-76.

Kaya, H.K., and Stock, S. P. (1997) Techniques in insect nematology. In Lacey, L.A. (ed.), *Manual of techniques in insect pathology*. CA: Academic Press., San Diego, p. 281-324.

Kaya, H.K. and Gaugler, R. (1993) Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol*, 38, 181-206.

Kiely, P.A., Leahy, M., O'Gorman, D. and O'Connor, R. (2005) RACK1-mediated integration of adhesion and insulin-like growth factor I (IGF-I) signaling and cell migration are defective in cells expressing an IGF-I receptor mutated at tyrosines 1250 and 1251. *J Biol Chem*, 280, 7624-7633.

Kikuta, S., Kiuchi, T., Aoki, F. and Nagata, M. (2009) Recovery of infective juveniles of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* via factors produced by insect cells and symbiotic bacteria. *Nematology*, Vol. 11(4), 611-618.

Kim, S.H. and Michael, W.M. (2008) Regulated proteolysis of DNA polymerase ϵ during the DNA-damage response in *C. elegans*. *Mol Cell*, 32, 757-766.

Kiontke, K. and Fitch, D.H.A. (2005) The Phylogenetic relationships of *Caenorhabditis* and other rhabditids. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.11.1, <http://www.wormbook.org>.

Kipreos, E.T. (2005) Ubiquitin-mediated pathways in *C. elegans*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.36.1, <http://www.wormbook.org>.

Klein, M.G. (1990) Efficacy against soil inhabiting pests. In *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Gaugler, R. & Kaya, H. K. (ed), CRC Press, Boca Raton, Fla. (USA).

Kloor, D. and Osswald, H. (2004) S-Adenosylhomocysteine hydrolase as a target for intracellular adenosine action. *Trends Pharmacol Sci*, 25, 294-297.

Kopacek, P., Weise, C. and Gotz, P. (1995) The prophenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella*: purification and characterization of the proenzyme. *Insect Biochem Mol Biol*, 25, 1081-1091.

Kovaleva, E.S., Masler, E.P., Subbotin, S.A. and Chitwood, D.J. (2005) Molecular Characterization of Aldolase from *Heterodera glycines* and *Globodera rostochiensis*. *J Nematol*, 37, 292-296.

Kranewitter, W.J., Ylanne, J. and Gimona, M. (2001) UNC-87 is an actin-bundling protein. *J Biol Chem*, 276, 6306-6312.

Krause, M., Wild, M., Rosenzweig, B. and Hirsh, D. (1989) Wild-type and mutant actin genes in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol*, 208, 381-392.

Kulkarni, G., Sabnis, N.A. and Harris, B.G. (2004) Cloning, expression, and purification of fumarase from the parasitic nematode *Ascaris suum*. *Protein Expr Purif*, 33, 209-213.

Lemmon, M.A. and Ferguson, K.M. (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J*, 350 Pt 1, 1-18.

Li, X.Y., Cowles, R.S., Cowles, E.A., Gaugler, R. and Cox-Foster, D.L. (2007) Relationship between the successful infection by entomopathogenic nematodes and the host immune response. *Int J Parasitol*, 37, 365-374.

Lin, C.L., Leu, S., Lu, M.C. and Ouyang, P. (2004) Over-expression of SR-cyclophilin, an interaction partner of nuclear pinin, releases SR family splicing factors from nuclear speckles. *Biochem Biophys Res Commun*, 321, 638-647.

Liu, J., Poinar, G.O., Jr. and Berry, R.E. (2000) Control of insect pests with entomopathogenic nematodes: the impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction. *Annu Rev Entomol*, 45, 287-306.

- Liu, T., Zimmerman, K.K. and Patterson, G.I. (2004) Regulation of signaling genes by TGFbeta during entry into dauer diapause in *C. elegans*. *BMC Dev Biol*, 4, 11.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Loukas, A. and Maizels, R.M. (2000) *Helminth* C-type lectins and host-parasite interactions. *Parasitol Today*, 16, 333-339.
- Lundin, V.F., Srayko, M., Hyman, A.A. and Leroux, M.R. (2008) Efficient chaperone-mediated tubulin biogenesis is essential for cell division and cell migration in *C. elegans*. *Dev Biol*, 313, 320-334.
- Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M. and Sugimoto, A. (2001) Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol*, 11, 171-176.
- Maizels, R.M., Tetteh, K.K. and Loukas, A. (2000) *Toxocara canis*: genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. *Int J Parasitol*, 30, 495-508.
- McArdle, K., Allen, T.S. and Bucher, E.A. (1998) Ca²⁺-dependent muscle dysfunction caused by mutation of the *Caenorhabditis elegans* troponin T-1 gene. *J Cell Biol*, 143, 1201-1213.
- McDermott, L., Moore, J., Brass, A., Price, N.C., Kelly, S.M., Cooper, A. and Kennedy, M.W. (2001) Mutagenic and chemical modification of the ABA-1 allergen of the nematode *Ascaris*: consequences for structure and lipid binding properties. *Biochemistry*, 40, 9918-9926.
- McElwee, J.J. (2004) Addressing the age-old question of old age. *Genome Biol*, 5, 337.
- Mende, V.N., Bird, D.M., Albert, P.S. and Riddle, D.L. (1988) *dpy-13*: a nematode collagen gene that affects body shape. *Cell*, 55, 567-576.
- Miller, M.A., Nguyen, V.Q., Lee, M.H., Kosinski, M., Schedl, T., Caprioli, R.M. and Greenstein, D. (2001) A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation. *Science*, 291, 2144-2147.
- Minarik, P., Tomaskova, N., Kollarova, M. and Antalík, M. (2002) Malate dehydrogenases--structure and function. *Gen Physiol Biophys*, 21, 257-265.
- Mitreva, M., McCarter, J.P., Martin, J., Dante, M., Wylie, T., Chiapelli, B., Pape, D., Clifton, S.W., Nutman, T.B. and Waterston, R.H. (2004) Comparative genomics of gene expression in the parasitic and free-living nematodes *Strongyloides stercoralis* and *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res*, 14, 209-220.
- Mizuki, H., Washio S., Morita, T., Itoi, S. and Sugita, H. (2006) Distribution of a fish pathogen *Listonella anguillarum* in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery. *Aquaculture*, 261, 26-32.

- Mori, I. and Ohshima, Y. (1995) Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 376, 344-348.
- Morley, J.F. and Morimoto, R.I. (2004) Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell*, 15, 657-664.
- Moser, J.M., Freitas, T., Arasu, P. and Gibson, G. (2005) Gene expression profiles associated with the transition to parasitism in *Ancylostoma caninum* larvae. *Mol Biochem Parasitol*, 143, 39-48.
- Ofulue, E.N. and Candido, E.P. (1991) Molecular cloning and characterization of the *Caenorhabditis elegans* elongation factor 2 gene (*eft-2*). *DNA Cell Biol*, 10, 603-611.
- Otvos, L.J., O I, Rogers ME, Consolvo PJ, Condie BA, Lovas S, Bulet P, Blaszczyk-Thurin M. (2000) Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry*, 39 (46), 14150–14159.
- Paradis, S. and Ruvkun, G. (1998) *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev*, 12, 2488-2498.
- Park, S.Y., Kim, C.H., Jeong, W.H., Lee, J.H., Seo, S.J., Han, Y.S. and Lee, I.H. (2005) Effects of two hemolymph proteins on humoral defense reactions in the wax moth, *Galleria mellonella*. *Dev Comp Immunol*, 29, 43-51.
- Parkinson, J., Mitreva, M., Whitton, C., Thomson, M., Daub, J., Martin, J., Schmid, R., Hall, N., Barrell, B., Waterston, R.H., McCarter, J.P. and Blaxter, M.L. (2004) A transcriptomic analysis of the phylum Nematoda. *Nat Genet*, 36, 1259-1267.
- Pendarvis, K., Kumar, R., Burgess, S.C. and Nanduri, B. (2009) An automated proteomic data analysis workflow for mass spectrometry. *BMC Bioinformatics*, 10 Suppl 11, S17.
- Piano, F., Schetter, A.J., Morton, D.G., Gunsalus, K.C., Reinke, V., Kim, S.K. and Kempfues, K.J. (2002) Gene clustering based on RNAi phenotypes of ovary-enriched genes in *C. elegans*. *Curr Biol*, 12, 1959-1964.
- Plenefisch, J., Xiao, H., Mei, B., Geng, J., Komuniecki, P.R. and Komuniecki, R. (2000) Secretion of a novel class of iFABPs in nematodes: coordinate use of the *Ascaris/Caenorhabditis* model systems. *Mol Biochem Parasitol*, 105, 223-236.
- Rasmann, S., Kollner, T.G., Degenhardt, J., Hiltbold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Gershenzon, J. and Turlings, T.C. (2005) Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, 434, 732-737.
- Riddle, D.L., Albert, P. S. (1997) *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY.

- Rogalski, T.M., Gilbert, M.M., Devenport, D., Norman, K.R. and Moerman, D.G. (2003) DIM-1, a novel immunoglobulin superfamily protein in *Caenorhabditis elegans*, is necessary for maintaining bodywall muscle integrity. *Genetics*, 163, 905-915.
- Rual, J.F., Ceron, J., Koreth, J., Hao, T., Nicot, A.S., Hirozane-Kishikawa, T., Vandenhaute, J., Orkin, S.H., Hill, D.E., van den Heuvel, S. and Vidal, M. (2004) Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library. *Genome Res*, 14, 2162-2168.
- Rzepecka, J., Rausch, S., Klotz, C., Schnoller, C., Kornprobst, T., Hagen, J., Ignatius, R., Lucius, R. and Hartmann, S. (2009) Calreticulin from the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* is a Th2-skewing protein and interacts with murine scavenger receptor-A. *Mol Immunol*, 46, 1109-1119.
- Sandhu, S.K., Jagdale, G.B., Hogenhout, S.A. and Grewal, P.S. (2006) Comparative analysis of the expressed genome of the infective juvenile entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *Mol Biochem Parasitol*, 145, 239-244.
- Sasano, Y., Hokii, Y., Inoue, K., Sakamoto, H., Ushida, C. and Fujiwara, T. (2008) Distribution of U3 small nucleolar RNA and fibrillarlin during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Biochimie*, 90, 898-907.
- Savage-Dunn, C. (2005) TGF- β signaling. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community. WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.22.1, <http://www.wormbook.org>.
- Saverwyns, H., Visser, A., Van Durme, J., Power, D., Morgado, I., Kennedy, M.W., Knox, D.P., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Gevaert, K., Vercruysse, J., Claerebout, E. and Geldhof, P. (2008) Analysis of the transthyretin-like (TTL) gene family in *Ostertagia ostertagi* - Comparison with other *strongylid* nematodes and *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol*.
- Schackwitz, W.S., Inoue, T. and Thomas, J.H. (1996) Chemosensory neurons function in parallel to mediate a pheromone response in *C. elegans*. *Neuron*, 17, 719-728.
- Schuske, K.R., Richmond, J.E., Matthies, D.S., Davis, W.S., Runz, S., Rube, D.A., van der Bliek, A.M. and Jorgensen, E.M. (2003) Endophilin is required for synaptic vesicle endocytosis by localizing synaptojanin. *Neuron*, 40, 749-762.
- Seeler, J.S. and Dejean, A. (2003) Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 690-699.
- Selvan, S., Gaugler R., and Lewis, E.E. (1993) Biochemical energy reserves of entomopathogenic nematodes. *J. Parasitol*, 79, 167-172.
- Shapiro-Ilan, D.I. and Gaugler, R. (2002) Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 28, 137-146.
- Smant, G., Stokkermans, J.P., Yan, Y., de Boer, J.M., Baum, T.J., Wang, X., Hussey, R.S., Gommers, F.J., Henrissat, B., Davis, E.L., Helder, J., Schots, A. and Bakker, J. (1998) Endogenous cellulases in animals: isolation of beta-1, 4-endoglucanase genes

from two species of plant-parasitic cyst nematodes. Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 4906-4911.

Sommerville, R.I., Davey, K.G. (2002) Diapause in parasitic nematodes: a review. Can. J. Zool., 80, 1817–1840.

Strauch, O. and Ehlers R.U. (1998) Food signal production of *Photorhabdus luminescens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. in liquid culture. Appl Microbiol Biotechnol, 50, 369-374.

Tabuse, Y., Nabetani, T. and Tsugita, A. (2005) Proteomic analysis of protein expression profiles during *Caenorhabditis elegans* development using two-dimensional difference gel electrophoresis. Proteomics, 5, 2876-2891.

Takahashi, M., Iwasaki, H., Inoue, H. and Takahashi, K. (2002) Reverse genetic analysis of the *Caenorhabditis elegans* 26S proteasome subunits by RNA interference. Biol Chem, 383, 1263-1266.

Tatulian, S.A. (2001) Toward understanding interfacial activation of secretory phospholipase A2 (PLA2): membrane surface properties and membrane-induced structural changes in the enzyme contribute synergistically to PLA2 activation. Biophys J, 80, 789-800.

Tissenbaum, H.A., Hawdon, J., Perregaux, M., Hotez, P., Guarente, L. and Ruvkun, G. (2000) A common muscarinic pathway for diapause recovery in the distantly related nematode species *Caenorhabditis elegans* and *Ancylostoma caninum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 460-465.

Tsang, W.Y., Sayles, L.C., Grad, L.I., Pilgrim, D.B. and Lemire, B.D. (2001) Mitochondrial respiratory chain deficiency in *Caenorhabditis elegans* results in developmental arrest and increased life span. J Biol Chem, 276, 32240-32246.

van Haften, G., Romeijn, R., Pothof, J., Koole, W., Mullenders, L.H., Pastink, A., Plasterk, R.H. and Tijsterman, M. (2006) Identification of conserved pathways of DNA-damage response and radiation protection by genome-wide RNAi. Curr Biol, 16, 1344-1350.

Van Montfort, R., Slingsby, C. and Vierling, E. (2001) Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. Adv Protein Chem, 59, 105-156.

Vinogradov, S.N. and Moens, L. (2008) Diversity of globin function: enzymatic, transport, storage, and sensing. J Biol Chem, 283, 8773-8777.

Vlahou, G. and Rivero, F. (2006) Rho GTPase signaling in *Dictyostelium discoideum*: insights from the genome. Eur J Cell Biol, 85, 947-959.

Wang, J. and Kim, S.K. (2003) Global analysis of dauer gene expression in *Caenorhabditis elegans*. Development, 130, 1621-1634.

Wang, P., Lou, P.J., Leu, S. and Ouyang, P. (2002) Modulation of alternative pre-mRNA splicing in vivo by *pinin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 294, 448-455.

Wickramasinghe, S., Uda, K., Nagataki, M., Yatawara, L., Rajapakse, R.P., Watanabe, Y., Suzuki, T. and Agatsuma, T. (2007) *Toxocara canis*: molecular cloning, characterization, expression and comparison of the kinetics of cDNA-derived arginine kinase. *Exp Parasitol*, 117, 124-132.

Williams, M., Lyu, M.S., Yang, Y.L., Lin, E.P., Dunbrack, R., Birren, B., Cunningham, J. and Hunter, K. (1999) *Ier5*, a novel member of the slow-kinetics immediate-early genes. *Genomics*, 55, 327-334.

Williamson, A.L., Brindley, P.J., Abbenante, G., Datu, B.J., Prociv, P., Berry, C., Girdwood, K., Pritchard, D.I., Fairlie, D.P., Hotez, P.J., Zhan, B. and Loukas, A. (2003) Hookworm aspartic protease, Na-APR-2, cleaves human hemoglobin and serum proteins in a host-specific fashion. *J Infect Dis*, 187, 484-494.

Williamson, V.M. and Hussey, R.S. (1996) Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell*, 8, 1735-1745.

Winder, S.J. and Walsh, M.P. (1993) Calponin: thin filament-linked regulation of smooth muscle contraction. *Cell Signal*, 5, 677-686.

Winter, A.D., McCormack, G. and Page, A.P. (2007) Protein disulfide isomerase activity is essential for viability and extracellular matrix formation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 308, 449-461.

Yan, Q. and Lennarz, W.J. (1999) Oligosaccharyltransferase: a complex multisubunit enzyme of the endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun*, 266, 684-689.

Yoneda, T., Benedetti, C., Urano, F., Clark, S.G., Harding, H.P. and Ron, D. (2004) Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *J Cell Sci*, 117, 4055-4066.

Zioni Cohen-Nissan, S., Glazer, I. and Segal, D. (1992) Life Cycle and Reproductive Potential of the Nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Strain HP88. *J Nematol*, 24, 352-358.

6. נספחים

6.1 תמיסות ומצעים:

מצע LP (Lipid agar)

(Difco) 2.5% w/v Nutrient agar

(Difco) 0.5% w/v Yeast extract

(Karo) 1% v/v תירס

(Oleum Jecoris) 0.5% v/v Cod liver oil

(Merck) 0.2% w/v MgCl₂

מצע LB

(Difco) 1% w/v Bacto-tryptone

(Difco) 0.5% w/v Yeast extract

(Merck) 0.5% w/v NaCl

1.5% w/v מצע מוצק הוסף

אגר (Difco)

מצע PP3

(Difco) 2% w/v Proteose Peptone # 3

מצע NA+ cholesterol

(Difco) 1.5% w/v Nutrient agar

(Merck) 10 mg/ml cholesterol

מצע NGM

(Merck) 0.3% w/v NaCl₂

(Difco) 0.25% w/v peptone

(Difco) 1.7% w/v agar

לאחר סטריליזציה הוספו:

(Merck) 0.1% v/v 1M CaCl₂

(Merck) 0.1% v/v 1M MgSO₄

(Merck) 2.5% v/v 1M K₂HPO₄

0.1% of 5mg/ml Cholesterol

(Merck) (in 100% ethanol)

מצע אגר מים

(Difco) 1.5% w/v agar

1.5% w/v מצע מוצק הוסף

אגר (Difco)

בופר מיצוי לחלבונים

0.1M Tris HCl (pH 8.0)

0.5% w/v Sucrose

2% v/v SDS

50mM DTT

2mM PMSF

40μl complete inhibitor

(Roche Diagnostics, מנהיים, גרמניה)

טבלייה אחת של complete inhibitor

cocktail tablet הומסה ב-1 מ"ל של מים.

Phosphate-buffered saline (PBS)

(Merck) 137.9 mM NaCl

(Merck) 2.7 mM KCl

(Merck) 8.1 mM Na₂HPO₄

(Merck) 1.5 mM KH₂PO₄

Ringer solution

(Merck) 100 mM NaCl

(Merck) 1.8 mM KCl

(Merck) 2 mM CaCl₂

(Merck) 1 mM MgCl₂

(Merck) 5 mM HEPES buffer pH 6

(Merck) 1.5 mM KH₂PO₄

-Saline תמיסה פיזיולוגית

(Merck) 0.08% w/v NaCl

6.2 רשימת פריימרים

6.2.1 פריימרים לבידוד הגנים *dpy-13* ו-*unc-22* מ-*C. elegans* ומ-*H. bacteriophora*

Primer	Sequence
<i>dpy-13F</i>	5' CCAGGACCAGTCGGACCACCAGGA 3'
<i>dpy-13R</i>	5' GCGAGTTCCGTCCTCGAAGAAGATT 3'
<i>unc-22F</i>	5' TTCGATCGTGCTGATAAGCCAGGAAC 3'
<i>unc-22R</i>	5' GCAAGATGACGTGGCTTAGCAACCAT 3'
<i>unc-22F2</i>	5' ATGCACCAACTGATGTTACCCAGT 3'
<i>unc-22R2</i>	5' ACTCCAGTATCTCCACGAACAGC 3'

6.2.2 פריימרים פנימיים לבידוד ואימות הגנים *dpy-13* ו-*unc-22* מהנמשדות *C. elegans* ו-*H. bacteriophora*

H. bacteriophora

Primer	Sequence
<i>dpy-13NF</i>	5' CAGGACAGCCAGGATCTGACG 3'
<i>dpy-13NR</i>	5' TGGACAGATTCCACGCTCTCC 3'
<i>unc-22NF</i>	5' CGGATCCATTGGAGGCTCGTG 3'
<i>unc-22NR</i>	5' GGAGTCGATTCTCCAGCCTTG 3'
<i>unc-22NF</i>	5' AGACTGGGTTGAGTGTGCACG 3'
<i>unc-22NR</i>	5' GTGGTCCTTCTGGAGTTCCTG 3'

6.2.3 פריימרים ל-Real Time qPCR

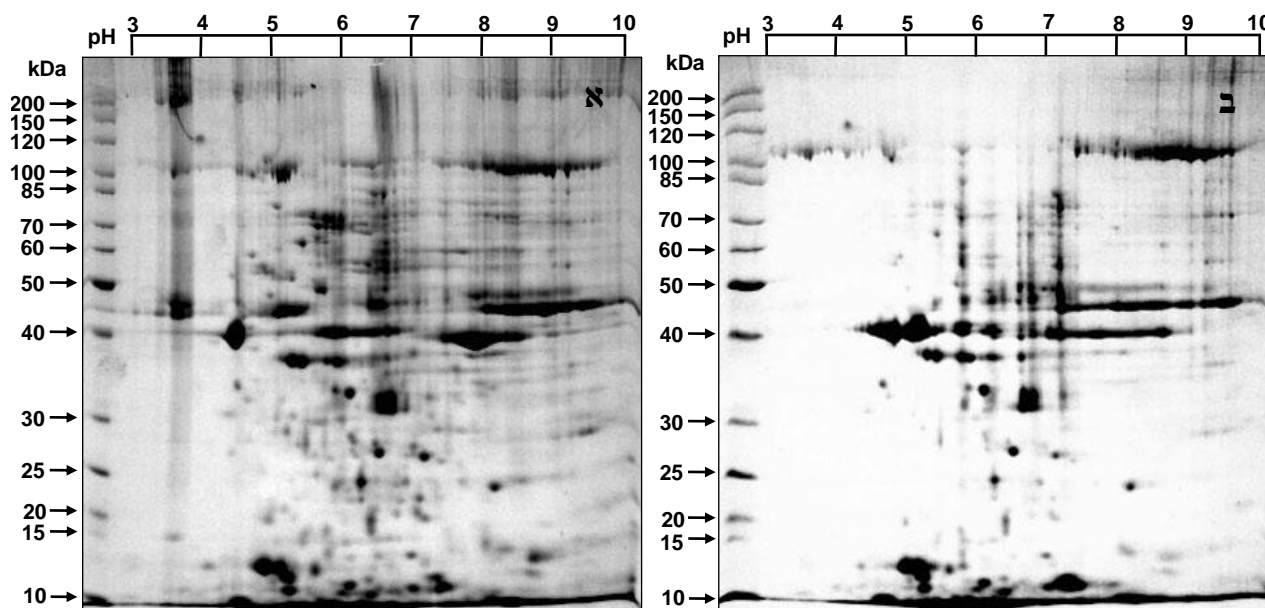
Primer	Sequence
<i>akt-1.29F</i>	5' GTTCAAACAGCAAATCGCC 3'
<i>akt-1.130R</i>	5' AAGCCTTCTTTGGAGAGGTGAA 3'
<i>aqp-7.32F</i>	5' TGGA ACTAAAGCAACTGCATTGTG 3'
<i>aqp-7.132R</i>	5' CAAGAAGAGCAGTTCCAGCTACCT 3'
<i>ier-5.384F</i>	5' TCCGGTGAACCACTTGCTTT 3'
<i>ier-5.485R</i>	5' CGTTTGCGGTCAGCAAGAC 3'
<i>rpl-19.59F</i>	5' CTCGTAGAAAGGGTCGCCAC 3'
<i>rpl-19.159R</i>	5' GAGTACGCGCACACGTCTCA 3'

<i>rsp-1.22F</i>	5' ACAGGTCGCGTCGTTCTTCT 3'
<i>rsp-1.122R</i>	5' CTCAATGTCCCTTTCTGATGCA 3'
<i>sarb-14.64F</i>	5' GGCCGAGGTACAAAGCGTTA 3'
<i>sarb-14.164R</i>	5' CGCAGCTTGTATAGCTTGCACT 3'
<i>sdha.603F</i>	5' TCTGTTCATGGTGCGAATCG 3'
<i>sdha.703R</i>	5' CCTGGTTTTGTGCCCTTCAG 3'
<i>tnt-2.376F</i>	5' AGGCTAAACGTGCCTTTTTTGG 3'
<i>tnt-2.476R</i>	5' GCGGGAATGCAGTTGCTTTAT 3'
<i>s-ahch.712F</i>	5' TTGGCGTAATCATGGTCATAGC 3'
<i>s-ahch.812R</i>	5' CCCCAGGCTTTACACTTTATGC 3'
<i>amp-1.37F</i>	5' GTGGACTACGGGTGCGGTAT 3'
<i>amp-1.137R</i>	5' TCTCAGCTGGTAATCCCCATTC 3'
<i>ctt-5.266F</i>	5' ATTTGCTGGAACCAATGACATG 3'
<i>ctt-5.366R</i>	5' AAATCATCCGCCCAACCC 3'
<i>gei-17.99F</i>	5' ATCATTGTTTTACCGAGCGGA 3'
<i>gei-17.199R</i>	5' CCGGCAATTCTTGTGATTGC 3'
<i>ipp-5.16F</i>	5' CCGGGCAGGTGTTTGAGATAG 3'
<i>ipp-5.116R</i>	5' TCCTGCTCAAACAATGATCCG 3'
<i>lbp-1.624F</i>	5' GAGCCGGAATCATAAAGGGTAA 3'
<i>lbp-1.724R</i>	5' CACGTTTCCGGACTGGAAAG 3'
<i>pdi-2.470F</i>	5' AATGAAAAGGCAGCCAAGGA 3'
<i>pdi-2.570R</i>	5' AACAACAGGCCGCCAACA 3'
Tapt.239F	5' GCGCAATATGATGGCTGTAAAC 3'
Tapt.339R	5' TTAGCCAGTCCCCCAAAAAT 3'
C15C8.7.357F	5' CGAGGTGTCGCACGTATCTTC 3'
C15C8.7.457R	5' CAGCGTCCTGCAGTTGATCA 3'
F01F1.113F	5' TTCCTACAAGTTGCAAGGTCTGAT 3'
F01F1.213R	5' ATTTGTTTTGGAGGAAGTGAAGAT 3'
PH-d.396F	5' ATATCCAAGGCCTACAAGCGAA 3'
PH-d.496R	5' CCCCGTAACCACCACCTCTA 3'
ITM.28F	5' GAAGAATTTGGATGCCGTTCA 3'
ITM.128R	5' TGACGACACCGGATGCAAC 3'

M-16.211F	5' TTATGGACCGACCCCCTACA 3'
M-16.311R	5' CCCGGGCAGGTACATCATT 3'
RhoGap.43F	5' CTCACCGGACTCTTTTGGAACT 3'
RhoGap.143R	5' TGA CTTGCCGTCCATCATGA 3'
<i>ttl-15.101F</i>	5' ACGGTGGAGTTATGGAAAAAGG 3'
<i>ttl-15.201R</i>	5' TCCTCCCCTCCCGAAATAGTA 3'
F35C11.295F	5' CTAAAATGAATCCCTGTTGCC 3'
F35C11.395R	5' TTACACGCAA ACTACATTCGCA 3'
<i>glb-1.227F</i>	5' GTCCCATGCCGTTTTCTGAGTA 3'
<i>glb-1.327R</i>	5' TTAAAATGGAACCCGCTCTTTG 3'
<i>glycop.86F</i>	5' GGAAGATCAGAGTCGCCCTGTT 3'
<i>glycop.186R</i>	5' CAACTCGCGGACGCTTAGAA 3'
<i>pinin.718F</i>	5' ACGAGCCGGAAGCATAAAGTG 3'
<i>pinin.818R</i>	5' GGTTTCCCGACTGGAAAGC 3'
Rnu3ip2.722F	5' CTTTCCAGTCGGGAAACCTGT 3'
Rnu3ip2.822R	5' GAGCGAGGAAGCGGAAGAG 3'
18SrRNA.490F	5' GCGTATCGATGAAAAACGCAG 3'
18SrRNA.590R	5' AAGGGAAAACCCAACGGC 3'

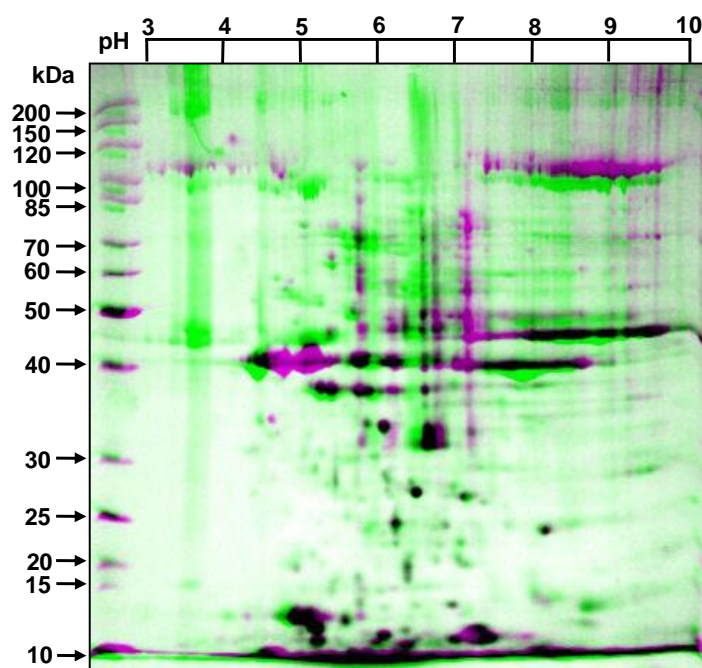
Recovery-ה-2D protein gels של חלבונים מזחלים אינפקטיביים בתהליך

תמונה מספר 18: ג'ל חלבונים מס' II שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות עם ובלי המולימפה.



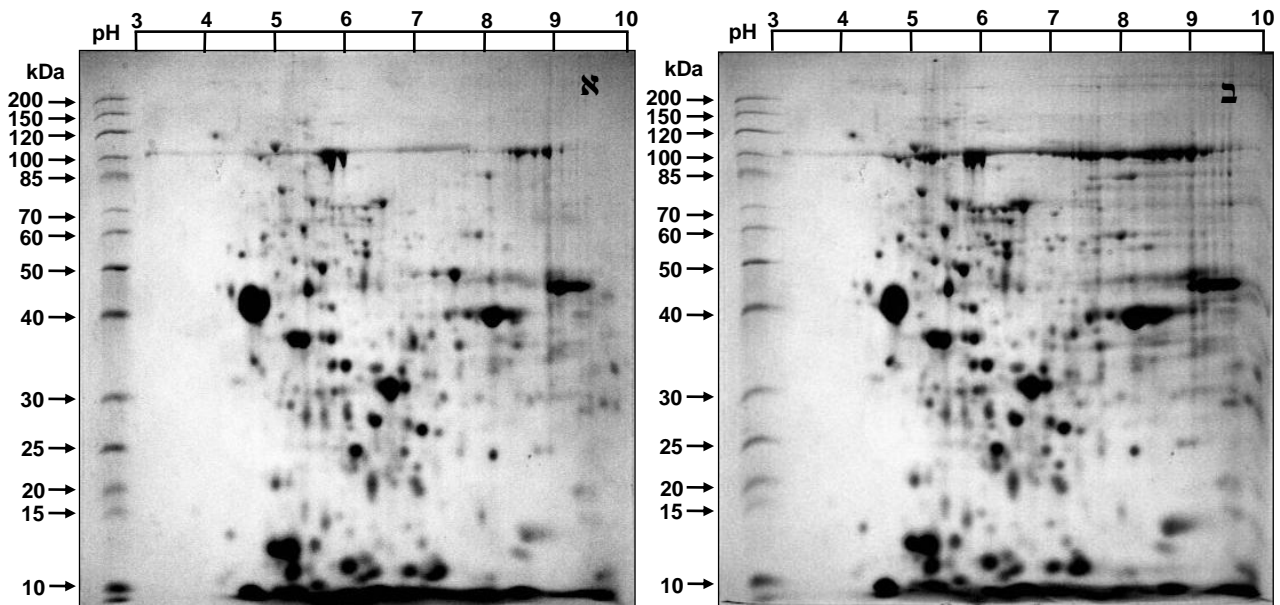
תמונה מס' 18: א. חלבונים שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות - ביקורת ב. חלבונים שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה - טיפול.

תמונה מספר 19: אנליזה של ג'ל חלבונים מס' II שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות עם ובלי המולימפה.



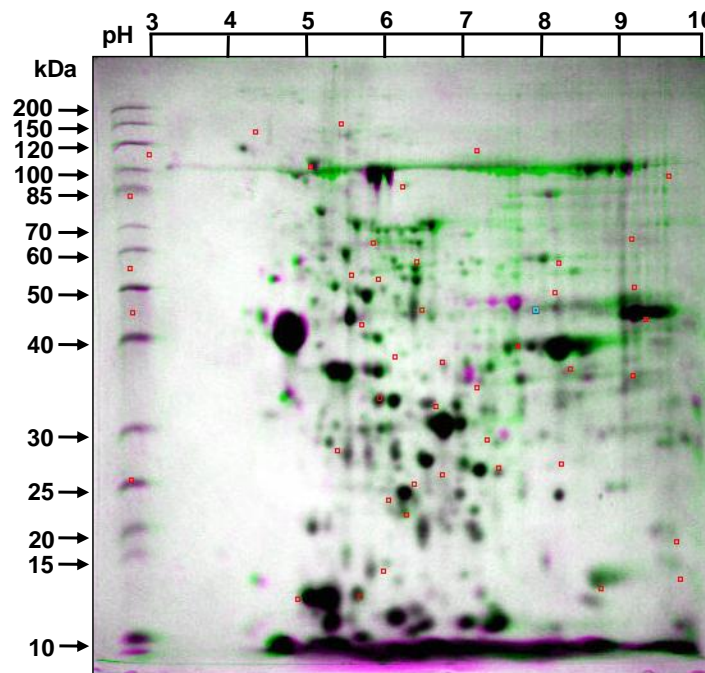
תמונה מס' 19: א. אנליזה כאשר שני הגלים מונחים האחד על השני, הגל הצבוע בירוק הוא ג'ל הביקורת והגל הצבוע בורוד הוא הטיפול, האזורים הצבועים בורוד הם חלבונים המופיעים רק בג'ל הטיפול ואזורים הצבועים בירוק הם חלבונים המופיעים בביקורת.

תמונה מספר 20: ג'ל חלבונים מס' III שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות עם ובלי המולימפה.



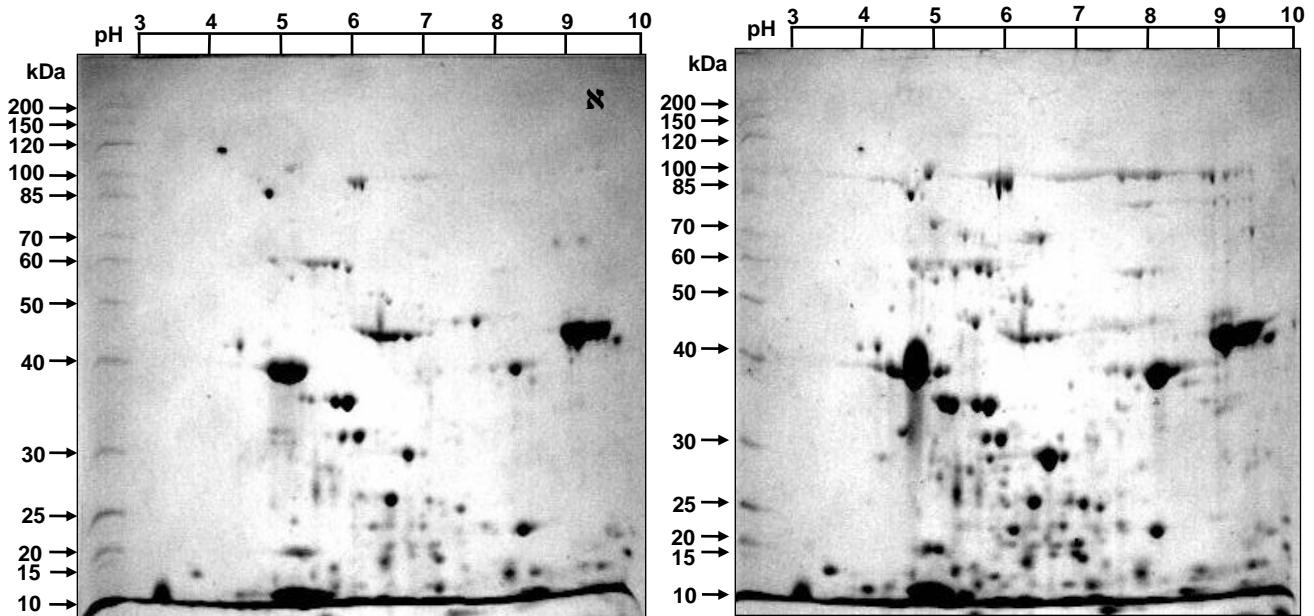
תמונה מס' 20: א. חלבונים שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות - ביקורת. ב. חלבונים שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה - טיפול.

תמונה מספר 21: אנליזה של ג'ל חלבונים מס' III שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות עם ובלי המולימפה.



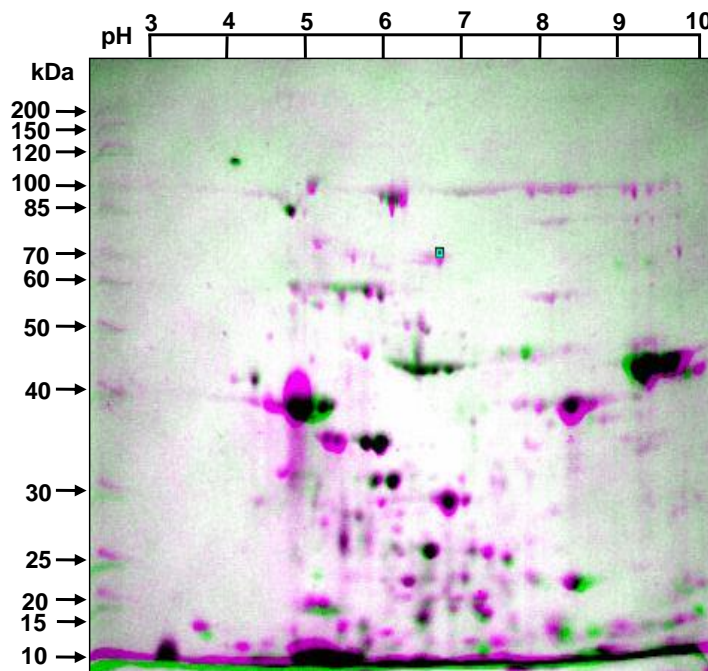
תמונה מס' 21: א. אנליזה כאשר שני הגלים מונחים האחד על השני, הגל הצבוע בירוק הוא ג'ל הביקורת והגל הצבוע בורוד הוא הטיפול, האזורים הצבועים בורוד הם חלבונים המופיעים רק בג'ל הטיפול ואזורים הצבועים בירוק הם חלבונים המופיעים רק בביקורת.

תמונה מספר 22: אנליזה של ג'ל חלבונים מס' IV שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות עם ובלי המולימפה.



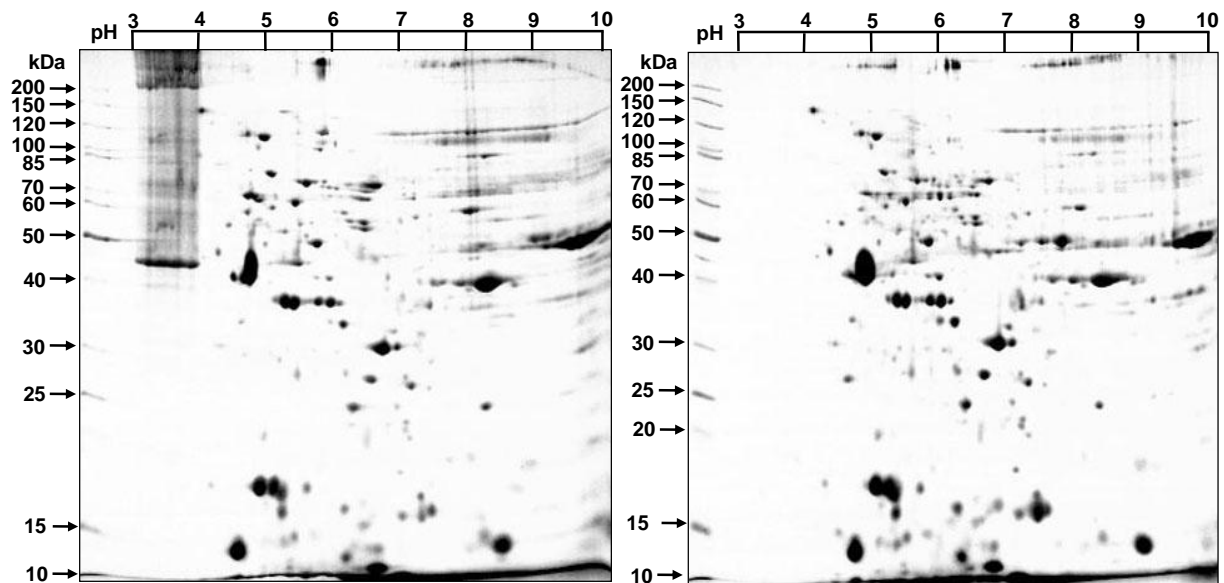
תמונה מס' 22: א. חלבונים שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות - ביקורת ב. חלבונים שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות חשיפה להמולימפה - טיפול.

תמונה מספר 23: אנליזה של ג'ל חלבונים מס' IV שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שלוש שעות עם ובלי המולימפה.



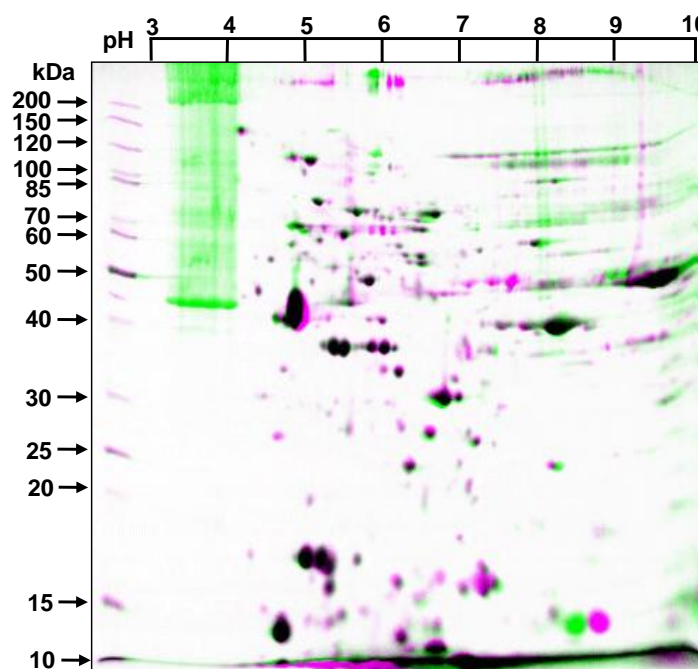
תמונה מס' 23: א. אנליזה כאשר שני הגלים מונחים האחד על השני, הג'ל הצבוע בירוק הוא ג'ל הביקורת והג'ל הצבוע בורוד הוא הטיפול, האזורים הצבועים בורוד הם חלבונים המופיעים רק בג'ל הטיפול ואזורים הצבועים בירוק הם חלבונים המופיעים רק בביקורת.

תמונה מספר 24: ג'ל חלבונים מס' II שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות עם ובלי המולימפה.



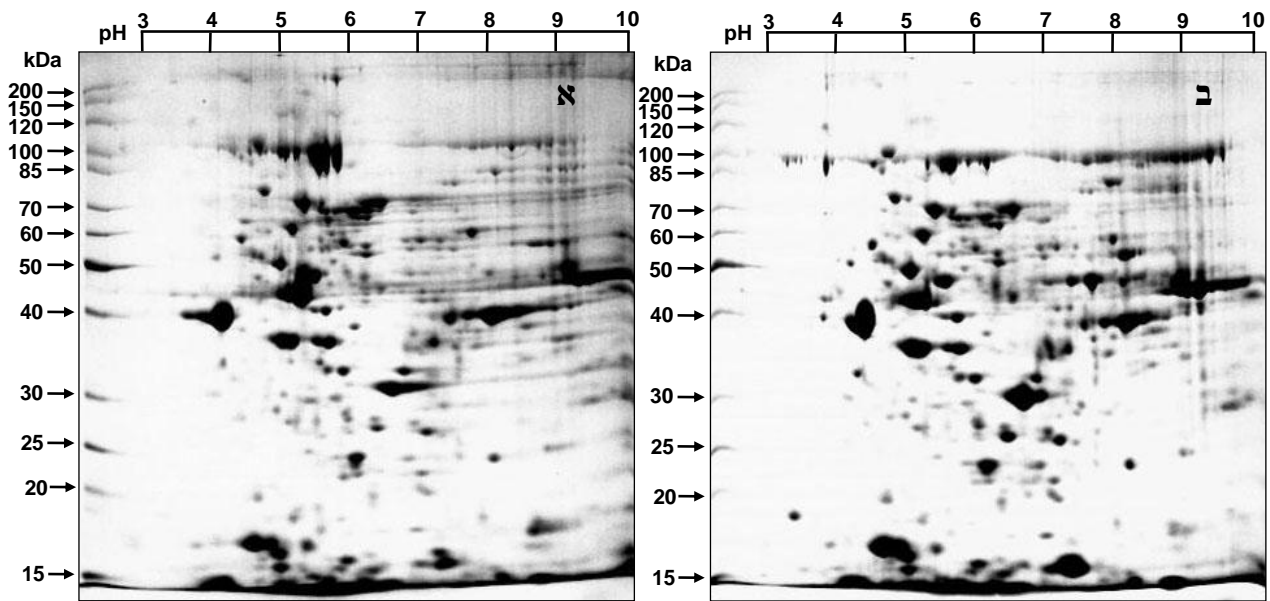
תמונה מס' 24: א. חלבונים שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות - ביקורת ב. חלבונים שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה - טיפול.

תמונה מספר 25: אנליזה של ג'ל חלבונים מס' II שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות עם ובלי המולימפה.



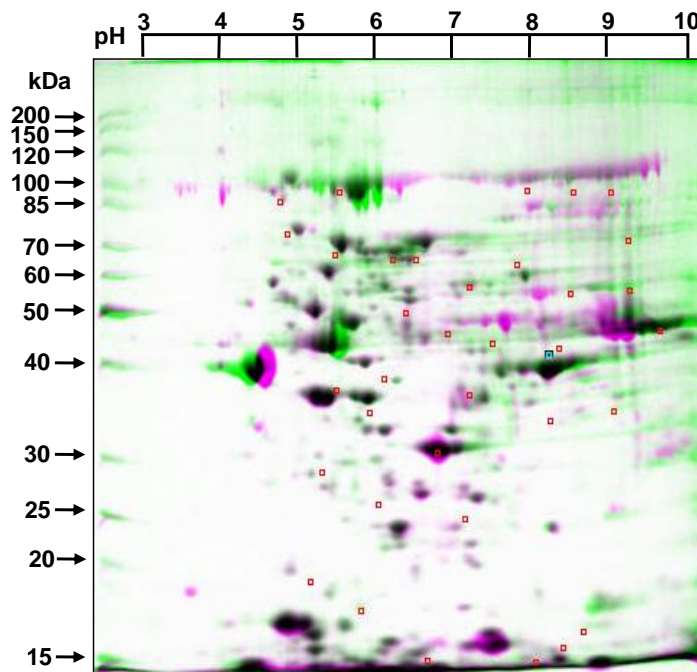
תמונה מס' 25: אנליזה כאשר שני הגלים מונחים האחד על השני, הגל הצבוע בירוק הוא גל הביקורת והגל הצבוע בורוד הוא הטיפול, האזורים הצבועים בורוד הם חלבונים המופיעים רק בגל הטיפול ואזורים הצבועים בירוק הם חלבונים המופיעים רק בביקורת.

תמונה מספר 26: ג'ל חלבונים מס' III שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות עם ובלי המולימפה.



תמונה מס' 26: א. חלבונים שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות - ביקורת ב. חלבונים שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות חשיפה להמולימפה - טיפול.

תמונה מספר 27: אנליזה של ג'ל חלבונים מס' III שהופקו מזחלים אינפקטיביים לאחר שש שעות עם ובלי המולימפה.



תמונה מס' 27: אנליזה כאשר שני הגלים מונחים האחד על השני, הגל הצבוע בירוק הוא ג'ל הביקורת והגל הצבוע בורוד הוא הטיפול, האזורים הצבועים בורוד הם חלבונים המופיעים רק בג'ל הטיפול ואזורים הצבועים בירוק הם חלבונים המופיעים רק בביקורת.

3.8	Silencing of <i>dpy-13</i> in <i>H. bacteriophora</i>	47
3.9	Silencing of 23 genes in <i>H. bacteriophora</i> by RNAi.....	47
3.9.1	RNAi phenotypes in <i>H. bacteriophora</i>	48
3.9.2	Recovery bioassay post RNAi in <i>H. bacteriophora</i>	53
3.9.3	Genes transcription levels post RNAi by Real Time qPCR	55
3.10	Proteins expression in the Recovery process	57
3.10.1	Proteins identification by LC/MS/MS	60
3.10.2	Proteins that expressed in infective juveniles 3 hours post hemolymph exposure	61
3.10.3	Identification of proteins that expressed 6 hours post hemolymph exposure	65
3.10.4	Proteins that expressed 6 hours post hemolymph exposure.....	66
4.	Discussion	
4.1	Recovery induction	68
4.2	Transcriptomic changes during the Recovery.....	70
4.3	Essential genes for Recovery	74
4.4	Protein expression during Recovery	80
4.5	Recovery and evolution	81
5.5	Summary	84
5.	References	87
6.	Appendix	
6.1	mediums and solutions.....	1
6.2	primers list	2
6.3	2D proteins gels	5
7.	English table of contents.....	VII
8.	English abstract	IV

Table of contents

Hebrew abstract	I
1. Introduction	
1.1 Entomopathogenic nematodes	1
1.2 Life cycle and biology of <i>H. bacteriophora</i>	1
1.2.1 The infective juvenile	2
1.3 Nematodes and symbiotic bacteria interactions.....	2
1.4 The nematode and bacteria pathogenicity.....	5
1.5 Entomopathogenic nematodes for biological control	6
1.6 What is Recovery?	7
1.6.1 Induction of Recovery in different parasite nematodes	8
1.6.2 Recovery characterizes the host-parasite interaction.....	9
1.6.3 Recovery in <i>H. bacteriophora</i>	10
1.6.4 Recovery in <i>C. elegans</i>	11
1.7 Molecular signaling pathways regulating dauer arrest and Recovery	12
1.7.1 Guanylyl cyclase pathway	12
1.7.2 TGF β -like pathway	12
1.7.3 Insulin-like pathway.....	13
1.7.4 Steroid hormone pathway	15
1.8 Research goals.....	16
2. Materials and methods	
2.1 Nematodes and growth methods.....	17
2.2 Hemolymph preparation for Recovery bioassay.....	18
2.3 Recovery bioassay in <i>H. bacteriophora</i>	18
2.4 RNA isolation	18
2.5 Suppression subtractive hybridization libraires	19
2.6 ESTs sequencing and bioinformatics analysis	19
2.7 Real time quantitative PCR.....	19
2.8 Isolation of the genes <i>unc-22</i> and <i>dpy-13</i> from <i>C. elegans</i> and <i>H. bacteriophora</i>	20
2.10 Preparing dsRNAi by <i>In vitro</i> transcription	21
2.11 Silencing genes by RNAi (RNA mediated interference).....	22
2.12 Recovery bioassay for silenced gene nematodes	23
2.13 Proteins extraction from infective juveniles	23
2.14 Tow-dimensional gel electrophoresis and identification of proteins by LC/MS/MS	23
3. Results	
3.1 Recovery bioassay	25
3.2 Suppression subtractive libraries	28
3.2.1 ESTs analysis	28
3.3 ESTs annotation	29
3.4 Gene selection for father analysis	41
3.5 Selected genes.....	42
3.6 Expression profile of the selected genes by Real Time qPCR.....	45
3.7 Isolating <i>dpy-13</i> and <i>unc-22</i> from <i>C. elegans</i> and <i>H. bacteriophora</i>	46

Abstract

Nematodes of the genus *Heterorhabditis* are insect parasites that are widely used as biological control agents. In *Heterorhabditis bacteriophora* the third juvenile stage which is well adapted to long-term survival in the soil and is developmentally arrested is the infective stage. When the infective juvenile (IJ) infects a suitable host, it recovers from the developmental arrest and resumes growth and development. This process is called Recovery. The Recovery characterizes the parasite-host interaction since it occurs in response to factors in the host hemolymph. Recovery of entomopathogenic nematodes is also a very important process from a commercial point of view. Understanding the molecular mechanism of the Recovery process will promote knowledge of different mechanisms of host-parasitic interaction in parasitic nematodes, as well as improve the Recovery *in-vitro* and thus the production efficiency of these nematodes. The aims of this study were to identify and isolate genes involved in the Recovery process in *H. bacteriophora*, characterize their expression profile, perform functional tests by RNAi and identify proteins that are expressed during this process.

For this purpose, a large scale bioassay for Recovery was established. Based on the bioassay, two subtraction libraries of recovered IJs subtracted by arrested IJs were constructed, three and six hours post host hemolymph exposure. Six hundred expressed sequence tags (ESTs) were sequenced and annotated resulting in three hundred useful ESTs that were blasted against protein data bases. Of them some had significant similarities to genes of eukaryotic organisms, some to genes of parasite nematodes and some to the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* genes. The ESTs were categorized into functional categories according to gene ontology. Genes of several functional groups were identified. Classification of the genes to metabolic pathways revealed that most of the genes belonged to metabolism pathways in recovering IJs as opposed to developmentally arrested IJs.

From the genes of the subtraction libraries, twenty three genes were chosen for further analysis. These genes were examined for their expression in the Recovery process by Real Time quantitative (q) PCR. The results of the RT-qPCR supported the results obtained from the subtraction libraries. Further analysis to these genes was done by RNAi-based functional analysis in *H. bacteriophora*. Twenty three genes were silenced by dsRNAi. The nematodes that had reduced expression of the genes showed different phenotypes such as: larval arrest, embryo death, sterile offspring and etc.

Bioassay for Recovery of IJs containing the silenced gene was performed in the RNAi-treated nematodes. Eight genes were found to reduce the rate of Recovery dramatically when silenced in IJs compared to non-treated IJs, in *H. bacteriophora*. Thus, these genes are suggested to be critical for the Recovery process. Only little is known on the essentiality of those genes to the recovery process in entomopathogenic nematodes wasn't known prior to this study. The genes include *akt-1*, which encodes an ortholog of the serine/threonine kinase; *glb-1*, which encodes an intracellular globin; *itm-1* which encodes an integral transmembrane protein; *gei-17* (GEX Interacting protein) which encodes a E3-SUMO ligase; *tll-15* transthyretin-like protein which encodes an unknown protein; *tnt-2* which encodes a TropoNin T; *ahcy-1* which encodes the enzyme S-adenosylhomocysteine hydrolase and *pinin* (pnn) which encodes to SR-like protein. Furthermore two of the genes are associated with insulin/IGFI pathway, which is known to regulate dauer formation in *C. elegans*. The other six gene relation to Recovery is not clear and should be further studied.

Proteins expressed in IJs during the Recovery process were examined by 2D protein gels, three and six hours post IJs hemolymph exposure. The results showed differences in protein expression between IJs undergoing Recovery versus developmentally arrested IJs. The most prominent proteins expressed in recovering IJs were sent to identification by LC/MS/MS. We identified few proteins that are known to be involved in the Recovery process in *C. elegans*, and some proteins that are known to be involved in the host-parasite interaction in parasitic nematodes. We also observed that some of proteins identified found to be represented by genes in the subtraction libraries. Furthermore our results suggest that during the Recovery there is significant increase in the number of expressed heat shock proteins. Those proteins are known to be expressed in response to stress conditions including those caused by host in parasite, in different parasitic nematodes

In this work we showed eight genes that are essential for the Recovery process in *H. bacteriophora*. Those genes can be divided into two groups; the first group includes genes that are known to be involved in the signaling pathways of Recovery in *C. elegans*. Those genes support the assumption that there is a common pathway, regulating entry or exit into the dauer stage in free-living nematodes and the infective juvenile stage in parasitic nematodes. This resemblance between free-living and parasitic nematode is very surprising due to the differences in the way of life; in parasitic nematodes the IJ identify the host, actively entering his body; it evades the host immune

system and as a result of this interaction with the host the Recovery process starts. In the free-living nematode the signal for Recovery are different and includes changes in pheromone levels, increase in food availability and decrease in temperature.

In the second group there are genes that affect the Recovery process and are not known to be involved in the Recovery process in *C. elegans*. Some of these genes have higher similarity to genes from parasite nematodes as *Brugia malayi* - human parasite nematode. Those genes support the assumption that in addition to the Recovery regulatory pathways that found in free-living nematodes there is a unique pathway regulating Recovery in parasite nematodes.

Based on this research I assume that there are pathways regulating the Recovery process that are activated as a response to food signal, which are common to the free-living nematode *C. elegans* and the entomopathogenic nematode *H. bacteriophora*, however there is a different pathway that is unique to parasite nematodes which is activated in response to host signals and isn't found in *C. elegans*. It is likely that these pathways are overlaps in some parts but the signal that activates them is different.

The findings of the current work may also help in finding ways to prevent Recovery of harmful plants and animal's parasitic nematodes. Possible approaches are silencing of essential genes inducing the process or development of substances /drugs that prevent the activity of these vital genes to the Recovery process in parasitic nematodes.

This work was carried out under the supervision of

Prof. Itamar Glazer

Dr. Hinanit Koltai

Host-parasitic interaction: transcriptome and proteome
analyses of the Recovery process in entomopathogenic
nematode *Heterorhabditis bacteriophora*

Thesis submitted for the degree of
“Doctor of Philosophy”
by
Anat Moshayov

Submitted to the Senate of the Hebrew University

November 2010

Host-parasitic interaction: transcriptome and proteome
analyses of the Recovery process in entomopathogenic
nematode *Heterorhabditis bacteriophora*

Thesis submitted for the degree of
“Doctor of Philosophy”

by

Anat Moshayov

Submitted to the Senate of the Hebrew University

November 2010