

72332 – מבוא לביולוגיה מולקולרית

פרק 1 - מבוא + PCR + ריצוף HT + Microarrays עם' 8-2

פרק 2 - מקרומולקולות עם' 9-14

פרק 3 - שעתוק (+ תרגול 3) עם' 15-25

פרק 4 - בקרה של שעתוק (+ תרגול 4) עם' 26-40

פרק 5 - תרגום עם' 41-54

פרק 6 - עיבוד RNA עם' 55-63

פרק 7 - RNA based regulation עם' 64-79

פרק 8 - סרטן עם' 80-88

פרק 9 - Mass spectrometry עם' 89-97

פרק 10 - מטבולומיקה עם' 98-105

פרק 11 - Tools and database עם' 105-113

פרק 12 - ברומטין ואפיגנטיקה עם' 114-123

פרק 13 - הנדסה טרנסגנרטית עם' 124

מבוא + PCR + ריצוף HT Microarrays**DNA ו-RNA - חזרה**

ביולוגיה מולקולרית – תאום מרכיבים ממולקולות רבות. ביולוגיה מולקולרית ננסה להבין, לאפיין ולמדוד איך תאים מגיבים בrama המולקולרית.

מבנה הנוקלאוטידים

1. סוכר: ריבוז – OH בעמדה 2, דיאוקסיריבוז – H בעמדה 2.
 2. בסיסים חנקניים: פורינים (A, G, שני טבעות) או פירמידינים (C, T, U).
 3. קבוצת פוסfat המחברת לפחמן 5 של הסוכר, מונעת למולקולה את המטען השילי.
- קשר גליקוזידי בין הסוכר לבין הבסיס החנקני.
 - הfosfat הקשור לפחמן 2 בקשר פוספו-אסטרו.
 - קשר פוספו-דיאסטרו בין נוקלאוטיד אחד לשני.

נווקלאוטיד – נוקלאוטיד בלי פוסfat.

Minor groove – סיוב צפוף.

Major groove – סיוב יותר פתוח. בדרך כלל יהיה שם קישור של חלבונים ל-DNA.

גדייל דן"א הוא בעל אוריינטציה שקשורה לכימיה של קישור הנוקלאוטידים. חיבור ה-5-ל-3 מבטיב את כיוון הדן"א. מבנה הדן"א הוא דו-גדייל וקיים בין גדייל הדן"א נעשה באמצעות הרבה קשרי מימן שמצליכים לייצב את המולקולה. GC מחוברים ע"י 3 קשרי מימן, AT ע"י 2 קשרים.

תזכורת: קשרים קוולנטיים הם קשרים חזקים ומתבססים על שיתוף אטומיים בין שני אלמנטים. קשרים לא קוולנטיים – מימן,ALKTOU סטטיים, ואן דר ואלס. ניתן לראות את ההבדלים בטבלה בין המרחוקים והאנרגיות.

הדגמה המרכזית – מודל שסביר על דרך העברת האינפורמציה בתאים. יודעים ביום שהמודל לא עדכני.

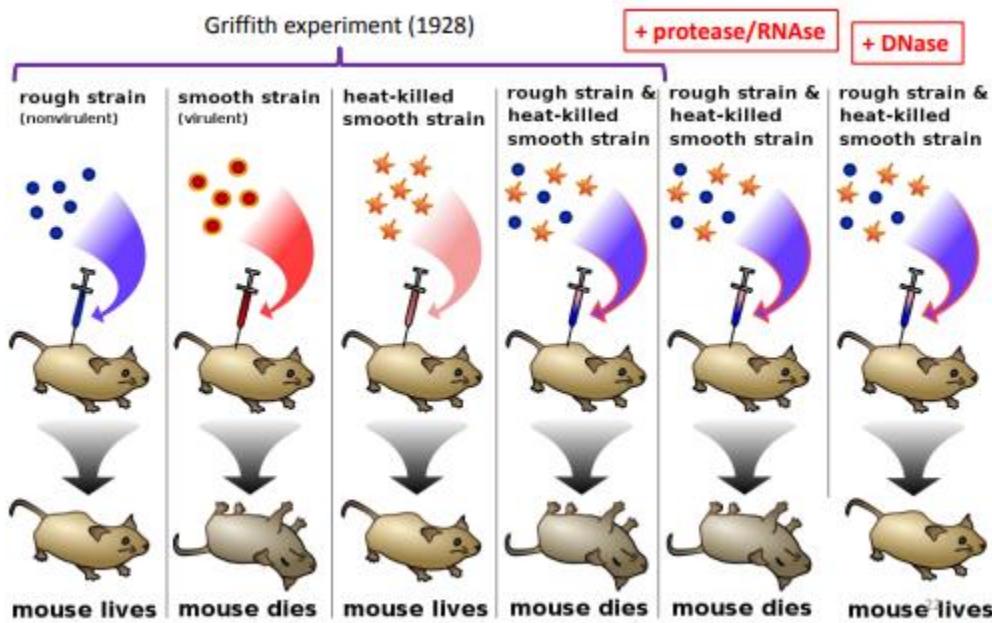
כל גדייל בסיל נפתח ועל בסיסו נבנה גדייל חדש (עמ' 20). מדובר בקשרי מימן ולכן יציבים באנרגיית חימום, הגדיילים יהיו מופרדים. בקיורו ולאחר זמן מסוים הם יחוزو לצורה המקורית (braha מסויימת).

סינטזה DNA**Cloning – טרנספורמציה של דן"א בתוך חיידקים (הניסוי של איורי מקלאוד מקארתי)**

טרנספורמציה בחידקים – העברת חומר תורשתי מהחיידק אחד לאחר ללא מגע ביניהם. השיטה היא שכפול החידקים והפקת דן"א מוגבר.

הניסוי של גרייפית: לקחו שני סוגי חיידקים – rough rough שלא משפיע על העברתsmooth שהורג אותו. ראו שבחממים את ה- smooth העברת לא מת, ואם מחממים את ה- rough ומזריקים אותו יחד עם smooth רגיל לא העברת מת.

איורי וככל השאר המשיכו את הניסוי ובדקו את התשפעה של הזיקת חיידקים rough מחוממים עם smooth RNase, והכניסו פרוטאזותRNase שמפרקים את החלבונים. במצב זה ה- smooth ממשיך להרוג את העברת. אולם, כשהוחבנס DNase העברת נשרח חי, ה- smooth לא הצליח להרוג אותו.



המסקנה: למחרות שהחידק rough היה לא פעיל, הדנ"א שלו יכול היה לעבור לתוךו ולהפוך אותו לפעיל. בלומר, החלבונים לא משפיעים על התא, אלא הדנ"א.

הניסי אפשר את הטרנספורמציה של דנ"א בתוך חיידקים, בلومר יצרו ספריות דנ"א בתוך חיידקים. ניתן **לייצר פלסמיד ולבטו** לתוך מה שנרצה, לעשות טרנספורמציה לחידקים, לשכפל אותם וע"י כנף הפיק דנ"א מוגבר. ניתן גם לייצר פלסמידים בעלי כוד לייצור חלבון שנייתן אחר בר להפקו בצורה תעשייתית.

איך השיטה עובדת?

הכנסת מקטע DNA, בד"כ תוצר של PCR, לתוך פלסמיד של חיידק (DNA מעגלי שקיים בחידקים) שנחתר ע"י איזוחה אנזים שחוטך בצורת end Steaky end. ככלומר משאיר חתיכות דבוקות של DNA. מערבבים את הפלסמיד יחד עם DNA וליגאץ שסגור אותם ביחד. על גבי הפלסמיד תימצא עמידות לאנטיביוטיקה.

ע"י זרעה בצלחת עם אנטיביוטיקה נוכל לעשות סלקציה בר שرك החידקים עם האנטיביוטיקה על גבי הפלסמיד יגדלו ונקבל רק את החידקים שנרצחה. הכנסה היא באנזים שטפרק סוכר, ומכניםים חומר סינטטי SHA-Z-Lac מפרק אותו ונוצר צבע כחול. נרצה את הלבנים. בפלסמיד יש נקודת שמזווהה ע"י DNA פולימראז שగורמת לשכפל הפלסמידים. מכניםים את הפלסמיד עם ה-DNA שרצינו לחידקים, החידקים מכפילים את עצםם ולבסוף ע"י מיצוי הפלסמיד מהחידקים ניתן לקבל את הגן בצורה מוגברת.

חיתוך DNA

על מנת "לבתוב" בפלסמידים מצאו שאפשר לחיתוך DNA ואז בעזרת אנזימים בשם Ligase ליגאז DNA לחבר מולקולות DNA אחת לשניה. קיימים **אנזימי רסטריקציה**, שהם אנזימים המסוגלים לחיתוך קטעי DNA באזוריים מסוימים.

חיתוך בלאנט – משאיר קצוות חלקים בדנ"א (ה奇特ון הראשון).

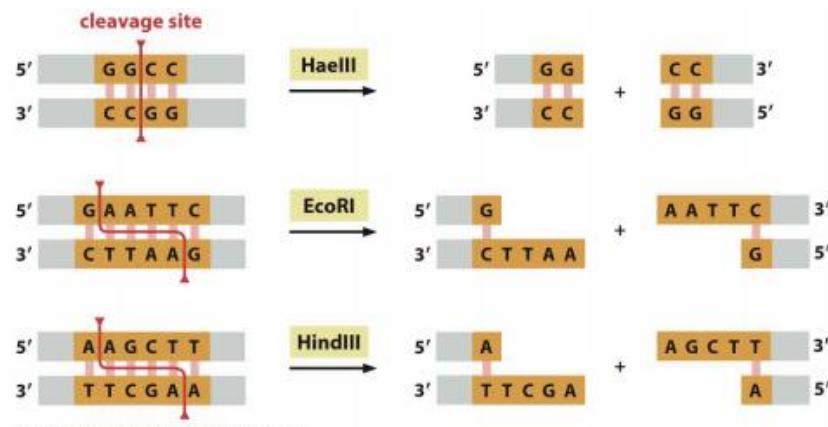


Figure 8-24 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

לעומת זאת, אנזימים כמו Hind3, EcoR1 מיצרים **COHESIVENESS** – חיתוך מדורג המביא לייצור אזורים דביקים. لكن על מנת להדביק חתיכות DNA שנחתכו זה ייה ע"י EcoR1 (בלומר ע"י אותו אנזים). עובדה זו מאפשרת לפתח פלסמידים ולהדביק חתיכות שנרצה לסנתז, להגבר עם פרימרים בעלי קצוות עם אותם האנזימים. בחיתוך של EcoR1 לעומת חיתוך של HaeIII, אם נריץ את התוצאות על גבי ג'ל נראה תוצאות שונות.

ספריית DNA

לריצוף הגנים האנושי, הפיקו גנים מבני אדם וע"י שבירה באמצעות אנזימים או זברים ששוברים את ה-DNA, נוצרו חתיכות שמייצגות אזורים בגנים. ערבעו אותן עם פלסמידים זחים, כל חתיכה נכנסת לפלסמיד אחר. החתיכות כוללות גם אינטרונים וקסונים וזה לא מייצג איזה גנים באים לידי ביטוי. עשו ספירה כזו גם ל-cDNA, בلومר הפיקו את כל mRNA מטא מסויים (הרץ של הדנ"א לאחר החיבור). הרץ שמקודד לחלבון).

אחר כך ב-PCR נעשה טיהור ויצירה של DNA על גבי RNA המשלים.

מה ההבדלים בין ספירת DNA לבין ספירת cDNA? ספירת DNA רגילה מייצגת את כל הגנים – אינטרונים, אקסונים. יכולה לשמש לסריקות של גנים. לעומת זאת ב-cDNA ניתן לדעת האם גן התבטה, צמצום האינטרונים (מאוד ארוכים ומפריעים לראות את הגן בשלהמו), הבדלי הביטוי בתאים שונים, כמוות גנים שה התבטהו.

יצור חלבוניים

המעבר מרן"א לחלבוניים נקרא "הקוד הגנטי". הרן"א מתחלק לששלות שיודעות להיות מוקדדות לחומצות אמינו מסוימות. – מורה על תחילת ייצור החלבון. Start Codon

Codon Stop – מורה על סיום הקריאה.

לכל גידיל DNA יכולים להיות שלושה פרויימים של קידוד.

עמ' 37 – ככל שהפרויים יהיה נקי מסטוף קודון החלבן שמתורגם יהיה בנראה יותר ארוך ויתר שלם.

אבלוציה בהקשר לרצפים

הארכיאיה יותר קרובה אליו מאשר הבקטריה.

ע"י השוואת רצפים של מינים שונים ניתן להבין את האבולוציה.

מספר ההופעות: בהינתן גנים באורך L - M בסיסים מס' ההפעות יהיה M/L .

השוואת רצפים

בשילובת שני רצפים, ניתן לראות אזורים שהם Match ואזורים שהם Mismatch, למשל בהשוואה בין הרצף של האדם ושל חיידק *E.coli*.

כדי לגרום לרצף אחד להיות יותר דומה לשני יש אפשרות לפתח מרוחקים ברצף.
(נגיד החדרה או החסירה של בסיסים, תלוי בכוון האבולוציוני).

הוספה או החסירה של נוקלאוטידים מבחינה אנרגטית הרבה יותר יקר, לכל פעה יש מחיר ובסוף נעשה חישוב לראות מבחינה אנרגטית מה יותר כדי במקורה של האדם והగירה/orנגאוטן.
באלסט – פירוט בפרק על בלאסט.

SYNTISIZER – קונים נוקלאוטידים וניתן לייצר רצף קבוע ע"י Solid Support. קישור פוספט דו-אסטריאי בין הנוקלאוטידים וכל מיני פעולות. מגביל באורך.

עמ' 49 – ניתן לשנות במבני קשר מיון על סמך הרצף.

PCR – הכפלת מקטע DNA

שלב דנטורציה: הפרדת הסליל ההפוך ע"י דנטורציה בטמפרטורה גבוהה (בד"כ 95 מעלות), קשרי המימן מתפרקים ונוצרים שני גידלים.

שלב האנליים (Annealing of primers): שימוש בפרויירים שניתן לייצר על סמרק רצף ידוע, תוחמים את הרצף אותו נרצה להגדיר. הפרויירים נקשרים לקצוות המיעדים בגידלים.

שלב אלונגציה (Elongation): בעזרת DNA פולימראז נוקלאוטידים ניתן לייצר את הגידיל המשלים (זהה להכפלת DNA בתא).

רק בשלב השלישי מתקבלים התוצריטים שנרצה.
ניתן קר להגדיל בצורה אקספוננציאלית את הכמות, لكن לא צריך להתחיל עם כמות DN"א גדולה. שיטה רגישה.

DNA ריצוף

הומצא ע"י פרדריק סנגר, על בסיס כימיה פשוטה בשם *dideoxy*. אין את ה-HO בעמדה 3, ואין אפשרות ליצור קשר פוספו-דיאסטריאי. לא ניתן להמשיך את הנוקלאוטיד. אם נחבר לו משחו פלורנסטי יוכל לקרוא אותו.

ניתן לקחת מולקולת DN"א וערबב אותה עם נוקלאוטיד *dideoxy* *dideoxy* שnitן לעצור את המולקולה.

ריצוף במקביל – ייצור ספרייה של פלסמידים, הרבה חתיכות DN"א שנכנסות לפלסמידים חיים, הכנסה לחידקים, הרבעה וקבלת פלסמידים רבים. **genomic DNA library**

? Shotgun sequencing whole genome

בעיות בריצוף RNA – כל מדידה שנעשה דורשת אמפליפיקציה (PCR) – נדרש בהגברת במות הגדים כדי להיות יותר רגילים במדידה. יש תהליכי יותר מדויקים.

RT-qPCR – מבוסס על PCR אבל אפשר למדוד את במות התוצר בכל מחזור. אם יש הבדל נראה עוקמה שמתחליה במחזור נמוך יותר עד שmagua להרואה.

DNA Microarray

משמש לבדיקת פרופיל השעטוק של הגן בהשוואה בין שני תאים (למשל תא סרטני ותא רגיל). בעצם מפיקים RNA משני מצבים – קונטROL וטיפול. הופכים את ה-RNA ל-cDNA וצובעים כל סמל בצע פלורנסטי שונה.

יש צ'יפ שזהו ה-*microarray* עם הרבה חורים שבתוכם יש סליל משלים של mRNA לגן ספציפי.

ניתן יהיה למדוד את הכמות לפי הפלורנסט בטא, ככלומר הצע שמייצא הci הרובה יצבע על כרך שאותו RNA משתעתק באופן מהיר יותר.

המגבלה המרכזית היא הצורך להדפיס פרימרים, לדעת מה אנחנו מוחפשים. ניתן למדוד מספר דברים מצומצם.

לעומת ה-*Microarray*, ניתן למדוד מה שאנו חוצים kali הנקה ראשונית. עד לא זמן היה תהליך יקר.

שיטת Illumina

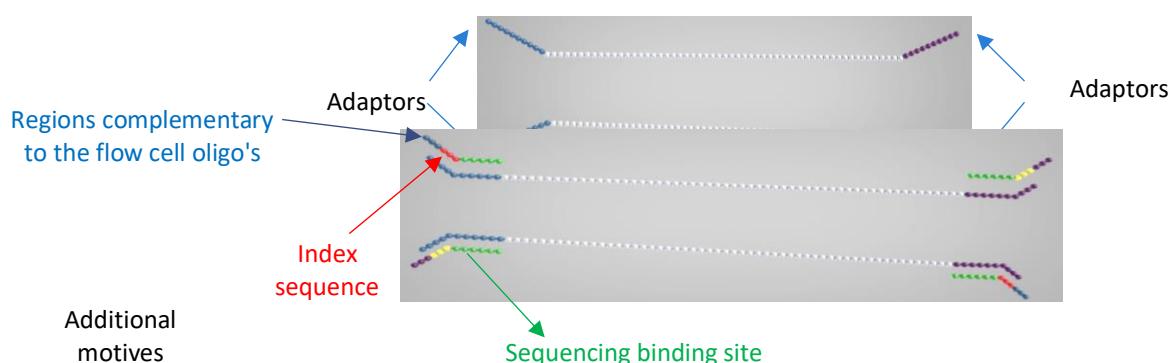
שיטת לריצוף מקביל של מקטעי DNA ו-RNA.

שיטת זו מבוססת על שימוש בצלבים הפיברים אשר מאפשרים את הזיהוי של בסיסים בודדים בעת שהם מצורפים לרצף ה-DNA.

שלב 1 - Sample Prep

פירוק גנים אחד לחתיכות של 800-200 בסיסים ובנויות הספריות על גביו.

1. ע"י PCR יוצרים אדפטורים – מוסיפים בקצות הfragments הדו גדיי אדפטורים – מקטעים זהים בכל קצה. (מבנהים פרימרים ח齊 משלימים לדנ"א וח齊 לא).
2. ע"י PCR מוסיפים רצפים בקצות לא זהים על גבי האדפטורים המכילים: Sequencing binding site - Index sequence -
3. נזריק את ה-DNA לתוך המבונה בשיטת מיקרו-פלואידי שמאפשרת להזריק DNA בנפחים קטנים. לפני כן נעשית דנטורציה כדי שה-DNA יוכנס בחד גדי.

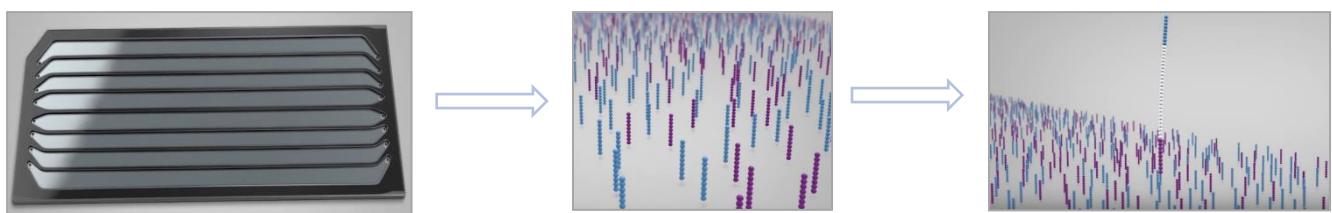


צריך לבצע היברידיזציה לסליד ולבן יש צורך במבנה ספרייה. הספרייה היא א-סימטרית כך שבכל צד של הגנים שנרצה לרצף יש משחה שונה.

שלב 2 - Cluster Generation

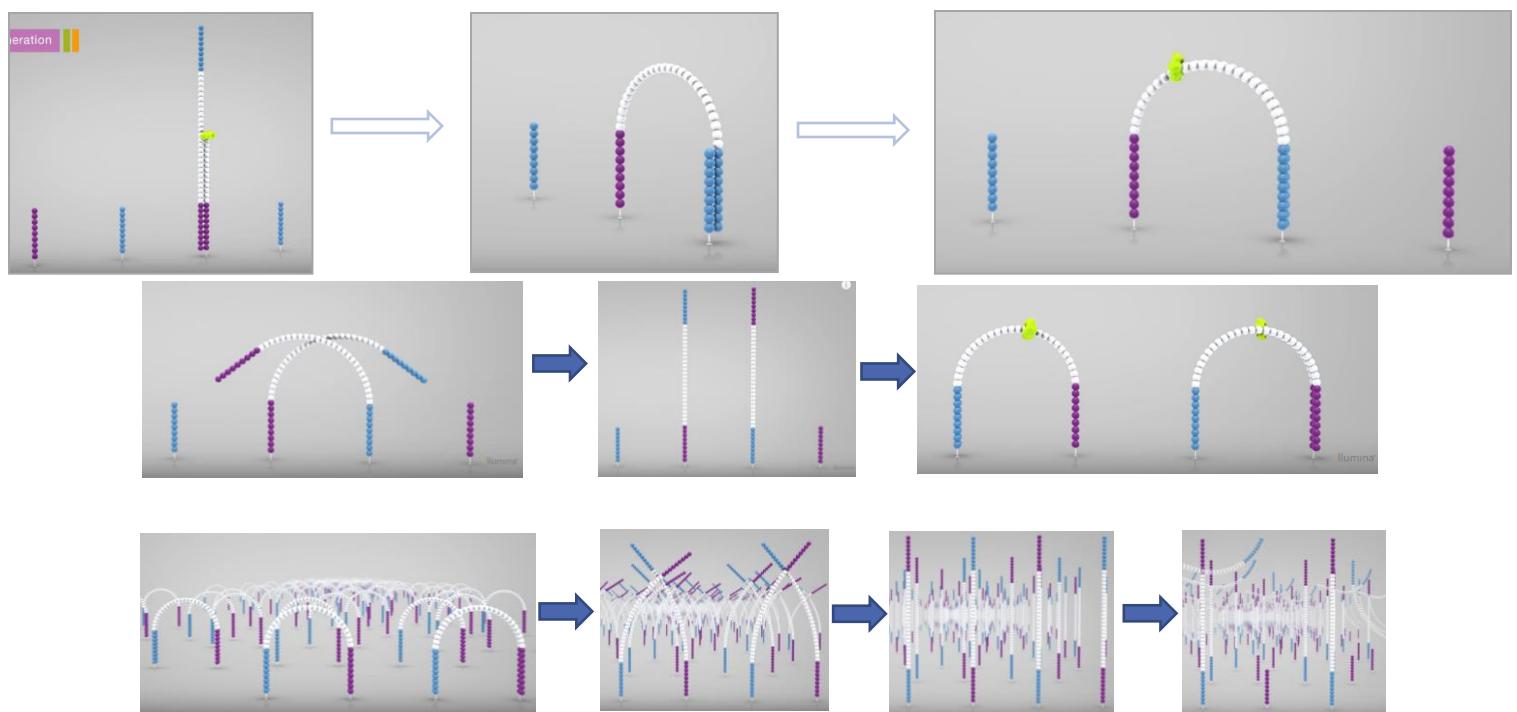
יצירת Cluster של פרגמנטים זהים לכל פרגמנט אותו נרצה לרצף. נרצה לעשות זאת כדי להגבר את הסיגナル הפולורנסני על מנת להזות לאחר מכן את הבסיסים שהתחברו.

- הכנסנו את-h-DNA בצורה חוג גדיית. קיימים ליבנים על גבי המשטח (cell) עליהם יש אוליגו אליו-h-DNA נקשר. האוליגו משמש כפולימראז ותמיד יהיה בכיוון 5' ל-3'. ברגע שנכנס DNA הוא נכנס בכיוון 3' ל-5'.



- סינתוז מ-5' ל-3'. חשוב להכין ריבוץ נמוך של DNA כיוון שהליינס מכילים אוליגו, ואם נכניס ריבוץ גבוה, לא יהיו מרוחקים גדולים בין הקלאסטרום והסיגナル של הפולורנסציה יכול להתרבעב.
- ונוצרים שני גדים, גדייל המקרו יוציא החוצה ונשאר הגדייל השסונטי. הגדייל המשונץ מתפרק ובגלל האוליגו, הסగלים משלימים לשידם ונוצר מעין גשר bridge amplification.
- סינתוז נוסף מכיוון 5' ל-3' על גבי הגשר.
- שני הגדים של הגשר נפתחים ומתקפים שוב לגשר נוסף, התהיליך חוזר על עצמו ונוצרים הקלאסטרום. גדייל ה-forward נחתכים ונשפפים החוצה, מה שימושו רק את גדייל ה-forward.

קצוות ה-3' פריטים נשומים כדי למנוע קישור.



שלב 3 Sequencing

בעשה ע"י סינתזה של גדיל משלים לrogramnet שאנו חנו רצים לעשות לו ריצוף. מתחבר פריימר לקצוט שהוספנו ל-DNA ב-binding sitesequencing ומודרים נוקלאוטידים מסומנים בפלורנסטים שונים. ברגע שנקשר נוקלאוטיד קומפלמנטרי על גבי הגדיל, נוצרת הערה שהմבשיר קולט ומזהה את הבסיס שנקשר. לאחר שנקשר יש תהילך כימי של הסרת הפלורנסט בר שהבסיס הבא יוכל להתחבר ולהיות מזוהה ע"י המבשיר. ה-

sequencing – תחיל מהקצתה שהתחבר מ-3 ל-5.

Read – במה נוקלאוטידים נקרא עד שישחרר הגדיל (בין 30 ל-70).

Single end – קריאה רק מכיוון אחת.

ביום יש מכשירים שמאפשרים קריאה מהצד השני. הסגול מתפרק ונקשר לאוליגו על גבי המשטח.שוב יש סינתוז ע"י פולימראז. הגדיל מהביבון הסגול נשטף החוצה ונותר רק הגדיל השני. באותו אופן ניתן לרצף מהקצתה זהה. ברן נוכל לרצף משני הקצוטות.

נשתמש ביום בשיטה זו כי היא נותנת יותר אינפורמציה על הריצף – נדע גם את ההתחלת וגם את הסוף.

שלב 4 Data analysis

מתקבלים read-ים רבים של הrogramnets. באמצעות תוכנות מסוימות עושים alignment לגנים.

Ion Torrent

mbosst על העבודה שבהוספת נוקלאוטיד בסינתזה משתחרר פרוטון מימן וה-H⁺ משתנה, אך אם נמדד אותו ונדע לזהות תנודות ב-H⁺ נדע שהתוווסף נוקלאוטיד.

יצור Clusters על ביטים קטנים המכילים אדפטור (שידע לזהות את השינויים ב-H⁺?!) אליו נקשרת מולקוללה שמייצרת מהו?

Flow Cell מורכב מ-Array שכל תבנית מכילה את הביט. כל פעם מכניסים נוקלאוטיד מסווג אחד לכל התבנית, ואיפה שקיים בסיס משלים לו ישתחרר פרוטון מימן והאדפטור יזהה את השינוי ב-H⁺.
יחסית יש יותר טעויות בשיטה זו.

מבנה של מקרומולקולות

סוגי קשרים

במולקולת DNA יש קשרים קוולנטיים, שהם קשרים יציבים מאוד, והיא יכולה לפעול עם מולקולות אחרות בעזרת קשרים לא קוולנטיים: קשרי ואן דר ואלס, קשרים אלקטרו-סטטיים וקשרי מימן. קשרים אלו הם יחסית חלשים לעומת הקשרים הקוולנטיים, אבל במקרה קשרים ביחד יוצרים יציבות לבנה.

קשרים קוולנטיים הם קשרים דורשנה כמות אנרגיה רבה על מנת לפרקים.

סוגי קשרים לא קוולנטיים:

1. **קשר יוני** – בששת מולקולות טענות מתקרבות אחת לשנייה ו莫וחזקות באינטראקציה אלקטרו-סטטית, מטען חיובי ושלילי.
2. **קשרי מימן** – יורחוב בהמשך.
3. **איןטראקציות ואן דר ואלס** – שני אטומים במרחק אובייקטיבי להתקרב אחד לשני, וזאת מכיוון שנמצאים.... כל מני דברים פיזיקליים שלא בחומר. בשני אטומים קרובים מאוד אחד לשני האורביטלות שלהם מתחילה להיות חופפות, ואם לא נוצר קשר כימי הם ייטה להתרחק.

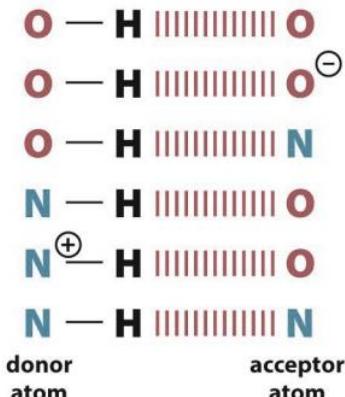
TABLE 2-1 Covalent and Noncovalent Chemical Bonds

Bond type		Length (nm)	Strength kJ/mole**	
			in vacuum	in water
Covalent		0.15	377 (90)	377 (90)
Noncovalent	ionic*	0.25	335 (80)	12.6 (3)
	hydrogen	0.30	16.7 (4)	4.2 (1)
	van der Waals attraction (per atom)	0.35	0.4 (0.1)	0.4 (0.1)

*An ionic bond is an electrostatic attraction between two fully charged atoms. **Values in parentheses are kcal/mole. 1 kJ = 0.239 kcal and 1 kcal = 4.18 kJ.

הגדלים נמדדים בקילו קלוריות למול. במה האינטראקציה חזקה ביחס לסבירה? T_k גודל חשוב בעניין זה ומיצג את האנרגיה האופיינית? שיש בטמפרטורה מסוימת, בויבורציה תרמית של מולקולה (למשל שני אטומים קשרים קוולנטיים ורודדים סביב אורך הקשר). כאשר מולקולה נמצאת בתוויך T הוויבורציה בסדר גודל של T_k . כדי לקבל אנרגיה במול נכפיל במספר אבוגדרו.

בעצם, האנרגיה האופיינית היא פחות או יותר מסדר גודל של קשר לא קוולנטי אחד. יש סיכוי שבסיבות תרמיים איןטראקציה קוולנטית עם קשר אחד תיווצר מספיק אנרגיה על האזור כדי שהאיןטראקציה תיפתח.



acceptor
atom

קשר על גבול הקוילנט שמתווים מימן בודד. מופיע בנסיבות רבות ←
המימן דוחה ממנו אלקטرونים שمعدיפים לוקליציה על האטום שמחובר
למיון, ובתוצאה מבר נוצר דיפול, הפרש מטען בין שני המימן יחסית יותר חיובי
מהאטום לידיו שלחוב יהיה שלילי. ניתן להגדיל בגודל שהוא קשר אלקטרו-סטטי
כלaws

בקשר מימן יש אלמנטים של חיפוי אורביטות, ובתוכה מכון יש לו דוחית מועדף בה הקשר הוא כמעט לינארי (לעומת קשרים אלקטרו-סטטיים). אם יהיה מימן על האותם השני לא יוווצר קשר מימן.

המים יודעים ליצור קשרי מימן בצורה מסיבית נ-
לשטי מימנויות. תופעה זו חשובה ממשית סירות:

1. אחת מהן
 2. העיקרית זה בഗל **האפקט ההידרופובי** – אחד האפקטים החשובים ביותר שקובעים את מבנה המקרו- מולקולות. האפקט מבוסס על כך שבעקבות יצירת קשרי מימן בצורה מסיבית של מולקולות מים עם מולקולות מים אחרות, יעדיפו המים לקשר מולקולות מים אחרות.
 3. כאשר בתמיסה יהיו לנו מולקולות שלא יכולות ליצור קשרי מימן (כמו מתיל), אז המולקולות "יתאגדו" ביחד בהשפעת האפקט ההידרופובי.
 4. צד נוסף של האפקט ההידרופובי הוא שכאשר מולקולות מים נמצאות בתמיסה הן חופשיות להסתובב. כאשר יימצאו ליד קבוצה שלא יוצרת קשר מימן, תהיה להן העדפה לכיוון מסוים, לא יהיו בכלל או ריננטציה. הסדר עולה, ככלומר האנטורופיה יודחת, וכך מצב זה מבחן אנטורופית הוא לא מועדף.
 5. היתרון: מולקולות המים יכולות לדוחף את הקבוצות שלא יוצרות קשרי מימן אחת לשניה. תופעה תרמודינמית אנטורופית.



החלשה אלקטרו-סטטיטית – כאשר יש שני יוניים טעונים, יש ביןיהם קשרIonic חזק. בתמיסה ההתנהגות אחרת – אם יש שתי קב' טעונות, אחת שלילית ואחת חיובית, מושות יוניים מהמים? יוניים שליליים או הצדדים השליליים במלול' מים פונים ליוניים החיוביים, והם מצפים את היון השילי. כמו שכבת הגנה עם מטען הפוך בין הioniים הטעונים. התופעה מורידה את האינטראקציה האלקטרו-סטטיטית, מבחן אנרגטיות הקשר הזה פי עשר (או פי מאה במינים) יותר חלש.

- מסקנה: המים מחלישים קשריםIonic יוניים.

מבנים בחלבוניים

AMINO ACID		SIDE CHAIN		AMINO ACID		SIDE CHAIN	
Aspartic acid	Asp	D	negative	Alanine	Ala	A	nonpolar
Glutamic acid	Glu	E	negative	Glycine	Gly	G	nonpolar
Arginine	Arg	R	positive	Valine	Val	V	nonpolar
Lysine	Lys	K	positive	Leucine	Leu	L	nonpolar
Histidine	His	H	positive	Isoleucine	Ile	I	nonpolar
Asparagine	Asn	N	uncharged polar	Proline	Pro	P	nonpolar
Glutamine	Gln	Q	uncharged polar	Phenylalanine	Phe	F	nonpolar
Serine	Ser	S	uncharged polar	Methionine	Met	M	nonpolar
Threonine	Thr	T	uncharged polar	Tryptophan	Trp	W	nonpolar
Tyrosine	Tyr	Y	uncharged polar	Cysteine	Cys	C	nonpolar

מבנה ראשוני: הרצף – סדר הבסיסים ב-DNA או סדר הח"א בחלבוניים.

מבנה שניוני: מבנים נפרדים מעבר לרצף האחרון. ב-DNA אלה שני הגדיילים שיוצרים את הסליל ההפוך, ובחלבונים יש את ה- α -- לקס שМОחזק ע"י קשרי מימן בין הליופרים, וה- β שיט בר שיש קשרי מימן בין המשטחים.

מבנה שלישוניים: RNA יכול ליצור דוגמאות שיזרים מבנה יותר מסובך (כמו ה-tRNA). בחלבונים מדובר בקונפומציית המבנה השינויים.

השרשות החלבונית (ולפעמים ה-RNA) יוצרת מבנים תלת ממדיים מורכבים.

קיפולים בחלבונים

חלבונים עם אותו רצף מתקפלים תמיד לאותו מבנה שרק בו יש פעילות.

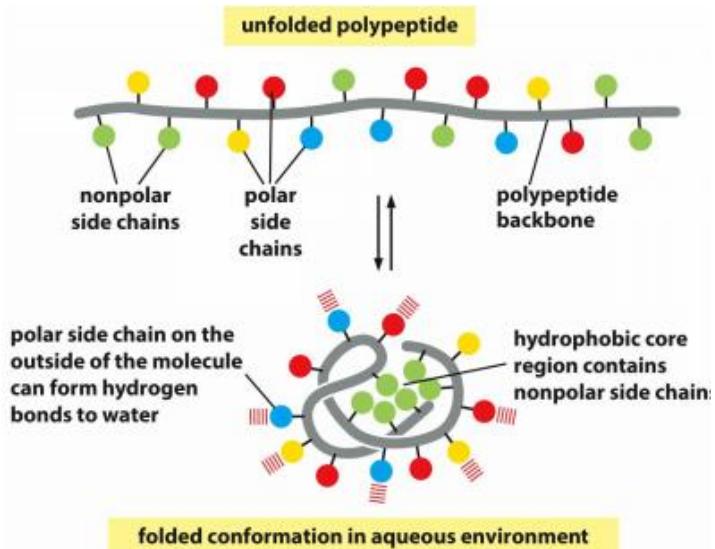


Figure 3-5 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

למה חלבונים מתקפלים?

בעיקר בגלל האפקט הידרופובי – החלבונים מכילים ח"א הידרופוביות רבות. קבוצות מסוימות יוצרות הליבה של החלבן תהיה הידרופובית.

יציבות החלבונים

תזכורת: נסחת האנרגיה החופשית של גיבס מצביעה על ריאקציה מסוימת האם תקרה בצורה ספונטנית ותחרור אנרגיה או שיש צורך בהשकעת אנרגיה. אנרגיית גיבס היא האנטלפייה, האנרגיה הרכימית, פחות הטמפרטורה כפול האנטרופיה:

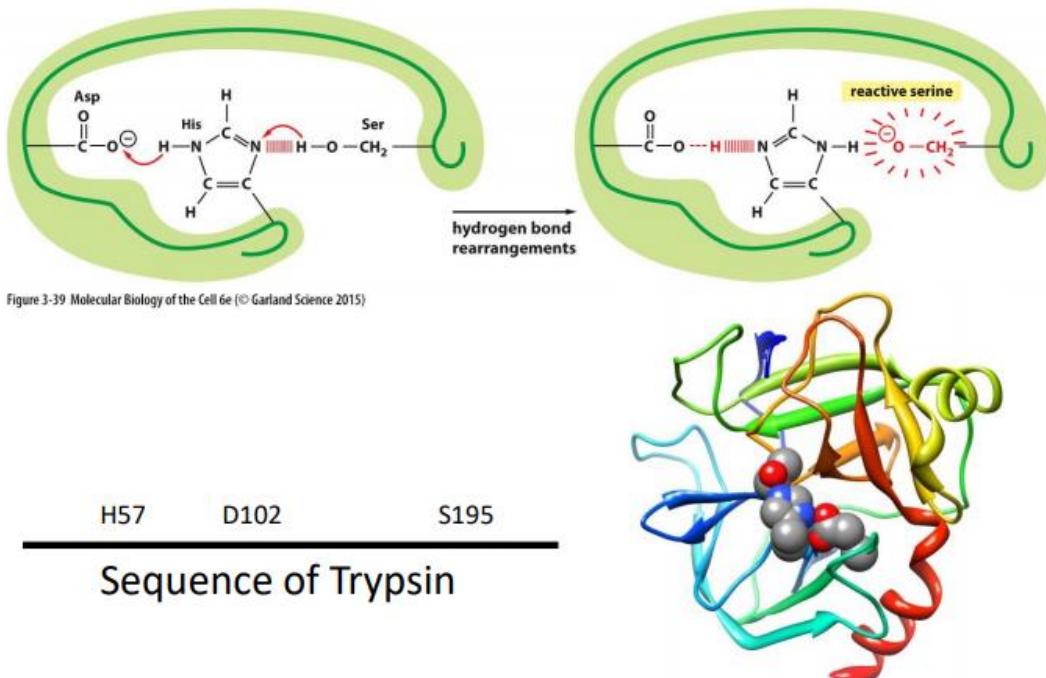
$$\Delta G = \Delta H - T^* \Delta S$$

קיפול של חלבונים קורה באופן ספונטני בתא, $-\Delta G$ שלילי. מבחינת אנטלפייה, קיפול חלבונים הוא מצב מועדף – במצב מוקפל המימנים בקשרי מימן $-\Delta H$ יהיה גבוה יותר. כאשר החלבן מוקפל הרבה יותר מאשר מימן בסביבתו ??? lagi ΔS , הסדר במערכת עולה והאנטרופיה יורדת מאוד, ובגלל המינוס במשווהה המחבר השני יהיה מאד חיובי.

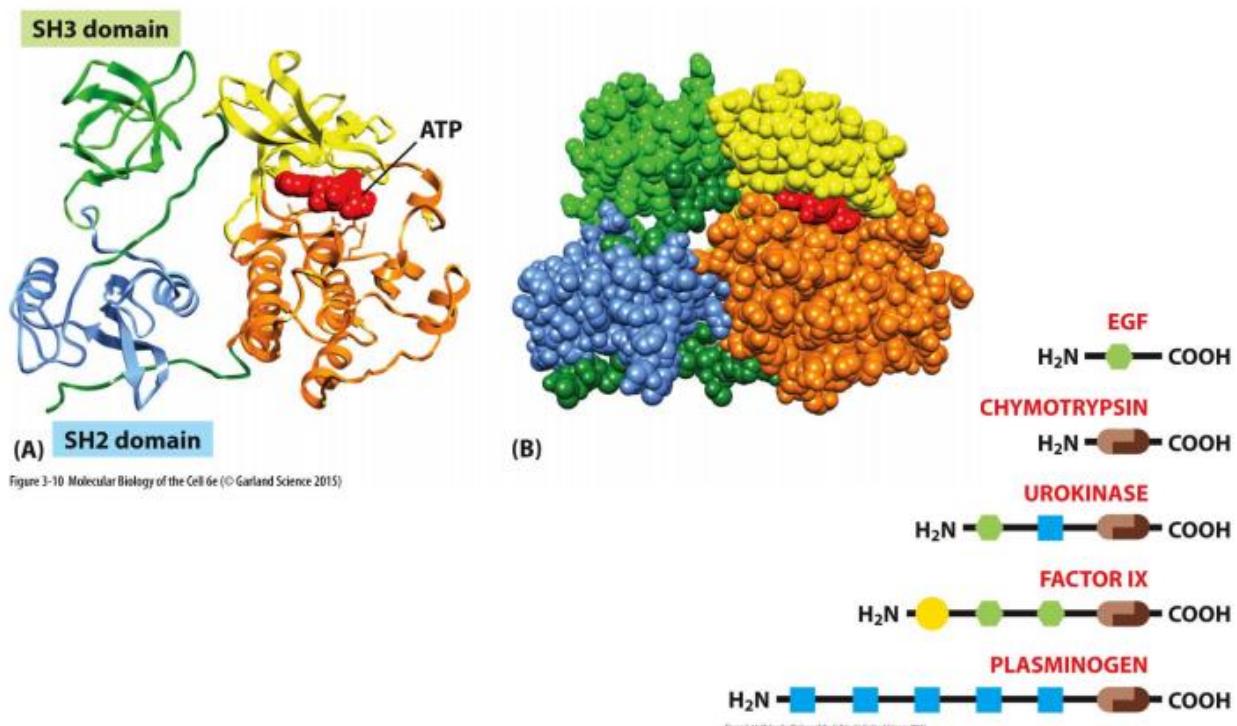
בסופו של דבר, G של החלבן אומנם קטן מ-0, אבל מאוד קרוב אליו. יש איזשהו קיזוז בין האנטלפייה לבין האנטרופיה. מכאן שחלבונים הם יציבים מבחינה גבולית, ובגלל המינוס במשווהה המחבר השני יהיה מכך חלבון ממצב מוקפל למצב לא מוקפל. זה טוב לעולם החי כי יש להעיר.

איך מתקפלים חלבונים?

נסתכל רגע על טריפסין, אנזים שנמצא בקיבה וחומר חלבונים אחרים בחלק מתהיליך העיכול. הרצף שלו הוא באורך 200 ח"א ולאורכו יש היסודות 57, סרין 195 ואספרטט 102. בששרשתו שלו מוקפלת, שלוש הח"א הופכות להיות קרובות אחת לשנייה מבחינה מרחבית. בעצם, זאת המטרה של הקיפול – החזקת שלוש הקבוצות האלה קרובות בצוואר יציבה. זה בניגוד لأنטרופיה, אם זה היה מפוזר בתמייה הסיכוי שהן יהיו קרובות הוא מאוד נמוך. בשזה קורה יש משיכת מימנים אחת מהשנייה ליצירת סרין ריאקטיבי שתוקף חלבונים אחרים, וכל זה קורה רק בזכות המבנה.



החלבונים האוקריוטים מורכבים מkomבינציה של מוטיבים בודדים. מודלים שימושיים ליצירת חלבון מורכב יותר. בבקטריות זה נראה הרבה פעות, החלבונים מורכבים מודמיין אחד או שניים.



מודיפיקציות בחלבונים

אחרי שהחלבון מסונתז בריבוזום הוא יכול לעבור שינויים שישנו את הכימיה שלו ע"י אנזיםים.

לדוגמ' **fosforילציה** – הוספת קבוצת פוסfat על ח"א מסוימות (סריין, טירוזין וכו'..) ע"י קינאזות. הקינאזות לוקחים ATP בך שקב' הפוסfat מהмолקולה נקשרת לח"א.

זה פוספורילציה – התהיליך הפוך, הוצאה קבוצת פוסfat מח"א.

התהיליכים האלה מאוד מבוקרים בתא ויש אלף סוגים של אנזיםים שבמציעים אותם רק בחלבונים מסוימים, רק על קבוצות מסוימות, רק בתנאים מסוימים וכו'.

המודיפיקציות האלה בינהו, חס-on/off. הfosforילציות מזבזבות ATP, אך למה דואקן לשים קבוצת פוסfat?

לא מדובר ביצירת מטען רגיל, אלא במטען-2.

דברנו על זה שהאינטראקטיות האלקטרו-סטטניות החלשות בתא. אם המודיפיקציות היו יותר "עדינות", מטען-1, זה לא היה מספיק חזק. המטען-2 זה איזשהו דגל על החלבון שנoston סיגנל מאוד ברור.

- קורות במובן גם ב-DNA וב-RNA.

אינטראקטיות בין מקромולקולות

כאשר שתי מולקולות יוצרות קשרים רבים, יש בינהן התאמה גבוהה.

אבל כאשר נוצרים שלושה קשרים למשל, השיפור האנרגטי חלש? והמולקולות לא יחזיקו מעמד ביחד הרבה זמן. רק כאשר נוצרת חסיפה טובה? הן יחזיקו מעמד זמן רב.

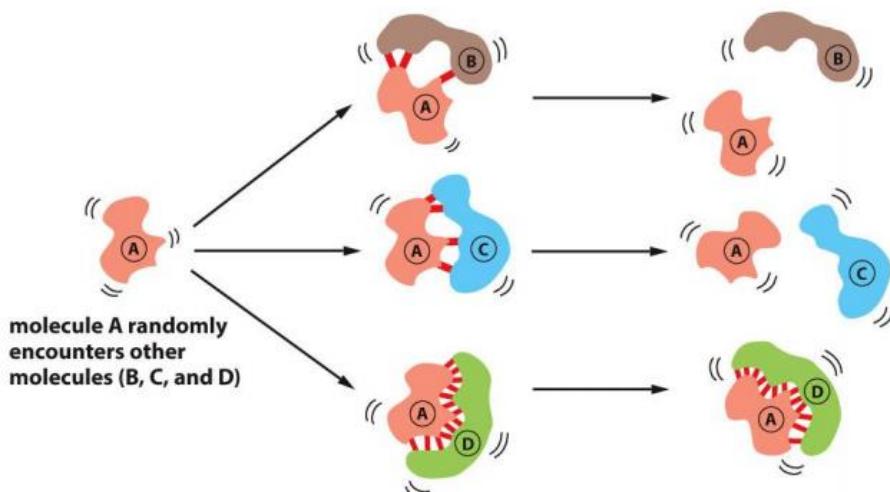
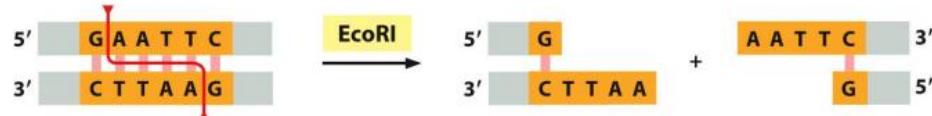


Figure 3-43 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

דוגמא: EcoR1

אנזים שחותך ברצף מסויים ב-DNA: GAATTC בצורה שימושית – **steaky ends**.
 נבין למה הרצף הזה הוא פלינדרום – אם לוחכים את הגדי המשלים מ-5' ל-3' זה יהיה אותו דבר.
 בשמסתכלים על האנזים עם ה-DNA בקריסטלוגרפיה, EcoR1 פועל בתור דימר – שתי יחידות על ה-DNA ביחד.

איך קורה החיתוך?

ה-DNA מולקוללה יציבה, ותפקידו EcoR1 הוא החזקת ה-DNA בפוזיציה מסוימת והבאת יון מגנזיום. ה-DNA טען שלילי ומגנזיום חיובי, ואם בתא המולקולות יתגששו לא יקרה כלום. אבל ב-EcoR1 המגנזיום יושב מספיק זמן כדי שהטען החיובי במגנזיום יפריע למטען השלילי על קב' הפוספט על ה-DNA ובתנאים מסוימים יחליש את הקשר פוסfat-פוסfat ויפרak את ה-DNA.

EcoR1 לא צורק אנרגיה, החיתוך קורה באופן ספונטני. •

למה הקשירה היא לרצף הנtent?

~ אין הקלהה של ההרצאה השנייה ~

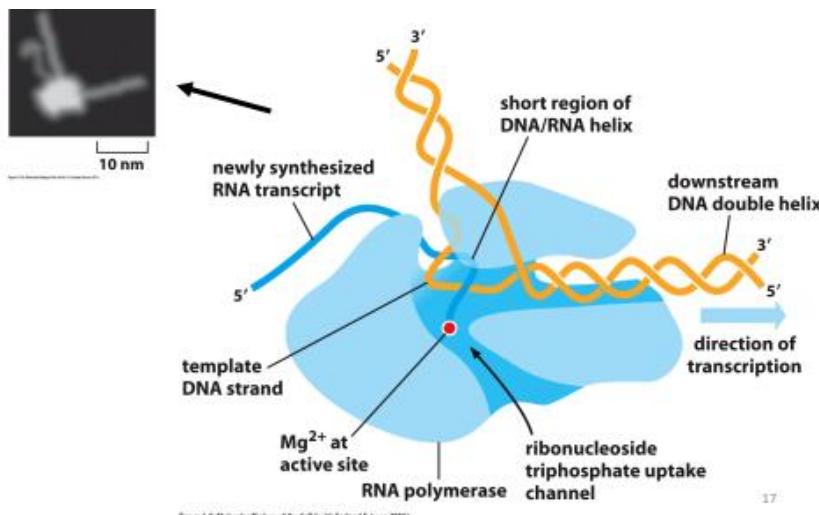
שעתוק**חזרה**

שעתוק – ייצור עותק של RNA מחד הגדים של DNA. מתבצע ע"י האנזים RNA פולימראז. יש איזושאי תלות בין כמות העותקים של ה-RNA לבין כמות החלבון.

RNA פולימראז – מבצע את השעתוק. קומפלקס גדול של חלבונים המכיל כמה אלמנטים:

1. אמצעי לפתוח את ה-DNA.
2. באזור בו נעשה השעתוק, ה-DNA חייב להיות פתוח כדי לקרוא אותו. רק הגדי שעובד שעותוק יהיה באثر הקטלי בו נעשית ייצור ה-RNA.
3. כניסה לחומר הגלם של ה-RNA (הנוקלאוטידים).
4. בשנכנס הגדי DNA יש התאמה סטריאוכומית ושל קשרי מימן אל הגדי, ואם יש התאמה החומצה אמינית מתחברת בצורה קוונטיטטיבית לגדי ה-RNA.
5. תעלת יציאה לה-RNA.

- סינזה של RNA בשעתוק היא מכיוון 5' ל-3'.
- הגדי שעובר את השעתוק הוא מ-3' ל-5'.
- התהיליך צורך אנרגיה שמקורה הוא מהחומרה גרעין. בקשרו הבסיסים לגדי משחררת אנרגיה.
- **ברומטיין** – החלבונים שאורזים את ה-DNA, נלמד בהרחבה בהמשך.



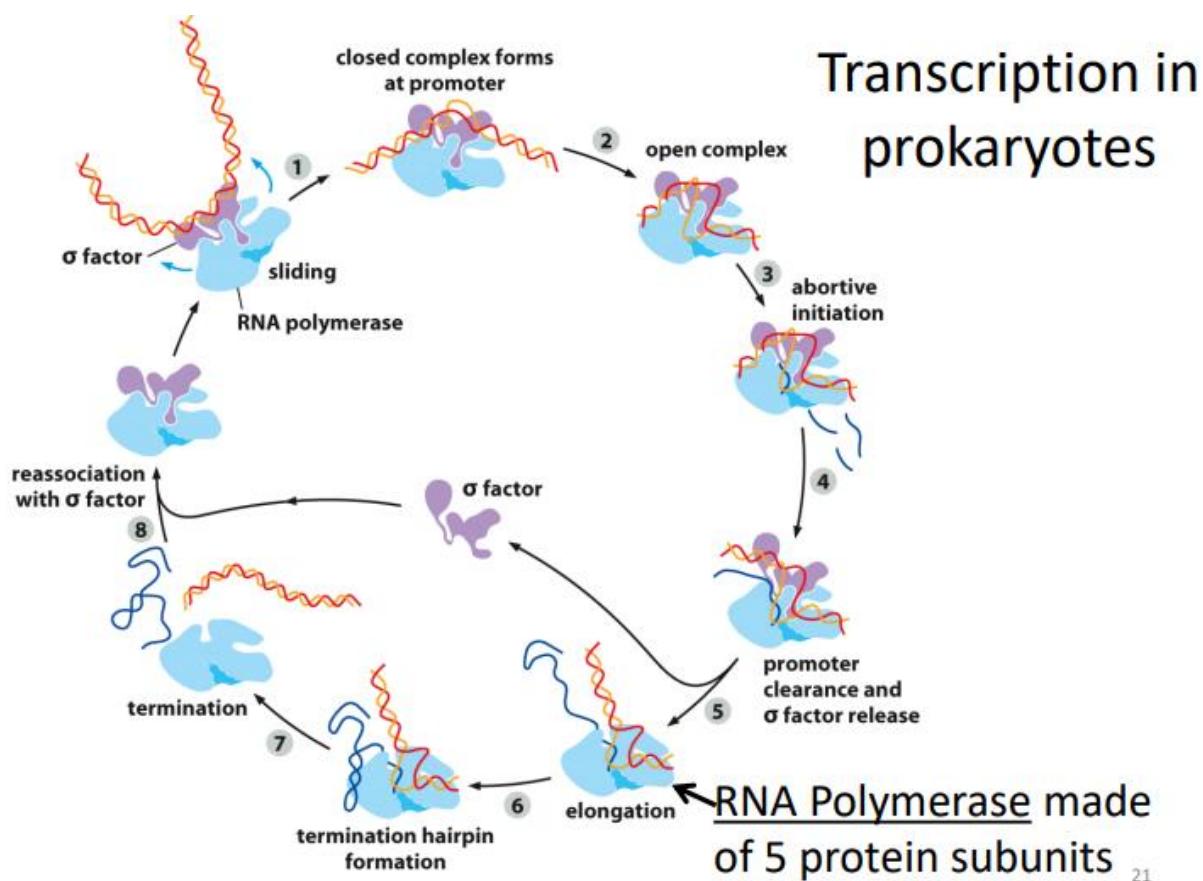
שעתוק בפרוקריוטים

ישנו פולימראז שבינוי מ-5' יחידות ומחלוקת לשני חלקים:

1. **הlibcאה:** חיבור הנוקלאוטידים וייצור ה-RNA, מרכיבת מרבע יחידות.
2. **סיגמא פקטור:** אחראי על הקישור הראשוני ל-DNA.

שלבי השעתוק:

1. **הסיגמא פקטור מחליק** לאורך ה-DNA עד ש מגיע לאזור ש מסמן את תחילת הגן. ברגע שהאזור נמצא נוצר קומפלקס גדול ויציב שככל גם עיות של DNA, כמו ביפוף. מחויבות לשעתוק.
2. **פתחת ה-DNA.** מבחינה אנרגטית ה-DNA יעדיף להישאר סגור ויש צורך לפתחתו בהשקית אנרגיה. כמו כן יש צורך שבפתחתה הגדיל הנכון יוכנס לקומפלקס של הפולימראז.
3. **הפולימראז מתחילה לנוע על גבי ה-DNA.** לעיתים הוא לא נaptops והולך הולך ושוב. רואים את זה באופן הבא: לוקחים פולימראז במחנה עם התנאים הדרושים, רואים שנוצרים בנוסח גדי RNA קצרים שהם בתחלת הגן. מכאן הבינו שיש התחלת, חזרה לנקודת ה-0, התחלת מחדש ושוב ושוב. לא ברור למה זה קורה.
4. **פרומוטור clearance** – הפרומוטור מסמן את תחילת הגן. ברגע שה-RNA הריאשוני עבר אורך מסוים, הפולימראז עוזב את אזור הפרומוטור ומתחילה השעתוק בקצב גבוה. שחרור של פקטור סיגמא.
5. **Elongation** – מספר אלפי בסיסים של הגן משועתקים עד הסוף.
6. לקראת סוף הגן, בשנרצה שהשעתוק יפסיק, יש רצף שיוצר לולאה (RNA פלינדרומי) ויש זיהוי של המבנה הזה ע"י פקטור נסף.
7. הקומפלקס מופרד.

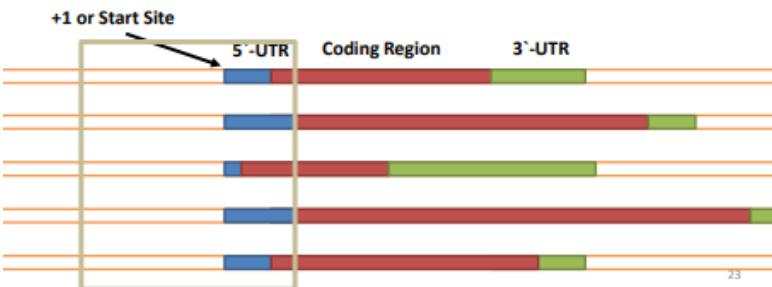


תחילת השעטוק

ישנם שלושה דברים שהפולימראז צריך לדאוג להם:

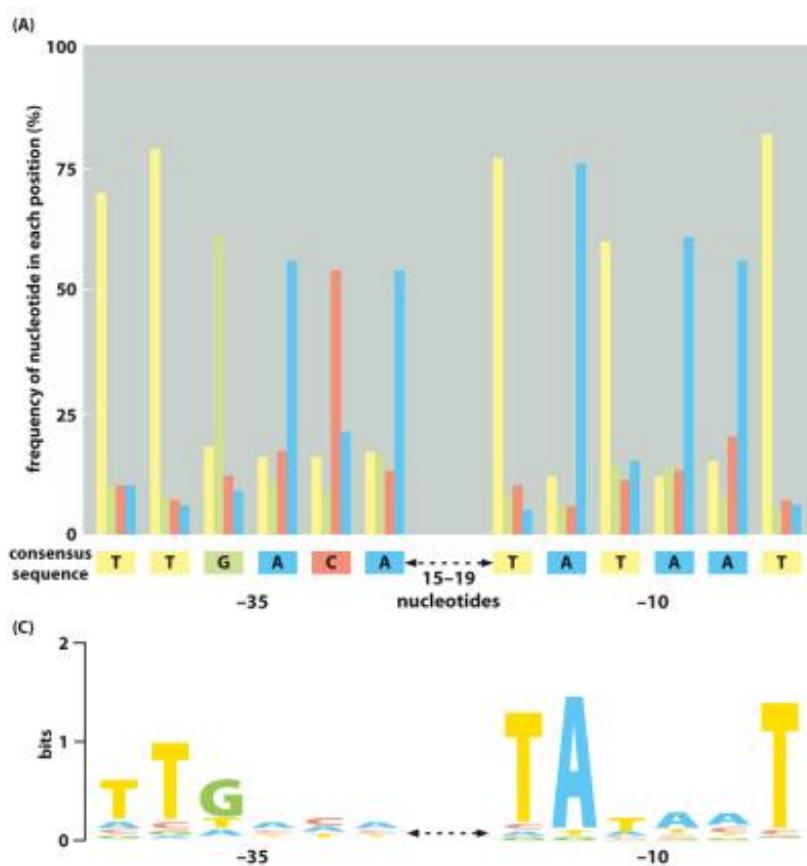
1. בתחילת הגן יהיו כל הרכיבים שקשורים לשעטוק (אצל פרוקריוטים – 5' חלבוניים, באאוקריוטים – מעל 100 חלבוניים).
2. ה-DNA צריך להיפתח כך שהסטרנד הנכון ייכנס לאתר הפעיל.
3. הקומפלקס היציב צריך לשחרר את הסטרנד.

מה קובע את תחילת הגן? יש שני אזורים **UTR'5'-UTR'3'** שהם לא חלק מהקובוד הגנטי של החלבון אבל הפולימראז יוצר אותם. אך תחילת הגן היא לא האזור המקודד.



הסתכלו על האזור הכהול (UTR'5') בבקטריות וראו שיש להם רצף משותף – 10-10' – בסיסים מתחילה ה-RNA שעובר שעטוק וראו שיש רצף מועדף שנקרא רצף TATAAT רצף באזור -35 וברק באזור -10. יש רצף משותף נוסף וזה הרצף TTGACA.

את אזורים אלה פקטורי הסיגמא מזהה.



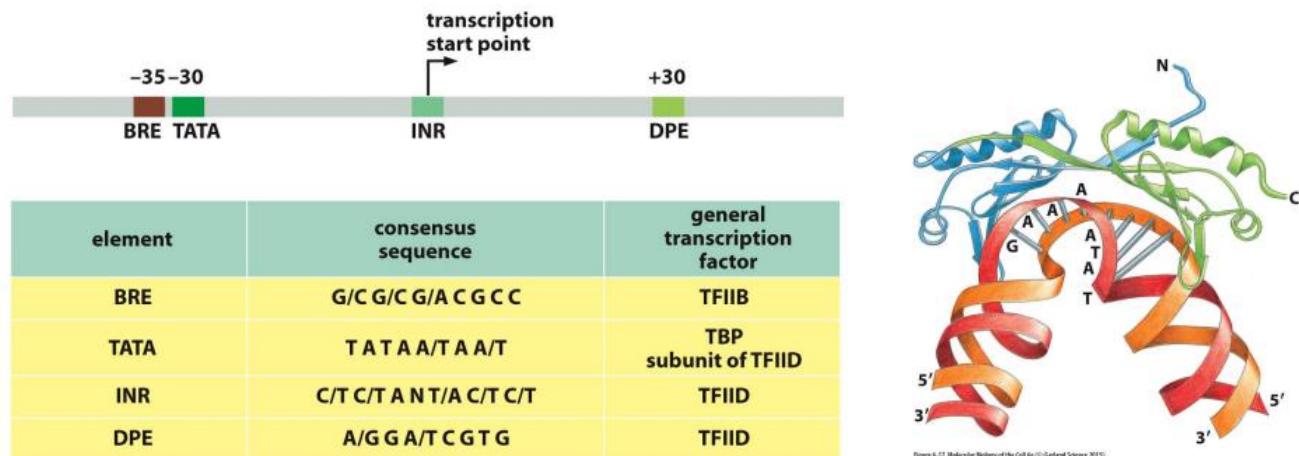
שעתוק באאקוּרִיטים**RNA פולימראז 1** – מייצרת RNA של הריבוזומים.**RNA פולימראז 2** – משעתק את RNA של כל הגנים. העיקרי.**RNA פולימראז 3** – בעיקר מייצרת RNA tRNA ויחידה קטנה של הריבוזום.**אזור הпромוטר באאקוּרִיטים**

בשימושים את אזור ה-UTR' 5' רואים שיש רצפים מסווגים:

- כמו בפרוקריוטים, יש את אזור ה-TATA, אבל הוא נמצא באזור 30-.
- יש בנוסף רצף שנמצא ב-start site שהוא רצף ההכרה שלו (INR?)
- רצף בתוך הגן בשם DP באזור 30+.
- אם יש אייזואהו אילוץ על הבסיסים, זה יכול להתנגש עם ח"א מקודדות, אז אם הקידוד מתחילה הרבה אחרי האזור חופשי.

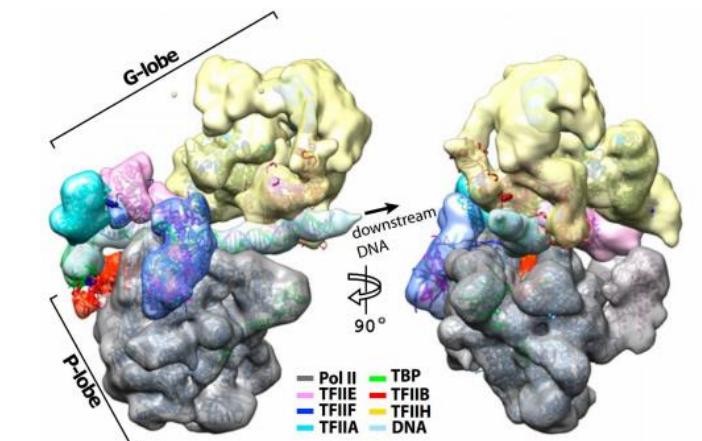
חלבן **TATA binding protein** (מקביל לSigma פקטור) נקשר ב-major groove של ה-DNA ויודע להיקשר חזק במיוחד לרצף הרצוי.

כמו כן, ל-A ו-T יש שני קשרים, ו-DNA שמורכב מהם יהיה יותר "רך" וזה יהיה אזור יותר כפיף. אז החלבן מכופף את ה-DNA ב-90 מעלות, החלבים אחרים מזהם את הכיפוף הזה ומתחילה מלהיקשר מסביב לאזור. גם באזוריים שבהם הרצף לא גבוה יש להם סיכוי להיקשר והסבירות עולמה.



בשעתוק אאקוּרִיטים דרושים **GTF – general transcription factors** ובלעדיהם לא יכול להיות שעתוק. קומפלקסים גדולים. ביחידים הפולימראז, זה הסט המינימלי הדרוש לשעתוק. (פירוט בעבלה בסוף) TF2H – פותח את ה-DNA.

הפולימראז מבנה גדול בעל 12 יחידות כאשר ביחידת הגדולה יש 400 ח"א. 200 מהח"א הנמצאות ב-C-טרמינל, הן יוצאות בתור אחר מהפולימראז. הרצף מורכב מחזירות של 6 ח"א ב-40-30 פעם. חלק מהח"א הן סרין וטירוזין שיכנות לעבר פוספורילציה (הוספה קב' זרחן) מסתובב שורק כאשר הקצה הזה עובר פוספורילציה השעתוק יכול להתחילה.



Architecture of an RNA Polymerase II Transcription Pre-Initiation Complex

Science, 2013
Kenji Murakami, Ann Eickbush, Nir Kalman, David A. Bushnell, Christopher R. Alm, Alvin Arribalzaga, Dorothee Strickland, Yael Levi-Kelmers, Ute Lüscher, Brian J. Gibbons, Michael Levitt, Roger D. Kornberg*

Structure of an RNA polymerase II preinitiation complex

PNAS, 2015
Kenji Murakami^{1,2}, Kaeng-Lai Tsai¹, Nir Kalman², David A. Bushnell², Francisco J. Asturias¹, and Roger D. Kornberg^{1,2}

אחר כך מנתחים את התוצאות ובונים מודל לפיהם ובראו איפה נמצאים חלבונים מסוימים.

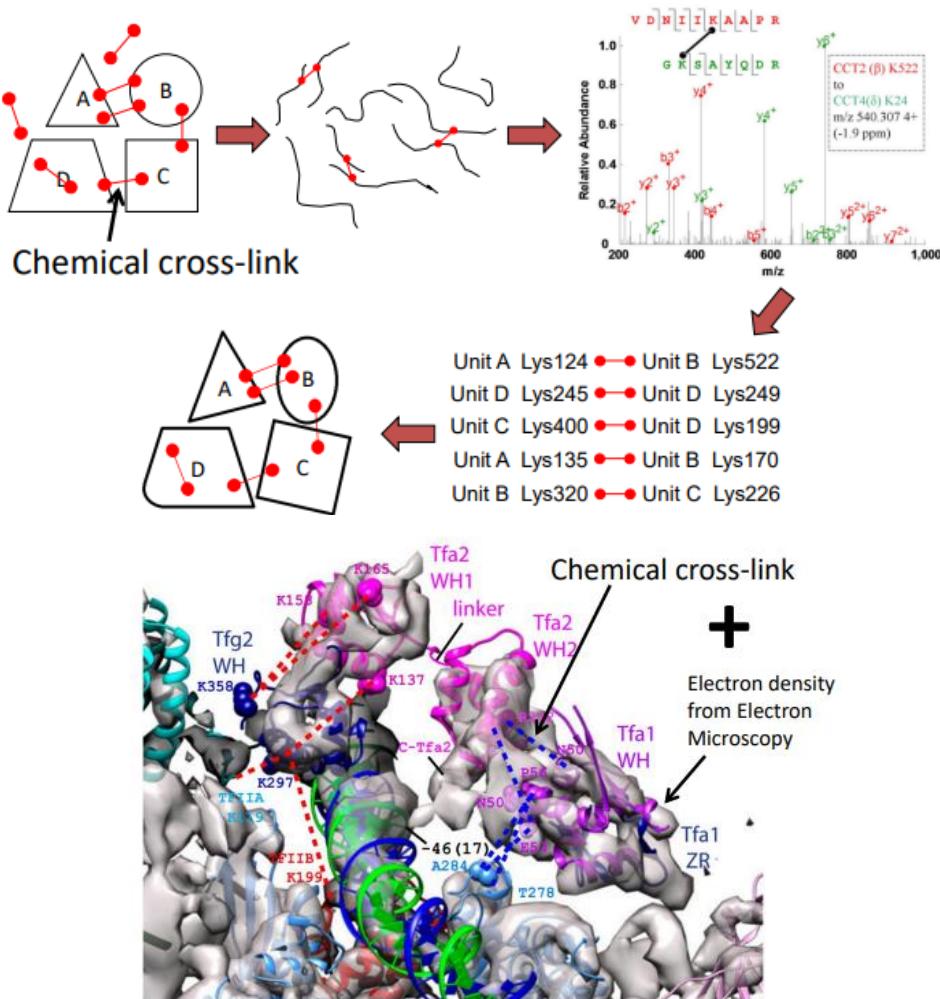
איך ה-DNA נפתח בשלב של השעתק?

גilio מונה ע"י הרכבה של מעטפת החלבונים באמצעות מיקרוסקופיה אלקטرونית, והיתר באמצעות טכניקת S-MS-XL:

שים קצווות דיאקטייביים שיכולים לתפוס חלבונים שונים הקיימים. מפרקים את החלבונים ומקלים פפטידים קצריים שחילק קשורים אחד לשני עם ה-cross-linker.

מכנים ל-MS וועושים אנליזה. נוצרת רשימה של cross-linker שמעידה על חלבון ההתחלה וחלבון הסוף וכן על מהי החומרה האמינית שבאה בראשה. cross-linker

התוצאה היא רשת קישוריות שבאה כל נקודה אדומה זה נקודות רחוקות במקס' לפני ה-linker-cross.



Helicase – נכנס אליו ATP והוא הולך לאורכו גן. ידוע שההלייקאז פותח את ה-DNA אבל לא ברור איך. באמצעות הטכניקה גלו שה-DNA מוחזק באזור ה-TATA עם ברzel. במקרה יש את ה helikazz שמחזק אותו. לא הבנתי שאר ההסביר, לחזור לה.

אלמנטים נוספים בשעתוק

אנהנסרים ופרטסרים

חלבונים שנמצאים ליד תחילת הגן והתפקיד שלהם או לחזק או לדכא את השעתוק, חלק מהקומפלקס שנוצר. **Mediator** אוסף סיגנלים מהאזור ומחייב האם לאפשר לפולימראז להתחיל בשעתוק או לא.

Chromatin remodeling complex

ה-DNA ארוך בקומפלקס חלבוני שנקרא נוקלאוזום. כאשר הנוקלאוזום נמצא בפרומוטוור, כלומר ה-TATA מלופף בנוקלאוזום, פקטוריים לא יכולים להתחבר ולא יוכל להתחיל לעבור שעתוק. נctrיך קומפלקס נוסף שירחיק את הנוקלאוזום ויחשוף את האתר של TATA לקישור של הפקטוריים.

השם שלו הוא **chromatin remodeling complex**. התחיל הזה דורש אנרגיה. פירוט בפרק של הברומטין 

יעבוד RNA

יש זנב לkaza ה-C טרמינלי לייחידה הגדולה של הפולימראז, ורק כשהוא עבר פוספורילציה ע"י אחד מה- σ -TF של השעתוק, מתחילה הפולימראז לשעתוק.

הפוספורילציות הן בעצם סיגנלים לחלבונים שקשורים לעיבוד ה-RNA.

כבר בזמן השעתוק חלבונים שהתקיים שלהם לעורק את ה-RNA, נקשרים לזרב קרוב ליציאה של ה-RNA והם במקומות מסוימים מושלים להתחיל את הפעולה שלהם. יש אנדומים ששומר על הקזה כדי שלא יתפרק, ויש אלמנטים נוספים שמתחלים לעשות את העריכה של ה-RNA עוד בזמן שהוא על הפולימראז. דבר על זה בהמשך.

Super helical coiling

כאשר ניקח DNA ונקשרו אותו בצורה חזקה בצד אחד ואת הקזה השני נסובב סביב עצמו, נראה שנוצרות לוולאות (עמ' 41). הלולאות מסובכות את ה-DNA. מה ההשפעה של זה על שעתוק? (עמ' 42) אם נסתכל על DNA ארוך ועל הפולימראז שזויה מולקולה כבדה מאוד הפולימראז בעצם רץ קדימה על גבי ה-DNA ומסלך את כל הנוקלאוזומים שיש ונוצרים ליפופי על. יש קומפלקסים חלבוניים בשם טופו-איזומරזות שימושנים את הטופולוגיה של ה-DNA ומאפשרים לשני גידלי DNA לעבור אחד דרך השני ומשחררים את הלולאות. לא חשוב כל כך ל מבחן בנראה.

TABLE 6–3 The General Transcription Factors Needed for Transcription Initiation by Eukaryotic RNA Polymerase II

Name	Number of subunits	Roles in transition initiation
TFIID TBP subunit TAF subunits	1 ~11	Recognizes TATA box Recognizes other DNA sequences near the transcription start point; regulates DNA-binding by TBP
TFIIB	1	Recognizes BRE element in promoters; accurately positions RNA polymerase at the start site of transcription
TFIIF	3	Stabilizes RNA polymerase interaction with TBP and TFIIB; helps attract TFIIE and TFIIH
TFIIE	2	Attracts and regulates TFIIH
TFIIH	9	Unwinds DNA at the transcription start point, phosphorylates Ser5 of the RNA polymerase CTD; releases RNA polymerase from the promoter
TFIID is composed of TBP and ~11 additional subunits called TAFs (TBP-associated factors); CTD, C-terminal domain.		

Table 6-3 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

30

תרגול 3**Cloning**

נתונים שני פלסמידים – אחד מכיל GFP והשני מכיל mCherry, שני חלבונים פלורנסנטיים. נרצה להחליף בין שני החלבונים.

אנזימי רסטריקציה – כמו EcoR1, חותך DNA באתרים ספציפיים (פולינדרומים וכו'). קיימים שני סוגים:

1. Steaky ends
2. Blond ends

היתרון של הסטיקי אנדס הוא שהם מאפשרו סpecificities שנובעת מהקהצה שלהם וההתאמה המרחבית לצירזה של קשרי מימן. במקרה דומה עדיף חיתוך באמצעות שני אנזימים. למה? התשובה היא מניעה שהמקטע יכנס בכיווניות לא רצiosa, הרि הרצף הוא פלינדרום.

תזכורת – Cloning

פלסמיד – DNA מעגלי שנמצא בתוך חיידקים ומכיל פחות גנים מה-DNA הגנומי של אותו חיידק. ניתן לחבר בין ה-DNA וה-DNA שאחנו מעוניינים בו ע"י אנזימי רסטריקציה, להכניס את הפלסמיד לבakterיה שמשכפלת את עצמה וכך גם ה-DNA משתכפל.

- איך נודא שלקחנו את החידקים הנכונים עם ה-DNA הרצוי? בתוך הפלסמיד יש מקטע של עמידות לאנטיביוטיקה, וכך נעשה סלקציה בין החידקים עם הפלסמיד ובל'.
- האם הוכנס המקטע הרצוי לחידק? **כן מדווח** – בהכנתה המקטע לתוך הפלסמיד, הוא אמרור להיכנס במאצע הген מדווח ואז הגן לא יפעיל. למשל במקרה Z lac -lacZ – בשיש את הген נראה צבע בחול, אך בשנןיס את ה-DNA לא יהיה את הגן והמושבות של החידקים יהיו לבנות.

איזה אלמנטים צריכים להיות בתוך הפלסמיד?

Inserted gene – המקטע שנרצה להגדיל.

Original replication – נקודת התחלת השכפול.

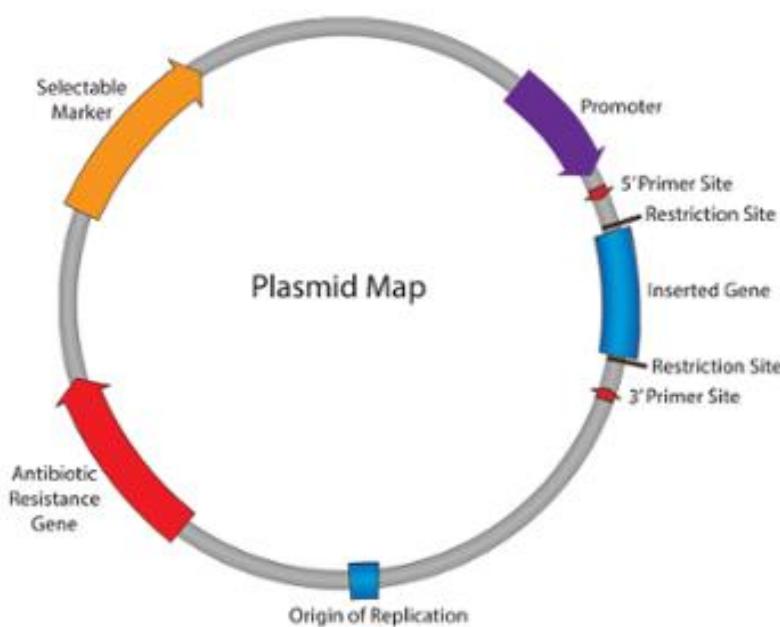
Promotor – אפשר לבטא את הגן.

Selectable marker – אם למשל

נרצה להכניס את הגן לבני אדם,

נרצה לדעת אם הפלסמיד נכנס

גם לתאים האנימליים. גם סוג של גן מדווח.



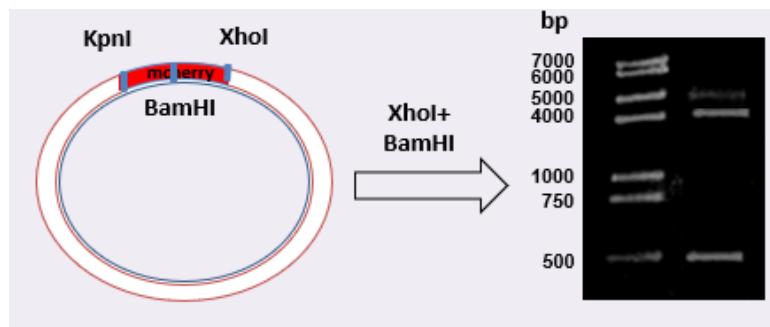
יש שני אנזימי רסטריקציה לכל גן שנרצה להחליף.

מהם שלבי הניסוי?

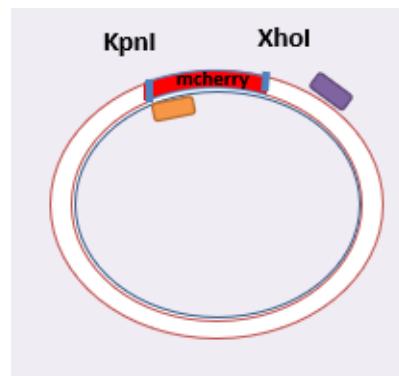
1. הכנסת אנדימי רסטוריקציה וחיתוך באמצעותם.
 - למה הפלסמיד לא נסגר על עצמו? שני אנדימי רסטוריקציה שונים ואלו לא אותם בסיסים בקצתות.
 - למה הפלסמיד לא מתחבר מחדש למקטע? הקשרים הקווילנטיים נותקו וכדי לחברם מחדש יש צורך באנזים ליגאז שיחבר אותם בצורה יציבה.
 - נשים לב שנעדיף את ends-ends כזאת יותר חזק.
2. בידוד של המקטע הרצוי באמצעות הרצה בגל. ניתן לבדוק את הפלסמיד ומהקטע זה ע"י אלקטrophורזה ולהפריד אותו בעצמו לפי גודל.
3. ניקוי הפלסמיד הליניארי והמקטע הרצוי מהgel. ביצוע שלבים 3-1 עבורי הפלסמיד השני.
4. ריאקציית ליגציה לחיבור המקטעים לפלסמידים.

איך נוכיח שהמקטע אכן נבנה?

1. שימוש באנדימי רסטוריקציה – יתכן שבתוך המקטע הרצוי יש עוד אתרים רסטוריקציה נוספים לחיתוך עם שני אנדימי רסטוריקציה *Xba*I ו-*Bam*HI.

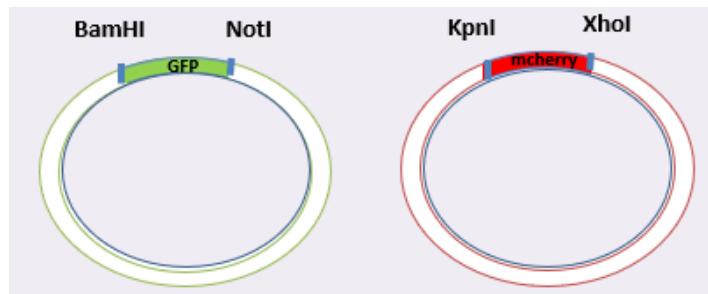


2. PCR – אם נדע את אורך המקטע והרצף שלו, בהגברת המקטע, אם מקבל את האורך המתאים זה אומר שנבנה המקטע. נוסף פרימר שהוא על תחילת המקטע.



3. ריצוף הפלסמיד והסקה על המקטע.

ניסוי 2 – באשר לפלסמידים אין את אוטם אתרי רסטריקציה.
הם לא יתחברו אם ייעשה אותו תהליך כמו ב-1.



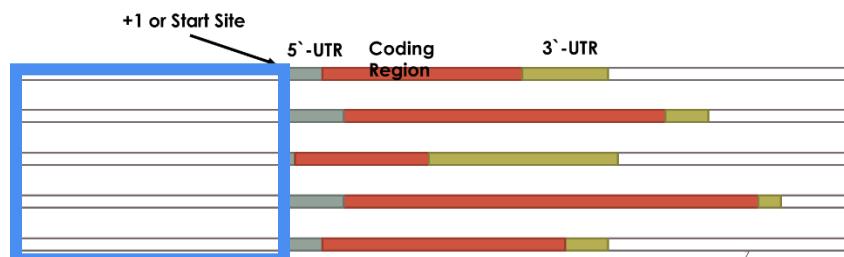
נרצה להכניס ל-GFP את אתרי הרסטריקציה שיש ב-mCherry, אבל הקצוות הם לא אותם קצאות.
בעזרת PCR ניתן להוסיף מוקטע ספציפי, בנוסף להגברה, דברים בקצוות.

1. בידוד הווקטור (כמו הניסוי הראשון)
 - א. מפרקים את המקטעים מהפלסמידים ע"י חיתוך עם אנדיימי רסטריקציה מתאימים.
 - ב. בידוד הפלסמיד באמצעות הרצתה בגל.
 - ג. ניקוי המקטע הרצוי מהgel.
2. PCR – תזכורת:
 - דנטורציה ל-DNA לפירוק הדו גדיל.
 - חיבור פרימרים (במקרה זה שמתאים לקצאות של ה-GFP וdone).
 - אלונגציה – הגברת המקטע עם הכנסת DNA פולימראז.
3. חיתוך באמצעות אנדיימי רסטריקציה.
4. הוספה של המטע לפלסמיד בנוכחות של ליגאז.
5. וידוא שזה הוכנס.

שעתון

קורה מקצה 5 ל-3 של הגדיל של ה-RNA.
יש גנים בהם הגדיל התחתון משועתק ויש גנים בהם להפוך.
למשל, אם נשכפל את הגנים c ו-g, אז ה-template הוא הגדיל התחתון.

mRNA-הרכב – Coding region – מה שמתרגם לחלבון.
UTR – קצאות שלא מתורגמים. בתחילת ה-5' UTR יש את ה-site start. הלבן לפני זה הפרומוטור.



- רצף קונצנזוס 10-.
- מה קורה באשר מערבים מקטע DNA בעל הרצף קונצנזוס 10 עם RNA פולימראז?
- RNA פולימראז לא נקשר לרצף.
- רצף קונצנזוס 35- נחוץ בשבייל קישור ראשוני של ה-RNA פולימראז.
- האם המרווח בין רצף 35- לבין רצף 10- הוא חשוב?
- הרצף זהה לא שמור, הוא לא קונצנזוס, אבל גילו שהאורך של ה-spacer חשוב.

Foot printing – שיטה יסנה שבמגע לא בשימוש. מאפשרת לדעת היכן קרתה אינטראקציה בין חלבון לבין DNA. הכנסת DNase לתמייה שמנפרק ה-DNA והיכן שמחובר החלבון לה-enzyme לא יכול לרצוף אלא ולא נראה את המקטעים האלה בהרצתה בgel.

שעתוק בפרוקריוטים

בהכנסת מוטציה לאזור 35- יש פגיעה בקיישור הראשוני של הפולימראז. בהכנסת מוטציה לאזור 10- יש השפעה על ריאקציית התגובה שמיירה את הקומפלקס ממצב סגור למצב פתוח.

ה-RNA פולימראז מתחבר לפקטור ס שנמצא רק בפרוקריוטים. מתחברים ומחלקים ביחד על גבי ה-RNA באינטראקציות לא ספציפיות, וכך אשר נמצא האזור 35- הוא מתחבר אליו באופן ספציפי. בחיבור קומפלקס זה ל-DNA, השלב הבא זה פתיחת ה-DNA והפולימראז מתחילה לשעתוק גדלים קטנים ומשתחרר RNA קצר עד שיש איזשהו לחץ שמאפשר את המשכת השעתוק כדי שהפולימראז וה-ס פקטור ישחררו והפולימראז ימשיך לנوع על גבי ה-DNA ולשעתוק אותו. התהליך נמשך עד שmagיעים לטרמינציה, לאייזהו אתר שגורם לבניה שנינוי ב-RNA ולפירוק הקומפלקס.

שעתוק באואוקריוטים

- בפרומווטור של האואוקריוטים יש יותר אזורים חוץ מה-35- וה-10-.
- אקסונים ואיינטונים לא מופיעים בפרוקריוטים.
- אזורים של אנהנסרים ואקטיבטורים.
- RNA פולימראז יחיד בפרוקריוטים, ואילו במטה סוגים באואוקריוטים.

הרבה פקטורי שעתוק שעוזרים לתחילהו.

הΖבב הssi טרמינלי של RNA פולימראז עובר פוספורילציה ועובד לעיבוד של RNA. כיפוף של ה-DNA בקיישור של TATA שמסמן לפקטורים לבוא לאזור ולהתחיל שעתוק. יש אזורים של אנהנסרים שמחברים חלבונים אקטיבטורים שיוכלים להגבר את השעתוק. חלבון מתווך של כל הפקטורים.

גנים מדוחים – גן שמוכנס לניסוי שונה לנו מידע מסוים, לדוגמה:

1. היכן חלבון מבוטא בתא?
2. לדעת על פרומווטר מסוים על זמני הפעולות שלו.

בקרה של שעתוק

שלבי הבקרה

יש ארגניזמים מסווג מסוים בהם בעלי אותו קוד אбел נראים אחרת. בעצם כל תא עברו אותו קוד מייצר סט אחר של חלבונים.

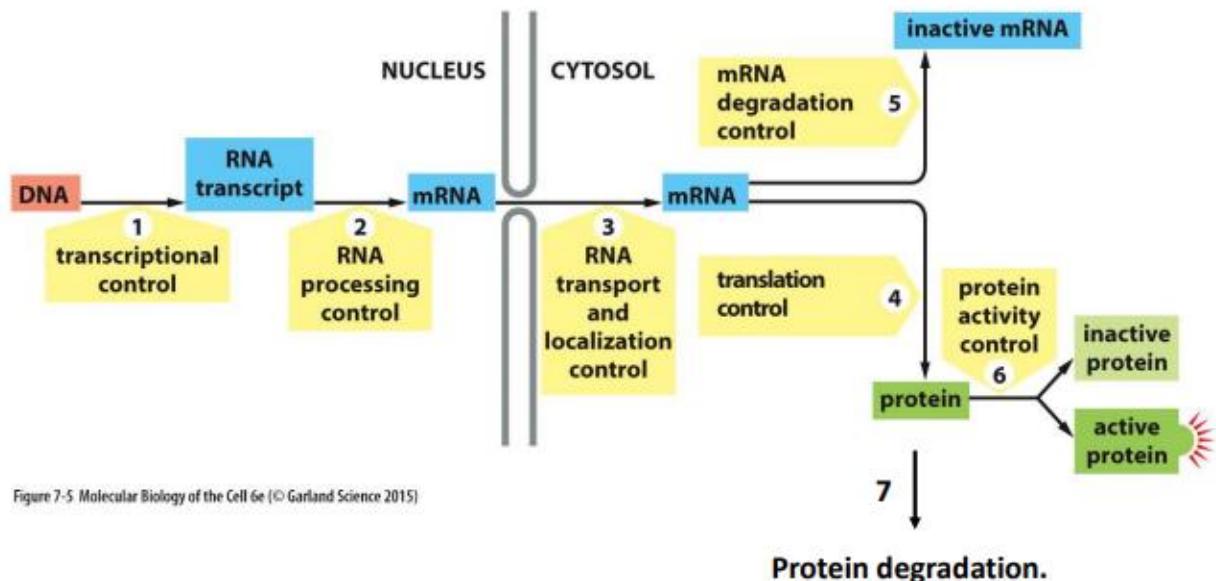
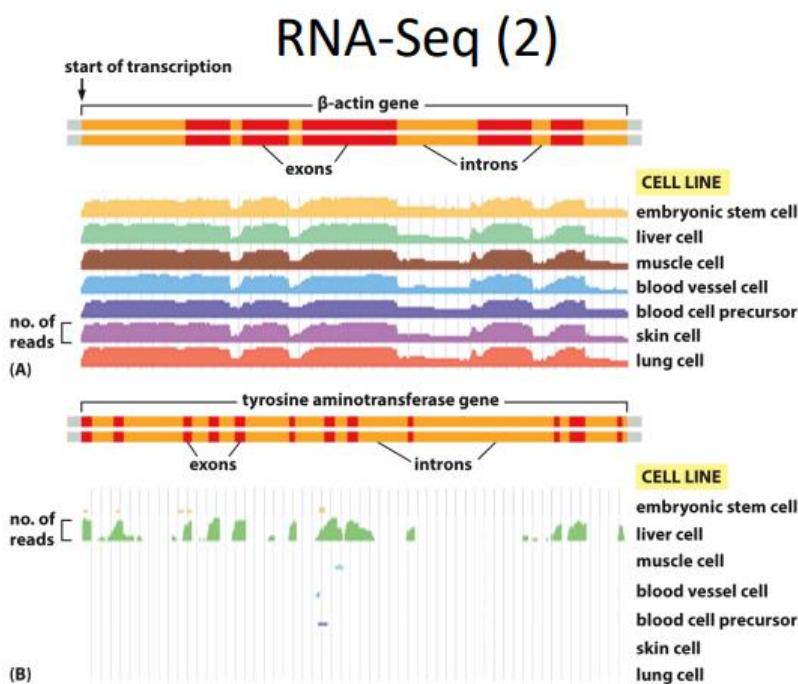


Figure 7-5 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

השלב הבci דומיננטי עם ההשפעה הבci גדולה יהיה שלב 1, המעביר מ-DNA ל-RNA.
אם נדע מה ההבדל בין ה-DNA לבין התוצר של שלב הראשוןណ' בדעת איזה שינויים קרו ומה שועתק.



הדרך שבה ניתן לבדוק את שלב זה היא **RNA-seq**: באמצעות אנזימים להפוך את ה-RNA ל-DNA, קריאת רצף שמקורה בעצם הוא ה-RNA. את רצפים אלה ניתן להשוות לרצף של ה-DNA.

דוגמה בעמ' 4: RNA של אקטין, חלבון המרכיב את השלד של התא. בכל שיש יותר RNA הגורף בעמ' 4 יהיה גבוה יותר. ניתן לראות שבכל התאים, לא משנה מאייזו ורקמה, לכולם יש RNA של אקטין. ככל מרבית האקטין כל הזמן עובר שעתוק.

אחר כך מסתכלים על האנזים טירוזין וברוב התאים האנזים הזה לא מבוטא, אלא רק בתאי BBB.

Figure 7-3 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

משוואת היל – כמה חזק הפקטור נקשר?

כדי לבחמת ולהפין את חזק הקישור של פקטורי מסוים, נרצה להבין:

1. איזה אחוז מאתרי הקישור בגדייל קשור ברגע נתון?
2. בהסתבל על אתר קישור אחד, נרצה לראות על ציר הזמן מתי הוא קשור.

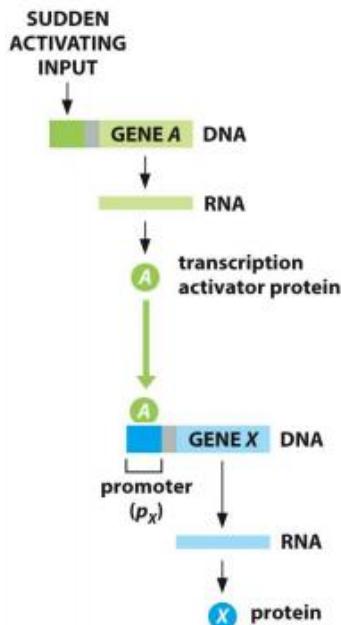
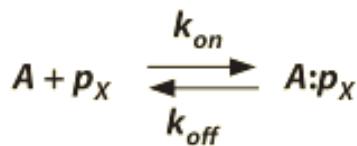


Figure 8-72a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



$$\text{rate of complex formation} = k_{on}[A][p_X]$$

$$\text{rate of complex dissociation} = k_{off}[A:p_X]$$

p_X – פרומוטר לא A
 A – חלבון חופשי
 $[A:p_X]$ – קומפלקס חלבון

מה משפיע על הקישורה של A?

1. חזק הקישור – ככל שיש יותר קשר מימן שמדביקים את A לפרומוטר קצב התפרקות הקומפלקס יהיה קטן יותר $.k_{off}$.
2. ריבוץ החלבון.

במה תלוי הקצב שבו הקומפלקס נוצר והקצב שבו הוא מתפרק?

- קצב פירוק הקומפלקס – תלוי ברכיב הפקטור, ככל שיש יותר A יש יותר סיכוי שהוא יווצר, וכן תלוי ברכיב הפרומוטר.

$$\text{rate of complex formation} = k_{on} \cdot [A][p_X]$$

- קצב הייצורות הקומפלקס – ברכיבי מסוימים של פרומוטרים שדבוק אליהם A בטמפרטורה קבועה, אך k_{off} תלוי ברכיב הkompleks. ככל יותר הזמן בו הקומפלקס נמצא.

$$\text{rate of complex dissociation} = k_{off} \cdot [A:p_X]$$

מה קורה ב-?steady state

בשיהם מערכת בשינוי משקל, קצב הייצורות וקצב הפירוק חייבים להיות שווים. לכן נוסחה 1 תהיה הנוסחה הבאה:

at steady state:

$$k_{on}[A][p_X] = k_{off}[A:p_X]$$

$\frac{k_{off}}{k_{on}} = K$ מתאר את האפיניות, כמה חזק הקומפלקס קשור.

$$[A:p_X] = \frac{k_{on}}{k_{off}} [A][p_X] = K[A][p_X] \quad \text{Equation 8-1}$$

נוסחה 2: לפי חוק שימור המסה.

במota הפרומוטרים הכלליות היא במota הפרומוטרים הלא קשורים ובמota הפרומוטרים הקשורים.
נבודד את p_X ונציב בנוסחה 1 ומשם נגיע לנוסחה 3 – משוואת היל.

$$[p_X^T] = [p_X] + [A:p_X]$$

substituting $[p_X]$ from the above equation into
Equation 8-1 yields:

$$[A:p_X] = K[A]([p_X^T] - [A:p_X])$$

$$[A:p_X](1 + K[A]) = K[A][p_X^T]$$

$$[A:p_X] = \frac{K[A]}{1 + K[A]} [p_X^T] \quad \text{Equation 8-2}$$

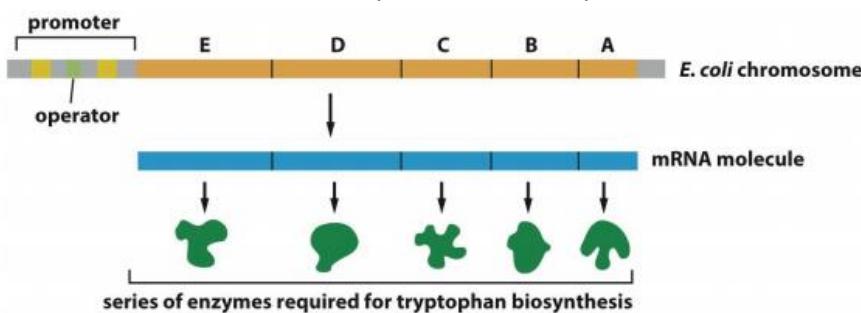
$$\text{bound fraction} = \frac{[A:p_X]}{[p_X^T]} = \frac{K[A]}{1 + K[A]} \quad \text{Equation 8-3}$$

המשוואה מציגה קשר בין האפיניות לבין הריבוז של A .

- כאשר $\frac{1}{K} = [A]$ נקבל שחייב מהרצפטורים קשורים, וזה איזשהו מודד ל- K .
- כאשר דרישים שני פקטוריים מסווג A כדי להיקשר, קבוע k_{on} יהיה תלוי בפעמיים הריבוז.

דוגמה 1 – סינתזת טריפטופן Tryptophan בבקטריה

על מנת לייצר את החלבון טריפטופן בבקטריה נדרשים מס' אנדמיים שמייצרים כולם ביחד. יש להם פרומוטר אחד שקובע אם יש שעותוק או לא, ברגע שיש שעותוק הפולימראז פועל ולאחר מכן פרוטיאה חותך את הפליפטיד שנוצר לחמישה חלבוניים נפרדים. מה היגיון? שימור וחסמים בין החלבוניים, אם אחד לא משתמש גם השאר לא.



הפרומוטר שמאפיין את השעתוק נקרא אופראן. על אזור הפרומוטר בין איזור-TATA לאיזור-shine-D�� קיים אתר קישור לחלבון שעושה רפרסיה לתהילך – בשעה קשור, הפולימראז לא יכול להתיישב על גבי ה-DNA. נרצה שאינדייקציה לרמות הטריפטופן בתא, תקבע את קישור החלבון זהה ל-DNA (מעט טריפטופן, נרצה שהחלבון ירד מהגדייל – ולהפסיק).

אם נסתכל על משווהת היל, A, מייצג את ריבוז הרפרסור בציגו פלזמה של החידק. K מייצג את חזק הקשר של A לפרומוטר. כאשר טריפטופן נקשר אל הרפרסור, בלומר כאשר יש הרבה חלבון זהה, ה-K יעלה. אידיאלית נרצה שמאה אוחז מזמן יהיה קשור הרפרסור ל-DNA.

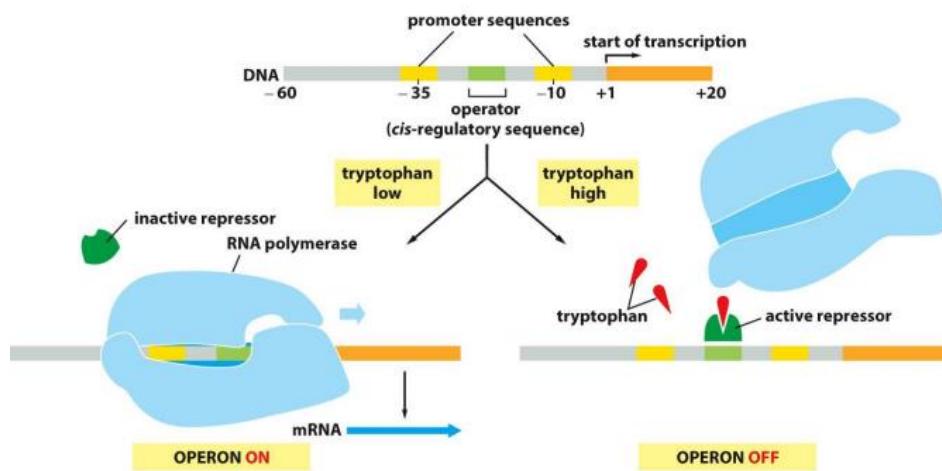
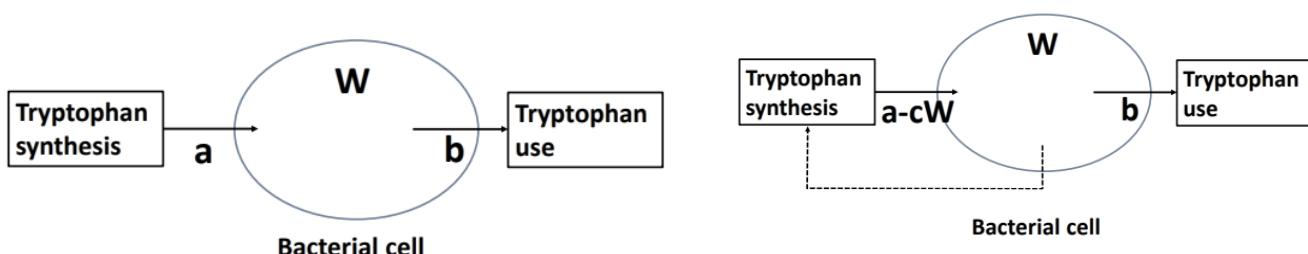


Figure 7-13 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

למה נצורך את הבקרה הזאת? הרבה משאבים מושקעים בכך. אם לא תהיה המערכת הזאת, נשנוץ בבקטריה הרבה טריפטופן. אם נסתכל על הדיאגרמה, נכנס טריפטופן בקצב a וויצא בקצב b. השינוי בקצב b יהיה b-a. (צד שמאל) אם a גדול מ-b, הבקטריה יוצרת טריפטופן שאין לה צורך בו ומכליה את המשאים שלה. لكن יהיה צורך במשוב – שינוי בקצב ייצור הטריפטופן בהתאם לריבודו של b. (צד ימין) c יהיה קבוע שכן הוא קשור בין ריבוז הטריפטופן לבין מנגנון הייצור – קשר לינארי. נקבע לפי משווהת היל. במצב היציב אין שינויים, הנקודות מתאפסות. כזה, ה-K יעלה. אידיאלית נרצה שמאה אוחז מזמן יהיה קשור הרפרסור ל-DNA.



$$\frac{dW}{dt} = (a - b)$$

$$\frac{dW}{dt} = ((a - cW) - b)$$

$$W(\infty) = \frac{a - b}{c}$$

דוגמה 2 – Lac operon

מסנתז אנזים שմפרק לקטוז.

ברצח שבי תנאים לפעולות הган:

1. הган יעבד רק אם יש לקטוז.

2. העדפת מטבוליזם על גלוקוז מאשר על גלוקוז:

אם יש גם גלוקוז וגם לקטוז נעדיף שלא יהיה שעתוק והבakterיה תעבור על הגלוקוז.

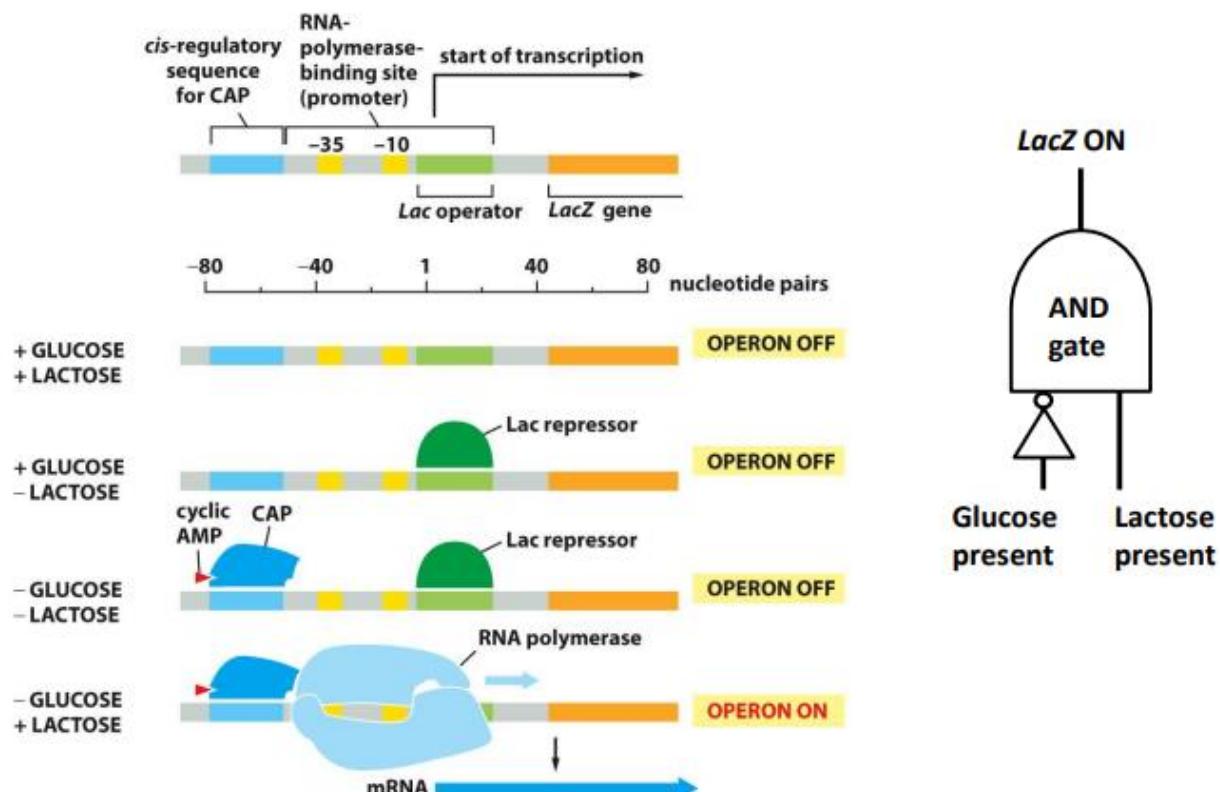
רק אם יש לקטוז ואין גלוקוז יהיה שעתוק.

יש רפרסור שנקשר כאשר אין לקטוז וחוסם את ה-DNA והפולימראז לא יוכל לשבת ותחילה את השעתוק.

הלקטוז מוריד את ה-K של הרפרסור.

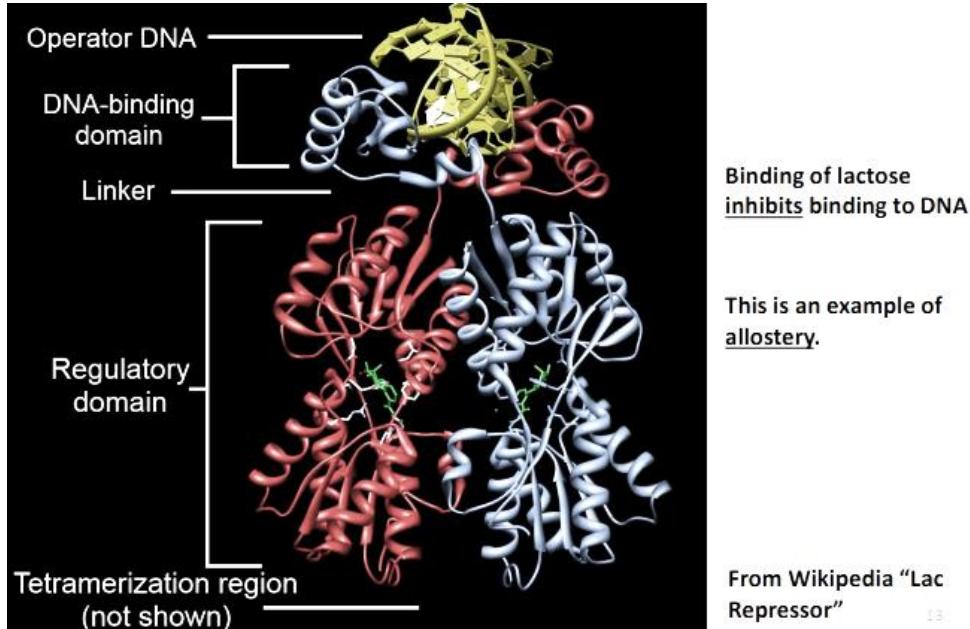
אבל הפרומוטר של הган הוא חלש, ובתוצאה מכיר הפלימראז לא ייקשר באחויזים גבוהים מהזמן ונctrור פקטור נוסף בשם CAP **שמעלת האפיניות של הפלימראז ל-DNA**. הפקטור נקשר לאזור ליד הפרומוטר בעל אפיניות גבוהה לפולימראז, מגיס את הפלימראז לאזור זהה, ובאשר הפלימראז נמצא מספיק זמן מבחינה כימית ליד האזור זהה, הסיגמא פקטור מזהה את האזור של הפרומוטר ומתחילה את השעתוק.

קישור ה-CAP מושפע ע"י cyclic AMP **שאם אין הרבה גלוקוז הריבוז של המולקולה עולה, יותר קישור של המולקולה ל-CAP**.



מבנה קריסטלוגרפי של הרפרסור:

- צחוב – DNA. ניתן לראות ש- Lac repressor-ORI בנוי משתי יחידות שיוצרות קומפלקס שקשר את ה-DNA ולבסוף אחד יש linker ליחידה יותר גדולה.
- ניתן להגיד על הרצף שה- Lac repressor פלינדרום כי יש שתי יחידות שנקשרות בסימטריות ב-180 מעלות.



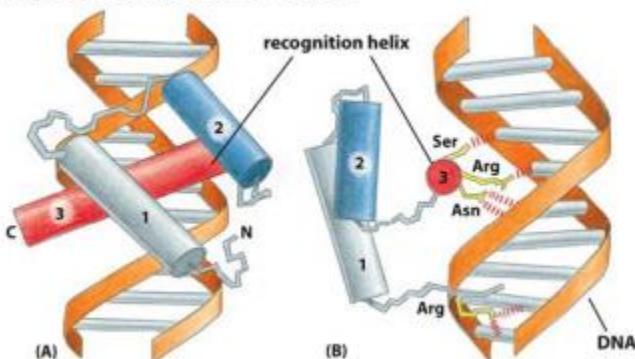
נרצה שהרפרסור יהיה מושפע מריבוץ הלקטוז בתא, ולכן ניתן לראות שמדובר רחוק מאוד מה- DNA. **דוגמה לאלוסטריה.**

גורמי שעתוק

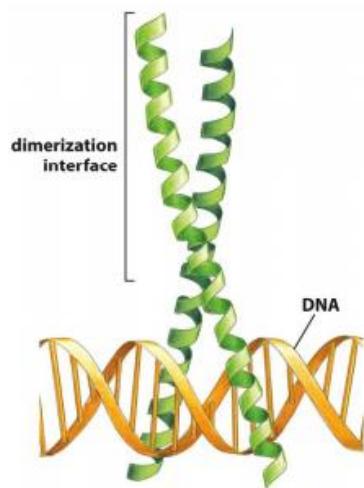
חלבונים שנקשרים ל-DNA ועושים איזושהי פעולה שקשורה לאזור אליו הם נקשרים.

סוגים של גורמי שעתוק:
Homeodomain proteins – חלבונים עם שלושה הלייקסים, ההליקס השלישי נכנס ל-major groove ונקשר לבסיסים. נצפה לראות אינטראקציות לא ספציפיות בין-ו-ו, כאשר הלייקס 3 הוא הלייקס בו יש **שינוי ספציפי**ת לגורם השעתוק אליו הוא נקשר ומהזה אלמנטים ב-major.

HOMEODOMAIN PROTEINS



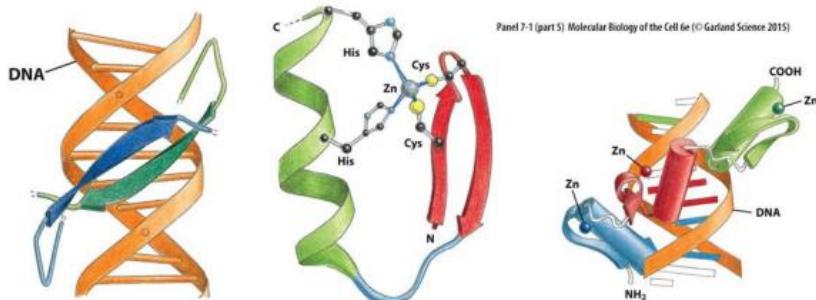
LEUCINE ZIPPER PROTEINS



Leucine zipper proteins

dimor של שני חלבונים. כל אחד מהם הוא הליקס ארוך וביחד הם יוצרים מ-
טוויסט באשר הקצה הוא שני הליקסים שנכנסים כל אחד ל-major וקוראים
אותו.
רכף ההברה שלו יצרך להיות פלינדרום, לעומת המות-homeodomains.

Zinc finger
מורכב מהליקס -hairpin (קיפול חלבוני) שקשרורים אחד לשני עם יון של אבץ ואז הולאה הזאת יכולה להיבנות
ל-major.



נסתכל על ה-major ויש לנו ארבע אופציות להברה :

1. קבלת קשר מימן.
 2. קבלת קשר מימן ויחסית שלילי.
 3. הידרופובי.
 4. תרומה לחבר קשר מימן.
- ולhalbונים יש רצפים שיכולים להתאים רק לאלה.

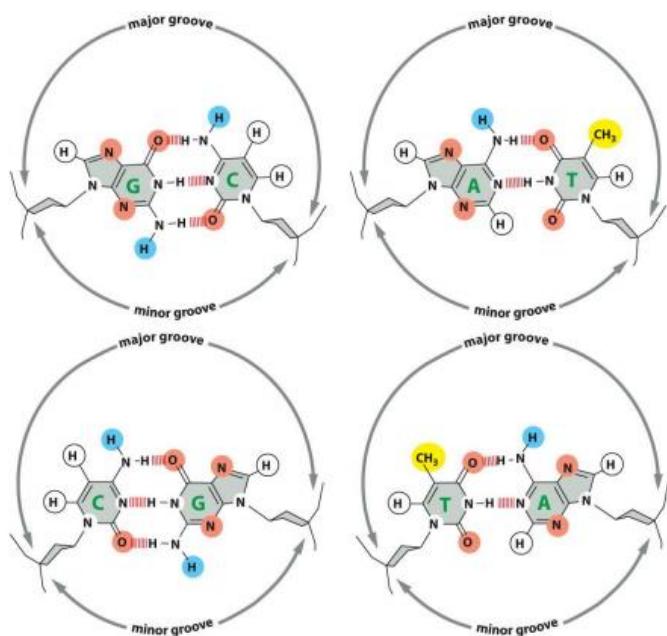
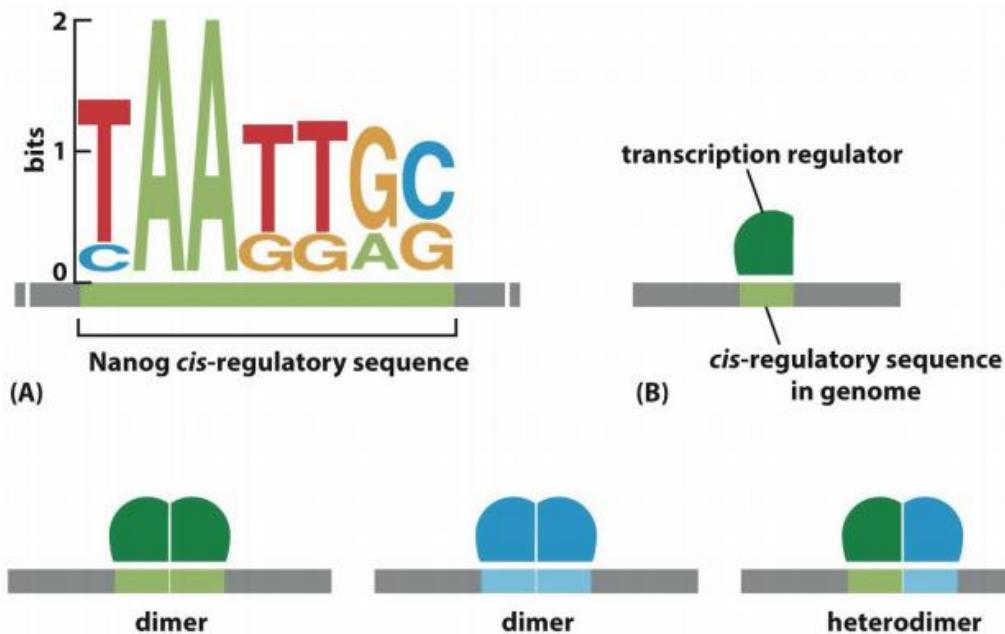


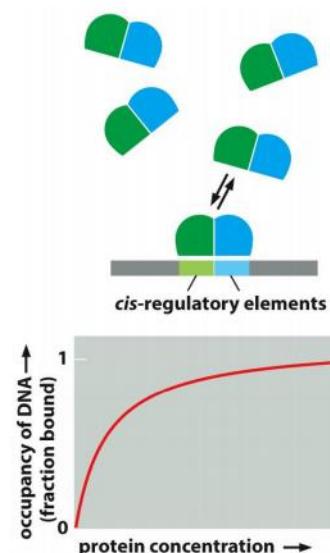
Figure 7.7 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

קואופרטיביות בין פקטורי בקרה

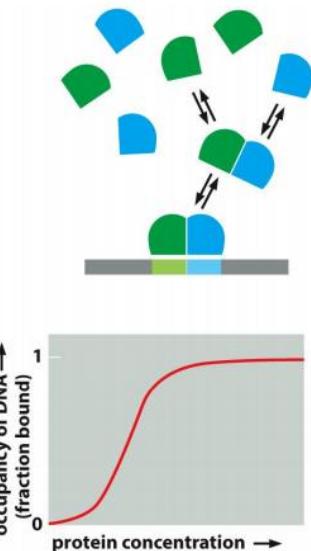
נסתכל בדוגמה על חלבון שידוע לזהות 6 בסיסים באופן מושלם, seh"ב הרצף מאד קצר, ואם נסתכל על הרצף, הוא קורה פעמי-⁶ בסיסים. ככלmor הוא יופיע מאות או אלפי פעמים. אז גם אם יש לנו הברה מאוד ספציפית, אם האורך לא יהיה ארוך גורם השעוטוק יהיה פחות עיל. יתרון שהוא ישמש בדימרים כדי לשכפל את הרצף הזה.



אם האפיניות בין שני חלבונים (הירוק והכחול) היא מאוד גבוהה כך שגם תמיד בתא ביחד, אך במקרה של היל נתיחס לריכוז הדימר, ככלmor לשני החלבונים ביחד. זאת תהיה משווהת היל מסדר ראשון.



אם החלבונים צריכים לעبور אינטראקציה לפני שהם נקשרים ביחד על ה-DNA, זה ייראה כך. יש במודל זהה עמידות לרשות סטטיסטי של ריבוז גורם השעתוק. ברגע שיש קצת גורם שעתוק בבר ייש הפעלה של המשך התהילר. יש כאן סף, ורק בשנубור אותו תהיה עלייה גבוהה בקשרו.

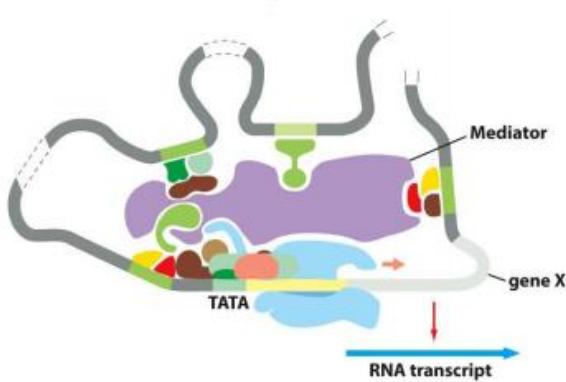


כאשר יש פעולה של פקטורי שעתוק בלבד, התוצאה תהיה גבוהה יותר מסכום הפעולות של שניהם בנפרד. דוגמה באירועה של ה-DNA בנווקלאוזם, יש כמה פקטורי שעתוק שמפעילים את השחרור שלו. אם נשים הפעלה של כל פקטור בנפרד, היא תהיה מאד חלשה.

מכניזם של אקטיבציה של שעתוק

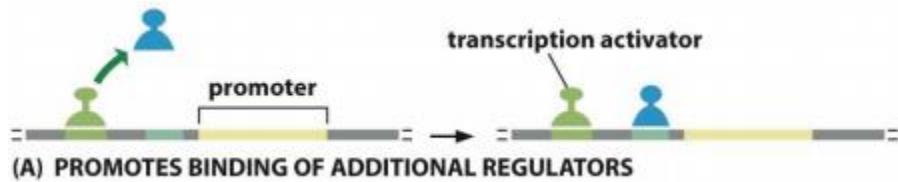
אזורים ליד הפרומוטר יכולים לקשר אלמנטים רבים של גורמי שעתוק. אבל יכולים להיות אזורים שהמרקם ביניהם לא צור הפרומוטר יכול להיות עצום, ואף יהיו ביןיהם גנים שלא מושפעים.

איך נעשית העברת הסיגנלים בקאלה מרוחקים גדולים?
אלמנט קריטי בכך הוא קומפלקס גדול בשם mediator. הוא יושב מצד אחד על קומפלקס תחילת השעתוק, ומצד שני אלמנטים שיוכולים לקשר גורמי שעתוק. ה-DNA מתתקף ואז הסיגנלים מגיעים ל mediator, והוא עוזה קטילה לפוספורילציה לזרב הפולימראז.

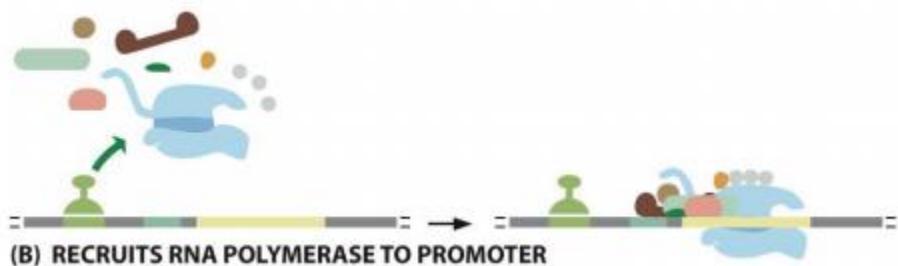


צורות נוספת למבנה של השעתוק:

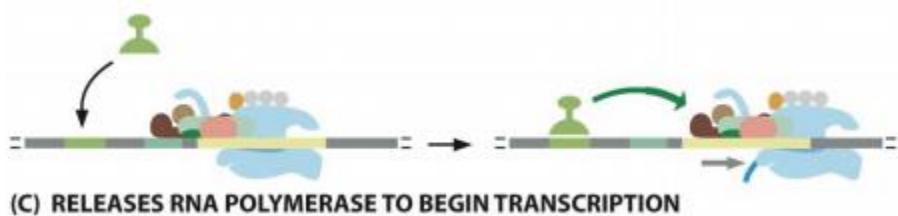
1. הפעלת גורמים אחרים והגורמים הם אלה שפועלים.



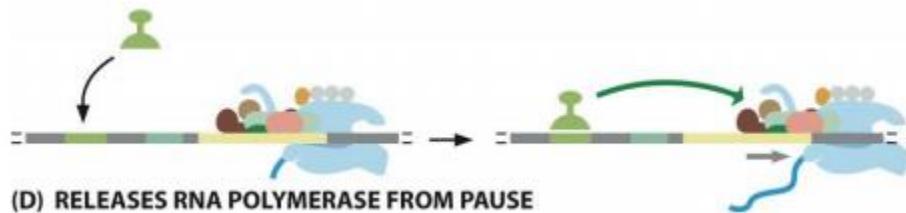
2. מגיסים אלמנטים מסויימים לאזור הפromoטר והתהילך יכול להתחיל.



3. שחרור הפולימראז כדי שיוכל להתחיל את השעתוק.

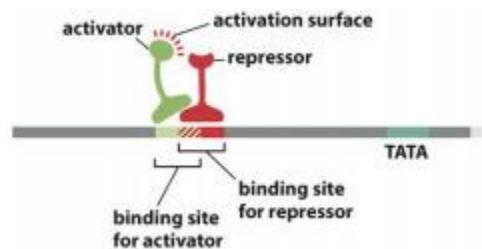


4. שחרור הפולימראז ממצב השהייה.

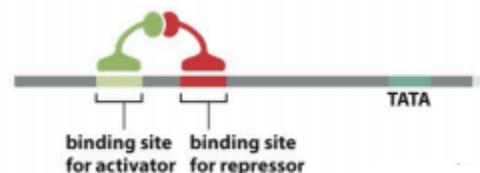


מכניזם של דיכוי שעתוק

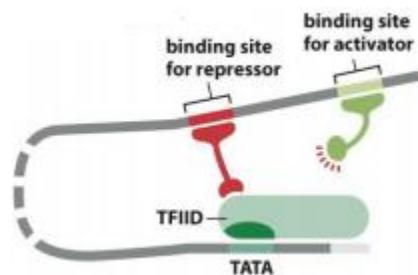
1. תחרות עם אקטיבטור – יקשר לאזורי אזור ב-DNA כמו אקטיבטור אבל חזק יותר ויחסם אותו.



2. נקשר קרוב לאקטיבטור ויש ביןיהם אינטראקציה שמשתקת את האקטיבטור.



3. הרפרסור פועל על אזור b-mediator שאמור לפעול עם אקטיבטור וחסם אותו.



~ נדבר בהמשך על אלמנטים שימושיים על מבנה הכרומטין. ~

Co-activators & Co-repressors

אותו פקטור שעתוק יכול לפקוד פעם כאקטיבטור ופעם כרפרסור.

איך זה קורה?

יש איזשהו אדפטור, מתאם, שיושב על הפקטור זהה ומזהה איזשהו סיגナル.

דוגמה – יצירת הסגמנטים בגוף הדדרוזופילה

העובד של הזבוב הוא שקי גודל שמכיל הרבה גרעינים שונים שככל אחד מתפקד בתור תא. באיזשהו שלב יש גן בשם Eve שמתבטא אך ורק בגרעינים שמוגדרים כפס לאורך העובר, ונוצרים 7 פסים באלה. גן אחר בשם Giant יוצר שני פסים.

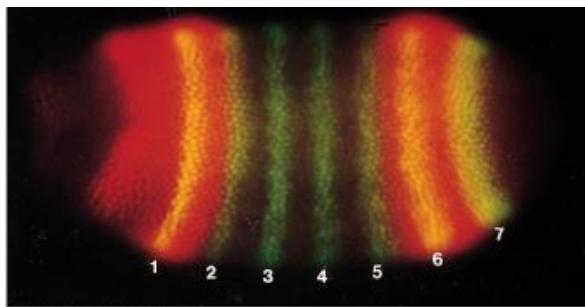
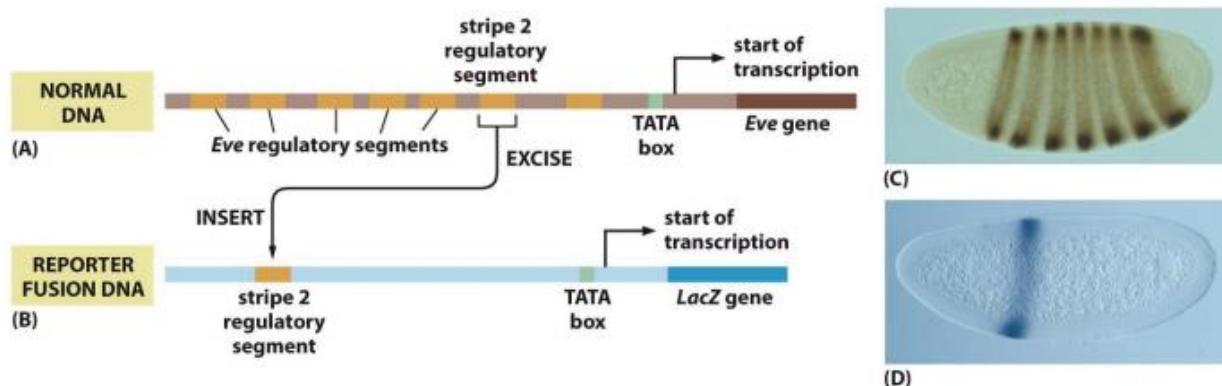


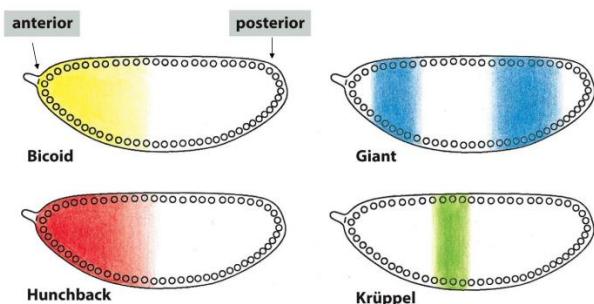
Figure 7-21 Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2013)

Green – Eve ; Red – Giant

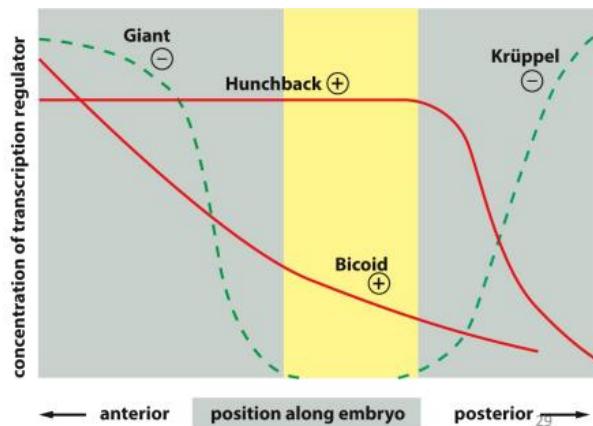
איך תאים מסוימים מבטאים רק גן אחד? דיהו באזור של הגן שבעה אלמנטים. כל אלמנט הוא אחראי לייצור את אחד מהפסים של ה-Eve. איך יודעים? לוקחים את הרצף של האזור זהה, שמיים עם DNA שמכיל גן מדוח. בהכנת פלסמיד זהה לדיזופילה, ראו פס רק באזור שנשאר מופעל.



מסתבר שיש ארבעה גורמי שעוטוק שרלוונטיים לצירוף הפסים האלה. אם נסתכל על פס 2 למשל, הוא מתבטא באזור של ה-Bicoid ובודיק אחרי המיקום בו Giant לא מתבטא.

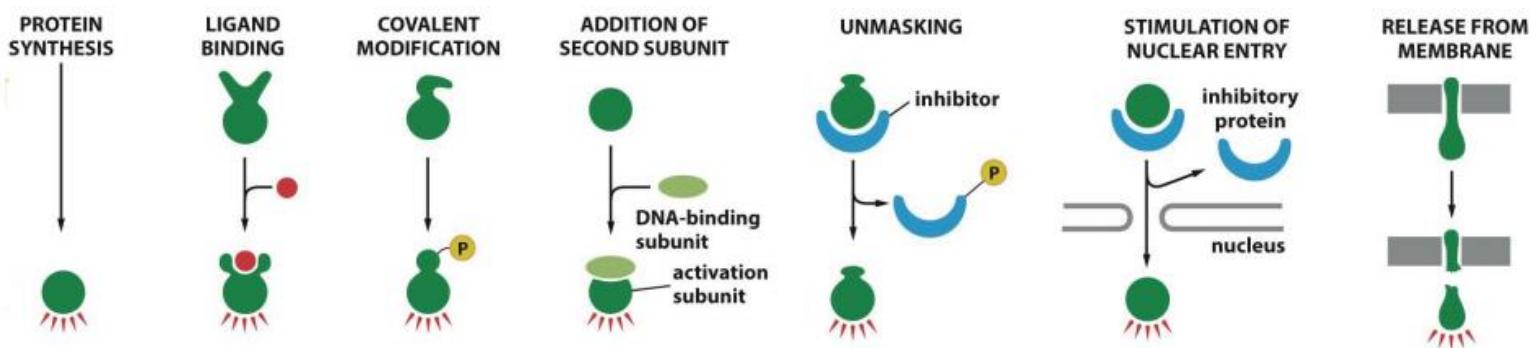


نبון מכאן למשל ש-Giant הוא פרטורי. הפס לא מתבטא בשום מקום שיש בו את הגן. אותו דבר לגבי Krüppel. אם מסתכלים על האזור הרגולטורי שהעתיקו לנו 2, רואים שיש אזור קישור ל-Bicoid ול-Hunchback, והפרטורים נקשרים לאותו מקום כמו האקטיביטורים.

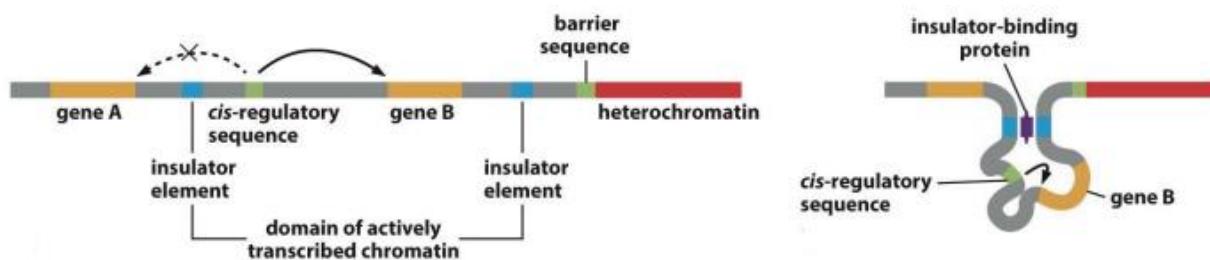


מכניזם בקרה על גורמי השעתוק

1. גורם שעתוק אחר מפעיל את גורם השעתוק.
2. השפעה ממצב בתא – קשייה או שחרור של ליגנד (כמו בטריפטופן).
3. השפעות קוולנטיות (כמו פוספורילציה).
4. אינטראקציה של שני חלבונים.
5. אינטראקציות קוולנטיות של חלבון שמעבב את הפקטור.
6. מניעה או אפשרות構成 של הגורם שעתוק לגרעין
7. הפקטור מחובר למברנה ואיזשהו אנדים חותך אותו ומאפשר כניסה שלו.

**איןסולטורים Insulators**

לפעמים רואים אזור רגולטורי שנמצא במרקח שווה משני גנים, אבל פועל רק על אחד מהם. איך זה יתכן? ה-DNA מאורגן במודולים שבבודדים ע"י חלבונים בשם **Insulators**. הם קשורים לא-DNA בצורה חזקה שמנענת מעבר סיגנלים ממודולים באלה ואחרים.



תרגול 4**שעתוק****בפרוקריוטים יש שפרוניים.**

לרוב רצפי הבקרה יהיו קרובים לפורמוטור.

באואוקריוטים בכל גן יש פקטורי שעתוק משלו.

רצפי בקרה:

1. אנהנסרים – ייקשרו לרצפים אלה חלבונים אקטיביטורים שמגבירים את השעתוק.
 2. סיילנסרס – חלבונים שמדברים את השעתוק, רפרסורים.
- זהות הרצף תיקבע לפי דומיננטיות החלבונים שנקשרים אליו.
יש חלבונים שיכולים לתפקיד גם באקטיביטורים וגם כרפרסורים..

Gene control region

AATA – אליו נקשר פקטורי השעתוק העיקרי.

AIR מתבצעת הבקרה אם הרצף רוחק מאתר השעתוק? חיבור חלבון מוביל לכיפוף של ה-DNA והחלבונים נהיים קרובים מרחבית. ריאקציות אלה מתחווות ע"י קו-אקטיביטורים או קו-רפרסורים.
יש פקטוריים שמתחרבים לחלבונים ומשפיעים עליהם אם להתנהג ב

לרוב פקטורי שעתוק כלליים יהיו זחים ברוב הגנים, אבל מיקום אתר הקשירה יחסית לפורמוטור משתנה בכל גן.
אם נשנה את האוריינטציה של אחד מרצפי האנהנסור, בנראה שקייפול אוינטראקציה של קומפלקס ישנה והפעולה לא תתקיים.

אם נהפוך את הכיווניות של כל הקומפלקס לא נראה שינוי.

בפרוקריוטים הבקר היא שלילית, BD"ב הרגולציה היא השתקה של גן.

באואוקריוטים היא תהיה חיובית.

מנגנוני פעולה**מנגנוני אקטיביטורים**

1. קישור אקטיבטור לאתר בקרה יכול להוביל לקשירה של רצפי בקרה שונים.
2. קישור אקטיבטור לרצף הבקרה מוביל לגיאוס כל החלבונים שלוקחים חלק ב-RNA פולימראז והשעתוק יכול לפעול.
3. בשhqומפלקס פולימראז בבר מרכיב לפורמוטור, קישור האקטיבטור מוביל לשחרור הפורמוטור ותחילת השעתוק.
4. פעילות הפולימראז נעצרת וכיישור האקטיבטור מוביל להנעת הפולימראז מחדש.

1. תחרות על אתר הקישור ברצף ה-DNA, חפיפה בין קצב הקישור.

2. קישור רפרסור מוביל להשתקה של פעילות האקטיבטור. שניהם קשורים.

3. תחרות לא על גבי רצף הקישור אלא על גבי איזשהו חלבון – למשל קו אקטיבטור או transcription factor.

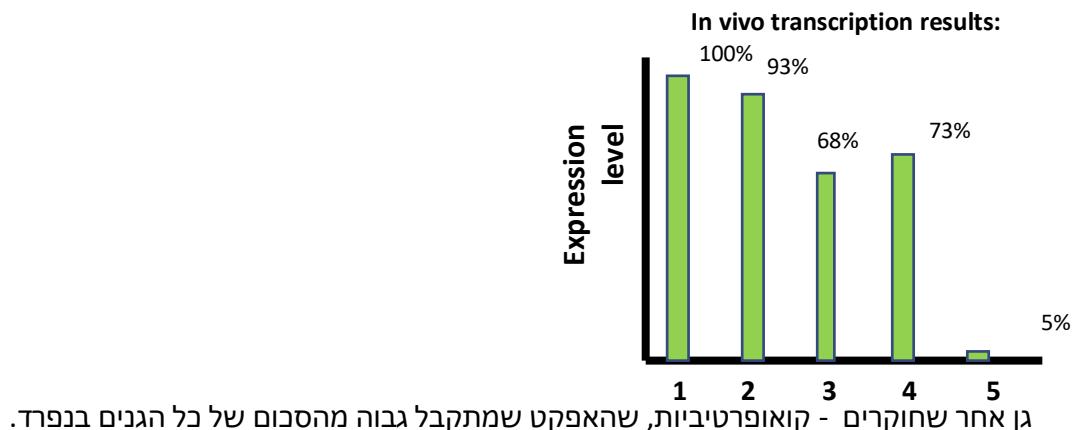
השפעה על הכרומטין – מובילים לסגירה של אתר הפורמוטור או שינוים על מודיפיקציות היסטוניות שיביאו לשינויים במבנה הכרומטין.

לדוגמה אctlציה על היסטוניים מוביאה לפתחה שלהם ותחילת שעתוק.
מתיל על ההיסטוניים סוג אותם.

תרגילים

תרגיל 1 – איך נדע אם רצפי הבקשה?

חתכנו רצפים בגין.
הוסףנו גן מדווח בסוף החלק המקיים.
נחדיר את הגן לפלטסמיד ואז לתא אונימי.
בבדוק את ביטויי החלבן לפי ביטויי הגן המדווח.
במקרים הקיצרים קיבלנו ביטויי נמוך וגבוגים ביטויי גבוה.
ניתן לראות שההבדלים בין 1 ל-2 הוא יחסית קצר וניתן לשער שהפקטור בקרה לא נמצא ברוח שופריד ביןיהם.
ניתן להניח שבין 2 ל-3 יש אזור שטוח לакטיבציה, אנהנסר. כמו כן בין 4 ל-5 ניתן לראות ירידה משמעותית וניתן להסביר על אנהנסור.
גילינו שני רצפי בקרה שהם אדיטיביים אחד לשני.



אדיטיבי – בלתי תלוי, סכימה של שני האפקטים בנפרד.
אפקט קוואופרטיבי מאפשר רגולציה יותר עדינה. במקרים שנרצה ביטוי של חלבון מסוים

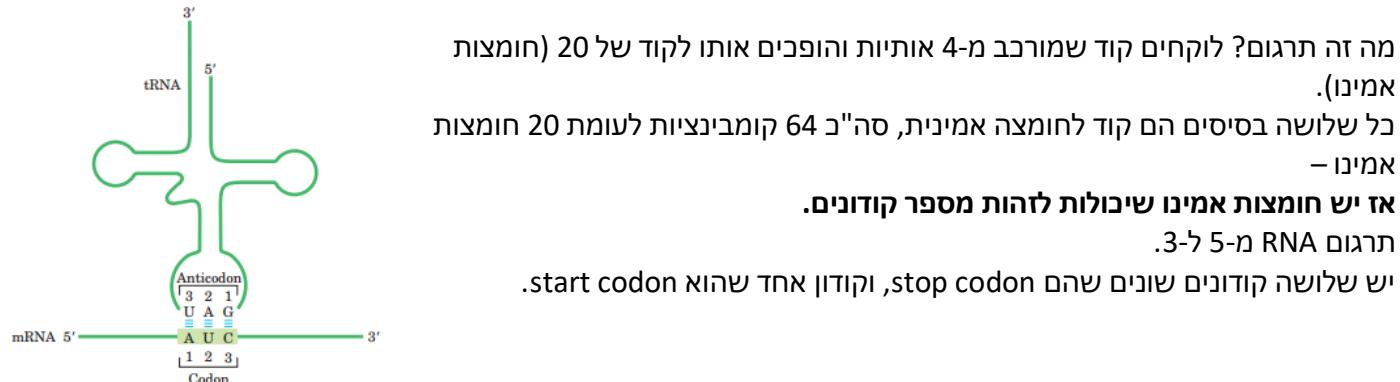
הגן Eve בדרוזופיליזה
ה证实ים מראים אם רצף החלבונים האלה מתבטאים בעובר.
ניתן לראות במה רצפי בקרה לאורך הסגמנט וניתן לראות שהחלבונים GIANT AND KRUPPEL הם רפרסורים והשניים הם אקטיבטורים.

Electro Mobility

הרצה על אלקטրופוזה DNA וחלבונים חדשניים ואם נוצר קומפלקס יווז בגל קצר יותר.
לפי עוצם הבאמד נסיק על אפיניות הקישור, למשל ב-A זה חלש.

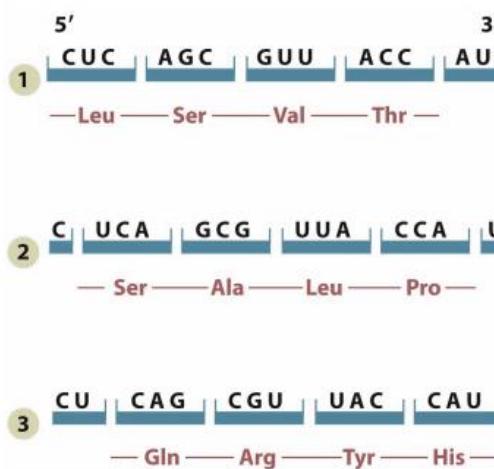
תרגומים
חזרה

בפרוקריוטים יש polycistron RNA במאגניטים שנמצאים על אותה מולקולה של RNA ומתרגם אחד אחריו. השני – רצף אחד של RNA יכול להיות מתרגם לכמה חלבונים אחד אחריו השני. כמו כן השעטוק והתרגם קוראים יחד שכן אין גרעין. באאוקריוטים יש monocistron RNA. במיטוכונדריה יש קצת שונה ב-DNA, והשעטוק והתרגם שונים.

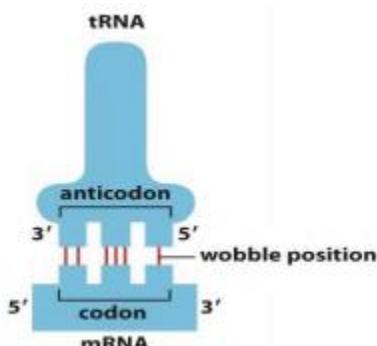
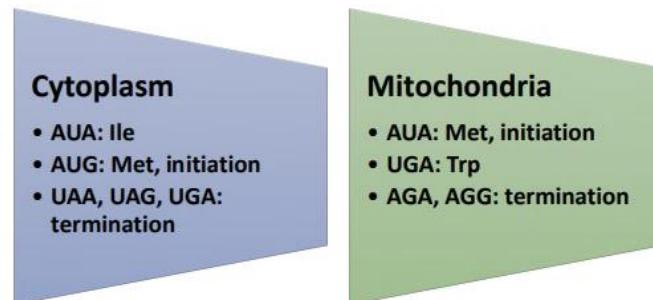


תכונות של הקוד הgentiy

1. **Commaless** – אין סימני פיסוק. רציף, אין רווחים. בשיש רצף לא ידלו על קודון ולא יקראו קודון. פעמיים. מתחילה לקרוא מה-frame reading – במשמעות הקריאה משתנה. stop codon – מה שבין start codon לבין him-frame Open reading frame



2. **קוד אוניברסלי** - תרגום DNA או RNA תמיד יהיה זהה. יש כמה יוצאי מהכלל ב-DNA מיטוכונדריאלי.



3. **דגרטיבי** - יש בקוד הגנטי חומצות אמינו שיכולים להיות מקודדות ע"י במא קודונים שונים. מה שונה ביניהם זה הבסיס השלייש. למה זה קורה? יתרון מבני, ה-tRNA מקשר בין הבסיסים ב-mRNA לחומצת אmino. המיקום של ה-5' באנטוי קודון (או במקומות ה-3' של הקodon) יש יותר חופש במקום זהה מבחינת קישור. מקום לגמישות. התכונה הזאת נקראת **wobble**. מה שכן, לא משתמשים בקודונים בצורה שווה.

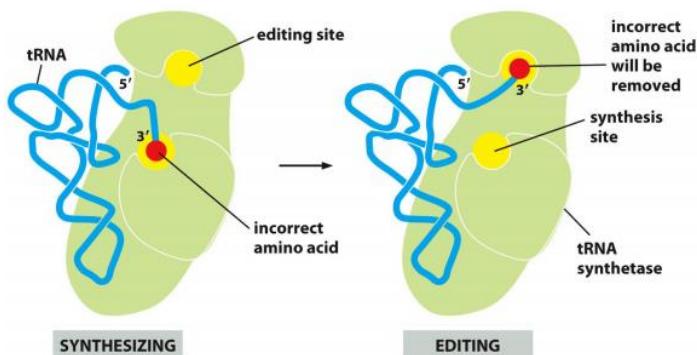
GCU		ACU
GCC		ACC
GCA		ACA
GCG		ACG
	Ala	
		Thr

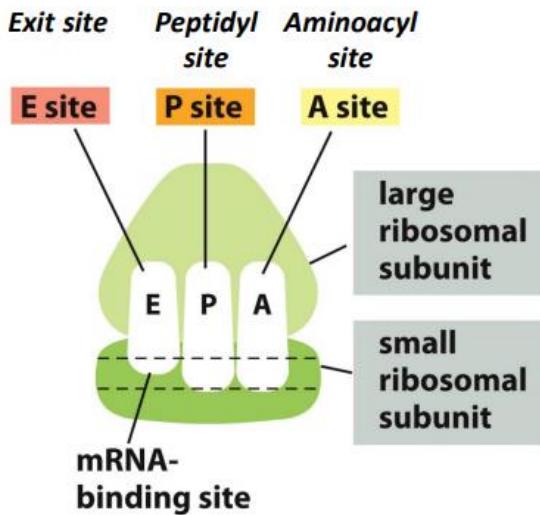
tRNA synthase

ה-hA-tRNA סינחס עשויה קטליזה לקשר בין ה-hA לבין ה-tRNA. תהליך זה דורש הרבה אנרגיה, שכן יש מולקולת ATP שתורמת לקשר והופכת למולקולהAMP. (2 פוספטים הוצאו). לכן הקשר הזה יהיה בעל אנרגיה חזקה מאוד שאחר כך תהיה האנרגיה שתשמש לקישור בין החומצות amino.

חשוב לציין את ה-hA הנכונה ל-tRNA, ויש לאנדים שני אתרים קישור. בתחלת הסינזה יש אתר קישור אחד והח.A. נכנסת כפונקציה של גודל, ואז נעשית הקטליזה של הקשר.

אם הח.A. לא נבונה ניתן לנתק את הקשר בעריכה. יש אנדים בכל חומצה amino, אחוזי שגיאה קטינים.



הריבוזום

המקום בו מתרחשת הסינטזה. טעות בריבוזום - $\frac{1}{10000}$ חומצות אמינו. מורכב מ-mRNA ומחלבונים, וה-tRNA הוא זה שבד"כ עושה את העבודה. הריבוזומים של הפרוקריוטים מעט יותר קטנים.

מבנה הריבוזום
מחולק לשתי תת-יחידות: Large subunit, Small subunit:
האתר שקשר את ה-mRNA מחולק לשלושה אתרים:
A site – כניסה של tRNA עם חומצה אמינו חדשה.
P site – נמצא הפעטיד שגדל ואליו החומצה אמינוית החדשה מתחברת.
E site – האתר שמננו ה-tRNA הירק יצא החוצה.

שלבי הסינטזה של החלבונים

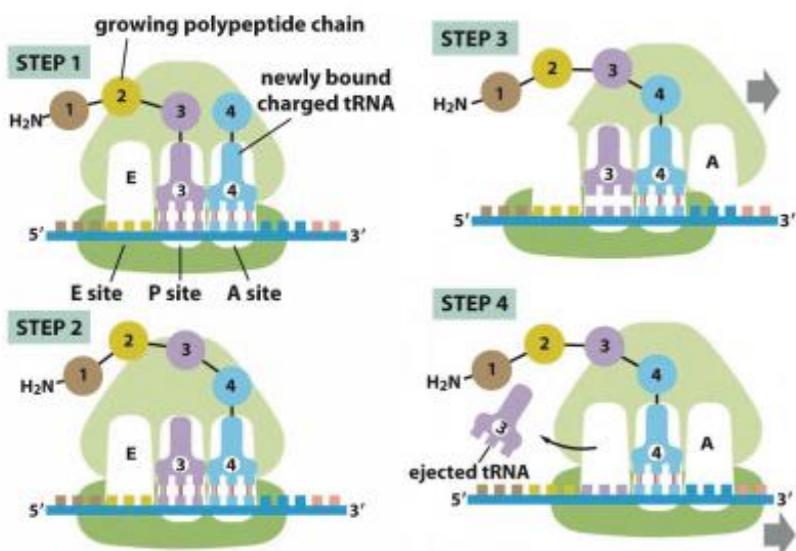
הסינטזה מתחילה מהתיכון ה-N טרמינלי ל-C טרמינלי זה מקביל ל-5'→3' ב-tRNA.

1. Initiation
2. Elongation
3. Termination

Elongation

שלב ההארבה. יש tRNA שמחובר לפעטיד קיים ב-P site.

1. מגיע tRNA עם חומצה אמינו חדשה ונכנס לתוך ה-A site.
2. יצירת קשר פפטיד חדש שנובע מהאנרגיה של קישור ה-tRNA הקודם לחומצה.
3. הנטה הירק עבר ל-E site – tRNA Shift.
4. חוסר סביבון בין ה-Large ל-Small, אז ה-Small.



לסיכום והרחבה - שלושת השלבים בכלל מחרור אלונגציה:

1. **שלב הבנישה – מעגל ה-Ef-Tu.**
חומר אמינו חדש נכנסת ל-site A יחד עם tRNA \leftarrow בשא-tRNA מתחבר היטב לרצף של ה-mRNA יש אקטיבציה של EF-Tu GTP שמספק לו אנרגיה \leftarrow פירוק של ATP – כמו ATP – מולקולה שנותנת אנרגיה ושהפירוק שלה יוצר שינוי מבני בחלבון עצמו. (מעגל ה-Ef-Tu).
 2. **יצירת הקשר הפטידי – ב-site P.**
 3. **טרנסלוקציה – תזוזת הריבוזום לאורך המRNA לשחרור השא-tRNA הריק ויצירת site A פניו.**
- לתהיליך נחוצים Elongation factors.

מעגל ה-Ef-Tu

- יש חלבונים שיודעים לפרק GTP, ברגע שעושים את זה המבנה שלהם משתנה והם יכולים לעשות משהו אחר.
- השינוי המבני הזה יכול להיות שונה במצבים: פעיל בהם מוחברים ל-GTP.
- לא פעיל בהם לא מוחברים (מוחברים ל-GDP).
- אחר כך יכולה להיות אקטיבציה נוספת של החלפת GDP ל-GTP ואז החלבון יכול לעבוד עוד פעם.

חלבונים שיעזרים למעגל:

- GAP – עוזר לפרק את ה-GTP ל-GDP.
- GEF – מבנים מולקולת GTP שמאפשרת שוב את החלבון.
- EF-Tu הוא סוג של GEF. עוזר ל-tRNA הנכנס ל-A, ה-Tu יודע לפרק ולצאת החוצה. השא-tRNA צרי להגיע לקודון הנכון. בתהיליך אקטיבי החלבון בודק שה-tRNA תוחבר טוב ל-mRNA, אחרת הוא מוציא אותו החוצה.
- הקשר הפטידי לא נוצר מיד. אך גם אם התוחבר לקודון לא נכון, יש זמן עד שנוצר הקשר הפטידי שבו השא-tRNA יכול לצאת מהריבוזום.
- (באוקריוטים המקביל זה EF-1α)

הمعالג:

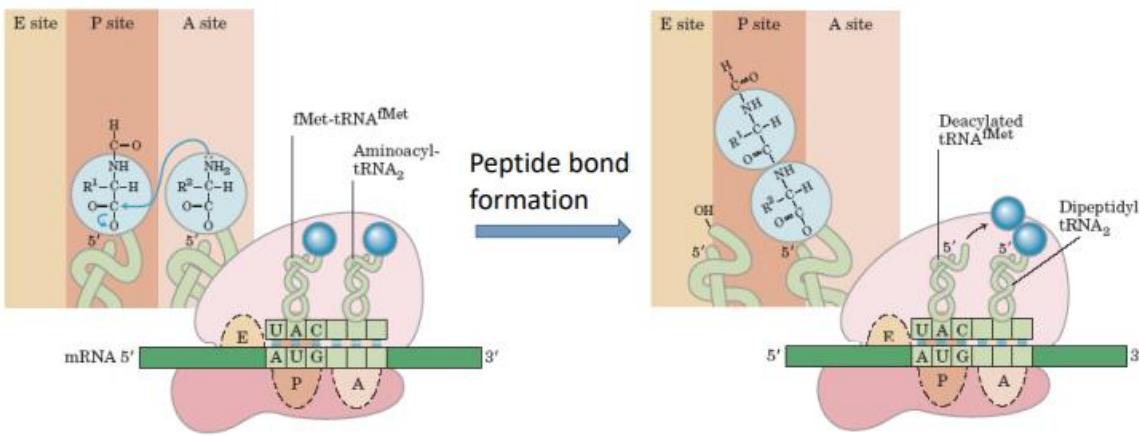
1. חלבון Ts-Tu מתחבר למולקولات GTP וה-Ts עוזב את ה-Tu כך שנהייה קשר Ts-GTP-Tu.
2. מגיעת tRNA שמחובר לחומר אמינו ונקשר אליו וኖצ'ר קומפלקס tRNA-Tu-GTP.
3. הקומפלקס נכנס לריבוזום וה-tRNA נקשר לקודון על המRNA, וליצירת הקשר לוקח קבוצת פוסfat מה-GTP שהופך ל-GDP כך שהקשר בין הקודון מתחזק ואז ה-Tu-GDP לא יוכל לקשור את השא-tRNA ועווזב את הריבוזום.
4. ה-Ts חוזר ל-Tu ובמהלך זה משחררת מולקولات GDP כ-GTP.



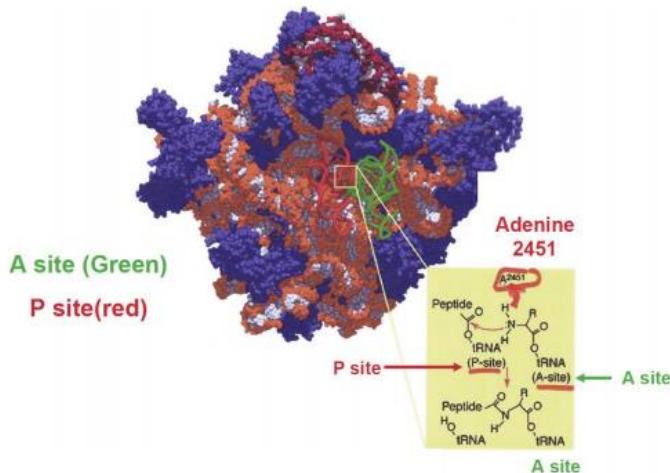
יצירת הקשר הפטידי

קורה ע"י פונקציה שקיימת בתחום ה-RNA הריבוזומלי, ככלומר יש RNA שעשויה קטילה לתחילה וזו את ע"י מיקום ה-tRNA עם החומצה האמינית בזווית מספיק קרובה כדי שייווצר קשר פפטידי.

1. שני אתרים תפוסים – ה-P וה-A, בשניהם יש tRNA שנושא חומצה אמינית ומחבר לקדון. לחומצה אמינית של גבי ה-tRNA שמחובר ב-P בדרך כלל תהיה מחוברת לשרשרת פפטידית. ב-A יש tRNA חדש. נרצה שהח.א יהו מספיק קרובות כדי שייווצר קשר בין הקצה הקרווקסיל של החומצה האמינית ב-P לבין הקצה האמינית של החומצה האמינית ב-A.
2. הפירוק של הקשר בין ה-tRNA (شب-P) לפפטיד מספק את האנרגיה לצירוף הקשר החדש.



הוא אנזים שהוא RNA – 50S ribozyme – peptidyl transferase. בעצם יכול ליצור קשר עם ה-tRNA ולבן הקשרים שנוצרים הם קרשים לא בין החומצות האמינו אלא בין RNA ל-RNA. האנזים אחראי על הקירוב של ה-tRNA בזווית מספיק קרובה כך שהחומצות האמינו יוכלו להתחבר ביניהן.

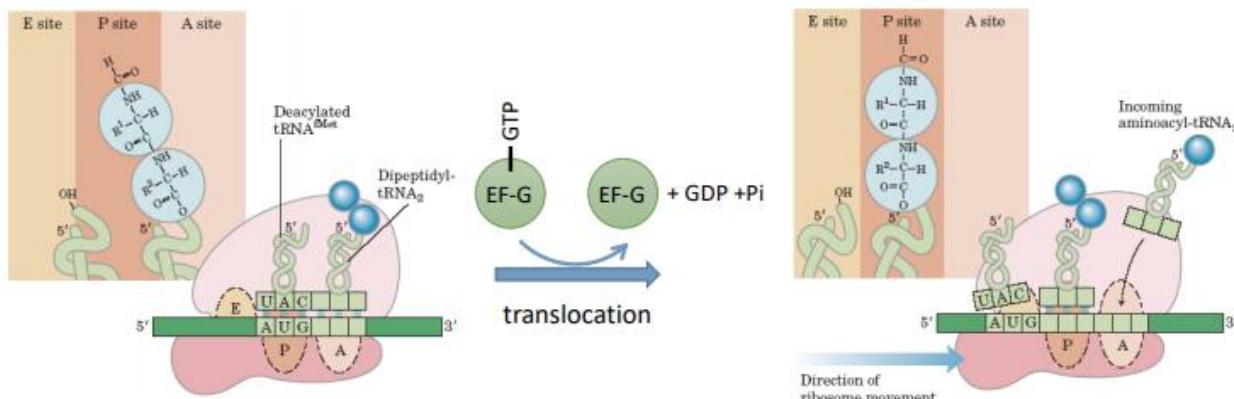


טרנסלוקציה

- EF-G עוזר להוציא את ה-tRNA מה תוך הריבוזום, והוא translocate – עוזר לשנות קונפורמציות של חלבונים אחרים. כשהוא קשור ל-GTP הוא עוזר להזת הריבוזום בקodon אחד.
- אחרי הטרנסלוקציה ה-tRNA נמצא ב-E וועוד.

פעולות EF-G

אחרי שיש יצירה של קשר פפטידי אנחנו מקבלים פפטיד שקשרו ל-tRNA ב-A ו-tRNA חופשי ב-P. אז נרצה שהריבוזום יוזד קodon אחד ימינה ביחס ל-tRNA. EF-G מחובר ל-GTP ומפרק אותו ל-GDP וכן עוזר לריבוזום לחזור לתהו tRNA עם הפפטיד מחובר ל-P והריך ב-E וועוד.

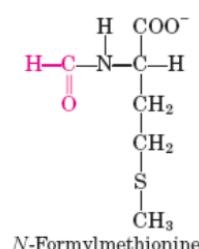
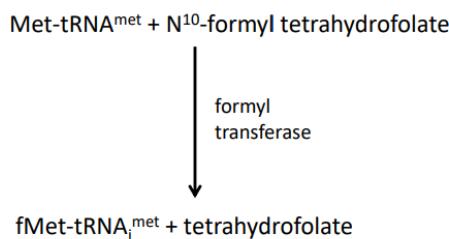


דומה מבחינה מבנית ל-EF, אך הוא גם נכנס לריבוזום ב-A. הידROLיזה של ה-GTP מייצרת שינוי קונפורמציה של הריבוזום ושל החלבון.
המקביל לו באוקריוטים זה EF-2.

Initiation

1. הריבוזומים באים כיחידות מפוקוקות ובשה-RNA יוצא מהגרען הם מתחברים בלבד.
2. הפרדה בין ה-50S (Large) ל-30S (Small) subunits של הריבוזום.
3. ה-tRNA מתיישב על ה-30S ואז יש תזזה של הריבוזום עד שמגיעים לקodon התחלת.
4. כל הריבוזום מתיישב.

Initiation factors: IF-1, IF-2, IF-3

מתינוי

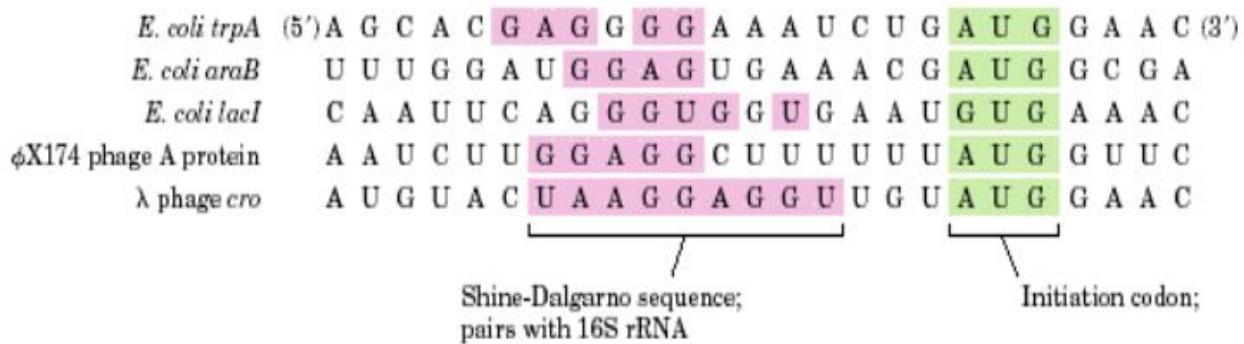
החומרה אמינית ממנה מתחליל התרגום. בפרוקריוטים יש הבחנה בין מתינוי ראשון לבין השאר בחלבון ע"י מודיפיקציה שהמתינוי הראשון עברת (אחרי המודיפיקציה החומרה המשמשת בקodon ההתחלת).

באוקריוטים המתינויו אותה חומרה אמינית, לא עברת מודיפיקציה.

התחלת תרגום בפרוקריוטים

איך הפרוקריוטים יודעים איפה להתחילה?

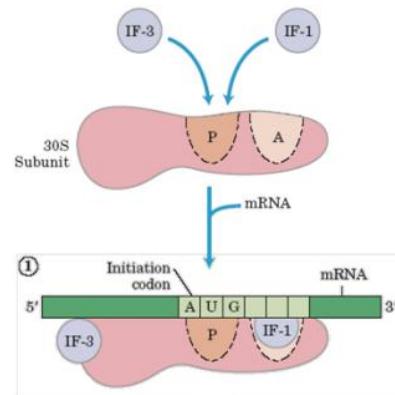
ברצף ה-RNA ראו שחוּץ מקודון ההתחלה יש רצף שחוּץ על עצמו קצר לפניו. הרצף נקרא **(S-D) sequence**. הקונצנזוס הכללי זה AGGA ואז רצף של הרבה פורינים לפניו-AUG ואז-h-AUG. הרצף מורה לרביזוזם لأن ליהיקשר. הוא נקשר לרצף זהה והוא נודד עד שהוא מגיע ל-AUG מי שנקשר בריביזוזם (מהאזור של ה-30S) זה ה-16S rRNA, שלקצתה 3 שלו יש רצף קונצנזוס UCCU שיבול ליהיקשר ל-AGGA של ה-SD. ב



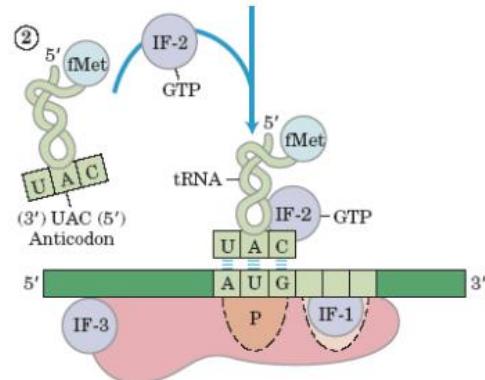
-AGGA PuPuUUUPuPu AUG-

שלבי ההתחלה

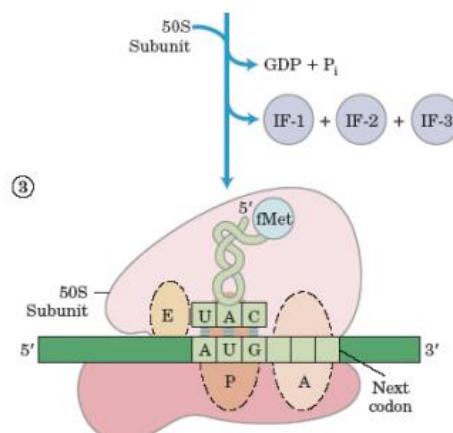
1. IF-3 ו-IF-1 נקשרים ל-30S, ואז הם מחברים את ה-SD ל-16S. ה-RNA mRNA יכול ליהיקשר ל-30S, ובעצם ה-AUG מתחבר ל-P.



2. קומפלקס של GTP מגיע ל-IF-2 והפקטור מביא tRNA שמחובר למתיוין שuber מודיפיקציה ומחבר אותו ל-AUG, וזאת ע"י פירוק GTP ל-GDP. כל זה קורה לפני שיש ריבוזום שלם.



ה-ribozom של הריבוזום מתיאש על ה-tRNA של החומצה האמינית ואז כל ה-initiation factors עוזבים.



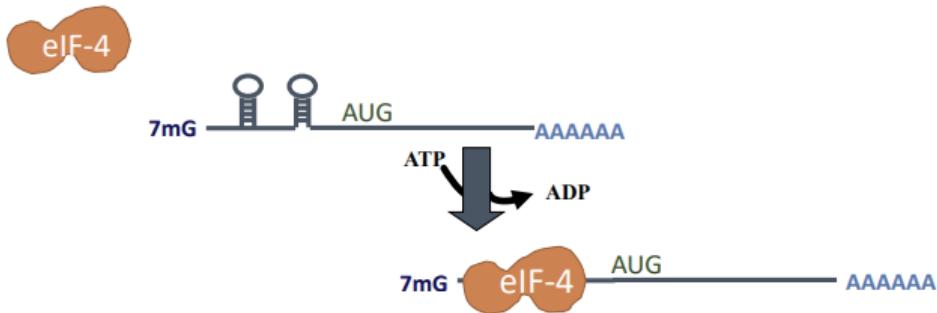
ה-tRNA עם ה-Met נכנס לפני שהריבוזום מורכב

התחלת תרגום בפרוקריוטים

1. הפרדה בין ה-Small ל-Large.
 2. קודם קישור של ה-Met עם ה-tRNA Small, ואז יש מיקום של ה-tRNA על ה-tRNA.
- בולם, בפרוקריוטים היה RNA שלו מתחבר ה-Small ולאחר מכן ה-tRNA. לעומת זאת באוקריוטים, ה-tRNA Small מתחבר ל-Large ואז הם "מחפשים" איפה להתחליב RNA.
3. הריבוזום רץ על ה-RNA עד שהוא מוצא את ה-AUG ומתייאש עליו.
 4. המתיוין רגיל, לא עובר מודיפיקציה. איז הוא יודע מאייה Met להתחיל? הוא מוצא איזשהו CAP שמසמן את ההתחילה.
 5. חיבור ה-Large.

סרייקת mRNA מה-CAP

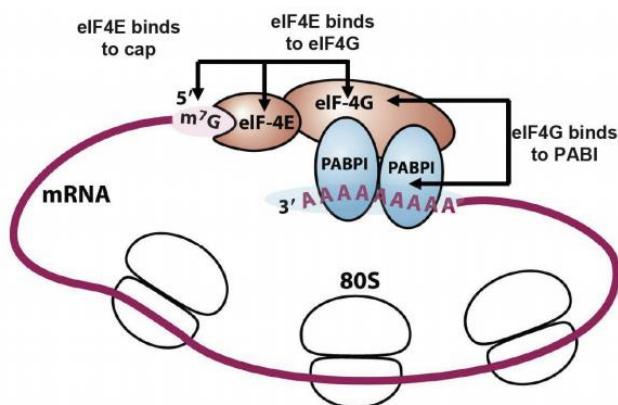
ל-RNA אוקריוטי יש מבנים שנויוניים, למשל ה-CAP. בקצתה 5 שלו יש CAP שהוא 7-methylguanine EIF-4 ו-7-methylguanine EIF-4 שזה פקטור שיודע לzechות את ה-CAP, וברגע שהוא מתחבר לקצתה זהה הוא יודיע שזאת ההתחלת והוא מגיש את הריבוזום עם ה-tRNA המתאים שיתחיל ממש. הוא גם יכול לישייר את המבנים שנויוניים ב-RNA.

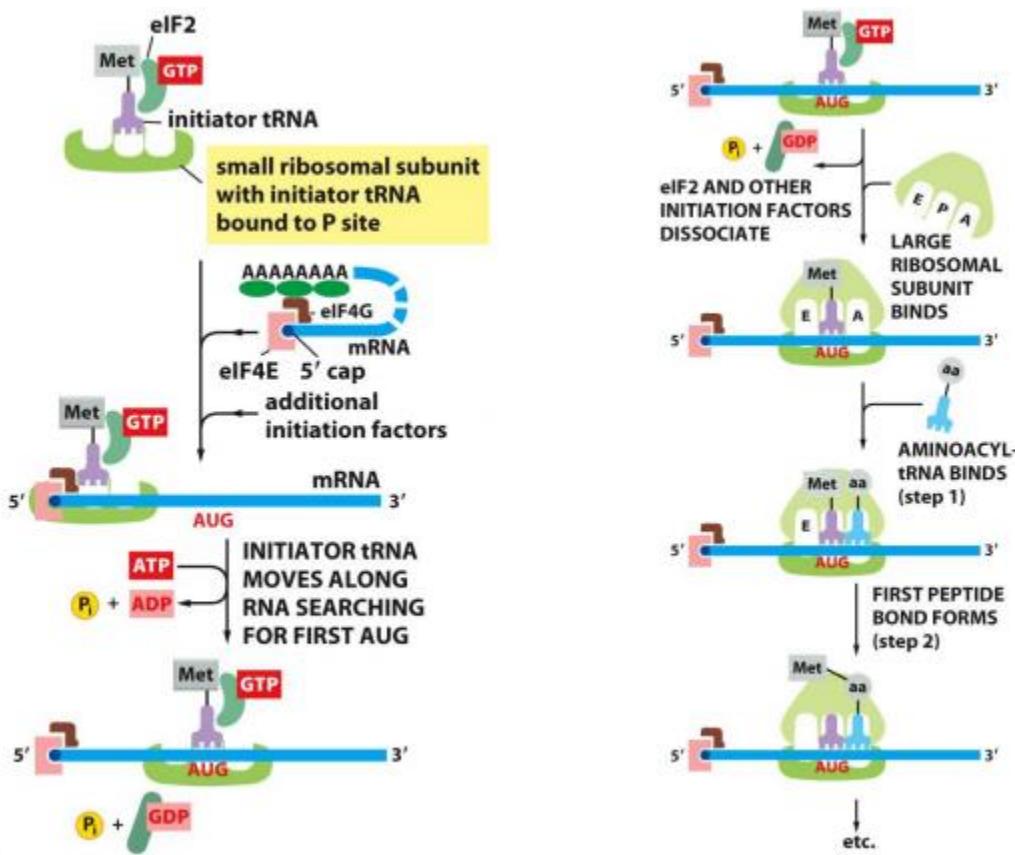


RNA מעגלי

בתרגום, מכיוון שיש חלבונים שיכולים גם להתחבר ל-CAP וגם לפוליא (הסוף) לפי המודיפיקציותשה-RNA עבר, והם יכולים להתחבר אחד לשני ונוצר RNA מעגלי.

מה היתרונות? הריבוזומים רצים עד שהם מגיעים לקצתה, אבל הקצתה מחובר לההתחלת ואז הם יכולים להמשיך לתרגום.





<i>Factor</i>	<i>Function</i>
elf2	Facilitates binding of initiating Met-tRNA ^{Met} to 40S ribosomal subunit
elf2B, elf3	First factors to bind 40S subunit; facilitate subsequent steps
elf4A	RNA helicase activity removes secondary structure in the mRNA to permit binding to 40S subunit; part of the elf4F complex
elf4B	Binds to mRNA; facilitates scanning of mRNA to locate the first AUG
elf4E	Binds to the 5' cap of mRNA; part of the elf4F complex
elf4G	Binds to elf4E and to poly(A) binding protein (PAB); part of the elf4F complex
elf5	Promotes dissociation of several other IFs from 40S subunit as a prelude to association of 60S subunit to form 80S initiation complex
elf6	Facilitates dissociation of inactive 80S ribosome into 40S and 60S subunits

Termination

הסיום תלוי ב-Release factors

Prokaryotes RF1 recognizes UAA and UAG

RF2 recognizes UAA and UGA

RF3 forms a complex with either RF1 or RF2 and stimulates its activity

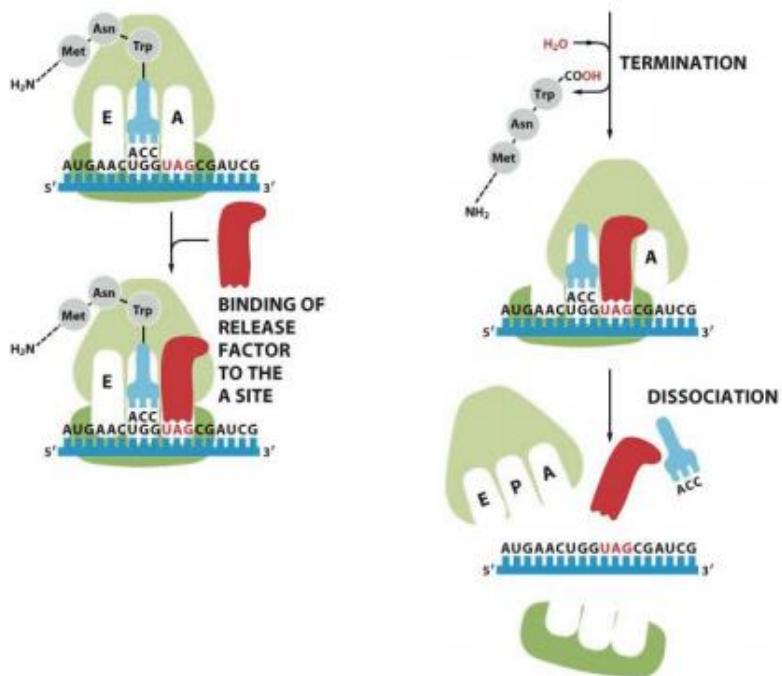
Eukaryotes Pretty much the same

However, eRF1 recognizes all termination codons

eRF3 stimulates eRF1

There is no eRF2

אנחנו מגעים במצב שבו יש codon stop, A שבו הקodon לא מתאים, אין tRNA שמתאים לו. בשלב זהה Release factor נקשר לרצף ואז מים נוכנסים.. והריבוזום מתפרק ופנוי כדי לסנתז RNA חדש.



The peptidyl transferase is converted to an esterase.

The uncharged tRNA, mRNA, and RFs dissociate from the ribosome.

Initiation : 1 GTP (IF-2-GTP)

AA activation : 2 ~P bonds

elongation : 2 GTP (Tu-GTP, EF-G-GTP)

termination : 1 GTP (RF-3)

תרגומן 5 - תרגום

אקטיבציה של חומצות אmino

מתרחשת ע"י צימוד ח.א ל-RNA שמאפשר:

1. לאكتب את הקצה כ טרמינל של החלבון.
 2. מאפשר את התרגום של הקודון לח.א, מלה

אין יידיelongציה שה-tRNA^Z נושא את החר. א. הנכונה (אלא רק יידי של ההתאמה בין האנטי קודון לקודון) וכן הבקרה מתרחשת בשלב זהה של הצימוד.

דוגמאות:

- אייזולאוצין וואلين דומות זו לו מואוד, כמעט מתיל אחד. ב-tRNA^z של אייזולאוצין, האפיניות של Val^{z} לא גבוהה בהרבה מההאפיניות של Val לאתר הפעיל; יש טוות של בערך 1 ל-200. מהסיבה הזאת, ישנו אתר נסוף, רגולטורו, של בקרת טוות. האתר הזה קשור את תוצר הבינים, אמינו-אציל-AMP. האתר הזה, שהוא אתר הידROLיטי, הוא קטן ויחסית. האיזולאוצין לא נכנס אליו, כי הוא גדול יותר; ואلين נכנס אליו, נקשר אליו, ומפסיק בו. לכן, אם יש לנו ואلين, התגובה תפסיק באמצע כי הוא לא יתאים. אם נקשר אייזולאוצין לאכנים – התגובה תימשך.

ואلين ותריאונין גם הם מאוד דומים, בשההבדל הוא הידרוקסיל בתרייאונין, מתיל בואلين. ליד האתר הפעיל יש ביס הידרופילי, שהוא האתר ההידROLיטי. אם tRNA^z נקשר לתריאונין, בדרכו החוצה הוא ימשך לכיס הידרופילי בgel הידרוקסיל, וה頓וצר יפורק. בנוסף, גם האתר הפעיל עצמו הוא יותר הידרופובי, ולכן יעדיף ואلين על תרייאונין.

עם זאת, ישנו אמינוacyl-tRNAs מסוימים שאין עבורם בקירה. טעויות בתרגום קוראות, באופן כללי, במקרה של 1 לכל 10^4 .

אינטראקציות בין אמינוacyיל RNA^t סינטаз או tRNA^t – בקוד גנטי שני:

למעשה האנדמים אמינים אצילים טירנה סינטתאז חיזב להבדיל בין מאות הטירן"א שקיימים ולדעתי איזה חומצה אמינית לשים להם. האינטראקציה בינהם נחשבת ל"קידוד הגנטី השני", מה שמשקף את תפkid החשוב שלו בשימירת הסינטזה של החלבונים. כאן הוחקים יותר מסובכים. הנוקלאוטידים השמורים על גבי הtRNA^t משמשים להבדלה בין הטירן"א השונים (ניתן לראות זאת בתמונה 16-27). המיקומות שונים על גבי הtRNA^t לשם ההבדלה בינהם נמצאים לרוב בזורע של החומצה האמינית ובאזור של האנטיקodon, במובן זהה כולל את הנוקלאוטידים שנמצאים באנטיקodon עצמוו . 10 או יותר נוקלאוטידים לרוב מעורבים בהכרה של האנדמים

האנדרטאות ההיסטוריות והתרבותית של העיר מושגויות על ידי מילויים ארכיטקטוניים וריהוטיים המבוססים על דוגמאות ארכיטקטוניות ותרבותיות מתקופה מסוימת. מילויים אלו יוצרים אינטראקציית חזותית בין המבנה והסביבה, ובכך מושג שילוב אמנים ופיזיון.

לאנזים זהה יש שתי קבוצות עיקריות שונות במבנה שלן ובאופן הפעולות שלהם. האנזימים הללו צריכים אנרגיה לשם פעילותם.

הריאקזיה זו מתרחשת רשויה של ריבר אמרר הפעיל של הארץ:

באשר הקצה הקרבוקסיל של חומצה אמינית מגיב עם הפוספטalfa של ATP, נוצר קשר אנהיידרי וтворצ'ר הרוירית אמינו-אציל-AMP מושך רדי שחרור של פירופוקטאנין.

בשלב אחד של אסנירופיקציה בשלהי זה במאכזות האמינואציל טרינ"א סינטאז יש קשרה של החומצה האמינית לטוי רכ"א הנכוון – קורה

או בקיצור:

בשלב הראשון של התגובה, הח' האמינית נקשרת באמצעות הקבוצה הקרבווקסילית שלה אל פוספט אלאף של ה-ATP (ה-OH של הקרבווקסיל מהוות נוקלאופיל חזק והוא תוקף תקיפה נוקלאופילית את הפוספט) נוצר קשר אנהידרייד ומשתחרר פירופוספט ונווצר AMP-Aminoacyl. בעת הרווחנו למשעה אסטורייפיקציה למולקולה עתירת אנרגיה.

בשלב הבא, עבר קבוצה 2 של האנדום:

הידרוקסיל שנמצא בקצתה ה-3' שבזרוע הח' האמינית של ה-tRNA^t(הקשרו לريبוז של אדנין) תוקף נוקלאופילית את הקשר האסטורי שבין הח' האמינית ל-AMP. נוצר קשר אסטורי חדש, בין ה-tRNA^t לח' האמינית – זהו אמינוacyl-tRNA^t. במקביל, ה-AMP משתחרר.

מעבר הקבוצה הראשונה:

הידרוקסיל שנמצא בקצתה ה-2', שבזרוע הח' האמינית של ה-tRNA^t(הקשרו לريبוז של אדנין) תוקף נוקלאופילית את הקשר האסטורי שבין הח' האמינית ל-AMP. בהמשך בריאקטיבית טרנסאסטורייפיקציה נוצר לנו קשר של החומצה האמינית על גבי החמצן הקשור לפחמן 3 מה שMOVIL לאוטו תוצר כמו מעבר הקבוצה השנייה אמינוacyl טירנ"א.

עיבוד RNA**הקדמה**

באוקריוטים תהליכי העיבוד של RNA מתרחשים לרוב בו-זמןית לתהליך השעתוק והם מתוארכים בערך צנב ה CTD של RNA פולימראז 2, שנושא אליו חלבוניים שקשורים לרגולציה על העיבוד? בפרוקריוטים, תרגום mRNA נעשה בו-זמןית לשעתוק ולכן יש מעט מאוד עריכה.

מולקולות צריכות לעבר עיבוד mRNA לרמה של RNA פונקציונלי, והתהליך דורש מספר שלבים בהם מולקולת RNA עוברת עיבוד. על מה בדבר?

Capping – הגנה של RNA מפני סיכוןhexo-נווילאות 5'-3'.

Splicing – הוצאת אינטראונים ממולקולה pre-mRNA וჩיבור אקסונים.

Alternative splicing – ייצור מספר מולקולות mRNA ממולקולה pre-mRNA אחת.

Cleaver – הוספת פוליא-UTR שזה נותן אורך חיים מסוים למולקולה.

או לבסוף מולקולת RNA מכילה אזור CAP, 3UTR, poly A וכו'.

Capping

מה קורה למולקולת RNA-pre בשייצאת ממולקולה הפולימראז בערו משעתק אותה? הדבר הראשון שיוצא מהפולימראז זה ה-N₅, האзор ה-5', שציר להגן עליו מהר מ-**hexo**נווילאות.

ה-CAP מתווסף לקצה 5' ובנוי בעיקר מהאלמנטים הבאים:

1. **נווילואיד G** שמחוברלקצת המולקולה **באוריננטציה הפוכה**.

2. **קבוצת מתייל** על החנקן בטבעת הקטנה של הבסיס החנקני של G.

מודיפיקציות נוספות שיכלולות לקרות זה הוספת **מתייל** על ההידרוקסיל בעמדה 2 של הריבוז של שני הנוקלאוטידים הראשונים.

- הוספת CAP מתרחשת עוד במקביל לשעתוק. RNA פולימראז יכול לסנתז בהמשך שרשרת ולקצת ה-5' כבר מוסף CAP. באופן יותר מדויק תהליכי זה מתרחש אחרי שעתק של כ-30-25 נוקלאוטידים ראשונים.

התהליך:

1. **פוספט** – הקצה 5' של הנוקלאוטיד יש הסרה של קבוצת פוספט. מזרע ע"י פוספטאז.

2. **גואניל טרנספרاز** – עם הורדת הfosfat אנדיז נקראה guanylyl transferase או בקיצור GT מסנתז

קישור של גואנין תוך הידROLיזה של פירופוסfat שני פוספאטים, כך שנוצר ל' **GMP המוחובר לשני**

פוספטיים בקצת 5 של RNA. RNA נקשר הכל נקשר קישור קוונטי **בכיווניות הפוכה** של '5' ל '5' בין שני

הנוקלאוטידים.

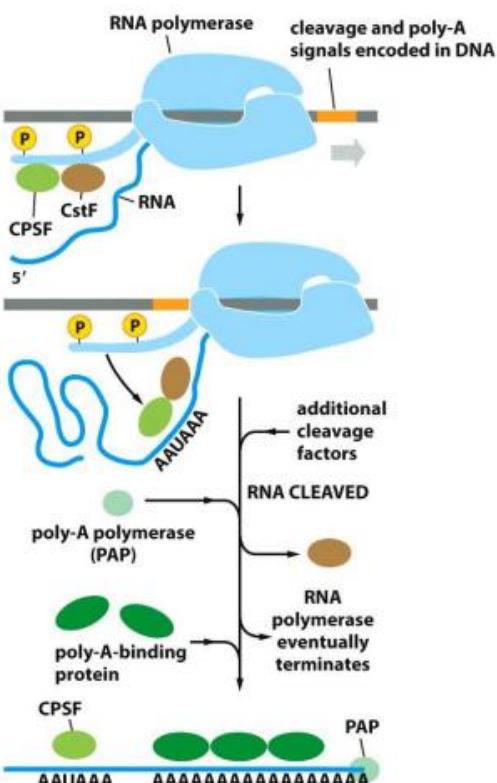
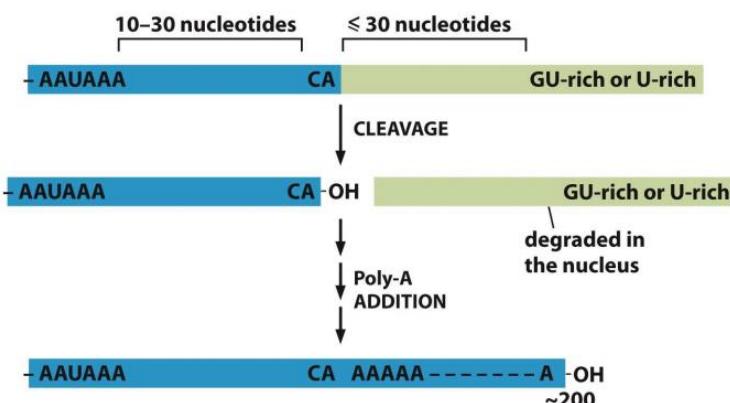
3. גואניל 7 מתייל טרנספרاز

4. טרנספרاز מתייל'O

ככה מתמודדים עם זה ש-אקסוןנווילאות יודיעים לזהות נוקלאוטידים רגילים.

Polyadenylation and Cleavage

- מתרחשת בקצת 3. מודיפיקציה זו מתרחשת גם תוך כדי השעתק של הגן ומתווכחת על ידי קומפלקסים חלבוניים היושבים על העמדות המצווחנות של ה-CDT:
1. Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor – **CPSF** – מודיפיקציה שהוא AAUAAA, ברגע שהוא יצא מהפולימראז.
 2. Cleavage stimulation factor - **CSTF** – CA-rich או GU-rich או U-rich.
 3. Poly A polymerase – אחראי שבחירת הנוקלאוטידים C-A הוא מושך בין 100 ל-200 נוקלאוטידים של A. לא צריך ופרימר לעומת שאר הפולימראזות.



- בשהפוליאדניל א נוצר קשרים אליו poly A binding proteins שעוזרים ליציבות המולקולה, ושומרם על הפוליאדניל A מדגרציה. חשובים גם לשגירה המעגלית של ה-RNA-mRNA ולהגדלת האורך הסופי של הזנב.
 - יש לציין שאחרי שהפולימראז עבר את סיגל החיתוך זהה הוא לא עוצר את השעתק בצוואר מידית אלא ממשך. למעשה ברגע שנוצר החיתוך, ה-RNA-ה החדש שימושה חסר CAP בקצת 5 על כן RNA לא מוגן זה עבר דגרדציה מהירה מקצת 5 לקצת 3 על ידי סקסו-hexo-Νοוקלאוזת. נראה שהסימן שגורם ל-RNA פולימראז ליפול זו הדגרדציה. הפולימראז יכול להמשיך ולנסות ב-1.5 אלף בסיסים במנזע לפני שהוא נופל.
 - הפוליאדניל A לא מקודד מה-DNA, רק אתר סיגל החיתוך בן.
 - אתר החיתוך ואטר סיגל החיתוך הם לא באותו המקום.
 - המנגנון, כמו ה-CAP, מסיע על המעבר של ה-RNA-mRNA הבוגר מהגרעין לציטופלазמה. המודיפיקציות בקצותות עוזרות לתא להבין שהוא מולקולה בוגרת שיש להعبر לציטופלזמה.
- ל-PAP יש מספר תפקידי:**
1. לסמן מולקולה שלמה ומעובדת לפני יציאה לציטופלזמה.
 2. לעזר לפוליאדניל A פולימראז לסייע על ידי הגברת האפיניות שלו ל-RNA.
 3. יש אומרים שהם קשורים גם להגנה של זנב האדנים מדגרציה.

Splicing

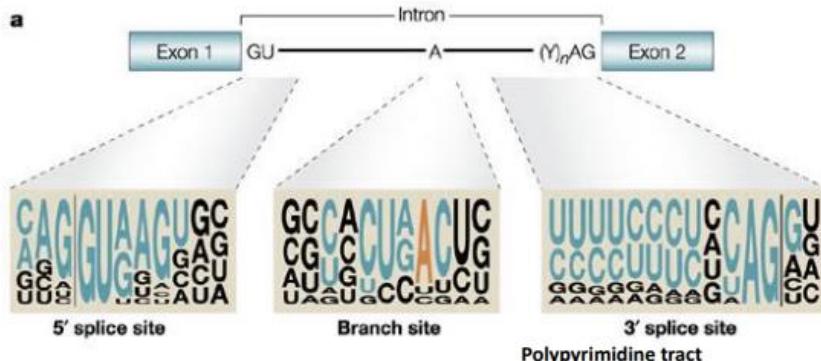
קורה בזמן RNA נוצר, בו זמינות לשעתוק.

הוצאת אינטראונים וחיבור אקסונים, מערכת מורכבת שדורשת דיק רם.

היתרון האבולוציוני – בקומבינציה, יוצרת מספר מולקולות mRNA מ-pre-mRNA אחת.

אתרים חשובים:

5' splice site – התחלת של האינטרון שמסומנת ע"י נוקלאוטידים מסויימים, לרוב GTAAAGT. אבל יש גם



אינטראונים שמדוים ע"י אזורים אחרים.

Branch site – נוקלאוטיד A לקרואת סוף

האינטרון. נמצא באזורי עשיר ב-T ו-C.

3' splice site – לרוב נגמר ב-AG.

אם תובנת מכך יכולת זהות אינטראונים
ואקסונים? לא. יש הרבה מעבר לרצף.

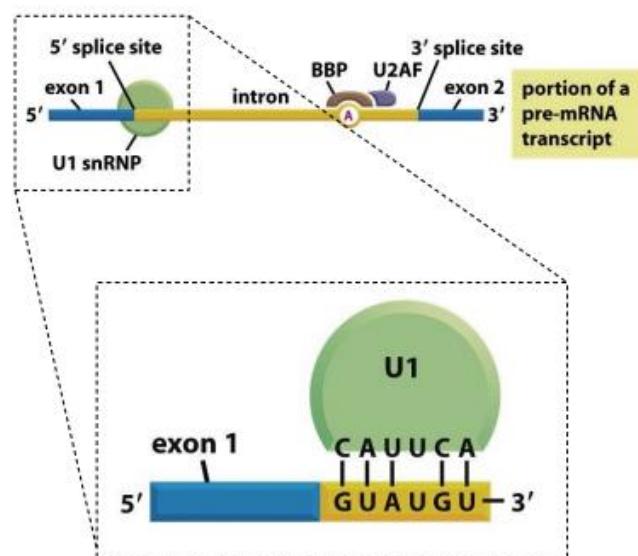
איך המערכת יודעת לזהות אינטרון?

הספליסינג מתבצע ע"י **ספליוזום** המרכיב מ חמיש מולקולות בשם **snRNAs (small nuclear RNAs)** (snRNAs) שאלה

בעצם רצפים של RNA שעוביים אינטראקטו עם חלבונים שמנעים את ריאקציית הספליסינג. הם משמשים

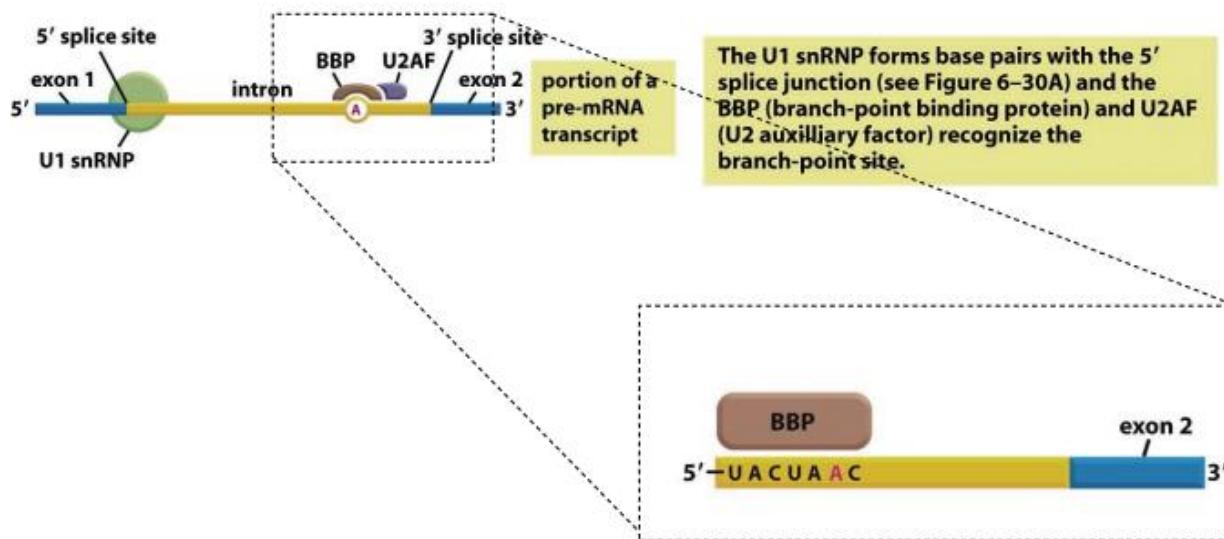
לזהוי והיקשרות לרצפי ההברה שהזכרנו ובכל הנראה גם בעלי פעילות קטלטיבית.

1. **U1** מזהה את ה-5' פריים של האינטרון ונקשר אליו באזורי GT. יש חשיבות לרצף.

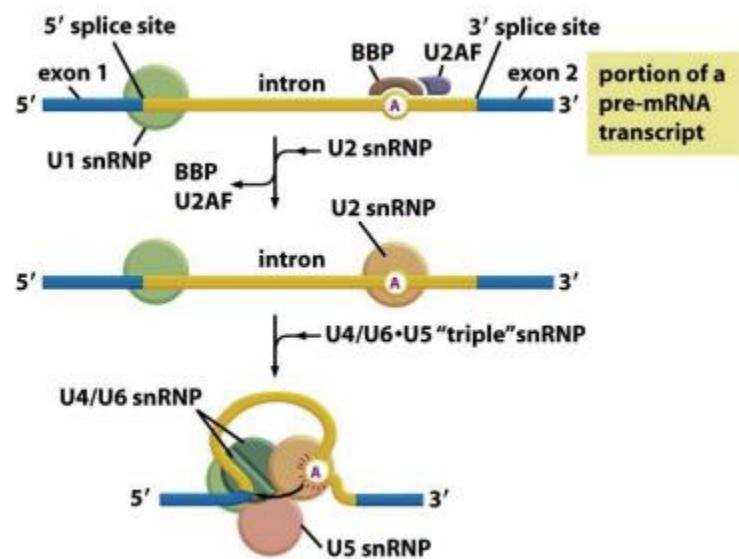


2. U2 מזהה את הבראנץ'.

לפניהם מזהה אותו, מגיעים חלבונים שנקשרים BBP branch binding protein שיודיעו לזהות את ה-A. U2AF שדה איזוחו פקטור שיודיעו לקשור את U2 בצד אחד ויודיעו לתוך את זה דרך ה-BBP. ה-U2 מחליף את שני החלבונים האלה ונקשר יותר טוב.

**3. U4+U6 מזהים את ה-U1 ומחליפים אותו.**

ל-U6 יש יכולות קטליפיות טובות לפירוק RNA, ולכן הוא מגיע קשור ל-U4, ואז נקשר ל-U2 וה-U1 עוזבים. 6-U המונע הקטלי של החיתון.



4. 5'OH, ברגע שהייתה קשירה לבראנץ', OH תוקף את splice site ה-5' וונצ'ר מבנה Lariant, ככלומר הקצה 5' נקשר ל-A. האקסון משוחרר אבל כדי למנוע את זה ה-5'OH מחדיק אותו ולא נוטן לו לברוח.
5'OH השחרר בintestinalים יוכל לעשות את הריאקציה השנייה? ולשחרר את ה-Lariant והאקסונים מתחברים בתיווך 5'OH.

התהיליך הזה מאד חשוב וכן כל הבקרה העמוסה הזאת.

יש חלבוני עד שлокחים חלק בתהיליך הזה, והם נמצאים על ה-CTD של הפולימראז. הם שעוזרים למשעה על ידי אנרגיה לשבור את קשרי ה-RNA-RNA לשם יצירת קשרים חדשים. סך הכל כל הריאקציה של שחבור יחיד דורשת בערך 200 חלבוניים. זה חשוב כדי לוודא שהרצפים הנכונים מזוהים.

אורכי האקסונים הם בקורסציה גבוהה עם אורך ה-DNA שעובר סיבוב סביב הנוקלאוזום. האקסונים שמורים באורך, אך מערכת השעתוק מתיחסת לנוקלאוזומים כמו מעצרים. הפולימראז נעצר על אקסון ויש זמן למערכת ה-slicing לדחות מה שקרה לפני ומה שקרה אחריו.

חלבוני SR

Alternative splicing – מהתרגול, חסורה ההרצאה

מולקולות RNA בזמן התהיליך העיבוד יכולות לעבור תהליך שחבור שונים. constitutional exon - אקסונים שתמיד יתבטאו בגן, לא משנה איזה שחבור מולקולת RNA עברת.

סוגי שחבור:

1. דילוג על אקסון.
2. אי הוצאת אינטרון (ואז בחלק מהמולקולות האקסון יתבטא ובחלק לא).
3. מצבים שבהם ימצאו ארנו 5 או 3 שונים באינטרונים ולכן השחבור יבצע בצורה שונה ורחוב נקלבל הכנסה של חלק מהאינטרון.
4. מצבים שבהם יש אקסון משותף ולעיתים יצאו את הראשון ולעיתים יציאו את השני.

בקרה על השחבור

1. **חלבוני בקרה** – חלבונים אשר יכולים להתחבר לאזורים מסוימים על RNA ומשם להשפיע על הספליסוזום, בין אם השפעה חיובית או השפעה שלילית. הרצפים שאלייהם נקשרים החלבונים הללו מבצעים פעולה דומה לרצפי הבקרה שנמצאים ב-DNA - cis regulatory sequences . אם מדובר ברצף בקרה שלוו מתחברים יותר פקטורים חיוביים נקרא לרצף אנהנסר, ואם מתחברים אליו יותר חלבוני בקרה שליליים נקרא לרצף הזה סילנסר.

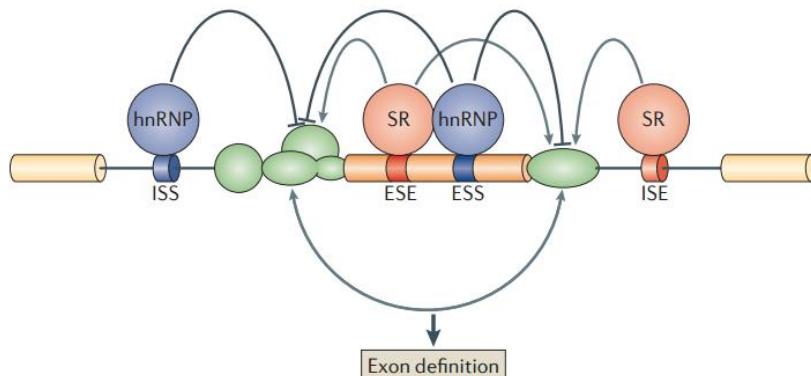
אם הרצף נמצא בקרה שלילי נקרא לרצף הזה סילנסר. **intrinsic splicing enhancers (ISEs) and intrinsic splicing silencers (ISSs).**

אם הוא ישב על אקסון אינטרון נקרא לו **exonic splicing enhancers (ESEs), exotics splicing**

silencers (ESSs).

החלבונים האלה הם משתי משפחות חלבוניים:

- המשפחה הראשונה נקראת **SR-ser/arg rich protein** לרוב החלבוניים הללו יהיו מעורבים בבקра חיובית.
- המשפחה השנייה חלבוניים שקשריהם אליהם RNA והם נקראים **hnRNP**s. הם לרוב נקשרים לסליזר וmdbאים את פעולות הספליסוזום על ידי הסתרת אתר הקישור.
- אם נשתכל על התמונה הכלולת נוכל לראות תמונה שיחסית דומה למה שראינו שהסתכלנו על בקרה על תהליך השעתוק – ישנו רצפי בקרה שאלהם מתחברים חלבוניים אשר מתקשרים למרכבי קומפלקס הספליסוזום ומשפיעים על הפעולה שלו.



2. **השמירות של רצפי הבקра ואפיקיות הקישור שלהם אל מרכיבי הספליסוזום.**
יש עדין וריאbilità מסוימת באשר אנחנו משתמשים על רצפי הבקра. הריאbilità זו תשפיע על אפיקיות הקישור של מרכיבי הספליסוזום ל-RNA ומהירותה שבה תתרחש הריאציה.
אזור הבקра שלהם יש דמיון גדול לאחר הקונצנזוס נקראים **אתרים חזקים** מה שאומר שהsplisozom יקשר אליהם מהר ובאפקניות גדולה בעוד אתרים שרחוקים מאתר הקונצנזוס נקראים **אתרים חלשים** ואליים הספליסוזום יקשר במידה נמוכה יותר.
בולם במקרה זה נקבל קישור שונה על פי אפיקיות ועל פי השמירות של אתרי הבקра.
השחבור יושפע מהקינטיקה של הריאציה.
3. **מהירות האלונגציה** - כמה מהר אתרים נחשפים לפני הספליסוזום.
מה יקרה אם האתר החזק יותר לא יחשף לספליסוזום כל כך מהר אחר וקצב השעתוק יהיה אליו יותר, ולמרכבי הספליסוזום יהיה מספיק זמן להיקשר לאתר החילש ולהוציא לפועל את ריאקציית **splicing**?
השחבור יהיה בר שαιנטרון הזה יוצא ולא יהיה דילוג על אקסון.
באשר האלונגציה תהיה מהירה הסבירות שאטור יותר חזק יחשוף תהיה יותר גבוהה והsplisozom יתחבר יותר מהיר לאתר זהה וידרג על האקסון וההפר.
אם האלונגציה תהיה איטית יהיה יותר זמן לחלבוני בקרה להתחבר ולהשפי.
מבנה הכרומטין יכול להיות מעורב. במידה והוא דחוס הוא יעכב את פעילות הפולימראז וכן יגרום לאלונגציה יותר איטית אשר יכולה לעבר יותר בклות בקרה, ותאפשר חיבור של פקטורי בקרה ותאפשר שחבור באזוריים יותר חלשים.

מכאן ניתן לראות שהעובדת שהשחבור מצומד לשעתוק משפיעת רבות על השחבור ויכולת להשפיע על הדפוס השחבור שנקבע.

תרגול 9**Southern blot - DNA**

הפרדה של DNA, ניתן לגלוות האם גן נמצא בתמיסה שנרצה.

התהילין

- **חותכים את-h-DNA** עם אנזימי רסטרייקציה לרצפים קצרים שאוטם **מריצים** באלקטרופוזה לקבלת הפרדה לפי גודל.
 - ה-h-DNA טען שלילי ולכן רץ מהקווב השלילי לחובי, ובעצם מופרדים לפי הגודל שלהם. זה נעשה בתמיסה שמכילה חומרים דנטורטיביים שעוזרים דנטורציה ומפרידים בין הגדילים. למה שנרצה להפריד בין הגדילים?
 - 1. נרצה לחושף את השירויים השליליים של-h-DNA שייקשרו למ מבנה שטעונה חיובי.
 - 2. ההפרדה הזאת גם תאפשר למעשה לפרובים שהם רצפים קצרים של DNA להיקשר לגדילים בהמשך.
 - 3. הדנטורציה תסייע להרים כל מיני RNA שאולי עדין קיימים בתמיסה.
- טרנספר – מניחים את הgal על גבי ממברנה**, שמיים ספג הספג בבופר עליו gal עליה ממברנה ועליה עוד ספג.
- הפעלת לחץ חזק על גבי המمبرנה שמתוחתיה הgal גורמת ל-h-DNA לעבור למ מבנה. העברה מתבצעת על פי הכוח הקפילי – למעשה הכוח הקפילי הוא הכוח של מים לעבור מאזור של מים עם פוטנציאלי גבוה לאזור של מים עם פוטנציאלי נמוך, כך הgal עבר למ מבנה. מה שקרה למעשה זה שה-h-DNA הטען שלילת נקשר למ מבנה הטעונה חיובית.
- את המمبرנה אפשר לחושף לבופר שעושה בלוקינג שיכל להעלות את הספציפיות.
- כדי שה-h-DNA יקשר באופן תמידי למ מבנה צריך ליצור קשרים קולגנטים בין החומצות גרעין, וזאת ע"י העברת המمبرנה לתנור בואקום ב-80 מעלות או חסיפה ל-UV.
 - **מקבלים העתק של gal על גבי המمبرנה**. יש הפרדת מקטעים לפי במדים.

עוצמת הצביעה מעידה על כמותיות – השיטה מאפשרת לגלוות האם המולקולה נמצאת ובאיזו כמות.

איך נדע שבבנד עליו אנחנו מסתכלים יש את מולקולת-h-DNA הרציה?

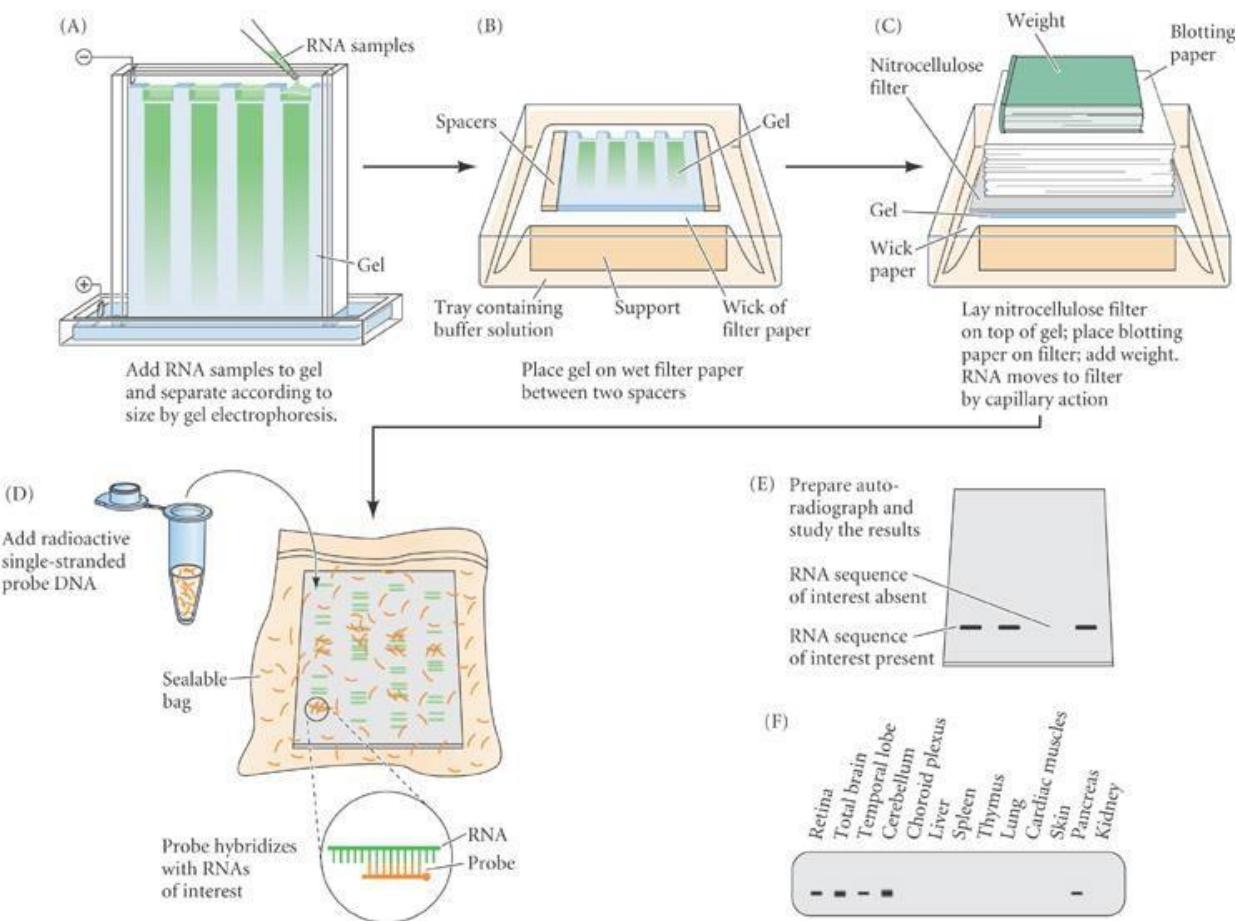
חוופים את המمبرנה לפרובים, שזה פריימר חד גדייל. את הפروبים קבועים בהתאם ל-h-DNA אותו אנחנו מחפשים.

הם מסומנים בצורה רדיואקטיבית/פלורסנטית. ע"י הסימון נוכל לעקוב אחרי מולקולת-h-DNA ולראות את היא קיימת במمبرנה ואם כן איפה.

על מנת להבטיח ספציפיות של הקשירה של הפروب לדוגמת-h-DNA, רוב הפעמים משתמשים ב-h-DNA חיצוני לשם חסימת כל האזוריים על גבי המمبرנה שאין בהם כלום. וכך ניתן להגביר את הסיכויים שהפרובים יקשרו למעשה רק למולקולת המטרה ולא לדברים לא ספציפיים. לאחר הסימון עם הפروبים את המمبرנה ניתן לחושף למצלמה מיוחדת שマーאה היכן נמצא-h-DNA על גבי המمبرנה.

Northern blot - RNA

- מrizים על ג'ל ומתקבלים הפרדה לפי גודל.
לג'ל עושים את הטרנספר לממברנה **blotting**
שים בבופר
אם ברצח להסתכל רק על מה שמקודד נשים בתמייה עם פול' D שיתקשר לפול' A ונשאר רק עם מה
שמקודד.



Western blot - peptides

המידע שנקבע: גודל החלבון ומידת הביטוי היחסית שלו.

локחים תערובת חלבוניים ומוסיפים להם **בטא-מורקפטואטנויל** שימוש כחומר מבחן והוא קשרי SS בחלבון (ה-SDS שנראה בהמשך לא יכול לעשות את זה). מחממים את הדוגמאות בטמפרטורה גבוהה כדי שהחלבון יabd את המבנה המרחבי שלו.

מוסיפים SDS – חומר המורכב משרשרת פחמנינן וראש הידרופולי פולרי והוא מיישר את החלבון במבנהו המקורי, ובכך לו מטען שלילי, כדי שירוץ בגל מהקווב השלייל לחובב.

מקבלים פוליפפטיד, ועטיפת החלבון במטען שלילי. מריצים את החלבוניים בגל. החלבוניים בעצם רצים לפי הגודל שלהם ולא לפי התצורה המרחבית, בעקבות כל הפעולות שעשינו עליהם.

טרנספר – העתקת תוכן הגל למمبرנה. המمبرנה עשויה לרוב מניטרוצולוז וע"י זרם חשמלי מושכים את החלבוניים מהgel למمبرנה הטעונה חיובי. כמו כן נוצרות אינטראקציות הידרופוביות שעוזרות להעתקה.

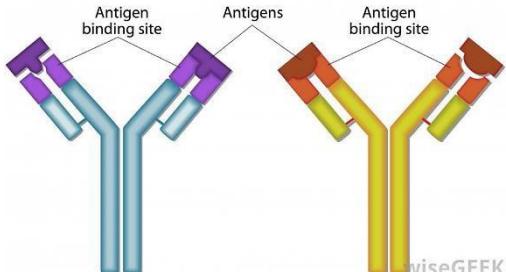
את המمبرנה שעשינו לה טרנספר שמיים בבעיר שעשו **בלוקינג**. שלב שימנע מהנוגדים להיקשר למمبرנה – חסימה של קשירה לא ספציפית של חלבוניים למمبرנה. זה נעשה על ידי תמיisa שמכילה חלבוניים. החלבוניים שבתמיisa נקשרים למمبرנה בכל המקומות שבהם חלבוני המטרה לא נקשרו. ובאשר מוסיפים נוגדן? אין מקום על המمبرנה שהם יקשרו והם חייבים להיקשר לחלבוני המטרה שלהם.

דתקציה ע"י הנוגדים.

כדי שנדע לאיפה נקשר הנוגדן על גבי המمبرנה השתמש בנוגדן שניינו שנקשר לנוגדן המקורי, והוא בעל סייגן מסוים שברגע שהוא יקשר לנוגדן הראשון הוא ייצור אותו.

הנוגדן השני מתחבר לחלק שהוא יחסית קבוע בר שלבן הנוגדים מאותו סוג באותו יצור יהיה אותו חלק. בר יהיה קל ליצור נגדים שהם יחסית אוניברסליים ובלי ספציפיות למטרה של הנוגדן המקורי אלא רק הזרות של החלק הקבוע? בר אפשר לסמן את המיקום של החלבון. במקרה זה התוצאות הן לא ב眞ות באופן ישיר. נוגדן אחד יכול להיקשר לשני חלבוניים וההפר.

אר עם זאת, ניתן באופן יחסית להציג על ב眞ות. אם נראה הארה ממשמעותית יותר גדולה ניתן לה宾 שהיה יותר חלבון במקום אחד לעומת מקום אחר.

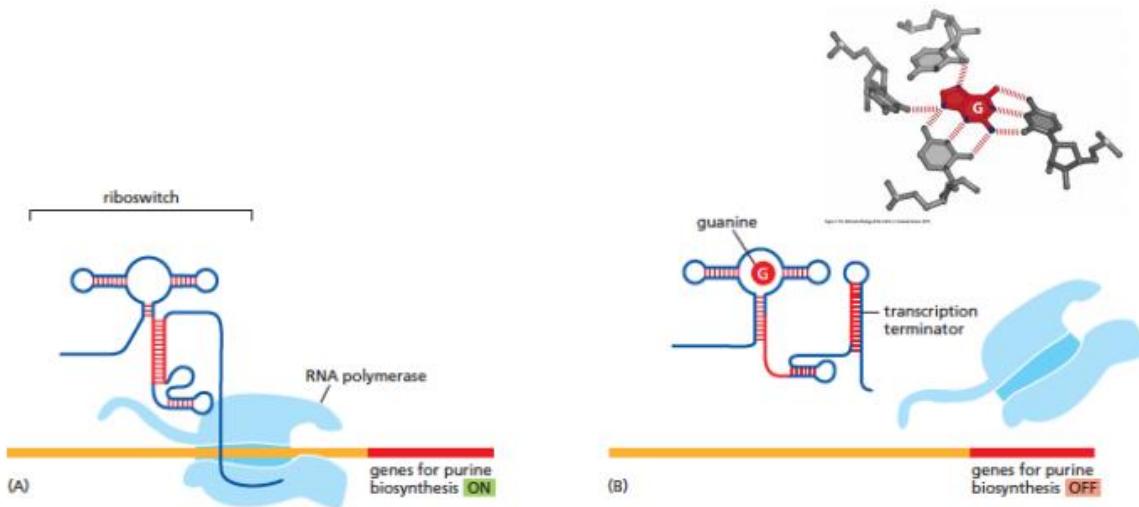
**אנטיגן**

משמשים כפרובים לחלבון, כלומר מזהים חלבוניים רצויים. איזורי וריאbialים באדם וסגול שימושיים ויכולים לקשר את האנטי גנים.

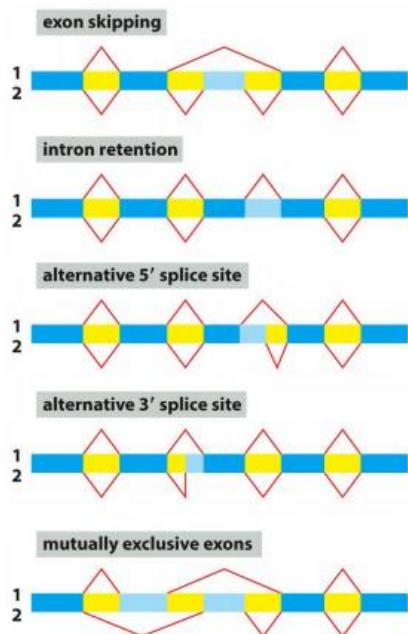
RNA based regulation

riboswitch

מנגנון ייחסי פשוט ונפוץ ברגולציה בפרוקריוטים. **שימוש מבנה שנוצר ב-5' פריטם, בנקודת ההתחלה של יצירת RNA, על מנת לשולט בתרגום החלבון.** מערכת שטובה למטרות – אין צורך בחלבונים רגולטוריים נוספים או במערכת מתוחכמת על מנת לשולט ברמת RNA. בהיווצרות RNA, כל עוד אין רמות גבוהות של גואני בתא, התא מייצר אנדזימים שיאפשרו לעשות ביוסינטזה של גואני, מצב חס. בשיש גואני בתא הוא נקשר לכיס של המבנה RNA וודע לעצור את השעתוק. תהליך מהיר.



חברור חלופי



בsha-RNA נוצר הוא יכול להשתמש באטרוי ספליזינג שונים וליצור חלבונים רבים למספר גנים מצומצם. DSCAM – גן בדרוזיפילה. מייצר 38,000 אופציות לספליזינג. יש יכולת לשולט ב-splicing דרך חלבונים. איזופורם שונה יכול להפוך את הפונקציה של הגן. ניתן לשולט בספליזינג דרך חלבונים. יש אפשרות לשחק עם הטנסקייטים בפונקציה של מה שהטא זקור.

פוליאדנילציה חלופית

המודיפיקציה האחורה של mRNA טרי היא פוליאדנילציה – הוספת זנב פולி A באטר ספציפי שמוכר ע"י חלבונים שונים בתא. יש מצב בו זנב הפולி A יכול להיקשר לכמה אתרים אלטרנטיביים: לעיתים יש יותר מאתר הבראה אחד, כאשר האתר החזק (קשר את ה-CstF חזק), הקרוב יותר לקצה 3', מזויה בין היתר על ידי CstF ונוצרת בעקבות הקישור פוליאדנילציה.

המנגנון יודע לזהות את סיגנל ה-polyadenylation (AAUAAA) ולעשות cleavage ב-CA שנמצא ב-20' בוקלאוטידים אחריו.

כל שייה לנו יותר CstF כך לתהיה יותר אפשרות לזהות אתרי פוליאדנילציה חלופיים, ובמקרים בהם יש CstF ביותר, האתר החלש שהינו מזוהה וכך נוצר mRNA קצר יותר. תהליך זה יכול לקרות בכ-50% מהגנים. יש לציין שלא ה-UTR' 3' (בעקבות הפולி-A באתר ה-UPstream) miRNAs כבר יאבדו את האתר הבראה שלהם לאווטו mRNA. נדבר בהמשך בהרחבה על miRNAs.

בוגר – האקסון הירוק מקודד לרצף הידרופובי שהוא טראסմברנאל. בשטאי B מזהים אנטיגן הם עוברים הפעלה, ונרצה שהנוגדים יושחרו למחזר הדם. המערכת של הפוליאדנילציה אלטרנטיבית מאפשרת את שחרור הנוגדים – באיקטוב של תא B יש טויגר שמעלה את ביטוי CstF והוא יכול להיקשר לאתר החלש. יש חיתוך מוקדם יותר של mRNA, אין את האקסון הירוק שמקודד לאזור הידרופובי, וזה מאפשר את השחרור של החלבונים מהمبرנה.

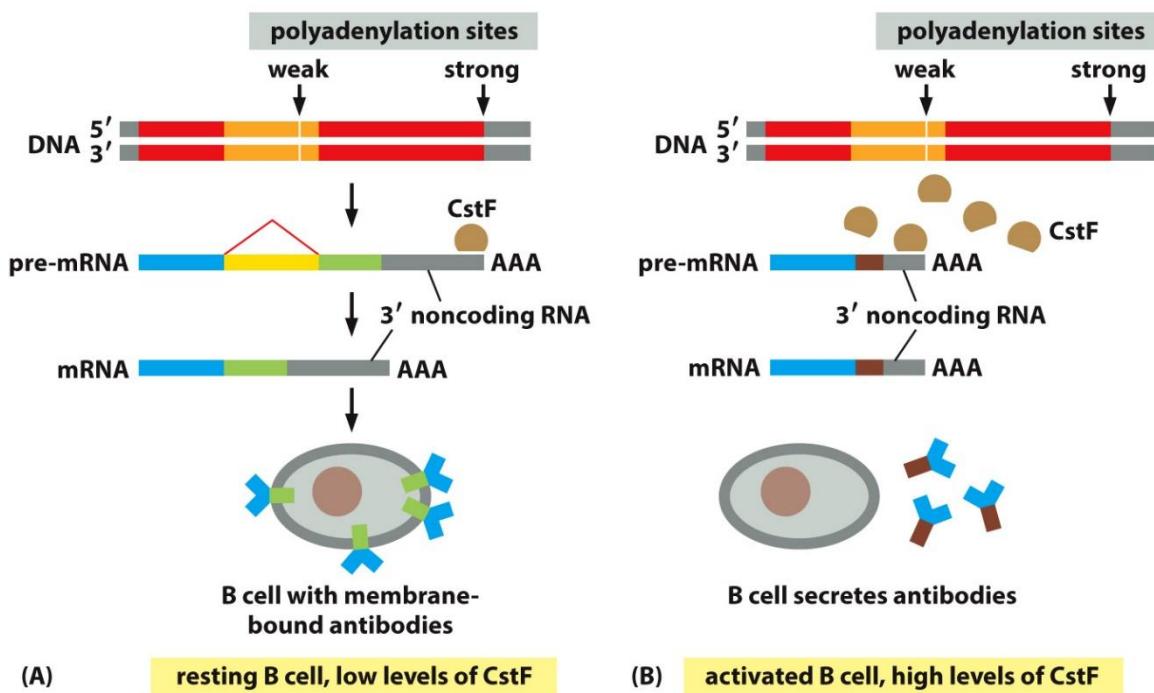


Figure 7-59 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

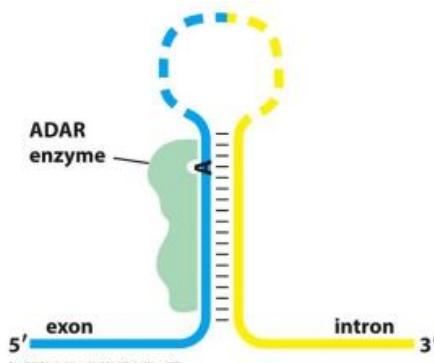
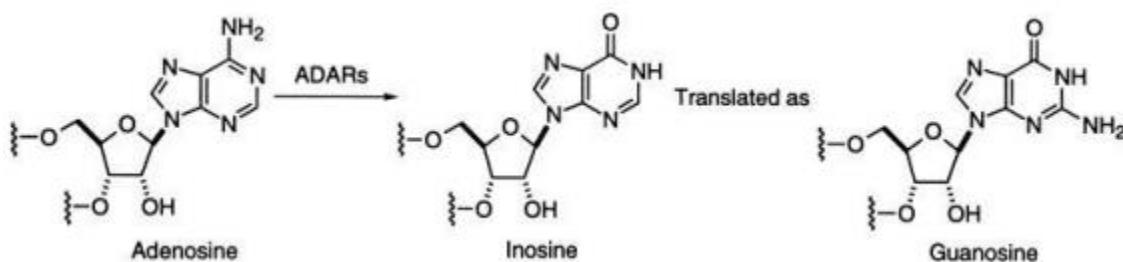
RNA editing

שתי צורות של עריכת RNA:

- דָה-אַמִינְצִיה שֶׁל צִיטּוֹזִין לְאוֹרְצִיל ע.



- דָה-אַמִינְצִיה שֶׁל אַדְנִין אַלְיאִזּוֹן ל.



דָה-אַמִינְצִיה מ-**A** ל-**I** יוֹתֵר נִפְזָחָה וּמִתּוֹבֶת ע"י אֲכִידִים בְּשָׁם **-ADAR** -
adenosine deaminases

יָדָעַת לְזָהָות double strand של RNA וָמָקוּם שְׁבוֹ נִמְצָא אַדְנִין שְׁצָרֵר
לְשָׁנוֹת אָוֹתוֹ.
קוֹרֶה לְעִיטִיתִים נְדִירֻתִים, אֲבָל בְּשָׂזה קָוָרָה זוֹ מִשְׁמָעוֹתִי מְאוֹד: יְכֹל לְשָׁנוֹת
חוֹמַצָּה אַמִינִית, לְיִצְרֹר pre-mature stop codon הַתְּעִירָב בְּמִעֵדָה
הַסְּפָלִיסִינְג וּכְוֹ.

דוגמאות:

- ברצפטור של גולוטאמט יש תט יחידה שבה שחלוף ה-A ב-I אפשר רגישות גבוהה למעבר סידן.
- בניסויים בהם פגעו בפעולות ADAR או החליפו בסיס, הייתה פגיעה ברגישות מעבר הסידן ברצפטורים.

3. בדה-אמינציה של C ל-U בגין apolipoprotein שנוצר או בכבד או במעי. בכך אין את האנדמיים של הדה-אמינציה ולכן נוצר חלבון ארוך שמותאם לתפקידו היבודי. לעומת זאת במעי נוצר איזופורם אחר בתוצאה מהעריכה שחווט לתקוד התקין של המעי.

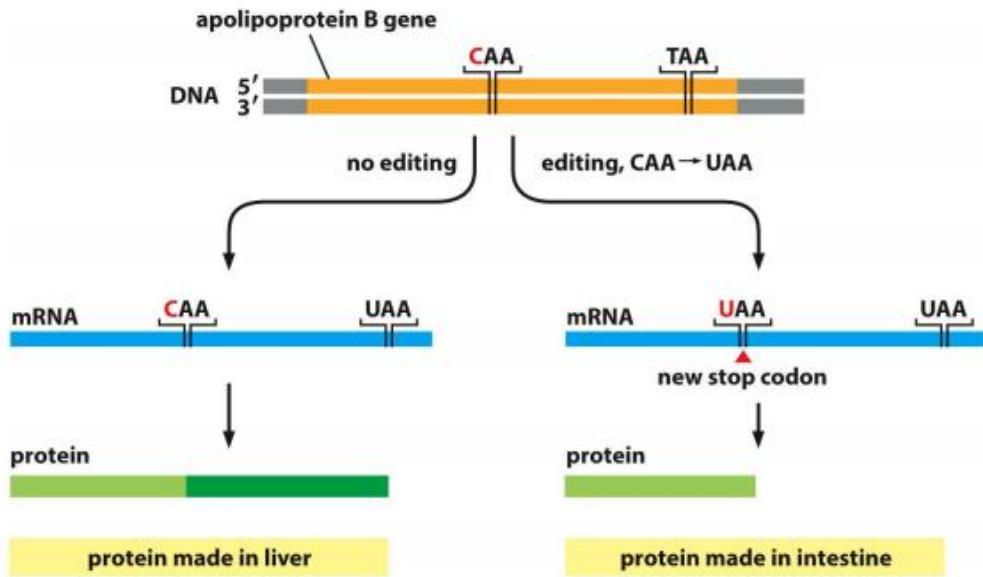


Figure 7-61 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

למה נוצר המנגנון?

1. לתקן טעויות.
2. להעשיר את האיזופורמים של החלבונים.
3. מערכת הגנה תאיית מפני פלישה של טרנספוזונים וירוסים.

Non-sense mediated decay (NMD)

תהליך בקרה שגורם לדגרדציה על mRNA **בעלי stop codon מוקדם**. נרצה לוודא שה-RNA יצא לציטוזול במו שצריך. בשיש pre-mature stop codon, הוא צריך קומונצייה מסוימת כדי שהמערכת תזהה אותו. Termination במקום מוקדם יגרום לייצבות נמוכה של hnRNA לעומת stop codon במקום הנכון.hnRNA עובר לריבוזום ומתחילה לעبور תרגום ראשון, כאשר הריבוזום מגיעה ל-stop codon upstream של 50-55 בסיסים מקצת 3' יש עוד אקסון, וה-exon junction מזוהה, המערכת תפעל. תלויה תרגום.

רקע

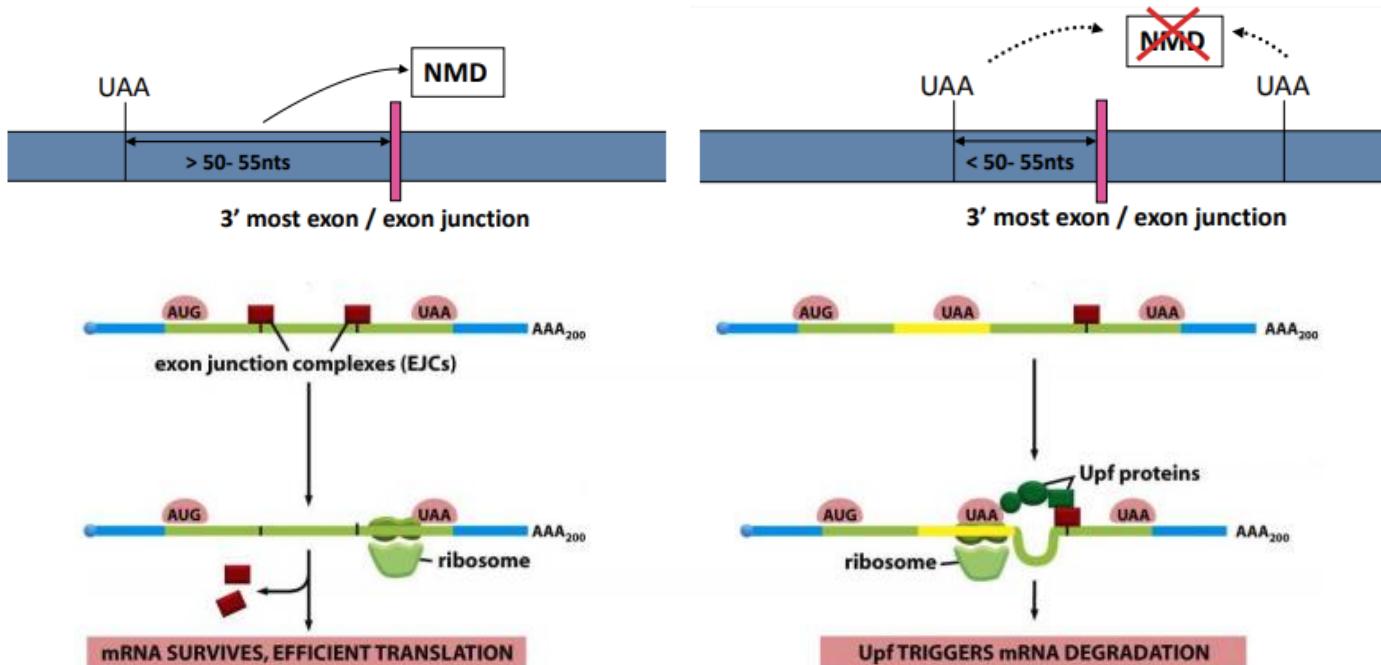
בזמן הטרנסקריפציה יש חלבונים שמתחרבים ל-RNA, כמו **snoRNPs** שנקשרים לאינטראונים והם עוזרים לאפשר לספליסוזום להבחין בין אינטראונים לאקסונים. מושעים שהם נקשרים ל-pre-mRNA ועוזרים לפתח מבנים שניוניים שקיימים ב-RNA וכן למעשה הם עוזרים לקריאה של סיגנלים של ספליסינג וסיגנלים אחרים על גבי הרנו'א.

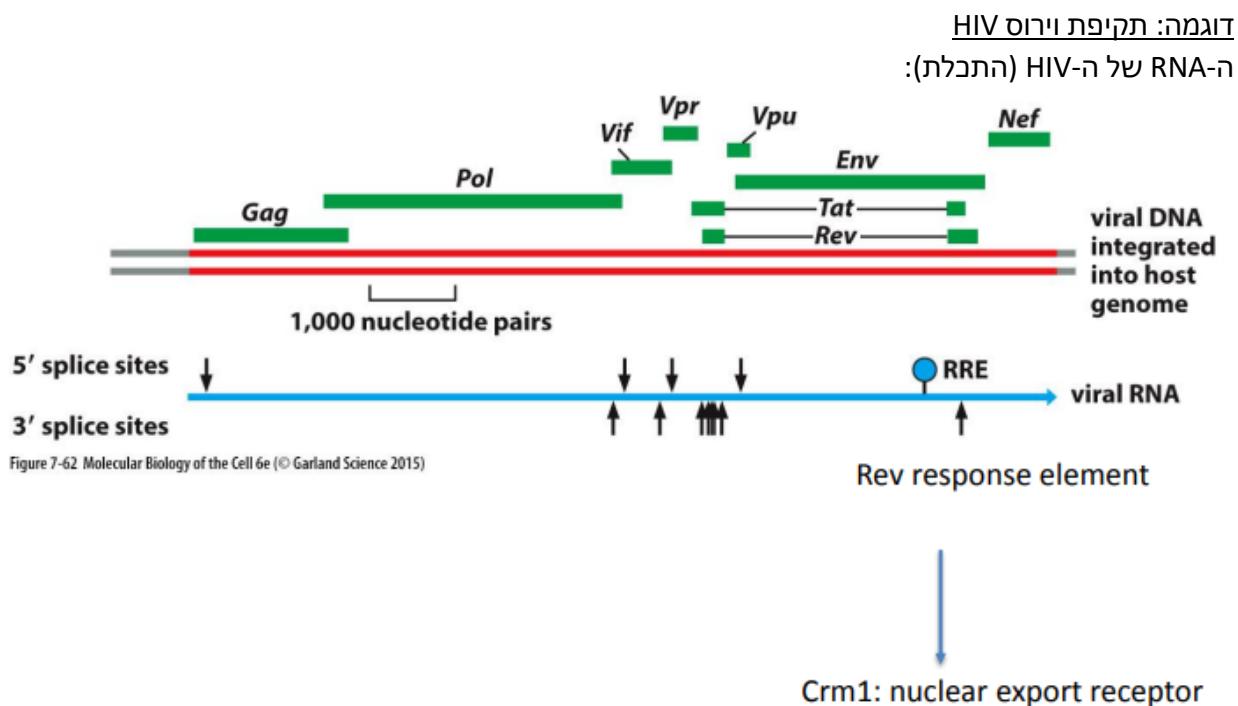
בנוסף לשערם שהם מהווים סיגנל המפריד בין mRNA סופי לאינטראונים הדריכים להיזרק (הם למעשה נקשרים על גבי האינטראונים ומהווים סיג널 שմדובר באינטראון שנחתר בסקפלייסינג). נשארים על האינטראונים ומהווים סיגナル שמאזורי mRNA הסופית לא מכילה אותם, והם בו זמןית עם השעתוק נקשרו ל-5' Cap pre-mRNA (לkaza 5' ולאחר מכן CBC – cap-binding protein complex) וחלבן הנקשר polyA (PABP).

exon junction complex - EJC

לאחר הוצאת האינטראון מונח הקומפלקס EJC 20 נוקלאוטידים downstream לצומת בין שני אקסונים. חלבון בקומפלקס זהה יש פקטור הקשור פקטור בשם TAP וביחד הם יודעים לשנע את hn-RNA מהגרעין לציטוזול. בעת, בתהליך ראשון של תרגום, הריבוזום מעיף את hn-EJC. **אם בשלב זה יש stop codon מוקדם, הריבוזום לא מצליח להעיף אתhn-EJC אחורי וגורם להפעלת מערכת NMD.** חלבוני UPFs מתחבריםhn-EJC ויוצרים קומפלקס עם פקטורי טרמינציה על גבי הריבוזום וגורמים לדגדציה של hn-RNA זהה. חלבוני אלה יכולים להתחברhn-EJC באופן טבעי אבל על מנת לעשות זאת הם צריכים זמן, מהם יכולו לעשות זאת רק כאשר יש עצירה באлонגציה (בשל הגעה לקודון פסק) המאפשרת להם מבחינה קינטית לבצע את הפועלה שלהם.

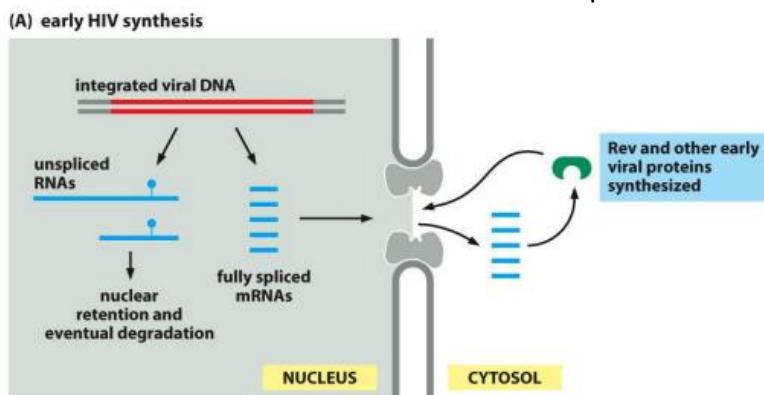
דרוש שה-codon stop יהיה 55-55 נוקלאוטידים upstreamhn-EJC (לפני האקסון האחרון), אחרת הריבוזום יוכל להעיף את hn-EJC ולא יהיה טיגרLNMD. אם הוא נמצא downstreamhn-EJC זה גם לא יעבד.





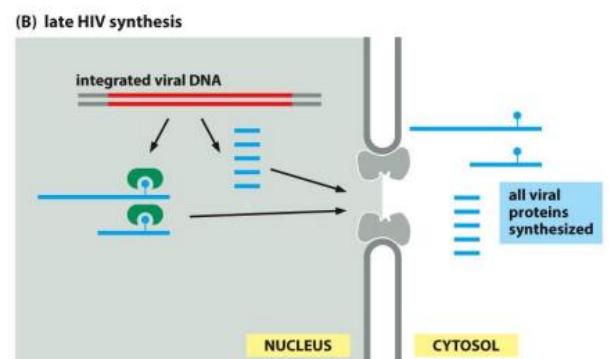
החצים מראים אתרים ספליזינג שונים.

בגנום של הוירוס אין Rev, Tat או Env והשוני זה בספליזינג. אזור ה-RRE מייצר מבנה ב-RNA שנקשר לאזור זה בתיאור של Rev response element ומודע לעבר אינטראקציה עם חלבון ה-Rev. ברגע שהחלבון נקשר לאזור זה בתיאור של צפטור Crm1 המולקולה יכולה לצאת ליציאת פליטה על מנת להיארך בתוך קופסית וליצור וirus חדש.



שלב ראשון

אותם RNA שהם unspliced, אין להם אפשרות לחברו לחלבון Rev ולצאת החוצה ולכן עברו דגרדציה מהירה. לעומת זאת אלה שהם spliced יצאו החוצה וייצרו חלבונים, כולל ה-Rev.



ה-Rev נכנס פנימה ומגן על הגנום המלא של הוירוס שיכל לצאת החוצה ולהיארך.

локализация mRNA

מולקולות ה-mRNA יכולות לקבל סיגナル שמאפשר להן להגיע למקום ספציפי בתא, כי יש בתחום אזורים של גורמים לריבוזום מוגבר של מערכות בקרה מסוימות. אוטם סיגנלים נמצאים בד"כ על ה-3'UTR ומאפשרים א-סימטריות. אפשרות לעשות רגולציה mRNA בתחום אחרת.

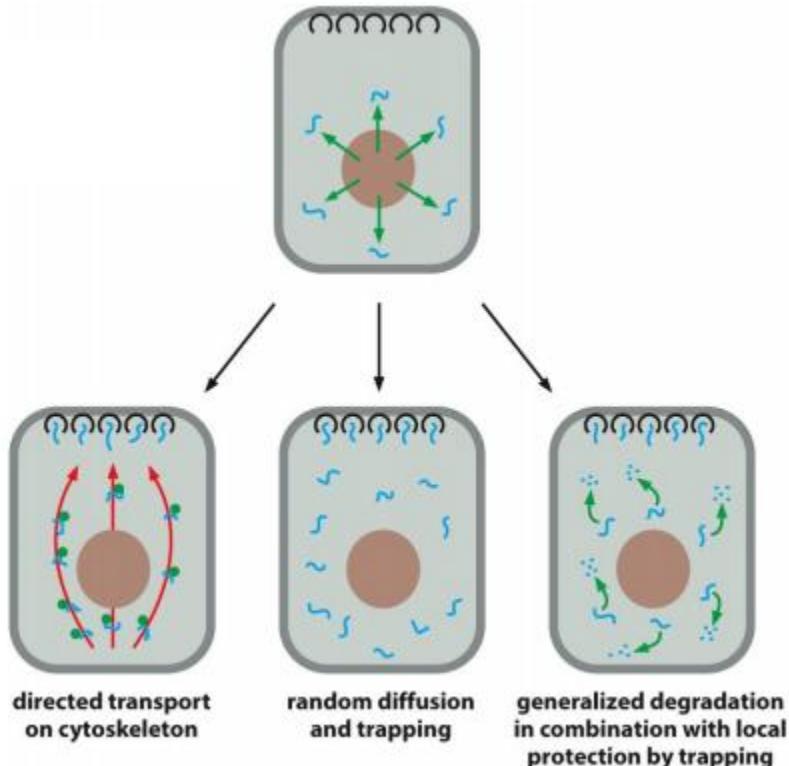
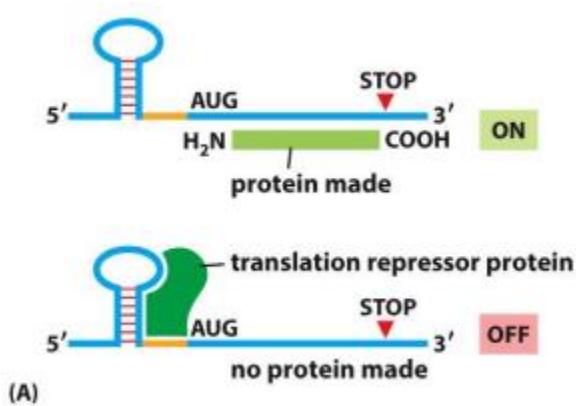


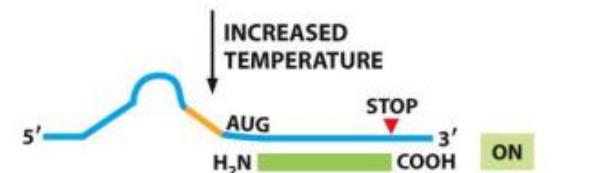
Figure 7-64 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

אזורים לא מתרגםים של mRNA (untranslated regions) mRNA

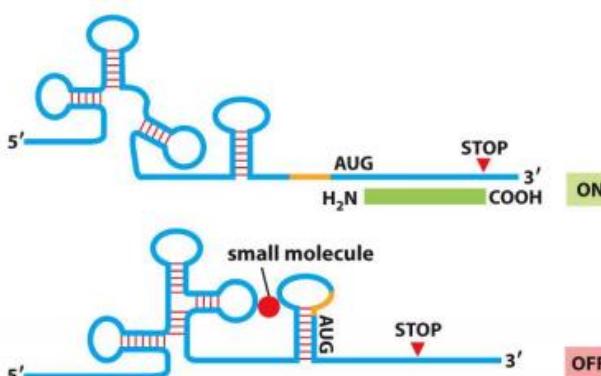
אפשר לראות בדוגמה מגנון אצל פרוקריוטים, שבו יש אזור upstream לתחילת התרגום, שלו נקשר סופרסור ש"מסתיר אותו" וגורם למערכת התרגום לא להזהות את האזור.



מנגנון נוסף, אותו מבנה מכיל את המתיון של תחילת התרגום ולא מאפשר תרגום עד שהחידק נקלע לטמפרטורה גבוהה, דיווגי הבסיסים נשברים והחידק יכול ליצור את החלבון.



(B)



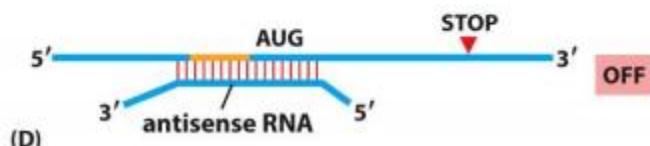
(C)

במנגנון זהה יש מולקוללה קטנה שכאשר היא נקשרת היא מונעת מה-AUG להיחשף.

Figure 7-66 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



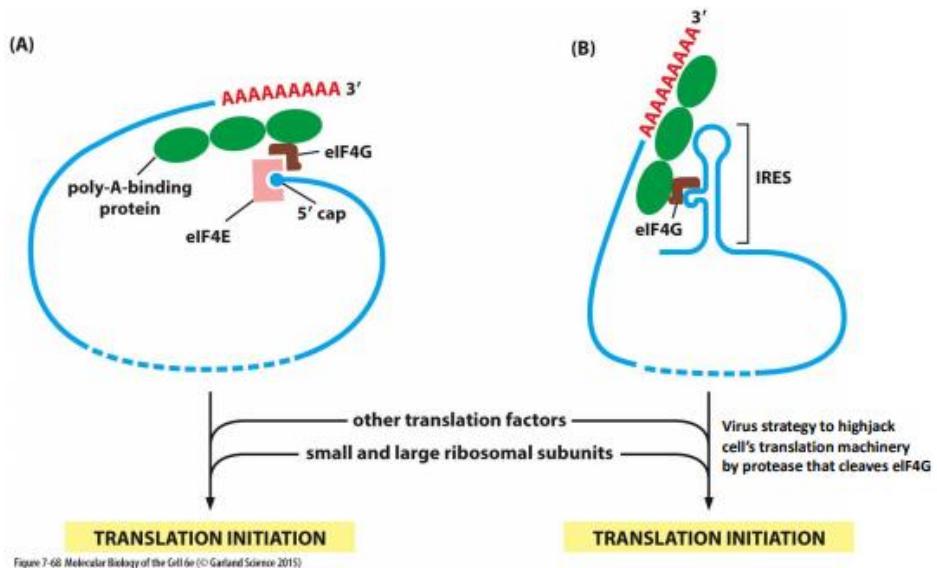
כאן יש הפרעה של התרגום ע"י גדיל antisense RNA שנקשר לאזור ההתחלה. הדבר על כן בהמשך.



רגולציה ע"י פוספורילציה

Internal Ribosome Entry Sites (IRES)

מערכת עוקפת CAP, נפוצה בעיקר אצל וירוסים כאשר הם רוצים לשתק את מערכת התרגום האוקריוטית. תזכורת – elf4G יודע לחבר את-CAP לказה של הפוליאול א' ולאקטיב אלונגציה. הוירוס פוגע בחלבונים כמו ה-elf4G ע"י ייצור פרוטאין שגורם להם לעבור דגרדציה. לא מתאפשר תרגום של כל המולקולה, אבל בן מתאפשר תרגום של אזור-IRES שב"ב נמצא אצל המולקولات הוויראליות.



uORF – upstream open reading frame

ב-UTR 5' יש אזורים שנראים כמו התחלת וסיום של מערכת תרגום (מתוינו, stop codon) שהריבוזום יכול לעبور עליהם, לתרגם אותם למולקולה לא חשובה ולא לייצר את מה שרצינו לתרגם. ניתן לשЛОט בהזזה ע"י ייעילות הריבוזומים בתא. אם נPsiיק פעילות ריבוזומלית לא תהיה הכרה בתהיליכים אלה והריבוזומים יגיעו ל-GCN4. בעצם בהשתקה של תרגום תהיה העדפה למולקولات המובילות את ה-uORF (GCN4). כנראה לא חשוב כי הוא לא נכנס להזזה.

dagdzia של mRNA

ב记载 במלולים שגורמים לדגרדציה של mRNA:

- הסרת ה-CAP וחסיפה לאקסונוקלאזות
- קיזור זנב הפוליאול א' ע"י אקסונוקלאזות
- חיתוך על ידי אנדונוקלאז ועוד דגרדציה על ידי אקסונוקלאזות

תחרות בין סטבילייטי לדגרדציה. נרצה לשלווט בזמןי החיים של mRNA. **P-bodies** – בניסוי שבשקל ראו שחלבוניים שיודעים להעביר דגרדציה של mRNA נמצאים באותו מקום בתא, ב-P-bodies, ושם קורה רוב תהליכי הדגרדציה.

RNAi – small interfering RNAs

יצירת RNA קצרים שלא מוקדדים לחלבון, ובאמצעות סיוג בסיסים ל-RNA_m, יכולים לגרום לרפרסיה של התרגום או לדגדצתה ישירה של mRNA_m.

איך גלו את זה?

עשו ניסוי על פרח שהצבע שלו סגול והוא מגיע מאיזשהו גן מסויים.

באשר הבסיסו לאותו פרח גן חיצוני שמכיל את הגן הקודם, ובעצם הגביר את השעתוק שלו, הפיגמנט עלה והסגול נביה בירה יותר.

לאחר מכון הבסיסו את הגן בכיוון ההפקיד והפיגמנט נהרס.

סבירו ש מולקולות antisense של RNA_m יכולה לעבור אליו סיוג בסיסים ולא לאפשר תרגום.

אחר כך רואו שההשתקה נגרמת גם בהבנסה של גדייל ה-sense ו הסיקו שההשתקה בתיווך של גדייל RNA כפולה.

ניסויים שנעשו על תולעת *c. elegans* לה RNA ds וראו שגן המטרה הושתק.

המנגנוןים:

siRNA .1

miRNA .2

piRNA .3

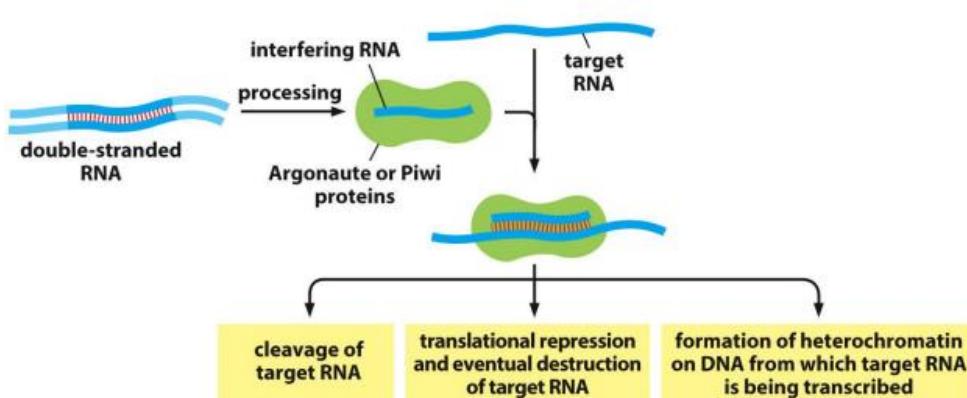


Figure 7-74 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

מתחלים מ-*dsRNA* שמודע
לעשות processing ל-*ssRNA*
שנקרא ? *guide RNA*
חלובנים הנקראים או
מיRNA שמתוווכים בין ה-*Argonaute*
Piwi RNA לגן המטרה ולגרום לפירוק
מהיר של RNA, לדיבוי תרגום וכו'.

miRNA

- ב-22 בסיסים.

- מבקרים תהיליכי ביוטו גנים ע"י צימוד בסיסים לגן המטרה.

- ב-1000 סוגים שעושים רגולציה לב- 33% מה-mRNA.

- משועתק מתוך הגנים של האורגניזם ונוצר בו מבנה hairpin.

- המולקולה יכולה להיות משועתקת בגן, בלומר מולקולה אשר עברה את העיבודים המלאים לאחר השעתוק שלה (cap וpoly A) אבל הייתה שהיא לא מוקודדת בסופו של דבר חלבון זה יחשב באזור של פסאודו גן.

כמו כן, המולקולה יכולה לעבור שעתוק בחלק מגן אבל ל"עוף" ממולקולות mRNA pre בשלב השחבור, כך שבמקרה זה מדובר באנטרין אשר לו תפקיד בתא. מולקולה כזו תקרא microtron. הוא לא יעבור דרך ה-Drosha (הסביר בהמשך), רק הספליסוזום חותך אותו. 72332

עם השעתוק של ה-miRNA נתקבל צורה ראשונית שלה שתקרא **pri-miRNA**. לאחר יצירת ה-pri-miRNA המולקולה עוברת מספר עיבודים. חלק מהעיבודים מבוצעים בגרעין וחלקם מבוצעים בцитופלазמה.

שלבים

1. RNA פולימראז מייצרת mRNA. עם הסינטזה של מולקולת pri-miRNA, המולקולה תופסת מבנה מרחבוי שניוני, בדרך כלל מולקولات אלו מאופיינות בחזרות של רצפים אשר יכולים ליצור לולאה של hairpin, ככלומר מבנה שניוני כך שרוב המולקולה נמצאת כדו גידיל.
2. קומפלקס שמכילה Drosha -RNAse (להיריד cap ופוליא), יודעת להפוך pri-miRNA ל-pre-miRNA שהוא יהיה קצר יותר (80-70 נוקלאוטידים) ועדין במצב hairpin.
3. ה-pre-miRNA יוצא לציטוזול ועם האנדמים Dicer נחתך ונוצר מבנה של dsRNAds בגודל של 23-20 נוקלאוטידים. בڪנותו יש בשני נוקלאוטידים רופפים (כלומר לא מצומדים לנוקלאוטידים אחרים ונמצאים בקונפורמציה של חד גידיל).
4. חלבונים בשם Argonauts הופכים את dsRNA ל-ss RNA שזה בעצם ה-guide RNA. החלבון יקשר על פי דיזוג בסיסים ועל פי הקצוות שיינו על ה-hairpin הדו גידיל.
5. ה-guide RNA נارد בקומפלקס שנקרא RISC (RNA induced silencing complex), בו ה-guideRNA מובל למצב חד גידיל.
6. הקומפלקס עובר דיזוג בסיסים די טוב עם גן המטרה וזה גורם לדגרדציה מהירה של RNA. אופי הדיזוג או החזק שלו יקבע מה יהיה גורלה של המולקולה.
 - באוקריוטים עילאיים דיזוג הבסיסים לא מעלה ונעשה באזור שנקרו SID שהוא של בערך 7 בסיסים מה שמאפשר לבמות מוגבלת של miRNA לזהות הרבה מולקولات RNA.
 - דיזוג הבסיסים לא מוביל מיד לדגרדציה, ה-RISC בעצם מונע מהריבוזומים לתרגם את המולקולה עד שהיא עוברת דגרדציה.

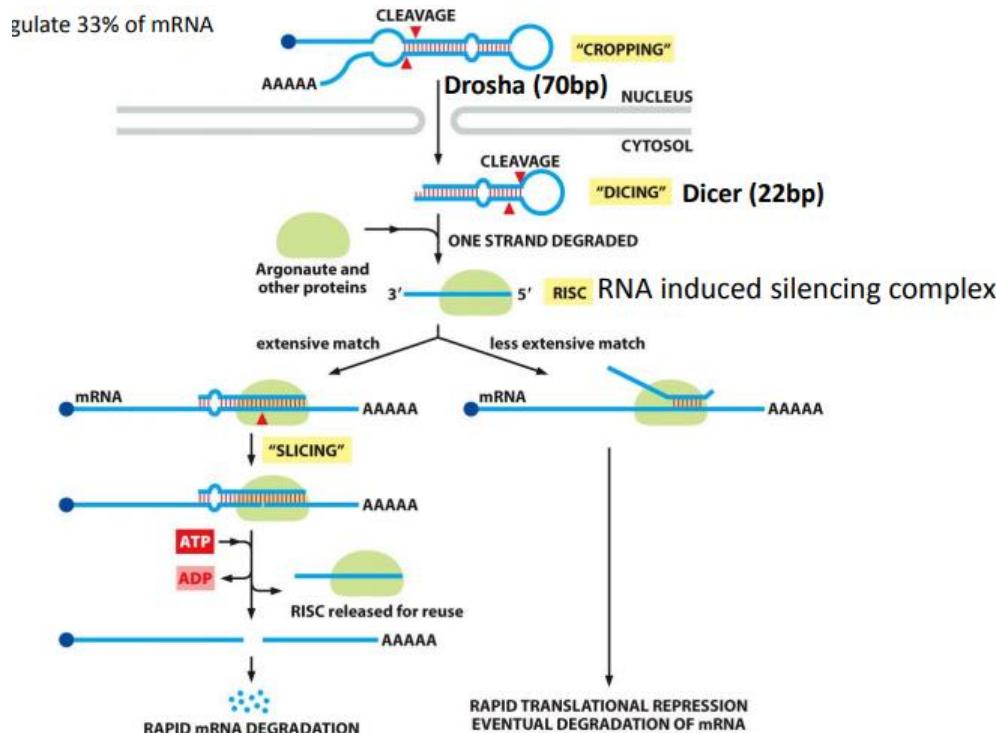


Figure 7-75 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

דיזוג הבסיסים לא מלא, בד"כ
שבעה נוקלאוטידים מזהים
איישחו רצף על גבי גן המטרה,
ולרוב בקצת 3.

כלומר miRNA יכולים לזהות יותר
ממולקולת mRNA אחת.

אם היה דיזוג בסיסים מלא זה היה
מפעיל את ה-Argonaute-3' שפה
חותך את mRNA.

איך miRNA מזינים את גן המטרה?

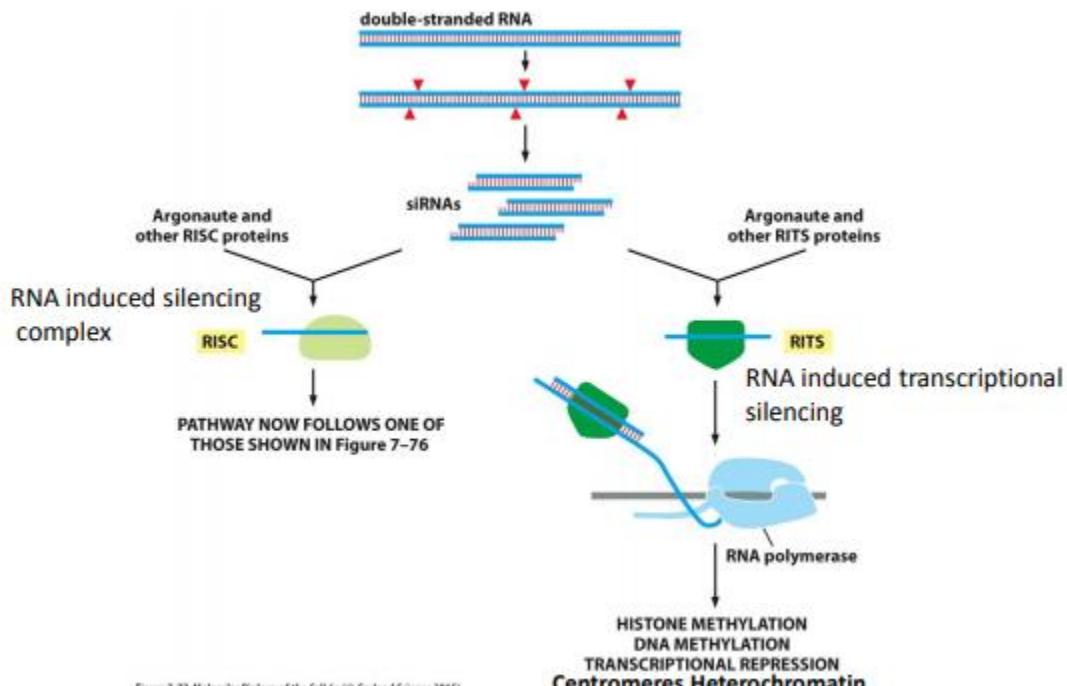
אזור ההבראה קצר זהה מאפשר ליותר-miRNA אחד להזין מטרה זהה יכול ליעל את המערכת. קומפלקס-hRISC נקשר בצורה לא מושלמת ומיציר איזשהו עיבוב ביכולת התרגום לעבור על אותה מולקוללה. בצמחים זההו הוא BD"ב מושלים איז הדגדיצה יותר מהירה. בשмарים ובצמחים, RISC יכול לתווך גם השתקה של הכרומטין ומתייציה של ההיסטוניים. חשוב במלחמה נגד טרנספוזונים.

המנגנון:

1. ב-translation, ברגע שהחלבון Argonaute-3UTR מגיע עם miRNA לאזור ה-3UTR הוא לא מסוגל לחלבועם של מרכיבי התרגום המשיך עם התרגום.
 2. Argonaute עם miRNA מפעיל פירע לפעילות הריבוזומים.
 3. משירה את הדגדיצה של מולקולת RNA.
- נקשרים לאזורים ב-3UTR באופן לא מושלם. מתווך ע"י RNase type 3 enzyme בתחום ה-3UTR.

למה זו בקרה טובה על ביוטו גנים?

1. נקשרת לסוגים רבים של mRNA, בעיקר עצם העובדה שאזור הבקרה נמצא באזור ה-3UTR.
2. אותה מולקולת RNA יכולה לעבור ביקורת ע"י מספר miRNA.



siRNA

מענה אימוני לתאים, מערכת הגנה של התא מפני וירוסים – RNA זו גדיל. ייצור מולקולות dsRNA ארוכות. לא דרוש את כל תהליכי הפרוסeing עם miRNA כמו *drosha*, הוא פשוט מגיע ל-Dicer ששובר אותו. הגעת RNA זו גדילית לתא מזוהה ע"י התא כזר (כיו RNA לא מופיע כזו גדיל אחר). ה-Dicer יודע לפרק אותו לדיל קצר ולהעביר אותו את אותו מסלול כמו של miRNA. מה שיקרה לרובה זה שהסתדרנד הזה ייחזר אחריה ל-RNA שיחזרו מהווירוס ויגרם לו לדגרדציה (אופצייה אחת ל-RNA, בכמה גיטאות).

שני מסלולים:

1. קשירה ל-RISC באמצעות argonauts כמו עם miRNA רק שהקומפלמנטציה יותר טובה והוא ישירה יותר מה לדגרדציה.

2. מסלול נוסף זה קשירה לקומפלקס בשם RITS – RNA induced transcriptional silencing. המתחבר לקומפלקס זה יוכל ליצור קומפלמנטציה עם mRNA תוך כדי שעתוק. הוא חזיר לגרעין, יודע להזות RNA בעודו מחובר ל-DNA ולתור כל מני בקרה של שעתוק או לדגרדציה של DNA ולגרום להיות הטרו כרומטיין, לעבור פחות שעתוק. השפעה על הцентрומר.

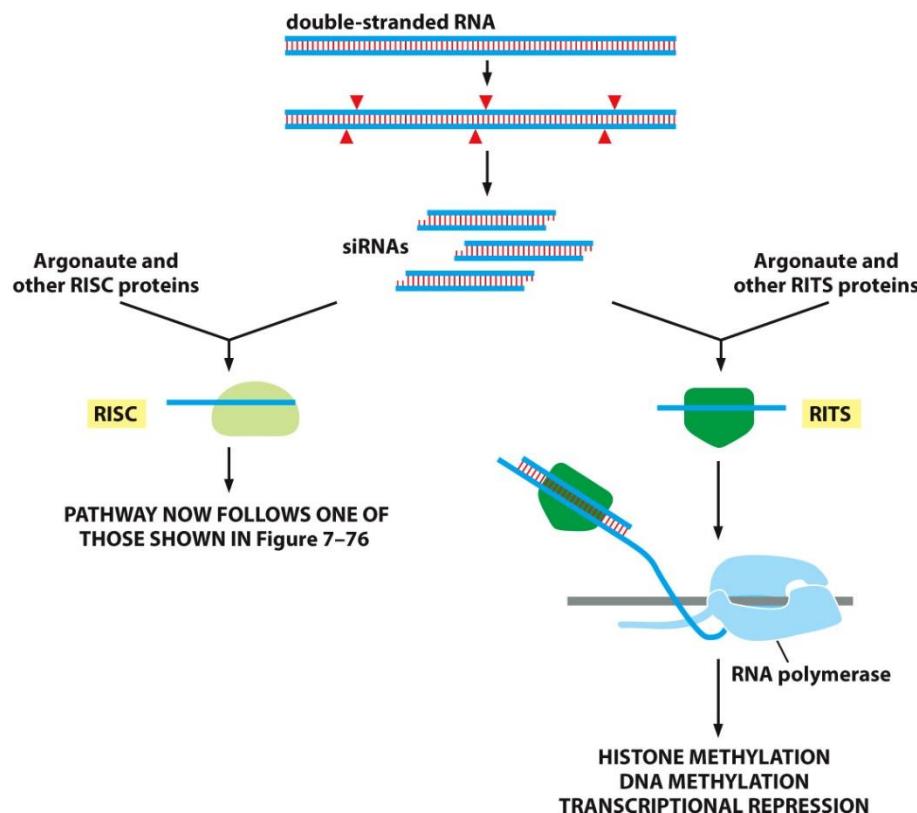


Figure 7-77 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

דרך של התא להtagון מטרנספוזונים.

ARNos סינטטי

ניתן להנדס ARNos ובר לבחן השתקות של גנים כדי ללמידה על פונקציות ופונוטיפים, קישור משמעותן לתהיליך ביולוגי, הכוונה נגד וירוסים ותאים סרטניים.

RNase

בדיסר יש אוצר של RNase (חותכים RNA), ומהם יש שלושה סוגים עיקריים:

1. היחידה הביי פשוטה, נפוצה בבקטריות, בקטրופאג' ובמה פטריות. יודע לזרות RNA ולהתפרק.
2. קבוצה שנייה שאליה משתייך Drosha, מורכב מכל מינו דומיינים, פועל במדומר – ווצר דימר שמתלבש על RNA וIODע להתפרק בצורה קבועה.
3. קבוצה שלישית אליה משתייך ה-Dicer.

piRNA

Dicer-ה לא לוקח חלק ולא יודעים איך מגיע guide RNA בlij התיווך שלו.

- רק בתאי מין.

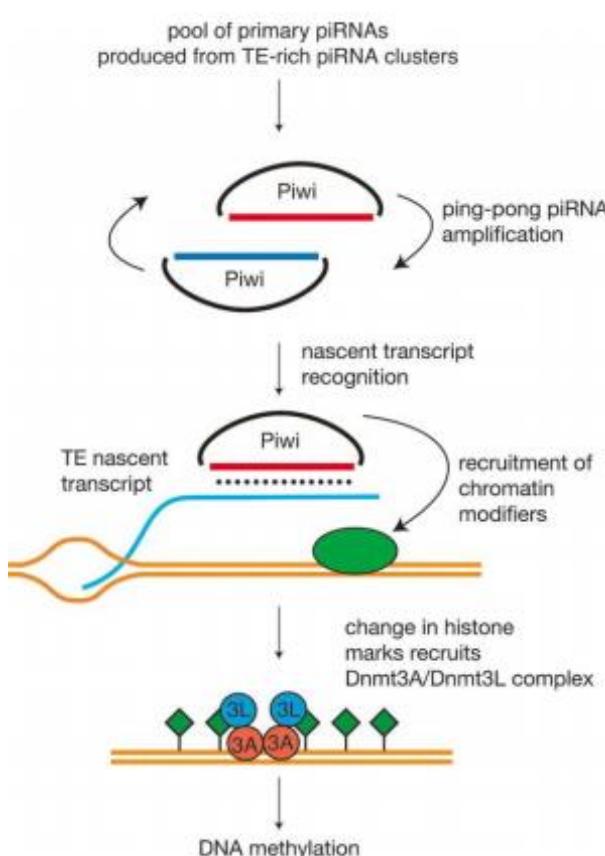
- ארוכות יותר מ-miRNA ומ-siRNA.

- דרך להתמודדות עם טרנספוזונים.

- מקור piRNA הם באלמנטים רטרו-טראנספוזונים בגנים.

- הביגנזה עדין לא ברורה ויש מספר תאוריות שונות לגבי זה.

- המחלוקת היא האם מגנים על ה-germline מרטרו-טראנספוזונים.

טהיליך הפינג פונג

חולבוני Piwi מחליפים את ה-RISC.

המ תופסים את guide RNA בתהיליך שנקרא **פינג פונג**. זה תהליך בו ה-Piwi וה-guide מגיעים למטרה, לטרניזפוזון ← הוא חותך את הטרנספוזון וה-guide Argonaute קושרים את החתיכבה שנוצירה מהטרנספוזון ← מגיעים לקלאסטר של piRNA ← בגנים, שהוא מורכב מהרבה piRNA שעבורו טרנסקריפציה ונחתכו ← הן מוטבענות על גבי (Piwi-Argonaute)

CRISPR

דומה ל-RNA. בבקטריות, "מחליפה" את המערכת האימונית. החידקים צריכים להיות מסוגלים להגן על עצם מהתקפות ויראליות. יש אזור רפטיטיבי בגנים שמכיל רצפים ממוקור ויראלי. בשתווך את הבקטריה וירוס, מדי פעם החידק מצליח לשבור חתיכת DNA ויראלי ולהכנס אותה לאזור הרפטיטיבי זהה ב-5 פריטים.

ניתן לרצף ולדעת את ציר הזמן של ההתקפות הויראליות. ה-DNA זהה מייצר מולקולות RNA שיודעת לעבור פרוטסיניג ולהיחתך למקטעים קצרים דרך העובדה שבכל אזור זהה יש רצף קבוע.

אותן מולקולות נאספות ע"י **חלבוני Cas** (נקראות **CRISPR RNA**), וחלבונים אלה בשונה מALA שדיברנו עליהם קודם, יודעים לחתוך DNA ולא RNA, ולאחר מכן להרוס את ה-DNA הויראלי בפעם הבאה בשירהה את המקטע?

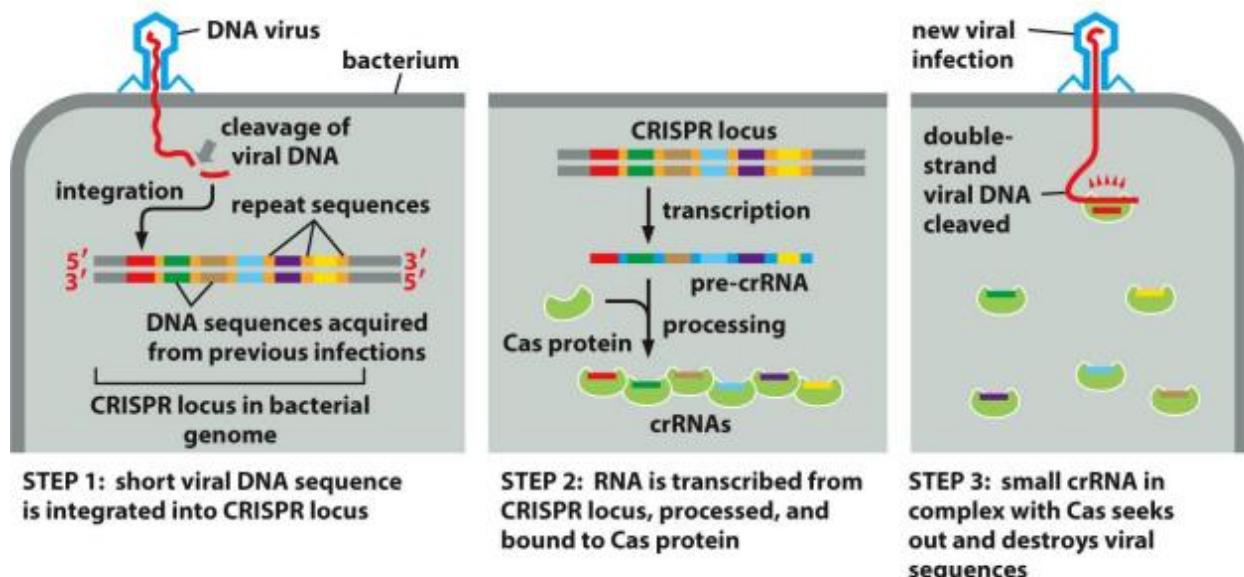


Figure 7-78 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

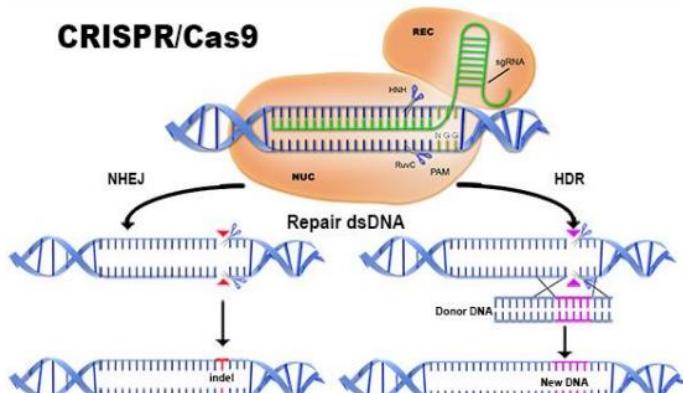
עריכת גנים ע"י Cas

אם נכנס את החלבון CAS בלבד עם guide RNA יוכל לכוון אותו לחתוך את הגנים במקום מסוים. מכיוון שתהליכי התיקון של נזקי/חיתוך DNA קורה בשתי

צורות:

1. תיקון שמכניס מוטציה שיכולה לגרום knockout של גן המטרה. לעיתים זה שומר על מסגרת הקריאה ואין מוטציה.

2. תיקון ע"י רקבוניציה (אם יש אזור שיודעת לעבור רקבוניציה).



IncRNA

молקולות RNA ארוכות שלא מקודדות לחלבונים. מעל 200 בסיסים. קשה למצאו בגנים כי הם לא משועתקים בرمות גבניות, נמצאו ע"י signature chromatin. בד"כ יודעים לחבר חלבונים ולהביא אותם לנוקודה מסוימת. יכולם לעשות את זה גם בטרנס וגט בTRANS. דוגמיה, גן שמייצר תעולות בנוירונים.

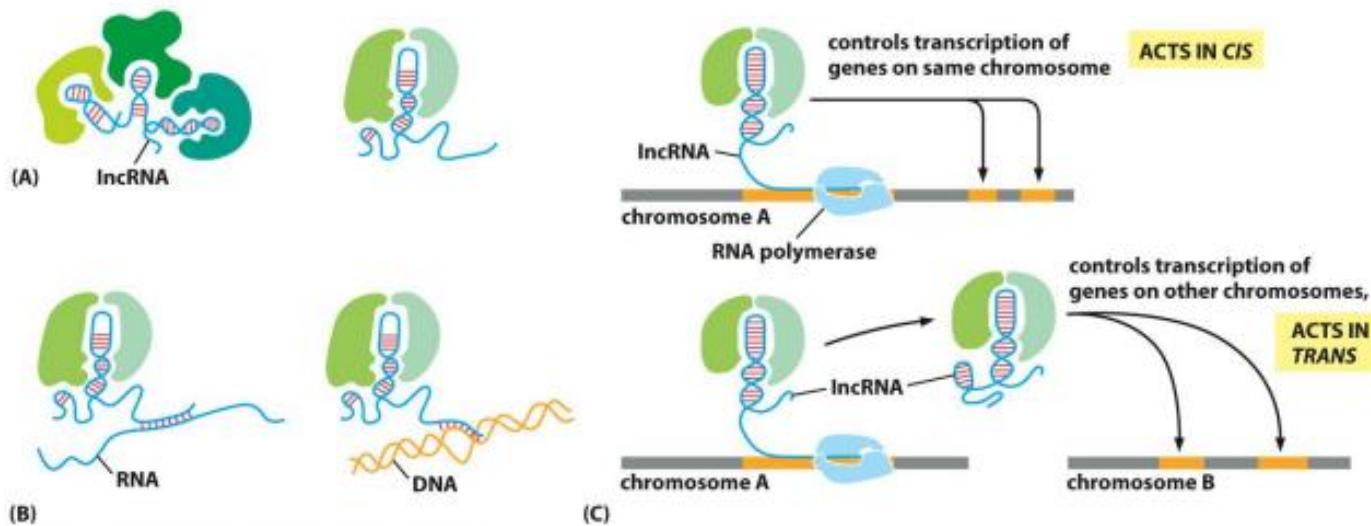


Figure 7-79 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

הוא בסיס של תהליך חשוב – IncRNA בשם exist ? . בנקבות יש שני כרומוזומי X, אחד חייב להיות מושתק. ההשתקה קורית ע"י IncRNA שבמיא חלבוניים לכרומוזום ואורדים אותו באזורי מסויימים בצורה שלא יכול להתבטא.

COMPARING DIFFERENT KINDS OF SMALL RNAs			
	siRNA	microRNA	piRNA
Length	21–24 nucleotides	20–25 nucleotides	21–31 nucleotides
Organization	Double-stranded	Single-stranded	Single-stranded
Requires Dicer for maturation?	Yes	Yes	No
Found in	Animals, plants, fungi, protists	Animals, plants, protists	Only animals
Function	Controlling gene expression, blocking transposons	Controlling gene expression	Blocking transposons

הבסיס המולקולרי לסרטן**הקדמה**

- מחלת שמתחליה מטה בודד, לכל תא בגוף יש פוטנציאל להפוך לתא סרטני.
- שם כולל למגון של מעל 300 מחלות שונות.
- תאים סרטניים מתחלקים ללא בקרה. הסרטן יודע לשלו גוררות וכן תאים סרטניים עוברים ממוקם למקום.

תא נורמלי

- מספר חלוקות מוגבל. בד"כ 50-40 חלוקות לפני המות התאי, הטולמרים בכромוזום מתקרים ואחריו 40-50 פעמים הם קצרים מדי להמשיך בחלוקת.
- עוגנים על איזשהו משטח, לא חופשיים במרחב וזאת כדי שיוכלו לגודל ולהתחלק.
- contact inhibition: לא צומחים בצורה בלתי מוגברת, ברגע שמרגשיהם מהסבiba שיש צפיפות הם מפסיקים להתפרק.
- תלויים בפקטוריו גדילה כדי להמשיך לגודל ולהתפרק.

תא סרטן

- יכול להתפרק לנצח. הטולמרים מפסיקים להתקצר, כי התא מצלה לבטח טולמראז שיבול לחדש את הטולמרים, או לעשות הומולוגיה ב��וצות של הטולמרים ולהאריך אותם מחדש.
- מאבדים את ה-contact inhibition, לא מוגבלים אליו.
- לא מעוגנים לאיזשהו מטריקס.
- איבוד התלות (יכול באופן חלק) בפקטוריו גדילה.
- יכול ליצור כל דם חדשים באזור, לעבור למקום אחר וליצור גוררות.

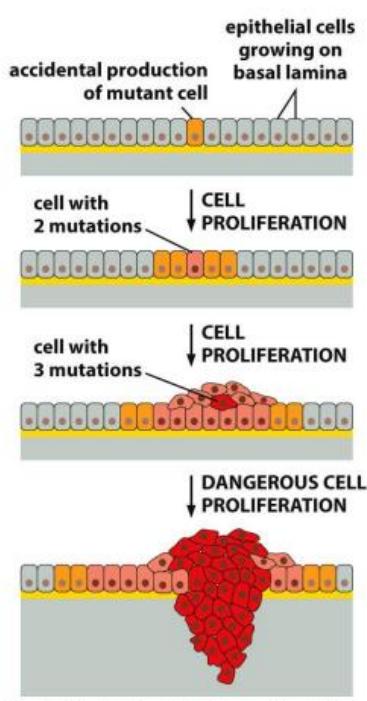
- הבסיס צריך להיות איבוד ההגבלה על הפוליפרציה, אבל כדי סרטן יהיה אלים הוא צריך גם את התכונות האחרות.

סטטיסטיקות

רוב הסרטנים המתגליים אצל אדם הם סרטנים שנקורם אפיתיליאי (epithelia) ונקראים קרצינומות. זה כי תאים אפיתיליאים ממשיכים להתפרק גם במהלך החימם. ככל שהגיל יותר מבוגר, הסיכוי לקבלת סרטן הולך וגדל. סרטן ריאות קורה יותר אצל גברים לעומת נשים.

מצבים הסרטן

מצב Benign – סרטן שעדיין לא הפך להיות אלים. סרטן זו מחלת גנטית, נובע ממוטציות ב-DNA. המוטציה גורמת לתא להתפרק יותר טוב וזה מעלה את הסיכוי לקבלת מוטציות נוספות עד להיותו סרטן אלים.



Fig

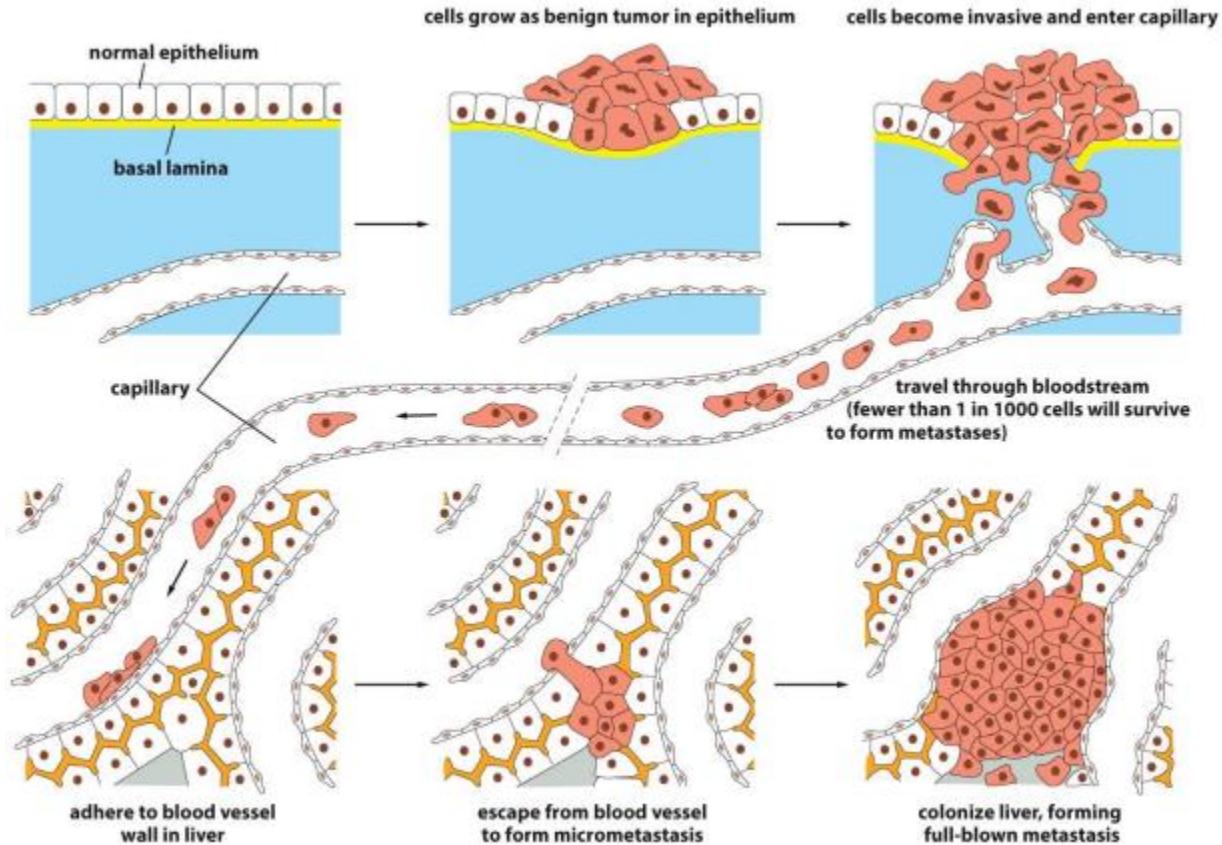


Figure 20-16 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

EMT – epithelial mesenchymal transition

יצירת גוררות. תאים בעלי תכונה אחת הופכים לתאים בעלי תכונה אחרת (כמו של תא אידם, כדי להצליח לעבורי) – עושים differentiation לא דרך תא גזע עוביים. רוב התאים מתפתחים בתאי אפיתל כי הם התאים שמתחלקים הכי הרבה בגוף ויש הרבה תחלופה.

בשלב מסוים התא לא צריך להיות מעוגן למשטח מסוים, ולשם כך הוא צריך לעבור למצב דמוי תא מזכינה (תא שלא צריך להיות מעוגן). בכך שיש להם את יכולות הדואת הם יכולים להיכנס למערכת הדם או הלימפה וליצור שם גידול (כבראה רק תא אחד מצליח).

ברקמה בריאה התאים נמצאים בשיווי משקל בין היכולת להתחלק לבין היכולת לעבור התאבדות תאית, ובסרטן יש הפרעה שלל האיזון זהה – הגבירה של התחלקות או העכירה של התאבדות.

כדי שתאים סרטניים יתחלקו יותר מהר או יפסיקו התאבדות מייצרים סיטואציה לא יציבה גנטית. הבקרה על גידילה ופרוליפרציה נפגעת.

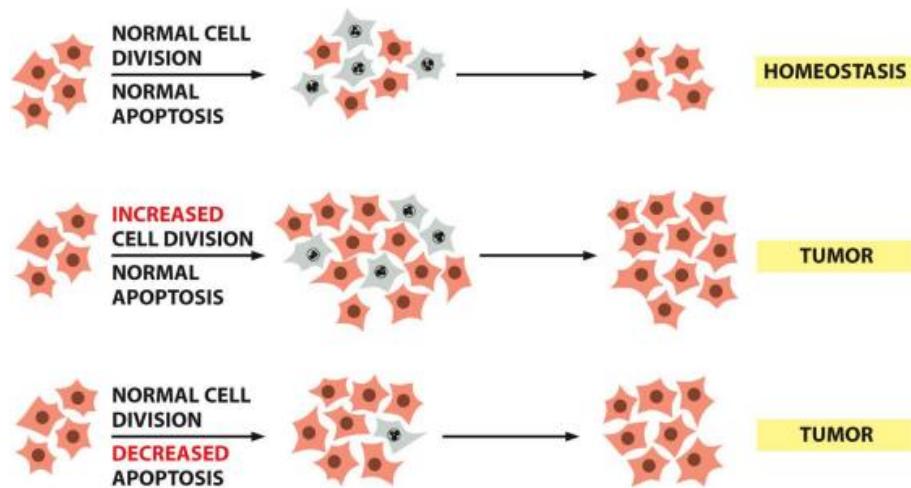
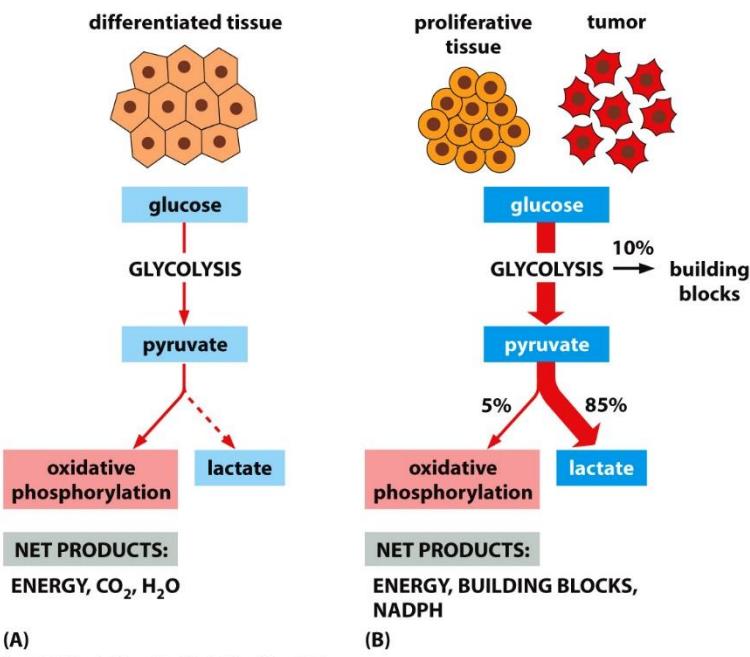


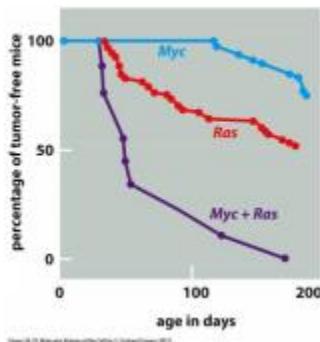
Figure 20-13 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Altered sugar metabolism
בשונה מתאים רגילים שכדי לייצר אנרגיה עושים פוספורילציה חמצנית, **תאים מתחלקים (עוביים) ותאים סרטניים** לא ירצו לפרק את כל הגלוקוז, הם משתמשו בתוצרי ביניים כדי לבנות מהם מקרו-מולקולות לתאים החדשים שיצרה.



ברקמה לא ממונת/ברקמה סרטנית יש שימוש בהרבה גלוקוז שישbor גליקזיה אבל 10 אחוז ממנו יילך משם לבניין של הרקמות כדי שימושו להתחלק. רק 5 אחוז הולך לפוספורילציה חמאנית, הרבה יילך לייצור לקטאט – **אפקט וורבורג**. תהליך זה משמר יותר תוצרי לוזאי ומיציר פחות אנרגיה. הלקטאט הוא **סיגナル לגוף** שיש לשמור על עיקת חמצן הוא יגיב בביוגנזה וייצור **דם חדשים** כדי לתakan את זה.

הגידול צריך את כל הדם החדשים כי הוא צריך אספקה גדולה של חמצן ונטריינטים.

היווצרות הסרטן ברמת ה-DNA**Mammary tumor in mice**

גנים הקרייטיים לסרטן
1% מהגנים, בערך 300. בעצם כל המינים שראינו מוקדם מוקדים בגנים ולבן צרך מספר מוטציות.
ביסוי שבו הרואו צורך מספר מוטציות – ביטלו בעברים שני אונקוגנים חזקים סרטן. בשחיברו את שתי המוטציות ביחד בכל העברים היה סרטן, וכשהלא התפתחות הסרטן הייתה מאוד איטית.

כל התאים הסרטניים מאופיינים באיבוד בקרת מחזור התא.

שלוש? נקודות בקרה Checkpoints על מחזור התא בהן התא מדוח על מצבו ומגנות על התא ממצב של התחלקות מוגברת:

1. האם התא מוכן להתחלק שוב?
2. האם התא מוכן להיבנס למיטוזה?
3. האם התא מוכן לצאת למיטוזה?

כמו כן מקבל אינפורמציה לגבי פגיעה ב-DNA, האם הסבירה מאפשרת גידול, האם ה-DNA סיימ את הכפלתו, והאם הברומוזומים מעוגנים למבנה הבישור. בסרטן אותן checkpoints נפגעות בשלב מוקדם.

כדי שתא יוכל להתפרק הוא חייב לגדול, לייצר את המולקולות הדרשיות לתא. יש סיגナル שאומר לתא להתחלקה וסיגナル שאומר לו לגדול והם קשורים. כל האנזימים שקשורים למסלול זה הם מטרות למוטציות סרטניות.

מוטציות גורמות סרטן**איזה מוטציות גורמות סרטן?**

1. מעילות את הפעולות של גנים שהחלבוניים שלהם גורמים לתאים להתפרק.
2. מורידות פעילות של גנים שהחלבוניים שלהם גורמים לתא לא להתפרק.

שתי קבוצות של גנים שגורמים סרטן

1. **פרוטו-אונקוגנים** – גנים שבתאים נורמליים מאפשרים לתא לגדול ולהתפרק. הסרטן הוא עובר מוטציה אקטיבית לאונקוגן ויש הגברת של התהילן.
 2. **Tumor suppressors genes** – גנים שמיעכבים את הגידלה. loss of function. צריך פגעה בשני אללים. מוטציה רציבית.
- כדי להעלות אקטיביות של אונקוגן מסוים מוטיצה אחת דומיננטית שמאקטיבת את אחד האללים עם הגן כדי להיבנס למצב של סיכון.

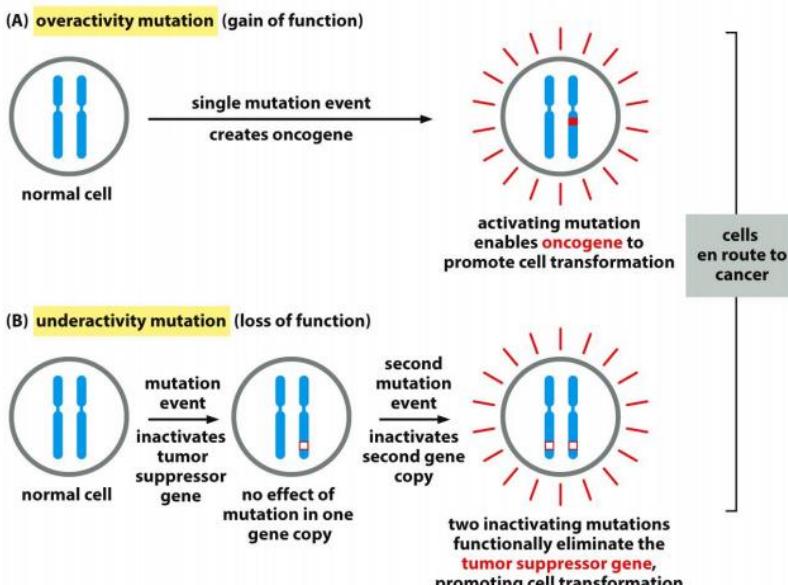


Figure 20-17 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

אונקוגנים – גנים שגורמים לסרטן. מצאו אותן בוירוסים שגורמים לסרטן. יכולם לבטא חלבון שהפעילות שלו לא טובה לתא. **גנים המצוים בכל תא** ופעילותם חשובה לגידול התאים ולתפקידם התקין. כאשר מתחולל שינוי גנטי בגנים אלו, הם עלולים לגרום לתהיליך **סרטן**.

מה יכול לגרום להפיכת לאונקוגן?

- מוטציה נקודתית
- אמפליפיקציה
- טרנסולוקציה

chromosome rearrangement – דוגמה בקרומוזום פילדלפייה. בראמווזם נשבב ומתחבר מקום אחר ומשנה פעילות של חלבון למצב של אונקוגן.

בדוגמה מדובר ב-tyrosine kinase שרגיעש לפקטורי גידלה....???

95% of chronic myelogenous leukemia (CML)

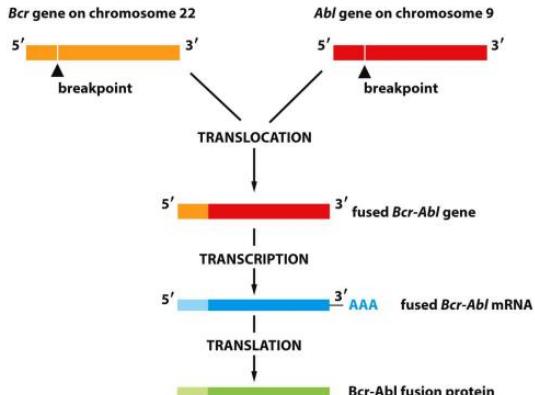


Figure 20-42 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

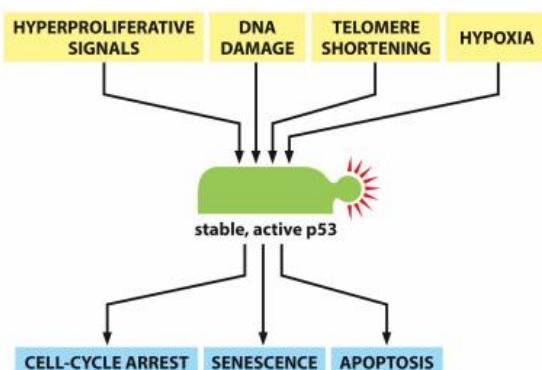


Figure 20-27 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Tumor suppressors genes

חסמים את גידול התא או את חילוקתו. בד"כ קשורים לחלבוני תיקון DNA, חלבוני עיגון ומעכבי גידול.

p53 – מולקולות השנה לשנת 1993.

מייצר חלבונים שקשורים כמעט לכל מסלול בתא. 50% מהחולי הסרטן בעלי מוטציה לגן.

הוא קולט בעיות כמו נזקים ב-DNA, סיגנלים של פרוליפרציה מוגברת,>K'יצור טולמרים והיפוקסיה, ולכל אחד עושים אקטיבציה ע"י דה פוספורילציה ולמשל שלוט במחזור התא, מבנים תאים למצב של senescence (אם יש נזק התא לא יכול להתחלק) ואפסטודיס.

Rb – גם שולט על מחזור התא (עוצר אותו בשלב G1 ע"י תפיית TF שקשור לאLONGציה), קיים בכל התאים. מוצפיה בו גורמת לרטינובלסטומה בילדים בשתי העיניים. מחלת מורשת, נולדים עם המוצפיה. מוצפיה בו גורמת להצברות מוטציות בגנים אחרים.

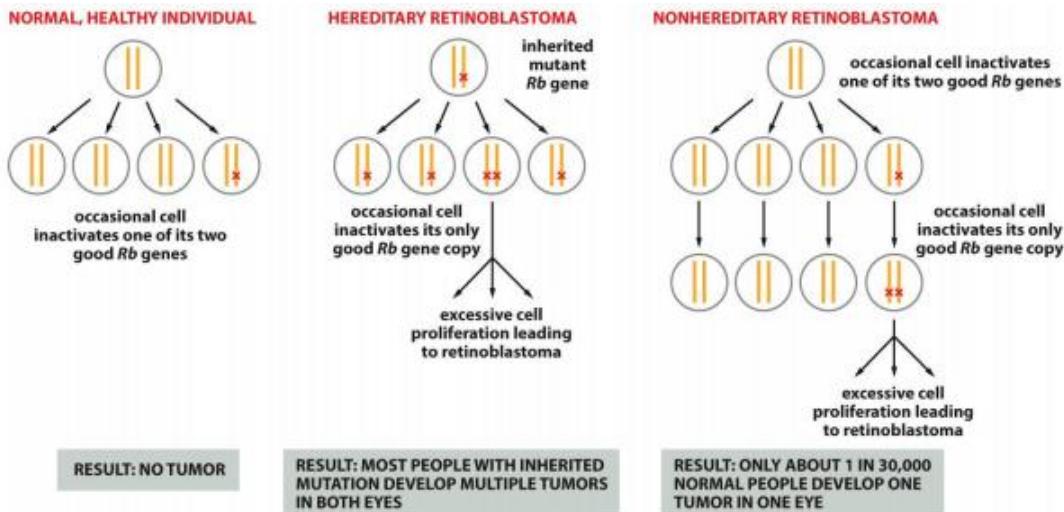
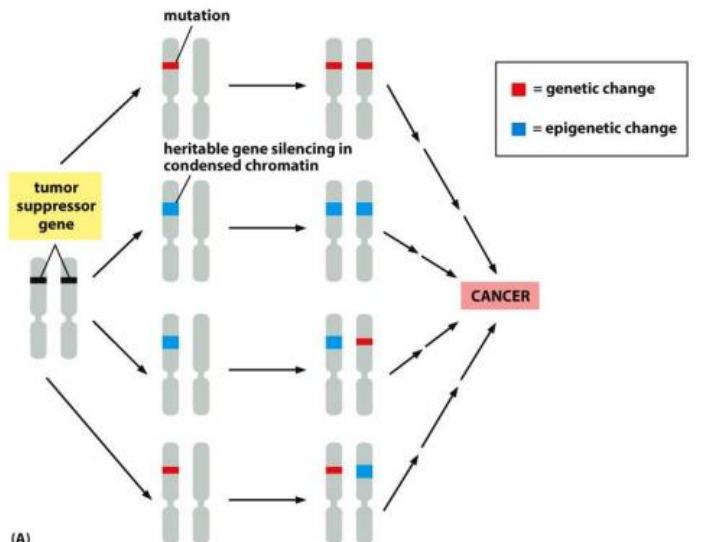


Figure 20-20 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

יבולה לשלב גם שינויים ברמה האפיגנטית – מוצפיה אחת ב-sg Tumor, ומוצפיה/שינויי באירוע שיגרמו לסרטן.

בדוג' יש לנו מידה של היפר-מתילציה ב-DNA (מרמז על DNA סגור וחוסר ביטוי גנים) ואכן יש עליה במתילציה יחסית לתאים בריאים.



Cancer heterogeneity

תאים סרטניים לא נראים אותו דבר, הם מבדים את הסלקציה שתאים ורגילים עוברים לייצור פעילות מסויימת ופונים למצבים אפיגנטומים מסוימים שגורמים לתא להתנהג בצורה שונה.

מציר מה שקרה בתאי גזע – תאים בעלי יכולת להתרמיין, בערך חצי לתאי גזע וחצי לתאים עם פעילות. סרטן מכיל הרבה תאים שהם תא סרטן ומעט תאים שיש להם ארכיות של תא גזע.

~ אימונותרפיה - בחלק של התרגול ~

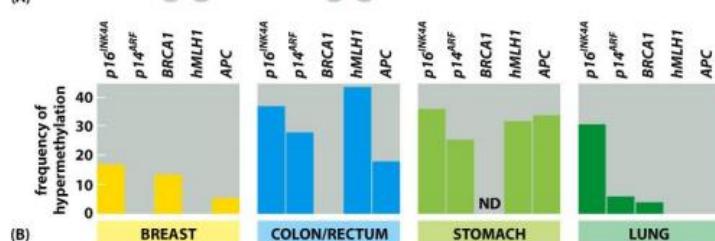
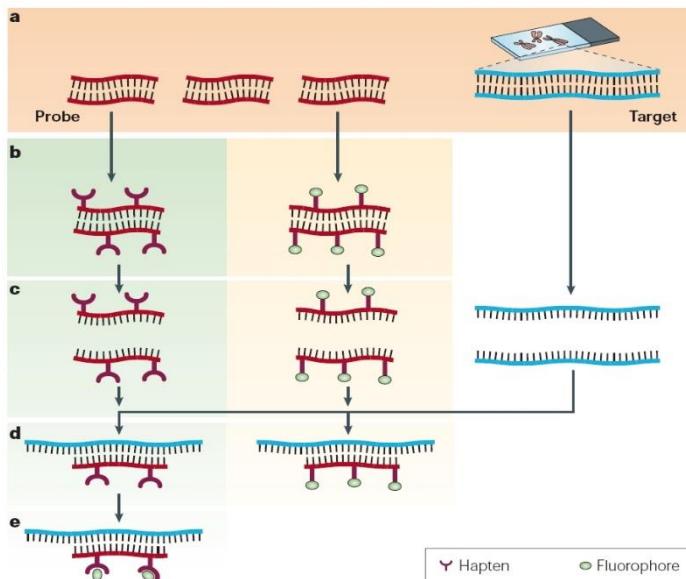


Figure 20-22 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

תרגול 8

FISH

שיטה לחיפוש DNA או RNA בركמה. מקובעים את הרקמה ומחפשים איפה נראת אותה רצף.



בונים פרוב שמסומן פלורנסנטית, או שבאופן ישיר הפלורנסנט קשור לפروب או שהפרוב יכול גם להכיל מולקולה שיבולה קישור משהו פלורנסנטי.

נקבע את הרקמה - נחמת את הרקמה, בעצם נעשה משהו שעשויה דנטורציה בכך שהפרוב יכול להתחבר. מה היתרון בסימון ישיר? חוסך שלב.

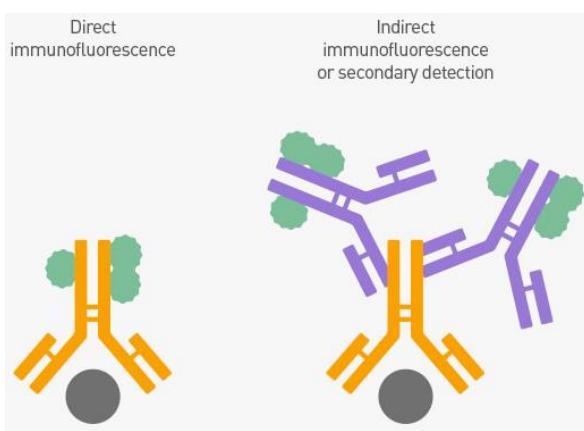
בסימון עקייף, יש אפשרות להגבר את הסיגナル (לעומת הסימון הישיר שיבול להיות די חלש).

AIR מכבים את הפרוב? לוחכים את הרצף שאנו חרים, נסיף DNase I שיחותן את הרצף ונבדלית ונסיף בסיסים מסומנים פלורנסנטית ואז נשלים את הרצף.

IF

צביעת חלבונים בركמה לפי נוגדים שיבול להכير רצף בחלבון:

- נוגדן ראשוני – הנוגדן עצמו מסומן פלורנסנטית.
- נוגדן שניוני – הנוגדן שמקיר את החלבון לא מסומן אבל מחובר לנוגדן אחר שכן מסומן פלורנסנטית. יכול להיות פחות ספציפי אבל יותר חזק ויתר זול.



מקובעים את הרקמה, מוסיפים נוגדים. זה יראה רק איפה הוא נמצא באותו רגע שקייבנו.

Cost משחו שיבול להפריע ולשנות את המבנה של החלבון. יכול להרס את החלבון והנוגדן לא יוכל אותן.

از אפשר לסמן אותו מלบทחילה ולסמן לו GFP וזה גם דרוש הנדוס, זה גם חלבון גדול מאד יחסית לחלבונים בתא. הסיגナル גם יכול להיות חלש אם מוסיפים אחד, ואם נסיף הרבה הם גדולים מדי. זה גם יכול לפגוע בתפקוד החלבון ובכונסה לאזר אלוי הוא אמר להיכנס.

טרנספוזון

יבולים להתמיין לשוש תתי קבוצות:

1. Retroviral elements לא עבר דרך RNA.
2. DNA-only transposons
3. Nonretroviral retrotransposons

מנוע לאבולוציה. יכול לגרום למשהו יותר דרמטי מאשר מוטציה נקודתית.

יש להם רצפים אופייניים שאפשר לזהות ולפי בר אפשר להזות אירועים באבולוציה.

ברגע שהם מגיעים לגנים הם נשאים שם, הוא לא יכול להיפרד מהם. אם האירוע קרה לא מזמן נראה מוטציה על הטרנספוזון.

DNA בלבד – גזר הדבק, רצף אחד שעובר מקום למקום ולא משכפל את עצמו. צריך אנדיז בשם transposase שמעביר אותו למקום אחר בגנים. כשהוא יצא הוא משאיר חור בגנים ונitin לסתום אותו באופן לא ספציפי זה יכול לגרום למוטציות. יש טרנספוזונים שכילים לקודד ל-transposase. נפוץ בחידקים, יכולים להעביר עמידות לאנטיביוטיקה.

Retroviral – העתק הדבק. היה שעתוק של RNA של הטרנספוזון. הגיע reverse שהשלים אותו לדג'il של DNA ובאמצעות חלבון בשם integrated נכנס למקום אחר בגנים. דומים ל-virus, אבל בוירוס יש גנים שמקודדים לחלבוני המעתפת וברטנספוזון אין. Nonretroviral – צריים אנדונוקלאז.

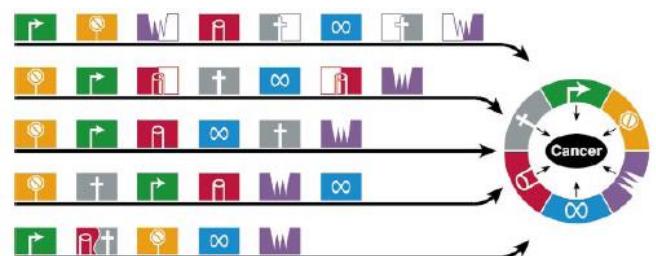
- LINEs
- SINEs
- RNA elementalu

הכנסת ALU לאינטראון: אם הוא מפיע לשחבורת כנ, ברוב המקרים אבל לא עשו כלום. הכנסה לפורמואט: אם פקטורי שעתוק לא יוכל להיקשר זה ימנע את שעתוק הגן.

 סרטן

Component	Acquired Capability	Example of Mechanism
↑	Self-sufficiency in growth signals	Activate H-Ras oncogene
⌚	Insensitivity to anti-growth signals	Lose retinoblastoma suppressor
✚	Evading apoptosis	Produce IGF survival factors
∞	Limitless replicative potential	Turn on telomerase
Ⓐ	Sustained angiogenesis	Produce VEGF inducer
☷	Tissue invasion & metastasis	Inactivate E-cadherin

סוגי מוטציות שמובילות לסרטן:
6 מוטציות שמתחרחות ומ接连ות לתא את היכולות המאפיינות תאים סרטניים. אין סדר מסוים. יתחל מהתא אחד שעבר שינוי גנטי מהותי.



מאפיינים מולקולריים של תאים סרטניים

- לא יציבים גנטית, מספר מודר ולא אחיד של ברומוזומים והעתקים. ואם נבדוק תא אחריו חדש זה ישתנה שוב.
- בקריה אחרת על גדילה ועל חלוקה.
- בקריה אחרת על מטבוליזם הסוכר.
- יכולת לא נורמלית לשרוד מצבים של סטרס ונזקי DNA.

אימונותרפיה - טיפולים

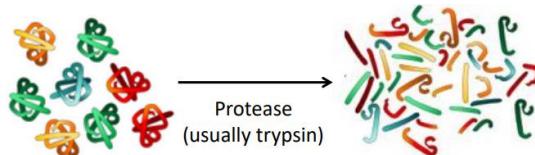
- **הקרנות** – תאים סרטניים רגשיים לקרינות UV.
- **CAR T-cell** – ניסיון לאקטב את מערכת החיסון שתתקוף את הסרטן. תא סרטן הם סוג של תאים של הגוף והם מצויים בדרך כלל בתגובה האימונית שבבים וזאת ע"י הורדת הפעולות של תא ה-T. מהנדסים גנ CAR שיווכל להכיר חלבון סרטני ומחדרים אותו לתאי T שבודדו מדגימת דם של החולה. יכול לגרום לתגובהות דלקתיות בעקבות הפעלה של מערכת החיסון.
- **החולד העירום** – לא ידוע על מקרי סרטן, גילו שהתאים של מפרישים חומצה בעקבות מוטציה באנדום 2HAS המנסנת חומצה זו. המנסנת חומצה זו. גילו שהחומרה מונעת את הייצאה מ-contact inhibition. השאלות:
 1. בעיה ב-2HAS שמייצרת את החומרה, או באנדום שմדכאת החומרה ונהייה פתאום עיל.
 2. Tumor suppressor
 3. מוטציה בשני עותקים ומוטציה שהיא loss of function
 4. לא מספיקה
 5. לא

Mass Spectrometry

הקדמה

איך אפשר לדעת מהו רצף החלבון שמעוניין אותנו?
פרוטואומיקה – הרכבת, במויות ומודיפיקציות של כל החלבונים שיש בתא, בركמה, באורגניזם. לדוגמה, נרצה לבדוק את הרכיב החלבוניים בדגימה, במויות, יחסים וכו'. הבסיס לשיטה זו הוא שלפפטידים יש חתימה ייחודית של מסה ביחס למטען (центрומריית מסות), אם נבחן את הרצף שמתקיים מהපפטידים ואת המסה שלו מדע להזיהות את החלבון. **הזהוי מתבסס על מאגרים** שמוקרים בפרויקט הפרוטואום האנושי.

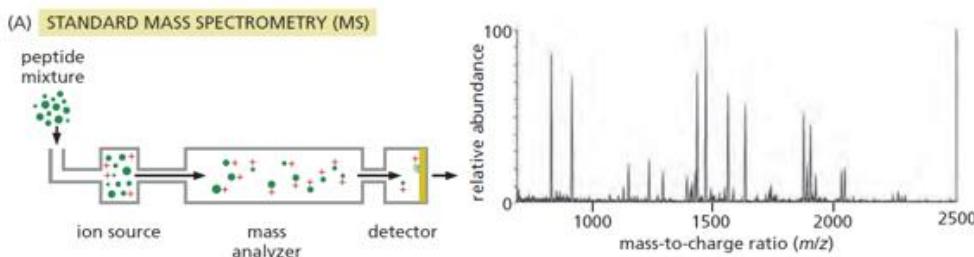
- השלבים של MS מוכלים ב-MS/MS שיותר נפוצה.
 - השיטה דורשת כמות חומר התחלתי נמוכה והוא בעלת יכולת להזיהות את המסה של החלבון ברמת שגיאה מאוד נמוכה, חלקי אחד במלילו.
- את החלבונים מפרקים בדנטורציה ובעזרה פרוטאז (בד"ב טריפסין שחומר אחריו ליזין וארגינין אלא אם כן יש אחריה פרולין) והוא חותך אותם לפפטידים קצרים באורך שרירוני (20-8 ח'א לפחות, 15-10 לח'ג'ה).



השיטה

שלבי MS:

1. **פיירוק החלבון** לפפטידים קצרים (מכני או כימי בעזרת אנזים).
2. **ion source** – יוניזציה, הטעתת הפפטידים במטען. נעשו בואקום, אין חלקיקים אחרים שיסיטו את האנוליזה. המכשור מבוסס על קר שנינו לעשרות מניפולציה חשמלית או מגנטית, אבל באשר ניקח החלבון מהתמיisha זאת תהיה מולקוללה לא טעונה ולא נוכל לעשות עליה מניפולציות. לבן, נניח את הפפטידים.
3. **Mass analyzer** – מרכיב משדה חשמלי שנונן תואצה לחלקיקים. הפפטידים מקבלים אנרגיה ומהירות ונעים לתוכם המכשור לקבלת המניפולציות האלקטרו מגנטיות - הפפטידים עצמם לשדה מגנטי. הוא מסנן פפטידים בעלי מטען ניטרלי שלא עברו לדלקציה. הפרדה לפי היחס בין המסה למטען, בסיס הגישה עומדת על העבודה שלחלקים בעלי מסה מטען גדול יותר יכוו למרחקים גדולים יותר כי יהיה יותר קשה לשדה המגנטי לעקם את מסלולם.
4. **Detector** – גלאי אשר יודע להזיהות את היחס מסה מטען ומתקבל לפני הגרף הרצוי. קיימים סוגים שונים של דטקטורים.



שיטות ליאוניזציה

1. **Pulse חזק** של לייזר שיוצר פלזמה בנקודת מגע ובתוכה מכף אלקטرونים נקרעים מהפפטיד וכן הפפטידים יהיו טעונים.
2. **אלקטרו ספרי** – דרך פיה קטנה מייצרים רסס ננו סקווי, טיפות מים מאוד קטנות בתוכן יש פפטיד בודד. שימושים אותן במקרים מסוימים מהר ומקבלים פפטיד שנשארו עליו מטענים מהרסס. שיטה יותר מקובלת.

איך ההפרדה והגלאי עבדים?

בוח לורנס שפועל על חלקיק טען בשדה מגנטי עם מהירות גבוהה יפעל כבה שהמסלול של החלקיק יהיה עיגול מושלם, ובו ניתן שבל התנאים קבועים (שדה מגנטי, מהירות חלקיקים וכו') רדיוס העיגול יהיה תלוי בשני גורמים – במסת החלקיק ובטען שלו.

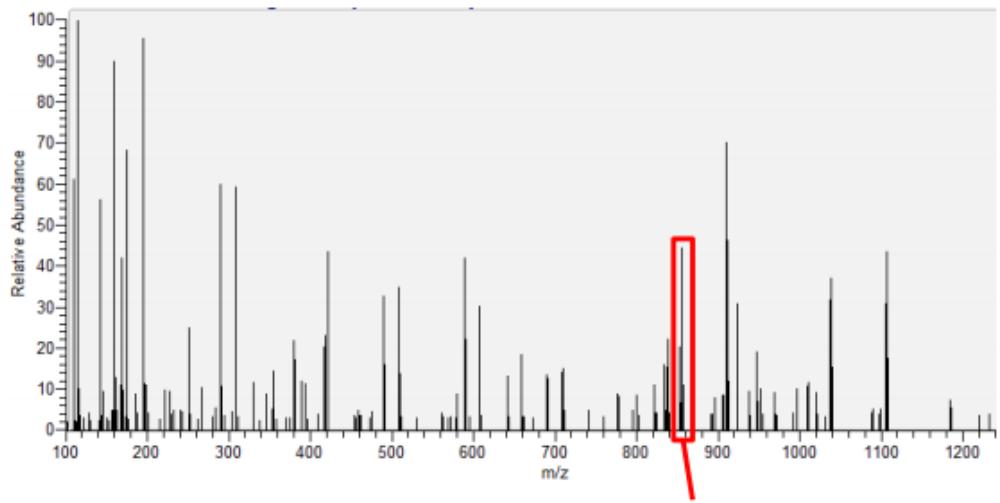
טען גבוה ← רדיוס קטן – החלקיק טען, השדה המגנטי מפעיל כוח גדול והרדios יהיה קטן.

מסה גבוהה ← רדיוס גדול – החזק השמי של ניוטון.

הרדios הסופי הוא היחס בין המסה לבין המטען.

בעת מניעים גלי זרם לאור האוזור. ברגע שיש קבוצה של יוניים עם אותה מסה ואלה מטען הם יימצאו באוזור מסוים, ובאשר נעביר את הגלאי לאור זהה נקבל "ספייק" (פיק?).

הgalai מתרגם לגרף שמוופיע כאן ובאיור לעיל, כאשר ציר x מייצג מסה חלקית מטען, וציר y זה העוצמה של הזרם (יותר גובה יותר יוניים), הנקראת שקייבלו. **השיטה במותית.**



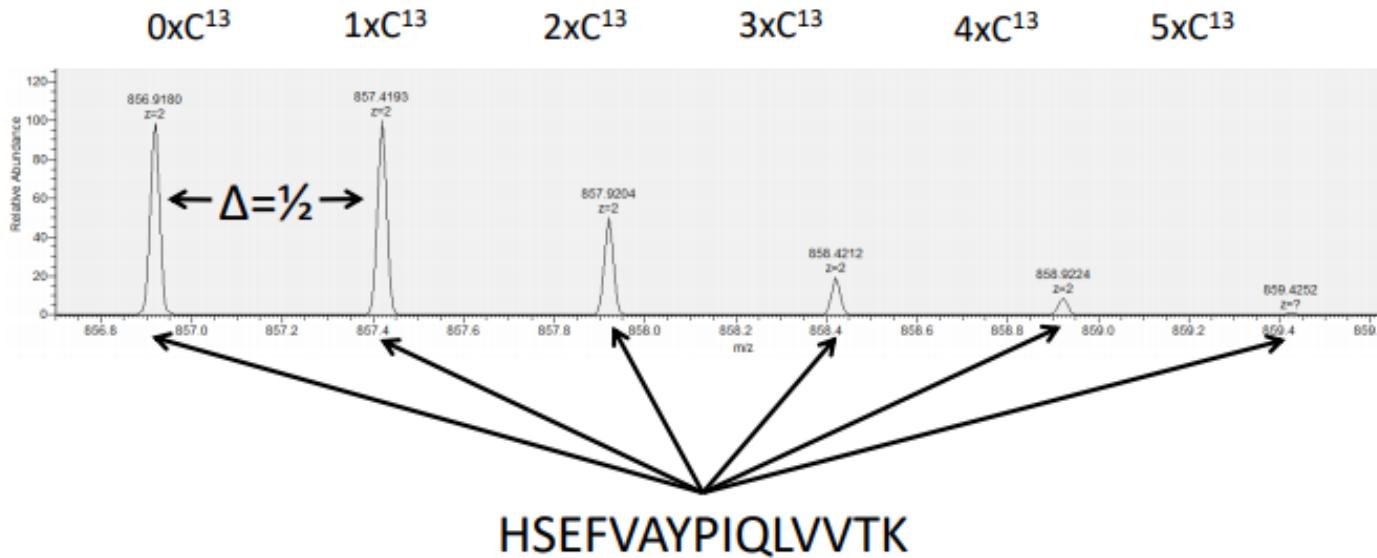
- אם קורה מצב שיש מטען שונה לפפטידים, לא נוכל באמת להסיק על המסה מהפפטידים. אבל, **לרוב המטען יהיה +2. למה?**
- אם נסתכל בגרף על פיק מסוים ונעשה עלייו חוץ zoom, נשים לב שהוא סדרה של פיקים ובולם יתיחסו לאותו פפטיד. למה הפפטידים מופיעים עם יחסים שונים?

במולקולות אורגניות יש סיכוי למצוא איזוטופים של פחמן אשר שונים זה מזה בנוירtron אחד. בולם בפחמן 12 רגיל יש 6 נוירונים בעוד שפחמן איזוטופ 13 יש 7 נוירונים ויש סיכוי לא贊ה בפפטיד שייהי לנו פחמן 13. כמעט בכל חלבון שאנחנו נבדוק יש וריאציה במספר הפחמנים שנקלבל, כך שלאותו פרגמנט יהיה הבדל ביחס מסה/מטען אשר יגבע מכמות הפחמנים שייהו איזוטופים.

הסתטיקה הזאת יוצרת לנו את "הסדרה האיזוטופית" שמאפשרת לנו לחול את z – את המטען. למשל הפיק הראשון יהיה עם המספר הנמוך ביותר של פחמן 13, וכן הלאה (כפי הם יהיו יותר בבדים).

בצם יש ערכים מסוימים להפרשים בסדרה זו, ואם נחסר גודל מוגדל נקבל הפרשים של $\frac{1}{z}$, אז בהינתן ההפרשים נעשו 1 חלק מהפרש ונקבל את המטען וממנו את המסה.

העלאת במתה הנוירונים מעלה את המסה-1 ולפיכך מסיטה את הקראיה שנקלבל. גם השיר יכול להיעtan חיובי וגם הקצה האמיןוי.



כדי לבדוק איזה חלבונים קיימים, בהינתן המסות שמדדנו נסתכל ב"ספר" שבו יש את המסות האפשריות (למשל אם המקור הומני נחפש בכל החלבונים ההומניים), ונחפש התאמות בין המדידות ומקר נזהה את החלבוניים.

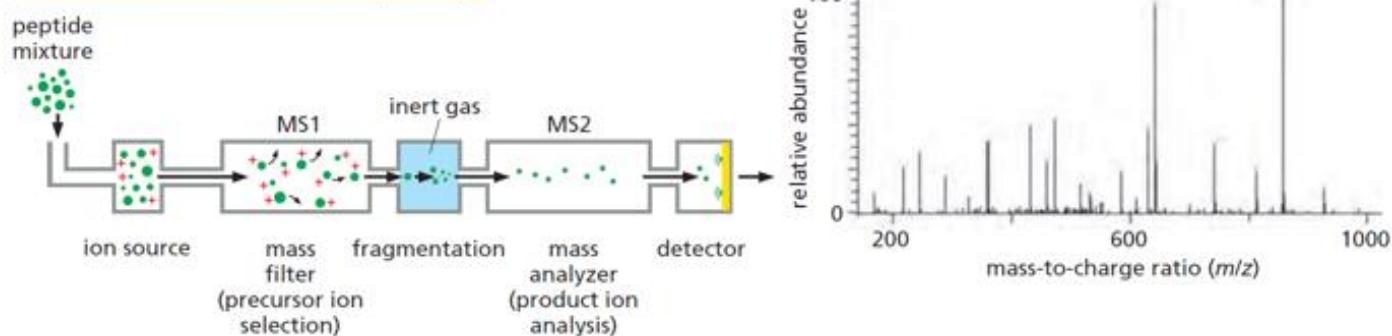
לכל מדידה יש לנו מספר אפשרויות (לא גדול, עד 100). הדיק של המבשיר הזה הוא מאוד גבוה, ולכן השגיאה סביבה המדידה תהיה קטנה וייהי לנו פחות מועדים.

MS/MS

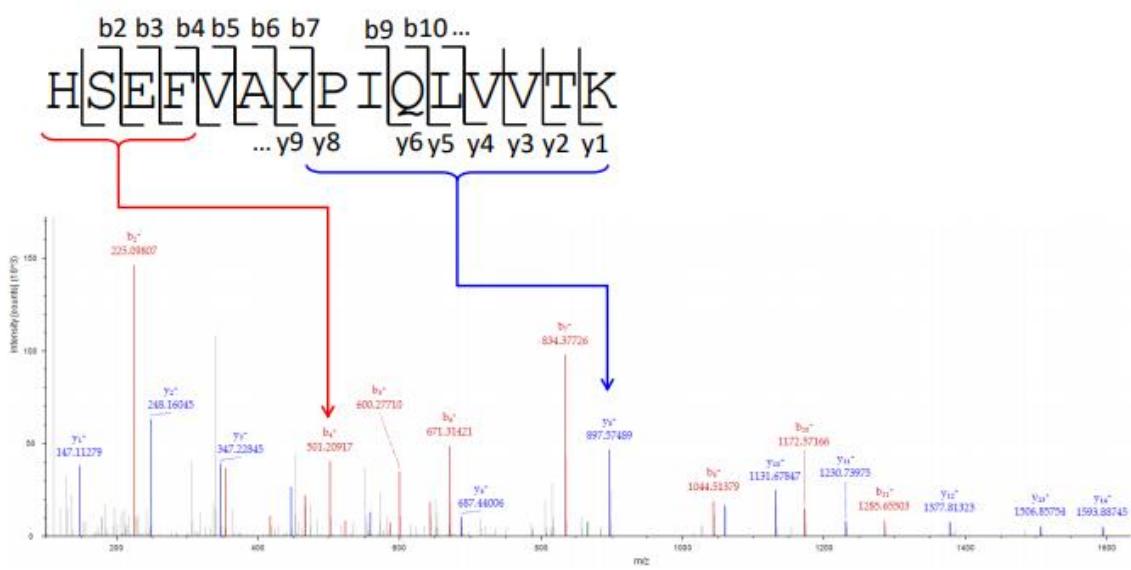
שיטת המאפשרת לקבוע את הרצף של חומצות האמינו המרכיבות את הפעטיד.

1. פירוק חלבוני Ion source
2. Mass filter – נרצה לבדוק רק פפטיד יחיד. גם מכיל שדה חשמלי ולאחר מכן שדה מגנטי, ורק שהשדה המגנטי משמש כפילטר למעבר פפטידים שהם בעלי אותו יחס למטען **ספציפי**. (בכל מחזור יחס אחד הפפטידים יוצאים 2+).
3. Fragmentation – הגז יציב. מביא פרוגמנטים. המטען יהיה באופן סטטיסטי 1+.
4. Mass analyzer
5. Detector
6. כל פיק בגרף מייצג פרוגמנט של פפטיד שעובר במדור הגז, מוחזרים של דקה.

(B) TANDEM MASS SPECTROMETRY (MS/MS)

Inert gas – שבירה לח"א

בתא זה יש גן חנקן אינהרטי דليل. היונים עוברים בתא ויש להם סיכוי התנגשות עם מולקולות חנקן. ההתנגשות אנרגטית והמולקולה יכולה להישבר. הקשר הכימי הכי חלש בשרשראת הפוליפפטידית הוא איפה שהבי סביר שייהי שבירה, והוא נמצא בקשרים בין השיריים של הח"א – **הקשר הפעטידי**. בכל אתר שבירה יכולים להיווצר שני פרוגמנטים.

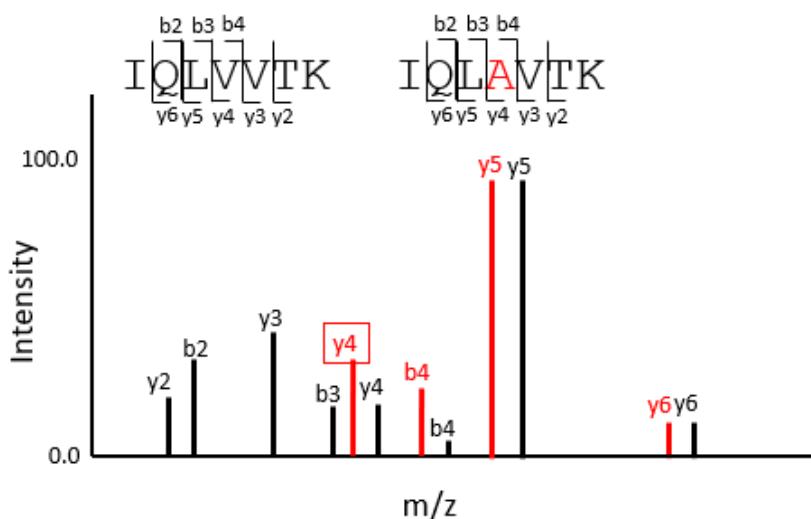


בעת בגרף יש מסות שמתאימות לשברים מסוימים.

קריאה של המסות השונות של הfragments והשווואה לידע מוקדם מאפשר לקבוע את רצף החלבון ולקבוע האם עבר מודיפיקציות. הדיזיון של מודיפיקציות אלה מבוסס על ההנחה שהן יגרמו לשטייה מאוד ספציפית ומוגדרת במסה של הrogram.

דוגמה מהrogram שיעזרת להבין:
בהינתן ספקטרום השבירה של החלבון QQLVVTK, איך יראה הספקטרום של QLAVTK?

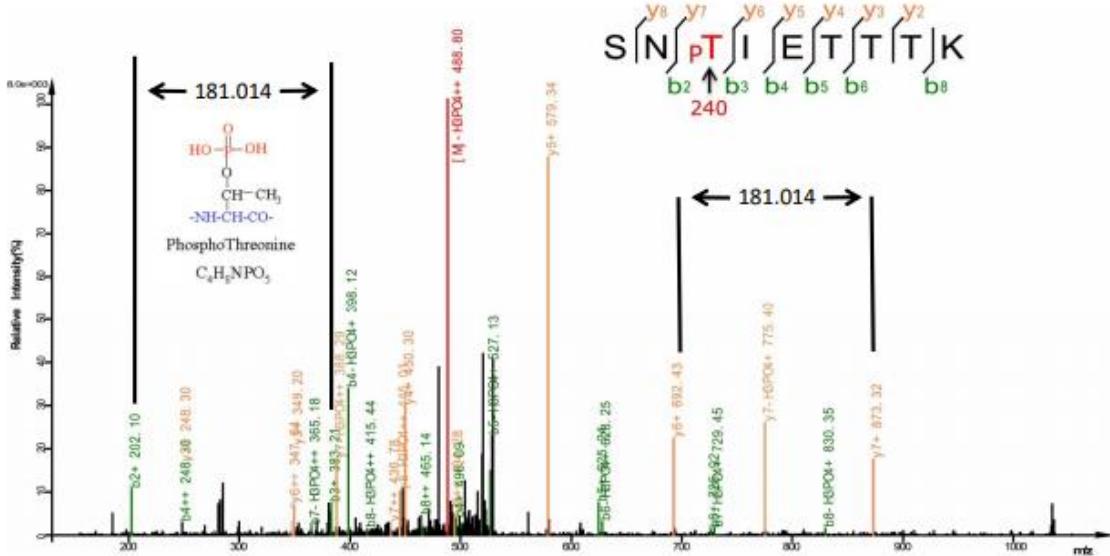
מה שיופיע על הפיקים הוא השוני במסות שלAlanine ואלаниן, שההפרש הוא 28. לכן כל פיק שיביל את אלanine במקוםAlanine יוזב ב-14 שמאליה.



זיהוי מודיפיקציות ברמת החלבון

ניתן לעשות זאת באמצעות ריצוף, אבל יש דברים שנitinן לראות רק ברמת החלבון. לדוג' פוספורילציה של שיירים שקרויה לאחר התרגום. זרchan במקומות מסוימים הוא מבוקר ולא אקריאי, ונרצה לדעת איפה יקרה. לאינדיקציה ראשונית נסתכל על פפטיד שמתאים למסה הכללית שלו (זרchan), ופפטיד שמתאים למסה בסיס עם התוספת של הפוסfat – לא נתנו מיקום אבל אינדיקציה אם הפפטיד מזרchan או לא.

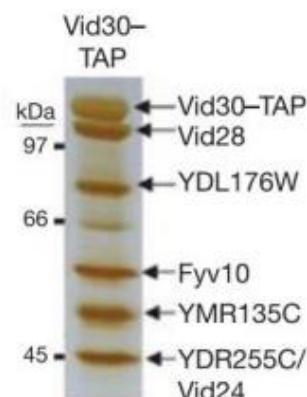
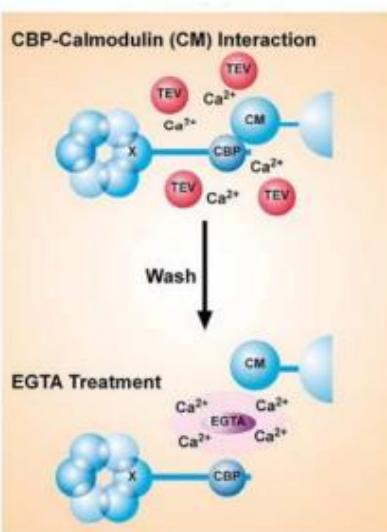
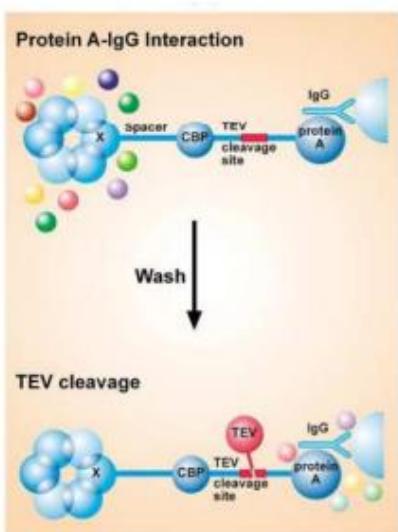
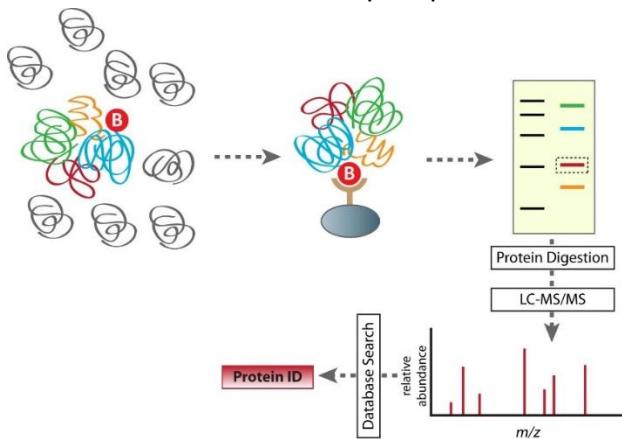
השברים יתנו לנו אינדיקציה לאיפה נמצא הפוסfat – בדוג', בשנראה הפרש של 181 דלטון (זהה המסה של החומצה עם זרchan) בין השבר השני לשבר השלישי,نبيון שהזרchan נמצא במקומות זה כי רק כך הפרש יכול היה להיות בערך זהה.



Affinity purification (AP-MS)

שיטת **לדיהו אינטראקציות בין חלבונים** המבוססת על מודיפיקציות גנטיות בתוך אחד החלבונים.

1. נסמן את "חלבון הפיתוי" בצורה גנטית באיזשהו-tag בעל שני מוטיבים שנitin להיקשר אליו.
2. שבירת הרקמה ויציאת הקומפלקס הרצוי.
3. קישור אחד המוטיבים בתג לנוגדן עם אפייניות ספציפית וכייצג אותו על איזשהו *bid*, כדור ג'ל שיקשור אותו בצורה חזקה.
4. שטיפה והרבה ניקוי ובתוכהה מכר מולקולות שאן לא חלק אמייתי מהקומפלקס יישטפו.
5. קבלת סט של חלבונים – חלבון הפיתוי וכל מה שמחובר לו בקומפלקס.

**בעיות בשיטה**

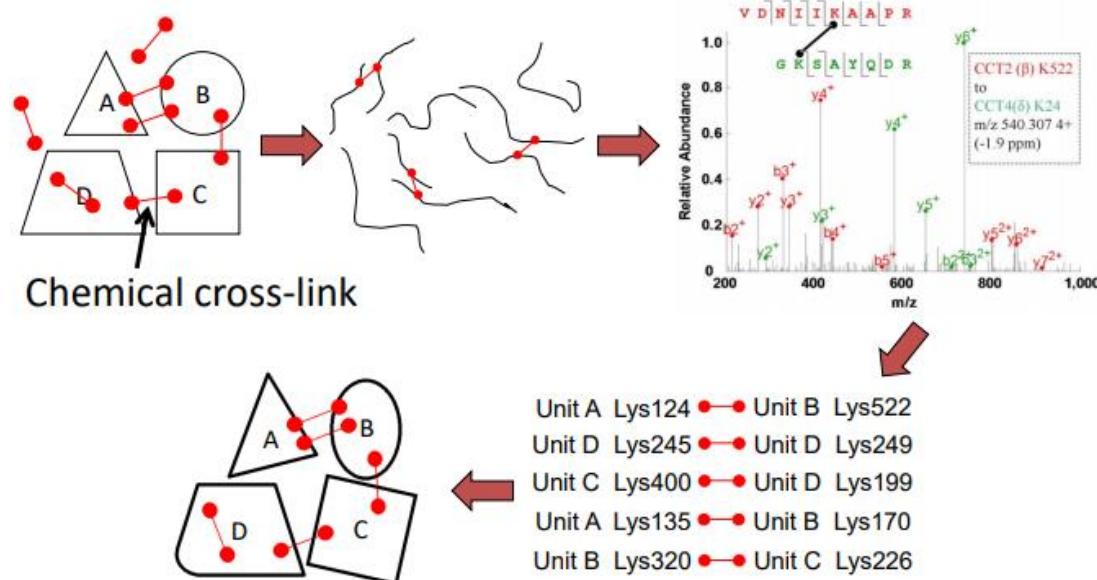
1. פירוק של הקומפלקס, חוסר יציבות.
2. רק על מערכות שנויות לשינוי גנטי.
3. קשה ליישום על חלבונים ממברנליים.
4. יודעים שככל הקומפלקס מתנהל ביחיד אבל לא יודעים מיקומים מדויקים – פתרה ע"י XL-MS.

XL-MS

מבוססת על עשיית cross-link ? לקומפלקס, פירוק לפסיטידים וקבלת ספקטרום השברים.

מתќבלות שתו סדרות של שברים – ירוקה ואדומה.

בר ניתן להזות יונים שעברו cross-link וזה מעיד על בר שהוא אחד ליד השני.

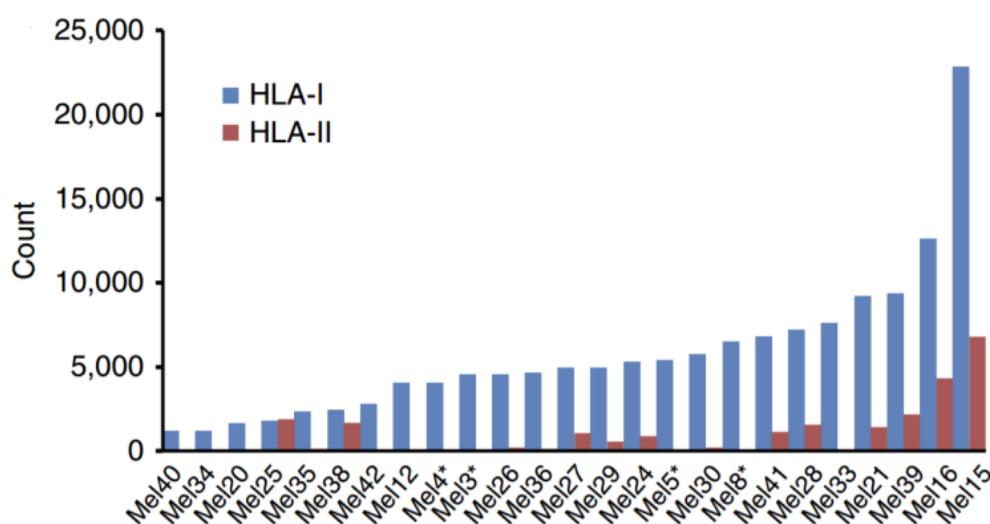


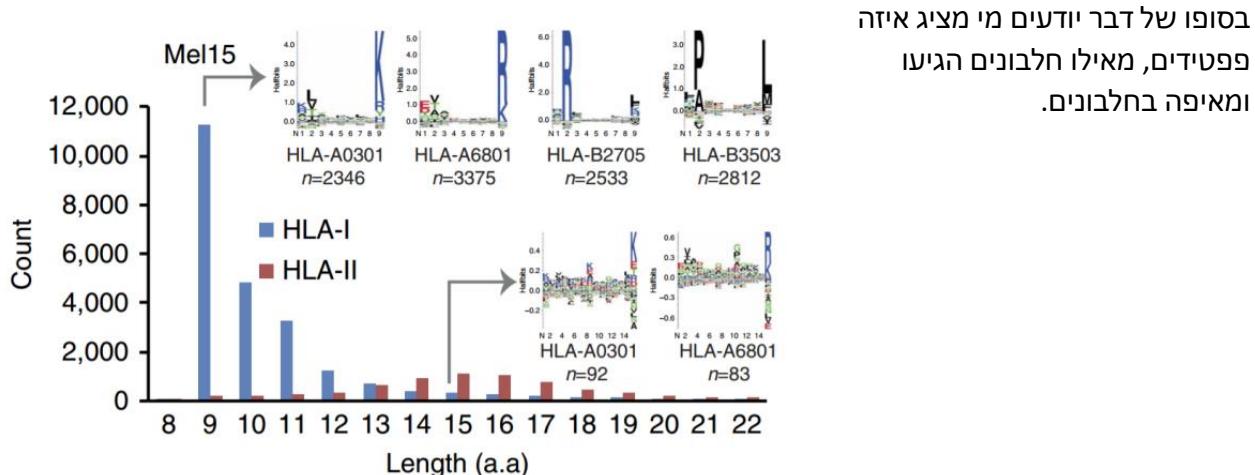
Immunopeptide

במבנה החיסון, תאים מציגים שני קומפלקסים חלבוניים MHC שהקצתה העליון שלהם חשוף לנוזל הבין תא-ו-תא והם מציגים פפטיד מהחלבונים שבוטאו בתוך התא, המטרה של זה היא להציג פפטידים ויראליים או חידקיים כך שתאי T יוכל לזהות את האנטיגן הזר וליצג תגובה חיסונית שתהרוג את התא הנגע. בתאים סרטניים נרצה להציג חלבוניים שעברו מوطציות בಗל הסרטן ותופעל נגדם תגובה חיסונית. נרצה ליצור תורפות שmbוסות על המנגנון הזה ולשם כך נצטרך להבין אותו היטב ולדעת איזה פפטידים מצויים.

לקחו גידולים מחלוי מלנומה (כל נק' על ציר ה- α היא חוליה) והפיקו מהם את חלבוני ה-MHC ואו-טם פרקו ולקחו מהם את הפפטידים שהיו מעלה (שאמורים היו להיות מצויים לתאי ה-T). הצלחו לרצף כמעט 100,000 פפטידים שונים שיוצגו.

נעשו סטטיסטיות על הפפטידים שהתקבלו. ראו למשל שאורך הפפטידים הם בין 9-10 ח"א שזה כבר היה ידוע. עשו קלאסטרינג וראו איזה סוגים של פפטידים מצויים על חוליה בודד, וראו שלחולים שונים יש קלאסטרים שונים.





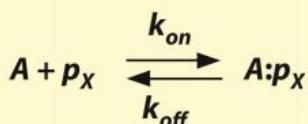
בוסףו של דבר יודעים מי מציג איזה פפטידים, מיילו חלבוניים הגיעו ומאיפה בחלבוניים.

– סיבוכיות Complexity

הביולוגיה מורכבת – בתחילת מסויים יש לנו הרבה שחקנים, הרבה אינטראקציות ורבה דרכים לקבל תוצאה זהה. לא ניתן להוכיח מתמטית לאיזה מסלול מתקדמים.

ביולוגיה מערכית System biology

- התמודדות עם הסיבוכיות. שימוש במתמטיקה, בפיזיקה ובמדמ"ח כדי למדוד ולכמת תהליכים ביולוגיים מרחב (רקמה, ארגניזם, ביוספרה) ובזמן.
- עשיות פרדיקטיביות הנינתנות למיפוי מבני.
- להבין איזה דאטא חסירה, מה עוד צריך לדעת.



$$\text{rate of complex formation} = k_{on}[A][p_X]$$

$$\text{rate of complex dissociation} = k_{off}[A:p_X]$$

משוואת היל

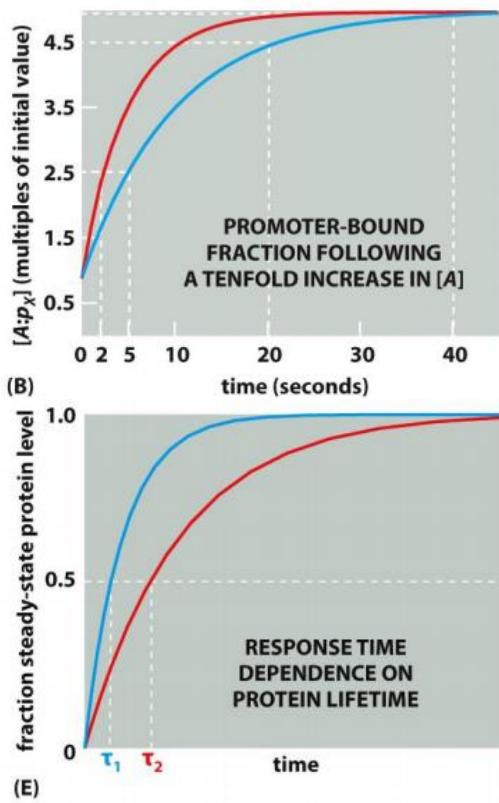
הrama המתמטית שתידרש בקורס (ר' Figure 8-2b Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2015))
פיתחנו אותה בעבר, וראינו שקיים מושואה שקשורת בין קצב העליה והירידה של ה-TF על ה-DNA – (k_{on} , k_{off})
הנגזרת, וב-state steady הנגזרת מתאפסת וממנה
פיתחנו את משוואת היל.

באמצעות system biology נרצה להבין את המערכת ביצוריה יותר מפורטת, איך להגיע במצב הרצוי (steady state).
למשל כדי להגיע אליו עם ריכוז ה-TF נctrיך לא לאפס את המשוואה (היפרנציאלית) אלא לפטור אותה.
בוסףו של דבר נקבל גרפ המראה את ריכוז קישור ה-TF ל-DNA כפונקציה של זמן.

$$\text{bound fraction} = \frac{[A:p_X]}{[p_X^T]} = \frac{K[A]}{1 + K[A]} \quad \text{Equation 8-3}$$

$$\frac{d[A:p_X]}{dt} = \text{rate of complex formation} - \text{rate of complex dissociation}$$

$$\frac{d[A:p_X]}{dt} = k_{on}[A][p_X] - k_{off}[A:p_X] \quad \text{Equation 8-4}$$



ניתן משל להסביר מהגרף שאם נכפיל את k_{on} ו- k_{off} ב-2, היחס ביןיהם נשאר אותו דבר ונגיע ל-steady state אבל רק כבמייר יותר (הגרף האדום).

protein lifetime – דוג' נוספת

רמת החלבון בתא תלויות במספר mRNA שנוצר, והוא נוצר ע"י TF שמבוטא בהיל. הריבוזום מייצר חלבון mRNA ביחס של $\frac{1}{m}$ החלבון נשאר בתא ובכל רגע נתון אחד ממנו מתפרק, מסמן ב- τ_x (זמן מחצית חיים, אחריו τ_x חצי מהחלבונים יעברו פירוק). כתוב את המשוואות בצורה מפורשת נגלה שב-steady state במספר החלבון הכללית תלויות במספר mRNA שנוצר ובכמה מהר מתפרק החלבון. מה שמשמעותו הוא שכשנסתכל על הדינמיקה – כמה מהר הגיע לרמה זאת? ומה הקצב תלוי? מסתבר שركב הקצב הפירוק של החלבון. המשוואות במצגת ע' 34 ובהמשך יש תוצאות נוספות.

השלכות של Complexity על מחקר ביולוגיה וברפואה

- כיום כדי לחקור ביולוגיה יש צורך במשאים רבים ורבים בסוף, וכן קיטוב במדיניות שעשוות זאת.
- ביולוגיה מדע רב תחומי.
- התחום מתפתח רק כבמייר.
- נותר הרבה לחקור.

מטבולומיקה**הקדמה**

מה זה? מדידה מקיפה ובמותנית של מולקולות קטנות במערכת ביולוגית. אבל לא יודעים את כל המולקולות הקיימות ולא יכולים למדוד את כלן.
הקטנות שקיימות ולא יכולים למדוד את כלן.
 מולקולות קטנות – מולקולות ארגניזות שהן בין 50-1500 דלטון.

סוגים עיקריים של ריאקציות מטבוליות:

1. קישור בין שתי מולקולות
2. התפצלות למולקולות קטנות
3. מודיפיקציה
4. טרנספורט

שני סוגים של מטבולייטים:

- **מטבולייטים ראשוניים:** מיוצרים ע"י כל הארגניזמים ונחוצים לשידות. כוללים אבני בניין כמו חומצות אמינו, סוכרים וליפידים.
- **מטבולייטים שניוניים (מתמחים):** מיוצרים ע"י מינים ספציפיים, מתפקדים בתגובה לסיגナル סביבתי מסוים או בהתקפות. מגוונים.

התמודדות עם סטרס באמצעות מטבולייזם

דוגמאות למטבולייטים בצמחים
ריחות – מטבולייטים שניוניים

למה להשתמש במטבולומיקה?

1. **פונטיפיניג** – הביי קרוב לפונטיפ שאנו יכולים להגוע אליו. אנליזה גדולה של גודלים ולבוח הבדל גנטיפי.
2. **הנתן הפעולות הגנטית** – אם לא יודעים את התפקיד של גן מסוים אפשר לקחת את המוטנט שלו ולבוח את המטבוליום ולהבין את הפעולות האנדימיתית שלו.
3. **גילוי חומרים פעילים** (סטרהואידים למשל).
4. **זיהוי מركבים מטבוליים** – המטבולייזם הביי קרוב לפונטיפ פיזיולוגי, ואפשר לנשות לאפיון מטבולית תאים לפני שאפינוינו שינוי פיזיולוגי (למשל לתפוס תאים סרטניים לפני).

מדידת מטבולייטים**אתגרים במדידה מטבולית**

- מרכיבות כימית.
- טווח דינמי. יש מטבולייטים בכמות גדולה ויש בכמות קטנה. יש גבול שאנו יכולים להבין – יש חומרה שיש הרבה אבל לא נוכל לדעת כמה הרבה.
- רזרביות. יש מבשרים שיכולים לתת מבנה מדויק אבל לא הפרדה טובה בין מטבולייטים, ולהפוך.
- מידע מבני על המולקולה.

סוגים של אנליזה

1. **Targeted metabolomics** – חיפוש מטבוליטים שאנו ידועים מהם וקיימים במערכת (לכימות וכו'). לא נדע אם קורה משזה מעניין מעבר לחומריהם שהסתבלנו עליהם. הגדרנו חומרים מראש ונסתכל רק עליהם (למשל השפעה של טיפול מסוים על מטבוליט מסוים).
2. **Untargeted metabolomics**. מודדים הכל. מקבלים יותר תוצאות אבל הוודאות מהן בדיקות יותר נמוכות. השתמש למשל בשורצים לדעת מה השוני בין כל המטבוליטים בהתאם, אפיון של מצבים מסוימים.
- אפשר לשלב בין שני הסוגים.

פלטפורמות אנליטיות

במטבולומיקה מתקבלת תערובת של חומרים ונצרך:

1. להפריד ביניהם לפי תכונות כימיות.
2. לזהות ולכמות אותם.

1. Gas Chromatography Mass Spectrometry – **GC-MS**.

2. Liquid Chromatography Mass Spectrometry – **LC-MS**.

3. Nuclear Magnetic Resonance – **NMR**. טכניקה שמתיחסת לתגובה האטומים בשדה אטומי.

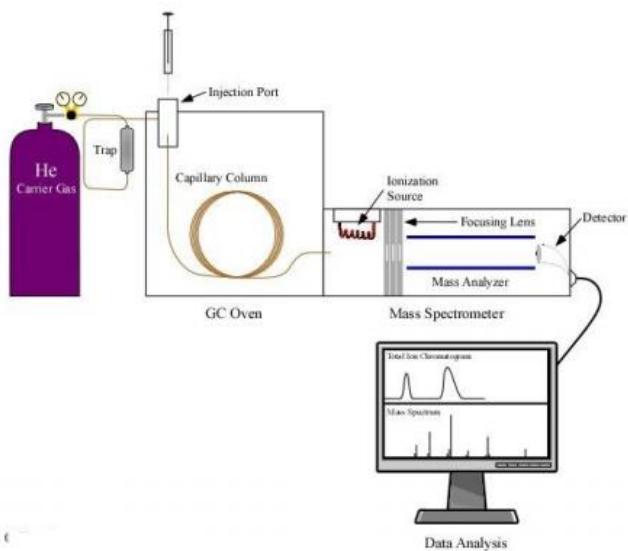
דוначיה לא גבואה, מקבלים רק מטבוליטים שנמצאים בكمות גדולה. יותר מידע מבני ואפיון מטבוליטים חדשים.

GC-MSלמה להשתמש בה?

- טוב להתחילה כי יש לנו יודעים מה אנחנו רוצים לראות.
- מאוד רובוטי – מכשירים שונים נותנים תוצאות דומות. ניתן להעביר מידע מכשיר למכשיר? לעומת LC שהוא תלוי מכשיר.
- אפשר למדוד בין 100 ל-400 מטבוליטים, מודד מולקולות מאוד קטנות כי הן צרכות להפוך למצב גז (בין 50 דלטון ל-800 דלטון). BD"כ משתמש ליהו מטבוליטים ראשוניים וקצת ייטמינים.

המולקולות צרכות להיות עמידות בחום כדי שלא יתפרקן
בשטיינרים אותן למצב גז.

- יחסית קל לעומת LC, אבל מוגבל.

למה להשתמש ב-LC-MS?

- גמישות גבוהה כי זה בפaza נוזלית ואפשר להשתמש בקולונות שונות.

מתאים לסוגים רבים של מולקולות (גם מולקולות שלא עמידות לחום כמו GC) שמחמם אותן כדי להפוך אותן למצב גזים, למשל ליפויים שלא יציבים תרמודינמיamente. אז הוא מודד בעיקר מטבוליטים שכוניים, ליפויים ומולקולות שלא עמידות בחום. – ניתן להכין את הדגימות בלי טיפול מוקדים (לעומת GC-MS שנדבר עליו אחר).

שלבי ה-GC-MS

1. **הכנת הדוגמה** - לוקחים דוגמה ומדריים לצינור, היא עוברת בקולונה ושם יש גז אינהרטוי (?) שלא משנה את התכונות של המטבוליטים, זו דוחת בקולונה לפי התכונות הכימיות שלה, מחממים וכל זה כדי לקבל מולקולות שיוצאות אחת אחרי השניה. כלומר המולקולות יוצאות מופרדות ל מבחנה בסדר מסויים שסדר זה מאפיין את המטבוליט. מאפיין זה נקרא retention time.
2. **Mass spectrometry** – המולקולות יוצאות ל- Mass spec שהוא קצר שונה מהרגיל. במדור אחד המולקולות עוברות יוניזציה ונשברות למולקולות קטנות (לעומת מודרים נפרדים ברגיל).
3. **Data analysis** – מקבל את המולקולה לאחר שנשברה. לכל מטבוליט יש דפוס שבירה מסוים שאנו אנחנו בכרה מכירם ולפי זה נזהה את המטבוליטים. אז זיהינו את המטבוליטים לפי שני מאפיינים: 1. סדר הייצאה 2. דפוס השבירה

שלבי האנאליזה של GC-MS

1. הכנת הדוגמאות.
2. הפרדה ב-GC
3. דלקציה של המולקולות
4. בימות והערכה.

דיגום – Sampling and extraction

- צרי הרבה חזנות כי השונות שמתקבלת היא גדולה. בין 4 ל-6 חזנות ביולוגיות בכל ניסוי וזה יוצר ניסויים גדולים. * הוכנסת חומר ידוע בכמות ידועה, אנחנו יודעים מראש את המאפיינים שלו ונדע לנרמל את הכמותות לפיו.
- קוונצ'ינג (ביבוי?) מהיר סוווז ריאקציית מטבוליט? לעצור פעילות מהר. סיכון במדידה של הפעעה או של המדידה. בד"ב ע"י הקפאה בחנקן נזלי.
- הוצאת המטבוליטים שאנו רוצים להפיק.
- מיפוי extraction של כל המטבוליטים ברקמה.
- העשרה של המטבוליטים שאנו רוצים לראות. لكن חשוב שנדע מה אנחנו רוצים לראות

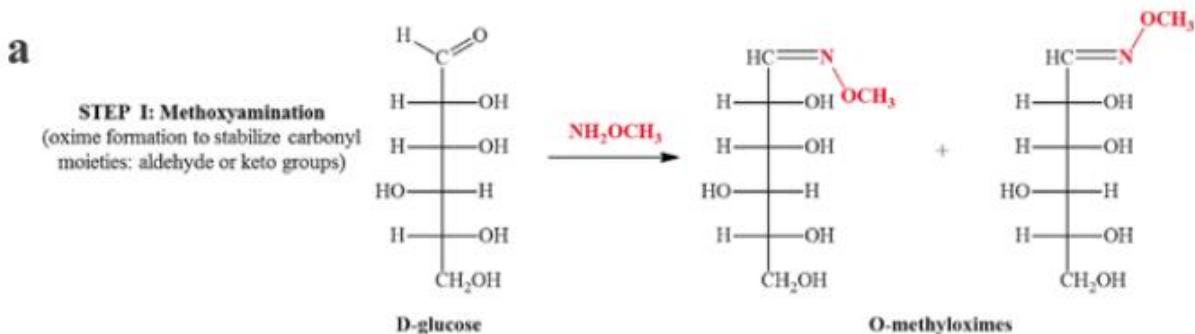
**FIGURE 2.** Typical sample preparation workflow used in plant metabolomics studies.Derivatization

דרוש ל-GC-MS. מודיפיקציות כימיות למטבוליט כדי ליצור נגזרת שתעמוד בתנאי המערכת (הפייה לגז למשל GC-MS). תהליך כימי שיגרום לפחות קונפורמציות של המולקולה, עושים דלקציה לנגזרת של המולקולה. כמו כן מרכיבים גם סטנדרט, המולקולה נקייה.

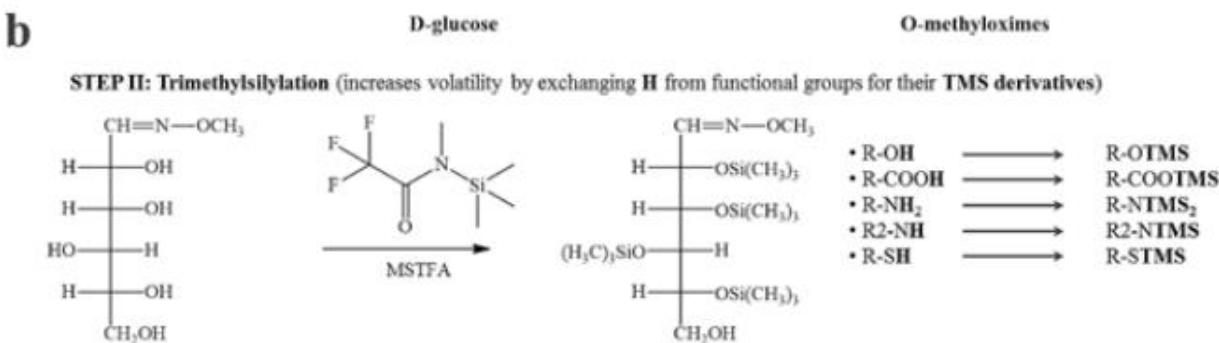
מה עושים?

.1 – לקבע את המולקולות בהוותה קונפורמציה. **Methoximation**

למשל בಗלקוז מוסיפים לקטן או לאלהיד משהו ומשאיר אותם במודיפיקציה פתוחה, לינארית. נקבל פחות קונפורמציות.

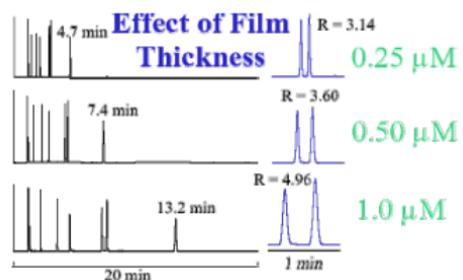
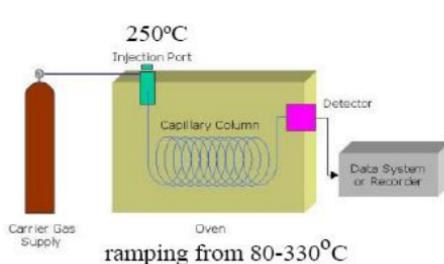


2. **TMS** – הוספה מולקולה כימית בשם TMS שמקנה למולקולות עמידות גבוהה בפני חום ומאפשרת להן לעבור בפאה הגזית.



בתוך הקולונה יש גז אינהרטוי שלא יגיב עם המטבוליטים במערכת (הליום או ארגון). זה מאפשר הפרדת המולקולות לפי תכונות כימיות מסוימות. ואיתם חומרים מוגבלים ברווח לפי שוני פרמטרים:

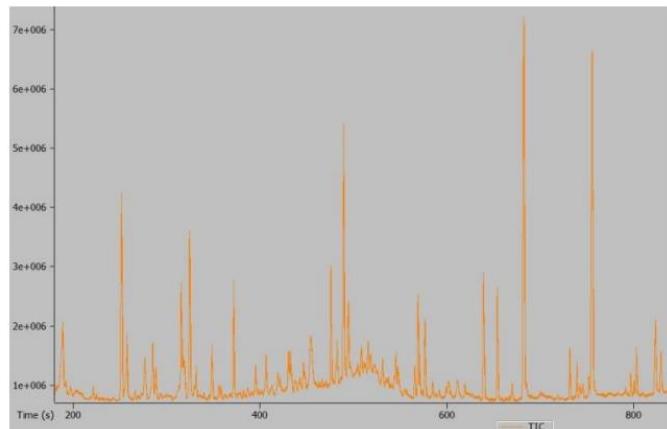
1. נדיפות.
 2. אינטראקציה עם חומרים בחולוגרפיה עצמה.



Mass spectrometry

תזכורת – הפרדה של יוניים לפי היחס בין המסה לבין המטען. המטבולייטים עוברים יונייזציה ומתרפקים לחומרים קתניים יותר. כל סוג מולוקולה נSharper אותו דבר, וזה כמו טביעה אצבע למולוקולה ודרך לדעת באיזו מולוקולה מדובר. אם היי כמה קונפורמציות הן לא היי יוצאות באותו זמן.

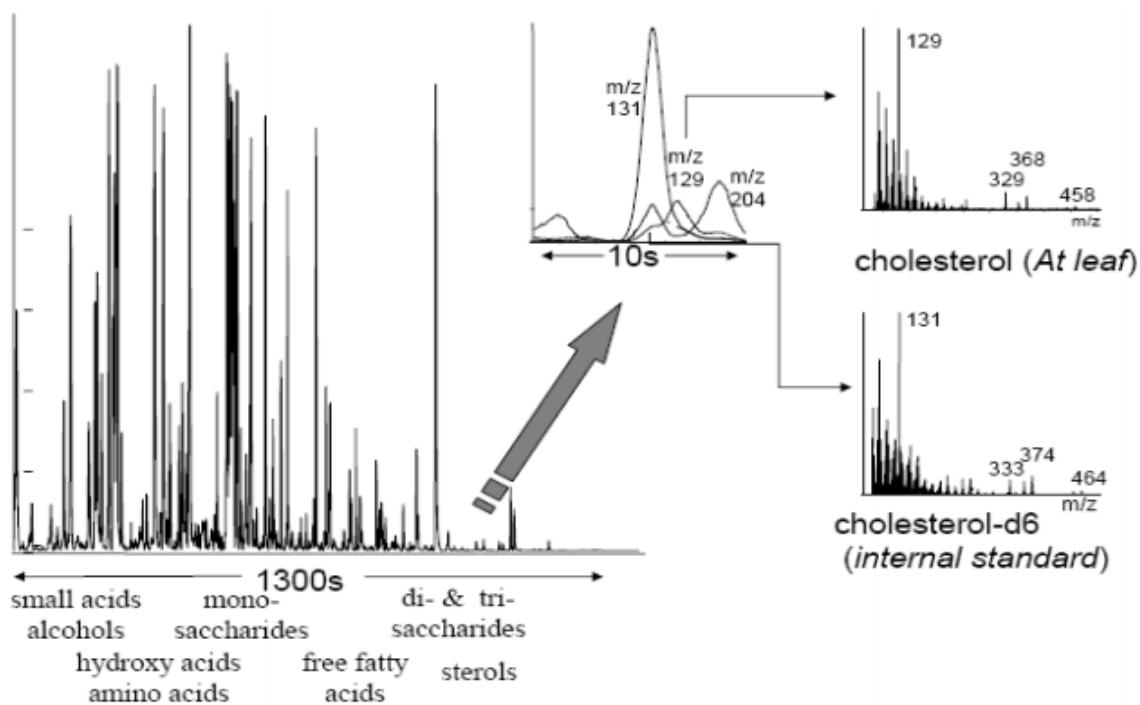
Data analysis



מקבלים ברכומטוגרפיה – סכימה של כל המטבולייטים במערכת. אי אפשר לדעת יותר מדי ולכן נדרש לעבד את המידע לפני, לפרק למטבולייטים נפרדים ולזהות אותם. יש יותר מפיק אחד לחומר, הם מתפרקים לכמה מסות שוות.

ציר x – זמן יציאה, retention time.
ציר y – אינטנסיטי, intensity, כמות החומר.

דה קונבולוציה – ניקח את הרכומטוגרפיה שמורכבת מכל המסות ולפרק אותה לדיאגרמות נפרדות וכל אחת מייצגת מסה אחת. (מסה/מטען)
איך נזהה שמדובר במסות? אם נסתכל על פיק מסוים ונראה כמה גראפים חופפים זה יכול להיות כמה פרגמנטיים של מטבולייט מסוים שהתחבר לכמה מסות.



הם יוצאים מהකולונה באותו זמן כי השבירה קורית אחרי היציאה מהתקולונה. בסופו של דבר מקבלים שלושה פרמטרים לחומר: intensity, מסה/מטען, זמן יציאה. זמן שבירה – כל פיק מתאר חומר אחר. אחרי כל האנליזות נדע כל חומר למה הוא נשבר ולהסיק על דפוס השבירה אותו נשווה למספרות קיימות.

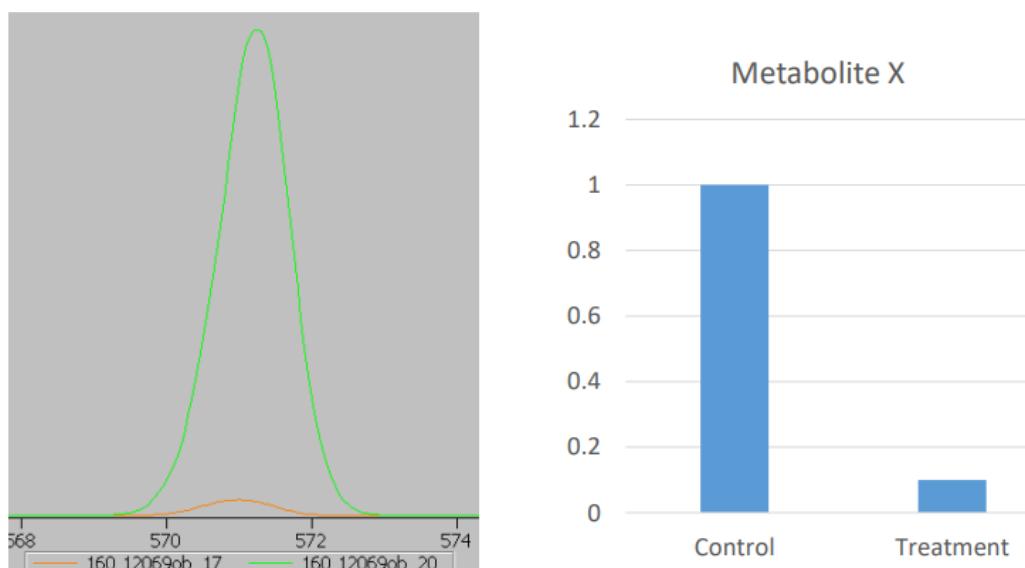
בד"כ המטבוליט יצא באותו זמן מהתקולונה ודפוס הפרגמננטציה שלו נשאר, ולפי אלה נוכל להזיהות אותו לספריה סטנדרטית ולפי זה להסיק.

המידע שנקלב הוא "תלת ממדי" – באיזה זמן יצא מהתקולונה, דפוס המסות ו-intensity: כמה המסות חזקות, חשוב לכימות.

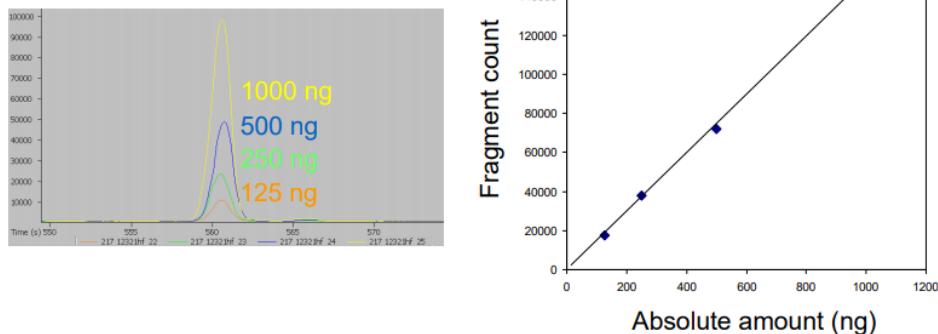
אנטנציה – מסתבלים בשקופית על פיקים, ומסתבלים על הזמן ומשווים לספריה הסטנדרטית את דפוס השבירה. אם הוא אותו דבר אפשר להבין שהוא אותו חומר. ב-GC-MS השמירה בספריות מדויקת.

כימוטים

כימוט יחסי – דוגמאות בשקופית. הירוק זה בקרה והכתום זה הבקרה, וראים שכמות המטבוליט ירדה בטיפול. נרמול השטחים וקבלת ערך היחסי בגרף הכהול ולהבין כמה זה ייחד.



כדי לדעת את הכמות המדוקנת נרץ עקומת ביוול רץ במוויות ידועות של החומר. בניית עקומת ביוול ונחשב אחורה לפי הכמות שהשתמשנו בהן ונקבל במה חומר. נוכל לעשות את זה רק עבור חומרים שידענו שייינו במערכת.



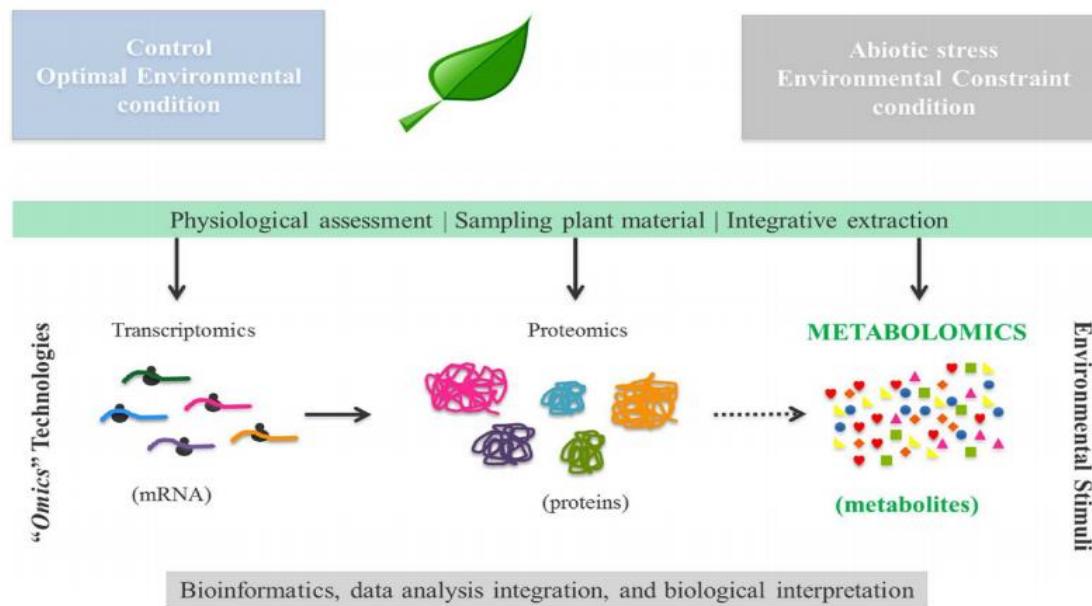
תיקונים בתחום המערכת

1. נורמליזציה ל-internal standard: התהילך נעשה ע"י אנשים וכיור להיות וריאבלי. נכניס מטבوليיט שלא נמצא במערכת, לכל הדוגמאות באותו במעטות.
2. נרמול למשקל הרקמה, לבמה וקמה לקחנו.

מה מקבלים בסופו של דבר?
טבלה של כל המטבולייטים שזיהינו אותם, המסות שלהם, ומה intensity של המסות במערכת.
מנרמלים כפי שצווין מוקדם.
בוחרים מסה מייצגת לכל מטבולייט.

GC-MS vs MS-MS
ב-MS-MS הדיהוי נעשה ע"י ריצוף חלבוניים ולא לפיה דפוס השבירה.
האנליזה של התוצאות די דומה.
מצריכות השוואה לספרייה.

דוגמה של שילוב כל השיטות – איך צמח מתמודד עם מצב עקה?
פיקח צמחים שגידלנו במצב עקה ובמצב רגיל, וולעשות כל מיני דברים ולהשוות בין השינויים ולאפין מה קורה במצב עקה.



Flux analysis – הסתכליות על תהליכי, **динמיות** ועל רמות הצריכה והפליטה של הריאגנטים. ניקח חומר גסמן אותו באיזוטופ ^{13}C שהוא יציב, ולעקבו אחרי החומר זהה. שאלת 2 בתרגול – הפתרון זה flux.

Method	Substance	Amplification	Complexity	Other
HT DNA sequencing <u>(illumina/DNA-seq)</u>	DNA	Yes	Low (only four bases)	Allows analysis of a single cell
HT RNA sequencing <u>(illumina/RNA-seq)</u>	RNA	Yes	Low (only four bases)	Allows analysis of a single cell
Mass Spectrometry	Proteins	No	High (20 amino acids)	Can detect proteins and interactions between them (XL)
GC-MS/LC-MS	<u>Metabolites</u>	No	Very high (all atoms that build organic molecules)	Can detect dynamics of metabolites (flux)

~ אין הקלטה של ההרצאה השנייה ~

מה זה Database בביולוגיה?

ספריות של מידע ביולוגי שנאסף מניסויים, פרסומים, וניתוחים חישוביים. הוצרך התחיל כי נהייתה כמות ענקית של חומר ונוצרו תוכנות שאפשרו להתמודד עם המידע.

סוגים של מאגרים:

מקדים מידע ביליאר לבודוק אותו. **Raw database**

נתונים שבדקו שהם נכונים. **Annotated (curated)**

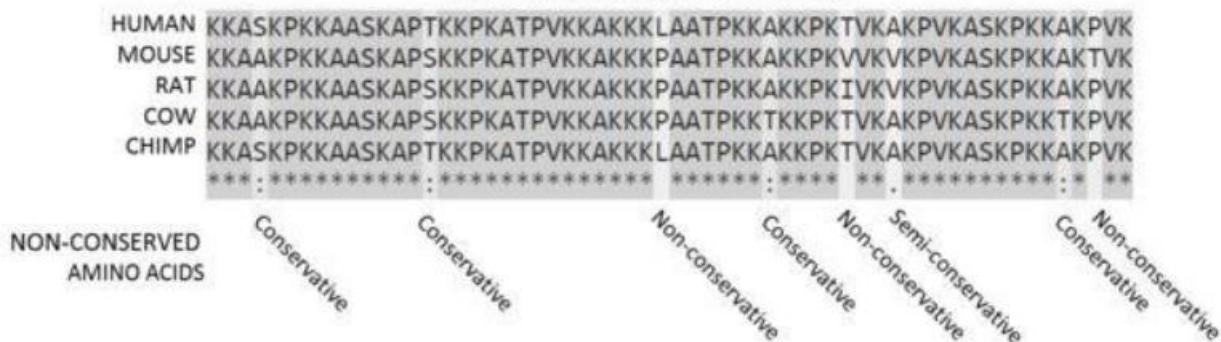
נתונים ראשוניים לא מעובדים, לא הסיקו מהם מסקנות. **Primary databases**

נתונים מורכבים מנתונים שונים databases אחרים. למשל, דיהו מוטיבים בחלבוני בעלי פונקציה דומה. **Secondary databases**

מכילים את שניהם. **Composite database**

Sequence alignment

סידור רצפים (DNA, RNA או חלבונים) אחד מתחת לשני והשוואתם כדי להסיק על דמיון ו שינוי ומרק לגזר מוטיבים, פונקציות זהות, אבולוציה (קרבה בין מינים, שמיות) וכו'.

Histone H1 (residues 120-180)Example:

```
AGAGTGCTGCCGCC
AGATGTACTGCC
```

Alignment:

```
AGA-GTGCTGCCGCC
||| ||| ||| |
AGATGTACTGC-GCC
```

12 matches of 15bp = 80% identity

סוגים של alignment

Global alignment – סידור רצפים אחד מתחת לשני מקצה רקצה כדי להזות דמיון, רוחחים או שינויים.

בד"כ מתאים לבדיקת חלבונים או גנים שאנחנו חושדים שהם דומים ורוצחים לדעת עד כמה, טוב לחלבונים שהם בערך באותו גודל.

- **Example:**

```
AGATGTGCTGCCGCC
TTTGTACTGAAA
```

- **Alignment:**

```
AGATGTGCTGCCGCC
||||| |
TTTGTACTGAAA
```

6 matches of 7bp = 86% identity

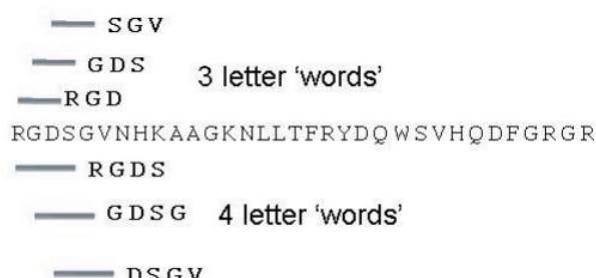
Local alignment – מציאת החלק בתוך רצפים שהוא הכי דומה ולפיו בונה תתי רצפים מתאימים. המقطع קצר יותר כי זה רק האזור המתאים.

BLAST – Basic local alignment search tool

אלגוריתם חישובי שיעשה alignment בין הרצף המקורי לבין database גדול של רצפים, ומוצא רצפים מתאימים בצורה מהירה.

השווואה

משתמש באלגוריתם אחר שמבצע local alignment ובודק שני רצפים, מסדר אותם ונוטן "ניקוד" – חיבוי אם הבסיסים דומים ושלילי אם הם לא דומים או אם יש איזושה מרובה. מוחפשים את ההתאמנה שנותנת את הניקוד הכי גבוה. זמן הריצה של האלגוריתם הזה הוא אכן מאוד קצר וריצפים ארוכים זאת בעיה.



BLAST לא משווה בסיס בסיס אלא עושה איזושה קירוב – הוא מחלק את הרצף למלילים (4-5 בסיסים) ובודק איפה ב-database קיימת מילה זו. מקצר את הזמן: פחת אופוריות, ובשותים יש database שמחולק בבר למיללים.

שלבי האלגוריתם

1. – חיפוש המיללים מתוך database ומציאת רצפים עם מיללים זהות.
2. – הרחבת-h-alignment בין הרצף שלנו לרצפים שנמצאו.
3. – שימוש ב-Cut-off סטטיסטי כדי לקחת רצפים מתאימים.



E-value – ערך סטטיסטי ש-BLAST נותן ומיצג כמה מועדים אקרים היינו מקבלים אם היוינו מוחפשים בגודל זהה, מה הסיכוי שלנו לקבל את הרצף הזה באופן אקרי?

פיצ'רים של BLAST

n blast – נוקלאוטידים.

p blast – חלבונים.

–blastx – מתרגם נוקלאוטידים לחלבונים (מחפש אותם ב-database של חלבונים).

Tblastn – מתרגם חלבונים לנוקלאוטידים.

ה Alignment - blast של שני רצפי נוקלאוטידים

בדוג', יש לנו פלסמיד ואנחנו רוצים להכניס לתוכו miRNA המנגד גן בשם ATG7. BLAST'ן לודיא שהמפתח אבן נכנס הפלסמיד ורץ' נשתמש ב-.
שניהם הרצפים הוכנסו (הפלסמיד והרצף של ה-miRNA)?

The screenshot shows the NCBI BLASTn suite interface. At the top, there are tabs for 'blastn', 'blastp', 'blastx', 'tblastn', and 'tblastx'. Below the tabs, there are two main sequence entry sections:

- Enter Query Sequence:** Contains a text area with sequence data (e.g., >S649_05_sa_miR-7-m12f (3) (1 .. 1076 - 1076_bp) followed by several lines of nucleotide sequence). It includes fields for 'From' and 'To' positions.
- Enter Subject Sequence:** Contains a text area with sequence data (e.g., >Hs1-A.tg7 followed by several lines of nucleotide sequence). It also includes 'From' and 'To' fields.

Below the sequence entry sections are search parameters:

- Algorithm parameters:**
 - General Parameters:** Max target sequences: 100, Select the maximum number of aligned sequences to display.
 - Scoring Parameters:** Match/Mismatch: 1,-2, Scores: Linear, Gap Costs.
 - Filters and Masking:** Filter: Low complexity regions (checked), Species-specific repeats for: Homo sapiens (Human). Mask: Mask for lookup table only (checked), Mask lower case letters.

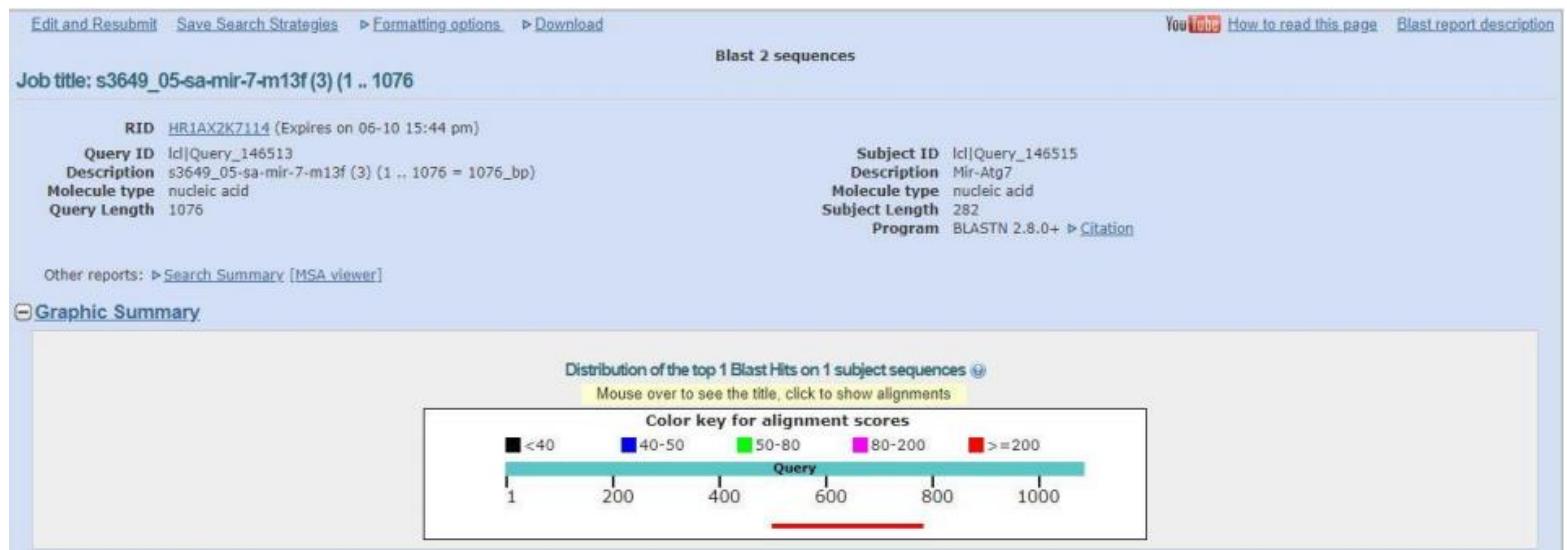
פרמטרים קבועים:

גודל המילה הוא 28
בסיסים, אם יש לנו רצף
יותר קטע לא נמצא.

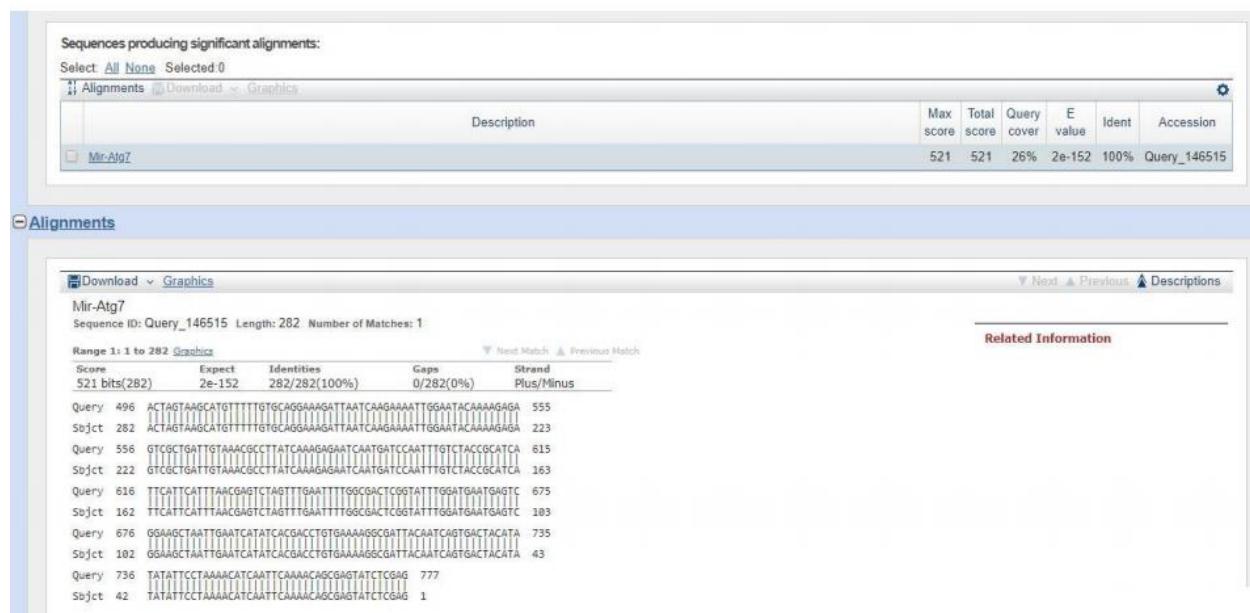
This screenshot provides a detailed view of the 'Algorithm parameters' section in the BLAST interface:

- General Parameters:**
 - Max target sequences: 100
 - Select the maximum number of aligned sequences to display.
 - Short queries: Automatically adjust parameters for short input sequences (checked).
 - Expect threshold: 10
 - Word size: 28
 - Max matches in a query range: 0
- Scoring Parameters:**
 - Match/Mismatch: 1,-2
 - Scores: Linear
 - Gap Costs
- Filters and Masking:**
 - Filter: Low complexity regions (checked), Species-specific repeats for: Homo sapiens (Human).
 - Mask: Mask for lookup table only (checked), Mask lower case letters.

התוצאות:



החתיכות ממש מתאימות אחת לשניה במקומות מסוימים, ואפיו ניתן להגדיר איפה ה-miRNA יושב על הרצף. אנחנו מקבלים גם ניקוד ל-alignment, ה-e-value מעיד על שמיות גבוהה. כמו כן אנחנו רואים 100% בסיסים זהים.



חיפוש ב-Database

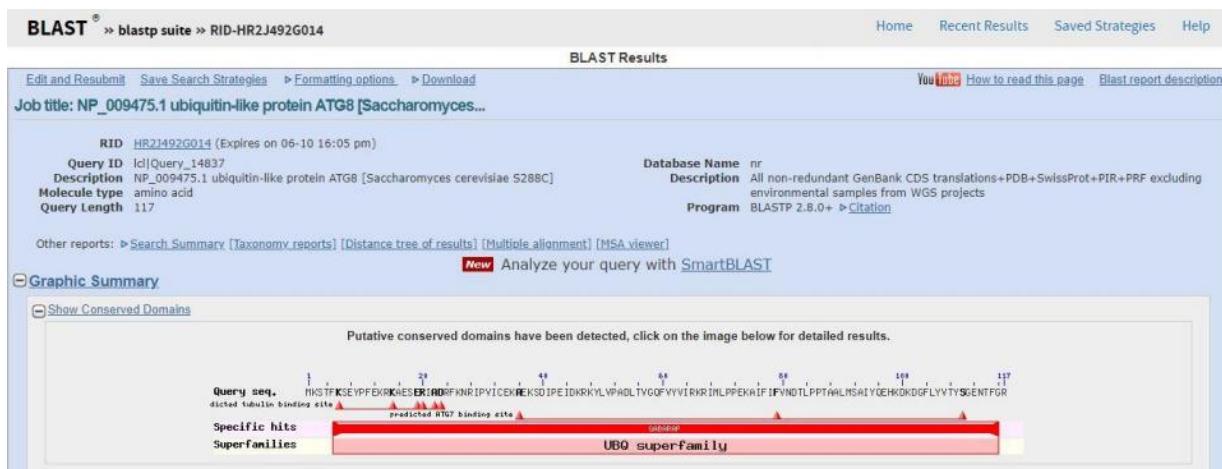
בדוג' חיפוש הומולוג לגן בשם ATG8 בשמרים.

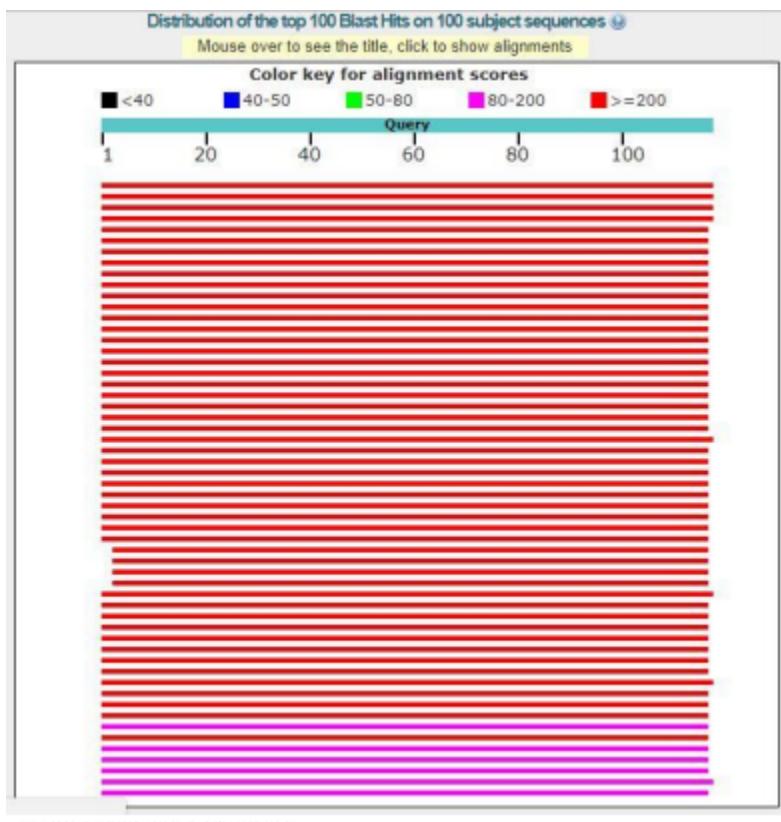
.חיפוש רצף החלבון ע"י האלגוריתם ב-**blast**

The screenshot shows the NCBI BLASTP search interface. In the 'Enter Query Sequence' field, the sequence NP_009475.1 ubiquitin-like protein ATG8 [Saccharomyces cerevisiae S288C] is entered. Below it, there's a note about the sequence being a ubiquitin-like protein. The 'Job Title' field contains 'NP_009475.1 ubiquitin-like protein ATG8 [Saccharomyces...]' and a descriptive title for the search. The 'Choose Search Set' section shows the database set to 'Non-redundant protein sequences (nr)', which is highlighted in yellow. The 'Program Selection' section shows the algorithm set to 'Quick BLASTP (Accelerated protein-protein BLAST)' and the program set to 'BLASTP 2.8.0+'.

התוצאות:

קיבלונו אנליזה של הרץ וזיהוי של דומיין, זהוי מוטיב קישור של ATG8 שמצוין גם ב-ATG8.





Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Chain A_Solution structure of the Autophagy-Related Protein Atg3		240	240	100%	2e-80	100%	XP_0007_A
ubiquitin-like protein ATG8 (Saccharomyces cerevisiae S288c)		239	239	100%	3e-80	100%	NP_00425_1
Atg8 (Saccharomyces cerevisiae x Saccharomyces kudriavzevi YM1)		238	238	100%	1e-79	99%	EF49763_1
Atg8 (Saccharomyces cerevisiae YJM61)		238	238	100%	1e-79	99%	AJ006442_1
Chain B_Crystal Structure Of Atg7c-Atg8 Complex		238	238	99%	2e-79	100%	3BIL_B
Chain A_The Crystal Structure Of Saccharomyces Cerevisiae Atg8-Atg12-41S-Corps		238	238	99%	2e-79	100%	2ZPN_A
ATG8-like protein (Saccharomyces cerevisiae)		236	236	99%	8e-79	99%	XP_018223490_1
atg8 (Saccharomyces cerevisiae H-3)		236	236	99%	9e-79	99%	EF544617_1
Chain A_NMR structure of Atg6-Atg7C10 complex		235	235	99%	2e-78	99%	2L5_A
Chain A_The NMR structure of the autophagy-related protein Atg8		235	235	99%	2e-78	99%	2KNC_A
Chain B_Crystal Structure Of Atg7c-Atg8 Complex		235	235	99%	3e-78	99%	3VH3_B
hypothetical protein KNAG_0802310 (Kazachstania naparashi CBS 8797)		233	233	99%	2e-77	96%	XP_022462919_1
hypothetical protein TDEL_0C01470 (Tetraplopora delmarensis)		232	232	99%	3e-77	97%	XP_003680247_1
uncharacterized protein ZYRC0B035420 (Zygosaccharomyces rouxii)		231	231	99%	6e-77	96%	XP_002405199_1
ZYRA0598_02652a1_1 (Zygosaccharomyces bailii CLIB 213)		231	231	99%	7e-77	96%	CDF90772_1
hypothetical protein ZYGR_0a001480 (Zygosaccharomyces rouxii)		231	231	99%	1e-76	96%	GHM02155_1
hypothetical protein Kest_1010e100 (Vanderwalztzyma polyspora DSM 7108d)		228	228	99%	1e-75	93%	XP_001647625_1
hypothetical protein NCAS_0E02560 (Naumovozyma cerebelli CBS 4209)		229	229	99%	1e-75	93%	XP_003676685_1

בכל פס זה "היט"? מה-database
בעצם נמצא הרבה חלבוניים דומים
באורך החלבן שchipשנו.
בטלה למטה יש לנו אחותים של זהות,
E-value וכו'.
כל ח"א אפשר לקבל ניקוד לפי זהות
שלחה.

עוד כל מיני דוגמאות במצגת

Structure browsing and homology modeling

PDB – דатаה ביס בו שמורות כל המבנים של מקוּרְ מולקולות (חלבונים, RNA וDNA וכו') שבא מעיקר מקריסטלוגרפיה ובום מיקרוסקופיה אלקטרונית.

Browser – תוכנה שמאפשרת להסתכל על המבנה.

Browsers Swiss-PDB-Viewer, UCSF-Chimera, and PyMol טובים הם Browser ~ הסבר על השימוש בהרצאה 10/06 חלק שני ~

Homology modeling

המבנה יותר שמור מהרכף, כי הרכף יכול ליצור מוטציות וקשה לדעת מה מקוּרְ.

המבנה הוא בסיס לפעולות המולקולה והמוטציות שייהו ירצו לשמר עליו.

לפעמים באשר עושים קристלוגרפיה לשני חלבונים, כמו שנראה בדוגמא, המבנים שלהם יכולים להיות זהים מאוד אבל הרכף שונה וקשה לזהות דמיון (אבלוציון).

השמירויות ברכף היא לא גבוהה, בסביבות 20%, אבל אלה שנשמרו שומרים על המבנה.

Homology modeling הוא תהליך שעבוד בצורה הבאה:

כאשר נרצה למצוא מבנה המתאים לאיזשהו רץ', נוכל להשתמש בידע שיש לנו על מבנה של רץ' אחר. נוכל לעשות alignment לרץ' שאנוחנו מחפשים.

אם מצאנו חלבון שהמבנה שלו ידוע והalignment נכון, אפשר לבנות מודל מבני ולבדק אותו.

דוגמא – HSF1 ו-DUX4

כיוון שרירים, בקצתה של כרומוזום 4, ליד הטלומר של הזורע הארכואה, יש מסגרת קרייה שמייצרת חלבון בשם DUX4.

~ המחשה בהרצאה ובהרצאה ב-13/06 ~

השלבים:

1. קיבלת הרכף ב-UNIPORT.
2. נרץ' עליו את BLAST עם השוואה ל-PDB כדי לראות אם יש מבנים הומולוגים – נצפו שני אזורים בתחילת הגן שיש להם הומולוגיות מאוד שמורים שכבר עברו קристלוגרפיה. אחד מהם זה גן בדרזופילा, ונמצאו שני אתרים דומים. ננסה להבין מה הם עושים.
3. בניית מודל הומולוגי דרך SwissModel. נבון למה הרכפים שמצאנו שמורים, מה הם עושים וכו'. נכניס את הרכף והוא יבנה מודל הומולוגי לפיו.
4. הבנת אספקטים ספציפיים של הרכף – הרכף ההומולוגי מכיל ארבע חומצות אמינו והן נמצאו ב-major groove בהליקס הכרה של גורם שעתוק בדרזופילा. קלומר ההליקס הזה שומר בין אדם לדרזופילा. שתיים מהח"א נמצאות בליבת החלבן ולכן נסיק שהחשיבות שלהן מבנית.

שתיים אחרים במשתף עם ה-DNA. מכך נוכל להגיד על רצפי ה-DNA שה-4DUX4 יקשר אותם יהו אותם רצפים בדרוזופילה שהוא קשור אותם.

Chain A, Homeodomain From The Drosophila Paired Protein Bound To A Dna Oligonucleotide
 Sequence ID: [1FJL_A](#) Length: 81 Number of Matches: 2
[▶ See 2 more title\(s\)](#)

Range 1: 19 to 76 GenPept Graphics					▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	
68.6 bits(166)	2e-14	Compositional matrix adjust.	33/58(57%)	40/58(68%)	0/58(0%)	
Query 95	RRKRTAVTGSQTALLRAFEKDRFPGLPESRIQIWFQNRFARHPGQ	152				
	RR RT + SQ L RAFE+ ++P I REELA+ T L E+RIQ+WTFQNRFAR Q					
Sbjct 19	RRSRTTFSASQLDELERAFERTQYPDIYTREELAQRTNLTEARIQVWFQNRFARLRKQ	76				

Range 2: 17 to 77 GenPept Graphics					▼ Next Match	▲ Previous Match	▲ First Match
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps		
64.3 bits(155)	8e-13	Compositional matrix adjust.	29/61(48%)	38/61(62%)	0/61(0%)		
Query 18	RGRRRRRLWTPSQSEALRACFERNPYPGIATRERLAQAIIGIPEPRVC	IWFQNENSRQLRQ	77				
	+ RR R ++ SQ + L FER YP I TRE LAQ + E R+C+WTFQN I+R +Q						
Sbjct 17	KQRRSRTTFSASQLDELERAFERTQYPDIYTREELAQRTNLTEARIQVWFQNRFARLRKQ	76					

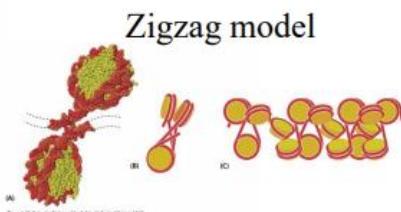
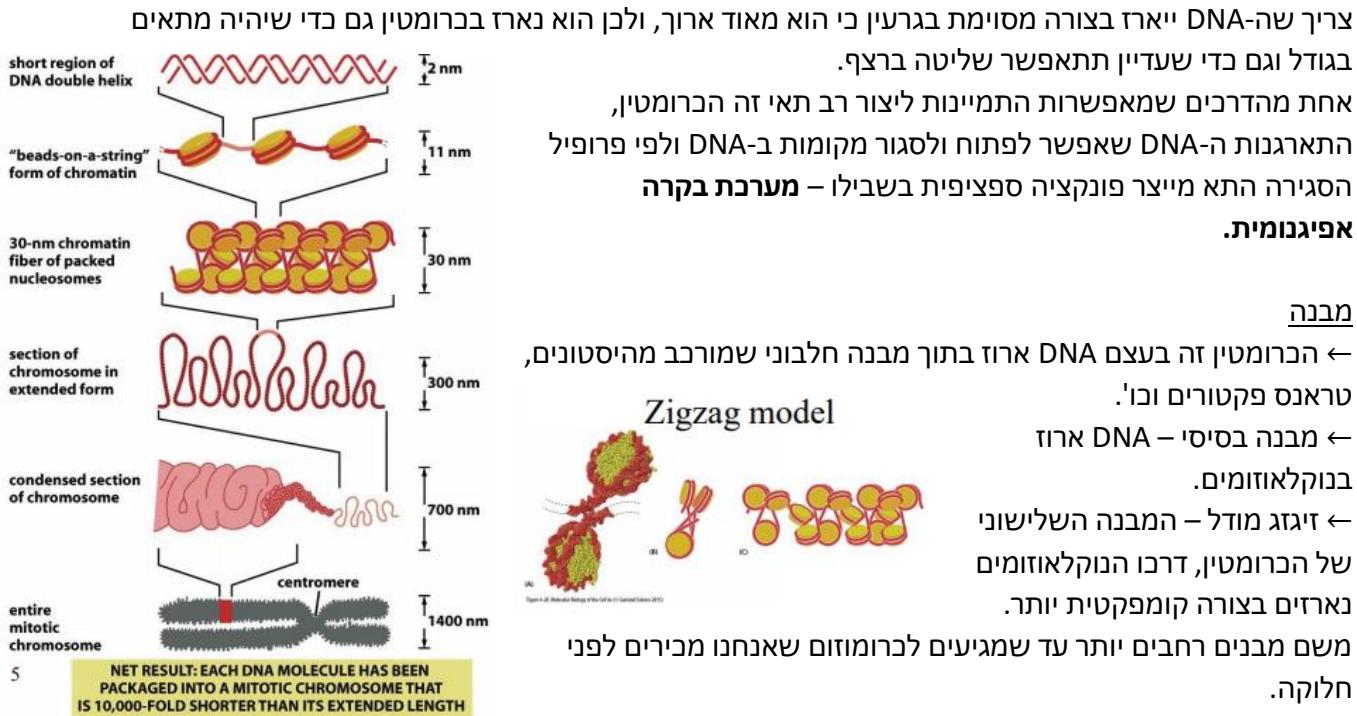
Genome browser

SCS – העלאת ריצופים של גנומיים קיימים.

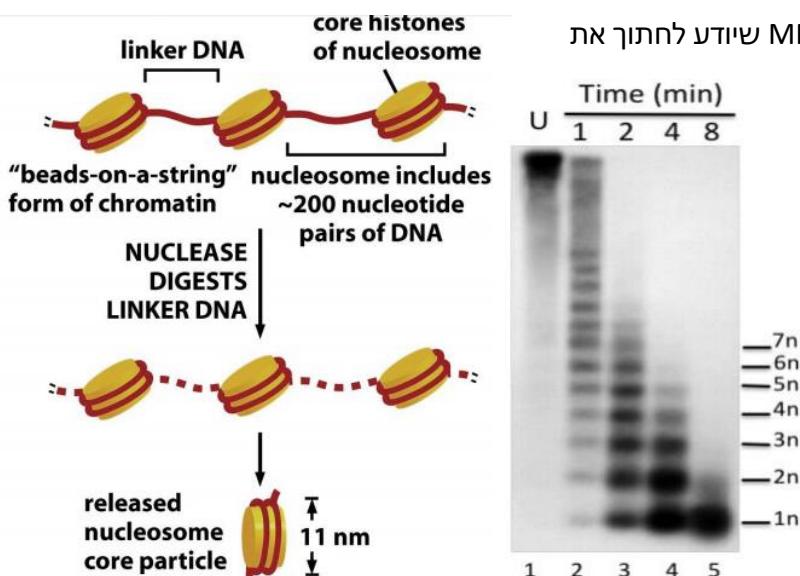
~ לא סיכמתי את מה שהיה בתרגול ובהרצאה כי זה די הסבר על איך להריץ חיפושים זהה מוסבר בתרגול טוב ~

Chromatin and Epigenetics

הברומטן

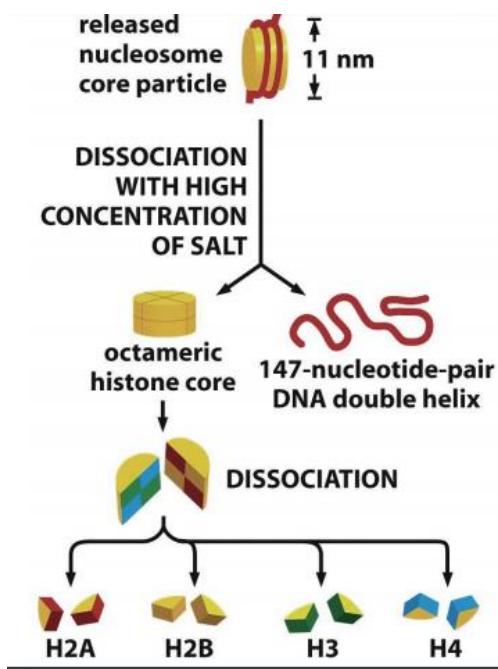


הנוקלאוזמים תופסים בערך 147 בסיסים (לנוקלאוזם אחד) ומורכבים מתתי יחידות בסיסיות – **8 היסטונים** לנוקלאוזם, ומסט חלבוני לא-היסטונים. הנוקלאוזמים הם בעצם ה-DNA מלופפים סביב היסטונים. בין נוקלאוזמים שונים יש בערך 5-50 נוקלאוטידים שימושיים למרחוק בין נוקלאוזמים יהיה 200 בסיסים בערך.

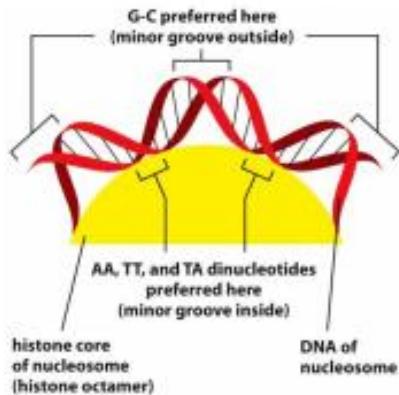


גלו את זה ע"י שימוש בנוקלאוזת, בעיקר ע"י MNase שיודע לחותך את ה-linker, האזור שמחבר בין הנוקלאוזמים, ולהחרר נוקלאוזמים עצמאיים ב-DNA. נסתכל על הגל - נראה שככל שהזמן עובר ה-

קשרים: קשרי מימן בין ה-DNA (backbone) להיסטונים (ח"א). חמיישית מהח"א של ההיסטונים הן אריגין וליזין שהן עם מטען חיובי וזה יוצר אינטראקציות חזקות עם ה-DNA שהוא טעון שלילי.



לצד הפנימי ב-*minor groove* של ה-DNA בשנארד יש בעיקר TA, TT, AA, ואילו החיצוני מועשר ב-GC, וזה מכיוון שהרבה TF שנקשרים ל-DNA מועשרים ב-G-C.



אחרי שנסחרר את החלבון בנוקלאוזום מה-DNA נקבל את התכולה החלבונית של הנוקלאוזום שמורכבת מ-8 **היסטונים**, 4 זוגות: H2A, H2B, H3, H4 – 2 תתי יחידות.

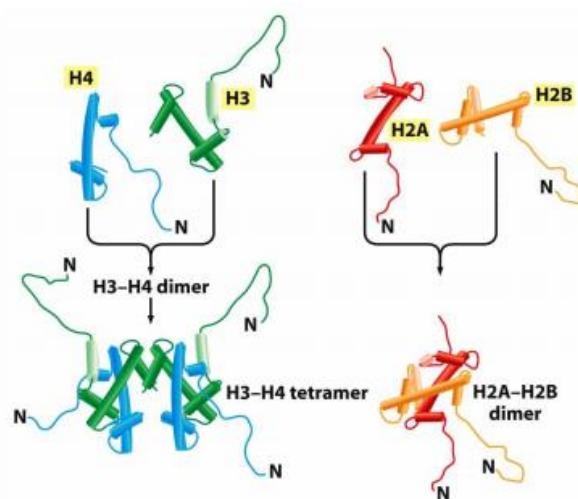
יש היסטון על ה-linker בשם H1 שיודיע להתחבר לבנייה הנוקלאוזומית ולשמור על ה-DNA בפרק מסויימת, ומיציר איזשהו הכרח בכך שהנוקלאוזומים לא מתערבבים.

יש מבנים דומים במרכז ההיסטונים, אבל שונה בזנב ה-N טרמינל ובערך C טרמינל, שהם בעיקר אלא שעוברים מודיפיקציות ומשפיעים על המבנה של הכרומטין. האזנות מאפשרות את המבנה המרחבי של הכרומטיין ע"י יצירת קשרים בין נוקלאוזומים.

H2A ו-H2B הם דימרים, ומתחברים לפני שמגיעים ל-DNA. H3 ו-H4 הם דימרים המתאחדים בטטרמר.

הטיסטונים שמורים מאוד אבולוציוני, מעיד על כך שהח'א'

חשיבותם לצף הצלבון.



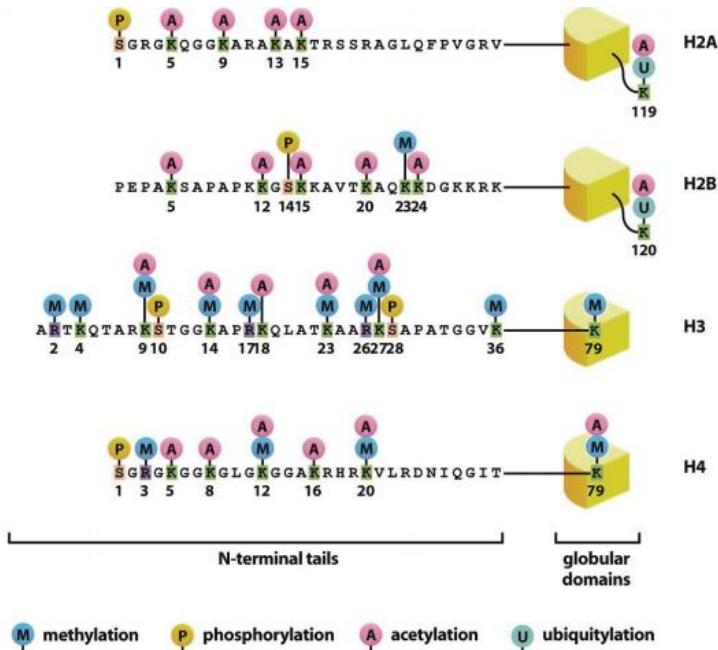
בקרה על מבנה הכרומטין

יציבות המבנה היא לא מושלתת, זה כדי שהטה יוכל לשמש ב-DNA.

בכל 10-50 milli-seconds יש שחרור שמאפשר לחלבון מטרה להיקשר ל-DNA. (TF או כרומטיין remodelers) המבוססת על הידROLיזה של ATP ל-ADP ובר מאפשרות פיתוח הצלבון. מטרת הרבה סוגים סרطن. יוצר קשרים גם DNA וגם עם הטיסטונים.

כאשר הטה מתחלק הוא מייצר DNA חדש, ויש צורך לא רצוץ באותו נוקלאוזומים על גבי ה-DNA המבוססת על הידROLיזה של ATP. נוצר בתא מיחזור של היסטונים באותו נוקלאוזומים שיוטר מהיר מהם שהיינו מצפים בזמן השכפל. Histone chaperons מאפשרים תחולפה של היסטונים לאותו סוג היסטון או לווריאנט שלו.

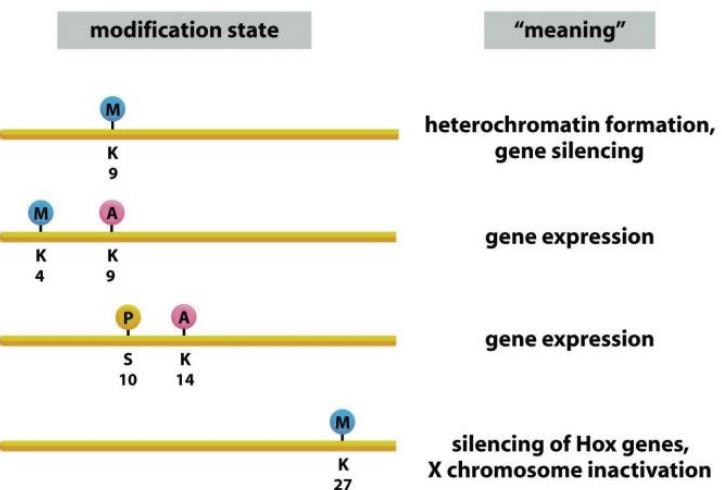
הfonקצייה של הכרומטן



צנבות הנוקלאוזם

נמצאים ב-N טרמינל ושם הח"א יכולות לעבור מודיפיקציות. למשל **ליין** נמצאת לאורך H3 במקומות מגדרים, רגשה למודיפיקציות בימיות כמו אצטיל-ליין, 1-3 מתילציות. **סריין** עוברת פוספורולציה.

במובן שיש שימושות למודיפיקציה והיא קשורה לפעולות האזור, וראוים מספר מצומצם של קומבינציות של קבוצות ביחד שمبיאות לאיזשהו מצב של הכרומטן.



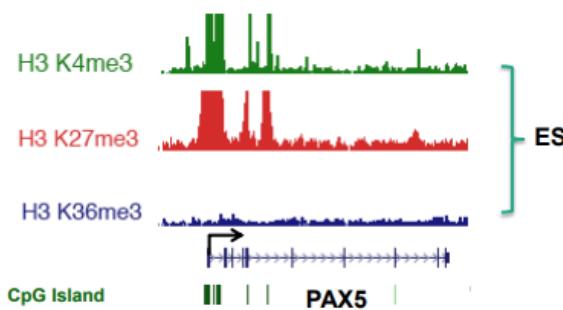
הקוד היחסטוני

הקומבינציות האלה יחד עם מתילציה יוצרות מצב של Chromatin state וגורמות למצבים שונים. המצביעים השונים יכולים לבקר ביוטו גנים, וגם את המצביעים האלה צריך לבקר זהה ע"י מערכת של חלבונים שנקראים Chromatin regulators שיודיעים לשנות את מצב הכרומטן. יש אנזימים שיוכולים להוריד או להוסיף את המודיפיקציות.

ChIP

כדי למדוד את המודיפיקציות ואת הבקרה משתמשים בשיטה בשם ChIP.

1. **Cross-linker** - כדי לקבע מצב מסוים. לא צריך אם רוצים למדוד את קשרת ה-TF ל-DNA ולכרומטן.
2. **Sonication** - שבירת הכרומטן למקטעים קטנים ע"י MNase.
3. **Immunoprecipitation** - הבנתנו נוגדים ספציפיים למודיפיקציות (לא תמיד יותר מדי ספציפיים וזה בעיתוי). הנוגדים קשורים ל-pip MAGNETIC LEADER למשור אותו לצד של המבחן ולשתוף אותו מנוקלאוזמים שלא קשורים אליו.
4. **נקיי ה-DNA** ע"י הסרת החלבונים כך שנשארים רק עם DNA.
5. **מדידת DNA** עם PCR או sequencing.



במפת הריצוף, הפיקים שנראות מעידים על העשרה למודיפיקציה באזור.

בדוג' אנחנו רואים מפת ריצוף של הген **PAX5** בתאים אמבריאוניים. הם לא רוצים שהגן יתבטא כי הוא TF של cell B, תא של מערכת החיסון.

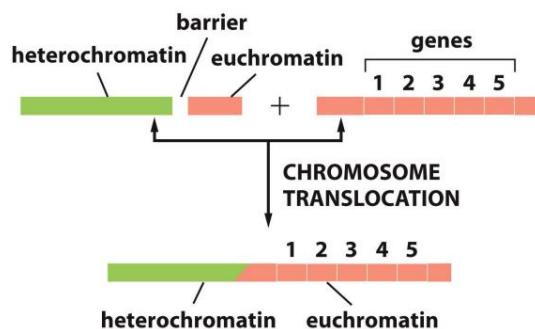
H3 K4me3 מסמן אקטיביות של פרומוטר.
H3 K27me3 קשור לרפרסיה לא סופית.

H3 K36me3 אם אין העשרה על הגן הפלימראז לא עובר על הגן, כמו שרצינו.

?? תהליך ההתרמינות של תאים הוא הדרגי, ES מתמיין למצב מתחיזב אבל בו הוא עדין תא גרען.
בשנתהא מבטא **CD92** יש שעתוק. ~ המשך ניתוח בחלק השני של הרצאה ~ 17/06

Epigenetic inheritance

מבנה הכרומטין יכול להיות נרכש. ברגע שתאים מתמיינים, חשוב שהוא לא יחליט להתחלק בעצמו אלא ילך למסלול שנקבע לו, עובדה זו משתקפת במבנה הכרומטין. יש מערכת זיכרון ברמת הכרומטין בשם **Epigenetic inheritance**.



אם יש אזור שהשתנה בכורומטין, השינוי יזכיר גם בתאי הבת. ראו את זה דרך ניסוי בדרוזופילים בו חיבורו אזורים פטוחים

heterochromatin ו**euchromatin** וסגורים (**closed**) של הכרומטין. גילו שיש אזור בשם **Barrier**, רצף אליו נקשרים חלבונים שמאגדירים את הגבולות של hetero-eu (hetero) וeu-hetero. חלבונים אלה נקראים

Barrier proteins. אפשרויות פעולה שלהם:

1. קירור למעטפת הגרען מבפנים כך שגם hetero לא יוכל לעבור לאזור eu.

2. חלבונים שמגנים על אזור החיז.

3. (fibroblast) שגורמים לצד אחד לעبور מתייציה של ליזון 9 ולא לצד השני.

איבוד מבני הגבול יכול להוביל לפטרנים שונים של התפשטות הטורוכרומטין וזה מושך לתאי הבת.

Position effect variegation – אם נחבר אזור eu עם אזור hetero נקבל spreading של המבנה hetero-eu וזה ייצור השתקה או הדלקה של גנים, וזה הקשור לחזק hetero. **Barriers**. **אפקט שונה כתלות בתפשטות הכרומטין**.

התופעה הזו מאפשרת את ההתרמינות.

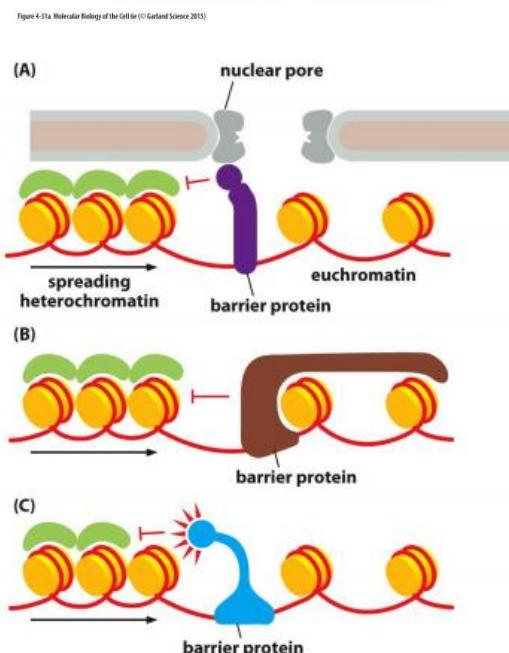


Figure 4-41 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

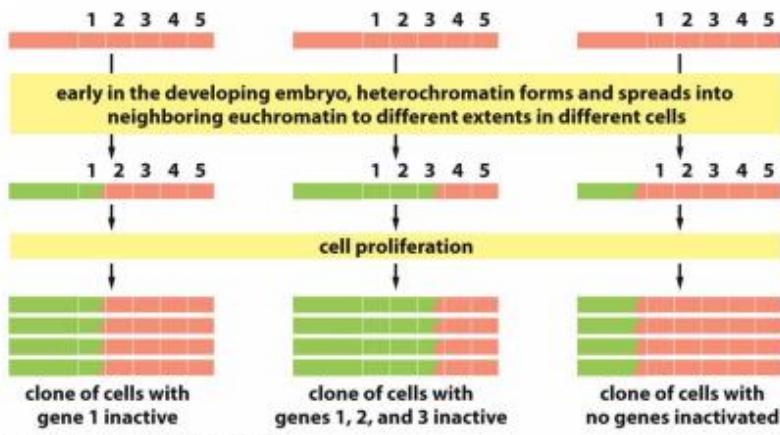


Figure 4-31b Molecular Biology of the Cell 6e © Garland Science 2013

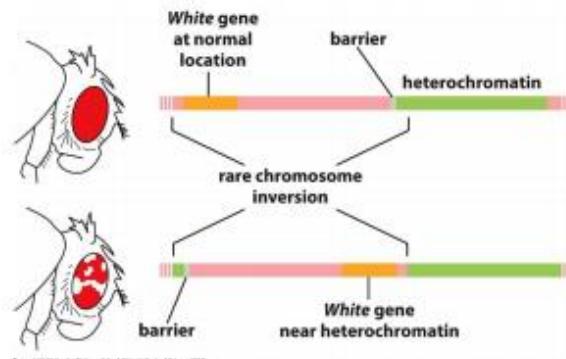


Figure 4-32 Molecular Biology of the Cell 6e © Garland Science 2013

בקהה על הכרומטין

שלושה סוגים של רגולטורים:

1. Readers – מזהים מודיפיקציות, מקשרים, וمبיאים לגיבוס פקטוריים נוספים.
 2. Writers – שמים מודיפיקציות של היחסוטונים.
 3. Erasers – מסירים מודיפיקציות.
- ספציפיים לרקמה.
 - קשורים לתהליכי התמייניות.
 - בסרטן, מותציות בהם נפוצות.
 - הרבה חלבונים שיודעים לעשות אותה פעילות אבל השוני הוא באיזור הקשירה.

רַדְעִים יודעים לקרוא מודיפיקציות על גבי הכרומטין. Readers

Readers-Writers-Komplexים

מה שగורם ל-spreading. איזשהו חלבון ספציפי למקום בו אנחנו רוצים ליצור את ה-Barrier יודע לקרוא ל-Writer ש"ובתוב" מודיפיקציה על הנוקלאוזום אותה יוכל ה-Reader לקרוא. ברגע שomething spreading למודיפיקציה. מיקום המודיפיקציה על הזנבות מאפשרת קישור גם אם הכרומטין ארוץ.

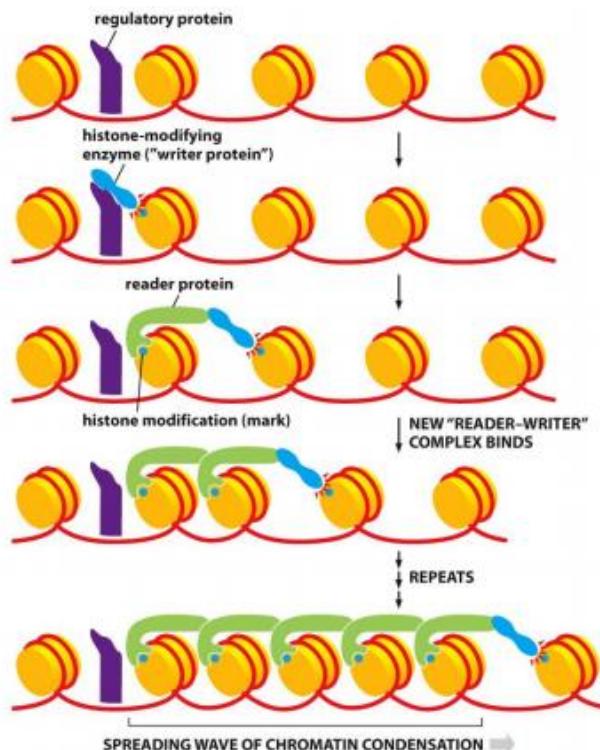


Figure 4-40 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

בשבוף החלוקה היא סמי-קונסරבטיבית והמודיפיקציות נשמרות בקר של DNA חזק מקבל בערך חצי מהנוקלואוזומים של האם, אך יש חלק חדשים וחלק ישנים. ע"י מערכת זו ניתן לחדש את המודיפיקציות באזוריים זהה הדיכרין האפיגנט.

נסתכל בדוג' על ניסוי בו הוציאו מביצית את הגרעין והכניסו גרעין של תא ממון ובו יש mRNA של H3.3 מעד על תא שריר ממון. ורצו לבדוק האם הדיכרין האפיגנטי נשמר בעובר. העובר הראה שהוא זכר את האזור MyoD והשאיר את האזור פתוח למורשת שבשלב זהה אין חלוקה, וזה מעיד על זיכרון אפיגנטי.

כיסוי נוסף היה הזרקת mRNA של H3.3 (ויריאנט של ההיסטוריה H3) מה שגם ליצירה שלו בעודף וזה גרם לעלייה ברמת ה-DNA.

בשחנסנו מוצנעת של H3.3 הרמה יורדת, בלומר האינפורמציה לקידוד היא ברמת הכרומטין.

מפת קורלציה – קורלציה גבוהה מעידה על קומפלקס שנקשר ביחד לגנים.

בזיכר שכיתן למיין אזוריים בגנים באופן הבא:

- פרומוטרים אקטיביים
- אנהנסרים
- פרומוטרים רפרסיביים
- transcribed

ויש הרבה קבוצות חלבונים בקורסיה שmaguiim לאותו

סוג של
אזור.

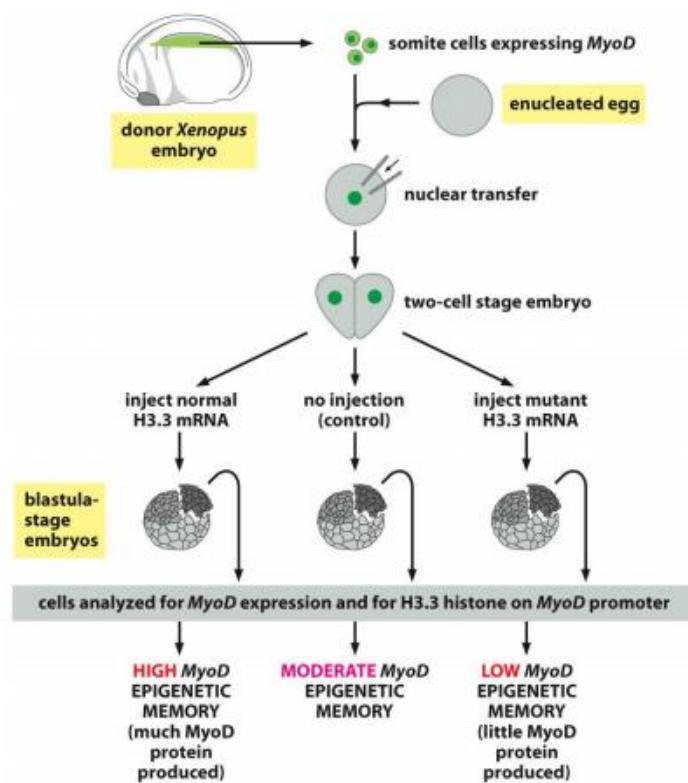
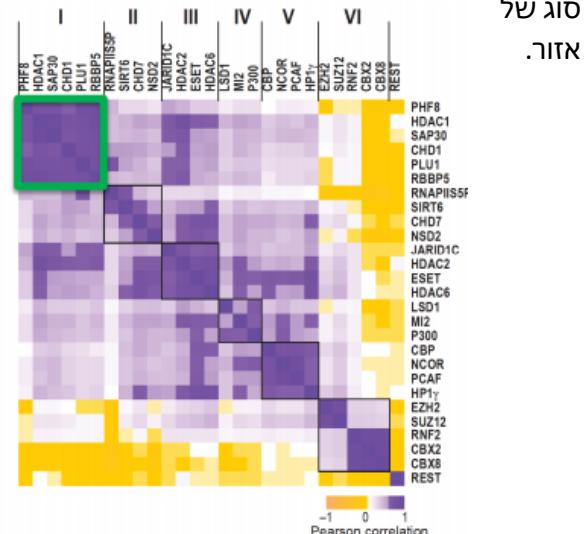


Figure 4-45 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



וריאציות של ההיסטונים

H3.3 מחליף את H3 באזורי אקטיביים.
CENP-A וריאנט של H3 בцентрומים שקשורים ליכולת של התא לעבור מיטוזה.
H2AX מחליף את H2A באזורי DNA repair. נמצא לרוב בפרומוטורים של גנים מקודדים. הנובחות לשם מביאה לפקטורי שקשורים לשעתוק. נתן להזות ע"י חיפוש המודיפיקציה הזו גנים שבאים לידי ביתוי.
H2AZ קשרור ב-gene expressing. לוקח חלק בתגובה למתקי DNA. בהגדיל נשבר הזנב עבר פוספורילציה על סרין 39 שמביאה סיגナル damage-DNA ומובילה לתיקון תא.
MacroH2A מתווך את ה-spreading שלibrano עליו מוקדם.

הווריאנטים נוספים על גבי הכרומטין לאחר שהוא נבנה, זה ע"י ATP dependent chromatin complex. סרין 39 שקובר היסטון שפרקן.

CENP-A

מחליף את H3 בnalaozm, והטה יודע לעשות את זה דרך רצף חזרה ברור שמנדר את הцентрומר. אותו וריאנט יודע לחבר את החלבוניים שמייצרים את הקינטוכור וקשרים את המיקרו-טובל בשלב המיטוזה.

קונפורמציות של הchromozom

מעבר לרמת ה zig-zag מודל, הכרומטין מייצר לפום, אזור שהוא דחוס ואזור יותר פתוח. באזורי הפתוחים בד"כ יהיו האזוריים הפעילים.
יש רמת רגולציה שקשורה בקונפורמציה של הchromozom.
 הכרומוזום יש מקום מוגדר בגרען והוא מסתדר בצורה אופיינית. הגן נדלק או נכבבה כפונקציה של ההסתדרות המרחבית ושל המיקום של הכרומוזום. ניתן ללמידה את הלופים באמצעות טכניקה בשם CHiBH בה מבדיקים עם cross linker את הכרומטין, שבירה ומהן נשביר זה מקטני DNA שבצורה יינארית לא קרובים אחד לשני וכעת ניתן לרצף ולממצא אם אזורים שלא אמורים להיות קרובים אחד לשני הם כן קרובים מבחינה מרחבית.

תרגול 11

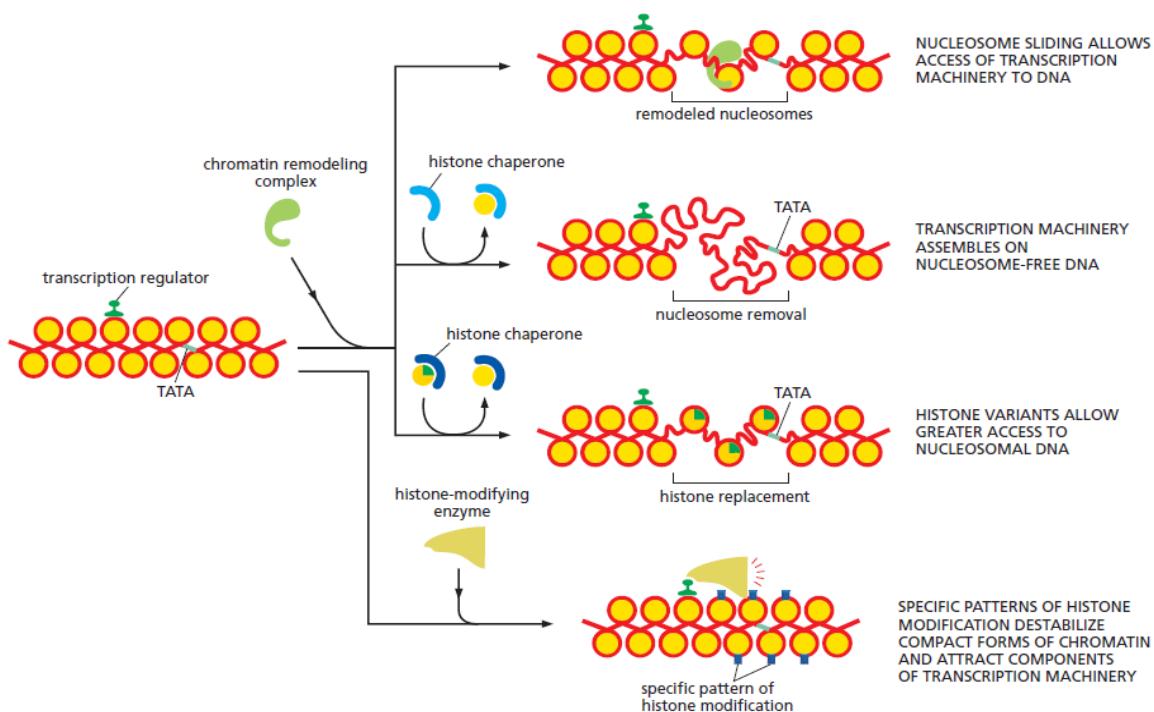
מודיפיקציות על הchromatin - תוספת

Type of modification	Histone							
	H3K4	H3K9	H3K14	H3K27	H3K79	H3K122	H4K20	H2BK5
mono-methylation	activation ^[6]	activation ^[7]		activation ^[7]	activation ^{[7][8]}		activation ^[7]	activation ^[7]
di-methylation	activation	repression ^[3]		repression ^[3]	activation ^[8]			
tri-methylation	activation ^[9]	repression ^[7]		repression ^[7]	activation ^[8] repression ^[7]			repression ^[3]
acetylation		activation ^[9]	activation ^[9]	activation ^[10]		activation ^[11]		

דוגמה להשפעת אקטיבטור על מבנה הchromatin:

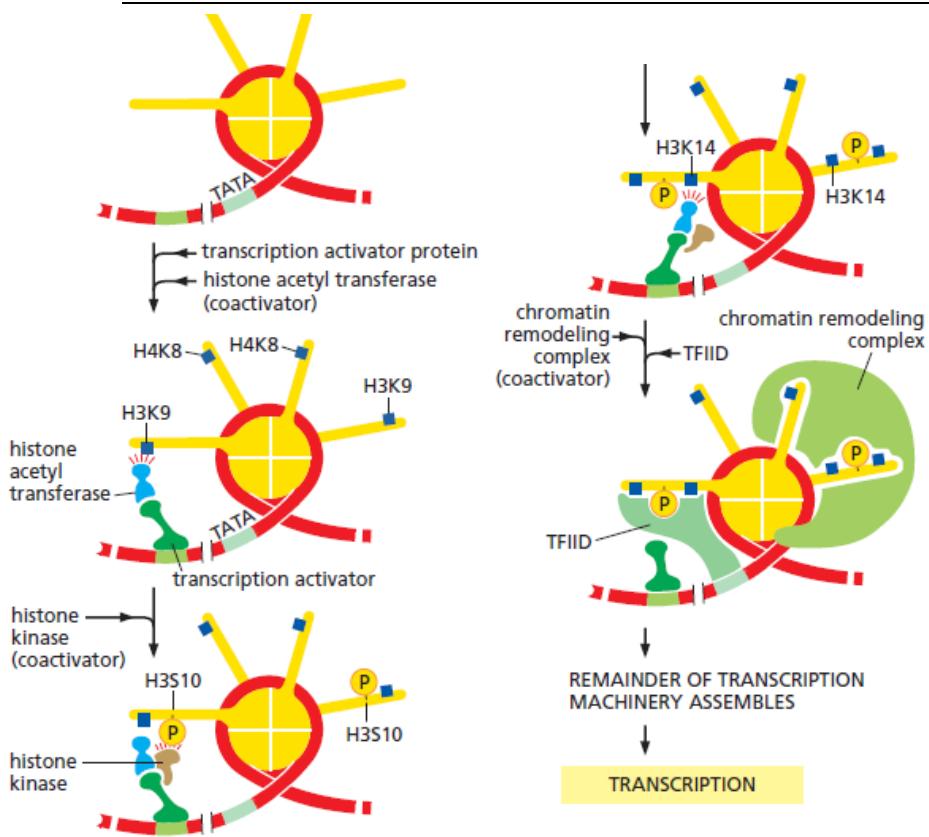
אקטיבטור מתחבר לאננסר ו庫רא ATP remodeling והוא יכול לפתח את הchromatin לחסיפת הפרומוטר ולאפשר את תחילת השעתוק. אופציות לפועלה:

1. הבאת histone chaperones שיכולים להוציא את ההיסטונים ולפתח את ה-DNA.
2. הבנתן וריאנטים שיכולים להשפיע על מבנה אזור.
3. קרייה لأنזימים שעשויים מודיפיקציות.

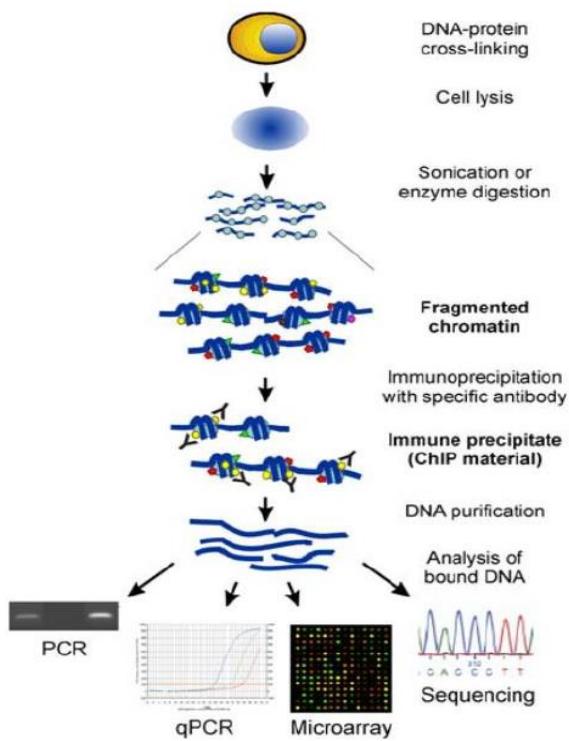


איך המודיפיקציות קוראות לפקטורים ומשפיעות על השעתוק?

בדוג', חיבור האקטיבטור לאננסר ו庫רא histone acetyl transferase שם קבוצת אצטיל באזור, ויש עבשו אצטיל על ליזין 9 בהיסטון 3. קורא עבשו لأنזים בשם קינאז שעשו פוספורילציה על סרין 10.



אחר לכך הוא עושה מודיפיקציות נוספת שיצירות קוד שמצויה ע"י TF שמתחבר לאזור יחד עם ה-remodeling של ה-DNA וזה מאפשר פתיחה השעתוק.

ChIP

השיטה עצמה נועדה לזהות אינטראקציות של חלבון עם רצף DNA. בגין נובל לשאול איך הפקטור ששותך מתחבר לכורומטין, וכן לשאול אם יש מודיפיקציה מסוימת על ה-DNA.

1. Crosslinking – הקפאת התא במצבו המקורי, בכך שהחלבונים הקשורים ל-DNA נשאים מחוברים.

2. ליזס לתא. לפי האופי הכימי של מרכיבי התא להפריד כורומטין משאר מרכיבי התא.

3. חיתוך של הכרומטין לפרגמנטים ע"י גלי קול או ע"י נוקלאזות.

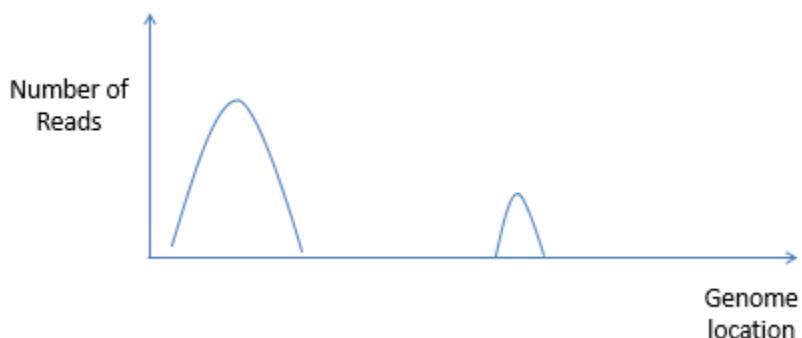
4. בחירת נוגדן ספציפי לפקטור ששותך שיוצר קומפלקס עם הפקטור. באמצעות מגנט אפשר להפריד בין המרכיבים המתחברים לנוגדן בין אלה שלא (בי נוגדן מתחבר לחיזוז מגנטי)

crosslinking Reverse cross linking פירוק ה-DNA-Sequencing שעשינו מוקודם ברי שנותר-hDNA-Shontar.

5. ריצוף הרצף והסקת מסקנות.

ChIP-seq

ל-DNA-Sequencing שקיים. בדוק' למשל זה שני אזורים אליום הוא מתחבר.

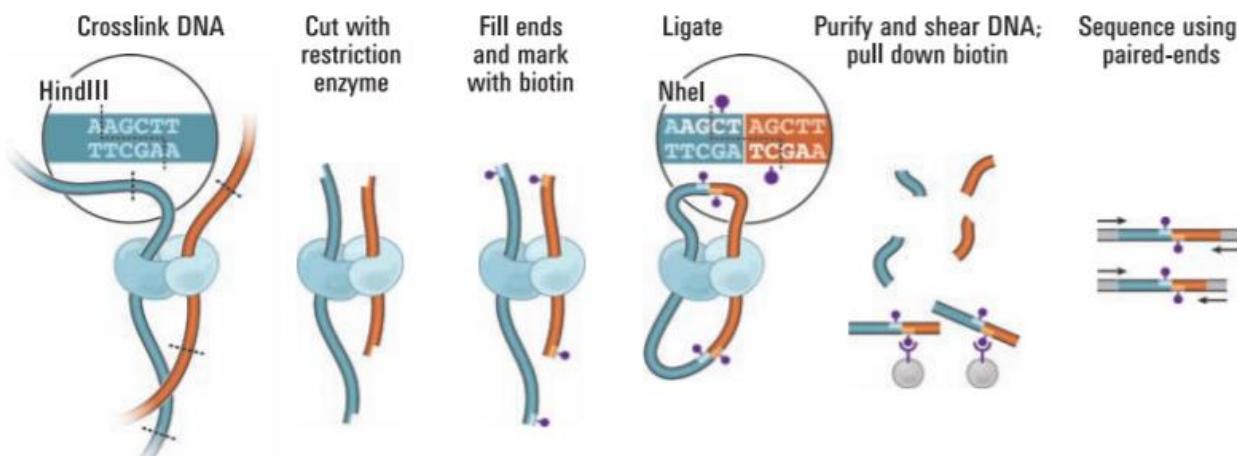
PCR

מענין אותנו על אזור ספציפי אם הוא התקבל, מתכנים פרימרים לאותו אזור ומגלים אם הוא היה בתמיישה.

יש בקרה של גנים דרך אלמנטים מרוחקים מהגנים, כמו אנהנסרים ופרטוריים. סידור הchromatin יכול להשפיע על בקרת הגנים ע"י יצירת קשרים שמאפשרת אינטראקציה בין השכנים. השיטה מחשבת את הסבירות שני אזורים מרוחקים בגנים ימצאו באינטראקציה, לפי המבנה המרחבי של הגנים. צימוד בין ליגזיה שתלויה בקרבה המרחבית של הfragments לבין massive parallel sequencing (אילומינה).

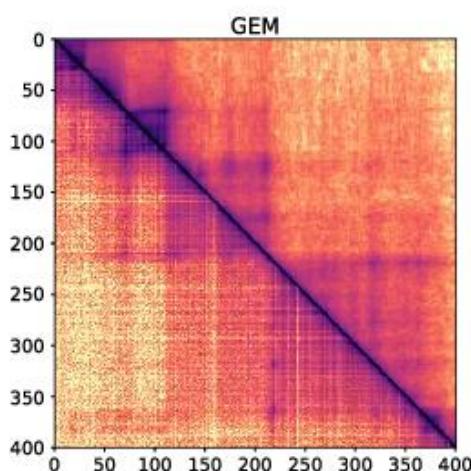
שלבים:

1. DNA Crosslink, מצב בו יש קשרים קוולנטיים בין אלמנטים סמוכים מרוחבים.
2. תיקון עם אנזימי רסטיריקציה ותיקון *steaky ends*
3. ליגזיה בין אלמנטים שעברו Crosslink (זהו סמוכים מרוחבים בתא) לקבלת פרגמנטים כימריים.
4. קבלת פרגמנטים מסומנים
5. דיזי פרגמנטים מסומנים כאלמנטים שקרובים ע"י ריצוף.



מקבלים מטריצה שצירה הם מיקומים על גבי הגנים. כל אינטראקציה בין מיקום למיקום מתוארת ע"י הפיקסל. האלבון הראשי מסומן בסגול בהה, ברור. צפים קרוביים יהיו בסגול בהה אבל פחות.

מה גילו?



אחד יש ארגון של לולאות (פתוחות – גנים פתוחים) בchromatin שmbia לאינטראקציות בין אזורים מרוחקים. ניסויים שניסו לבנות מודל תלת ממדי של chromatin הביאו למבנה שמאפשר דחיסה אבל עם גמישות להיפתח. territories. גילו שיש ארגון שהוא לא רנדומלי בגרעין. אזורים שמכילים מעט גנים והם הטרכורומטין יהיו בפריפריה, ואזורים פתוחים עם הרבה גנים יהיו במרכז הגרעין.

במעבר בין השתקה לאקטיבציה יש תזוזה של chromatin, והאזור שמבווטא יצא מהטרכוטוריה chromozomלית ופותח את לולאת-hDNA.

הנדסה טרנסגנרטית**אור מכנים עכברים**

בחירת הגן הרצוי כך שנדע איזה עכבר לעשות, ובהתאם לכך לשבט את הגן/לעשות מוטציות וכו'.

טכניקות לייצור עכברים מהונדים:

1. בשנרצאה לבטא משהו נוסף.
2. שימוש בתאי גזע עוברים זהה בשרצים להחליף משהו ספציפי בעכבר (נוקאאוט לגן, החלפת נוקלאוטידים וכו').

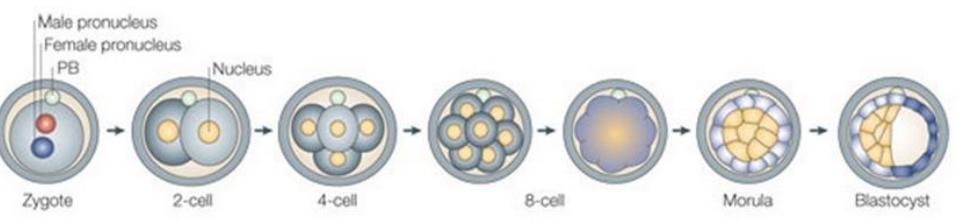
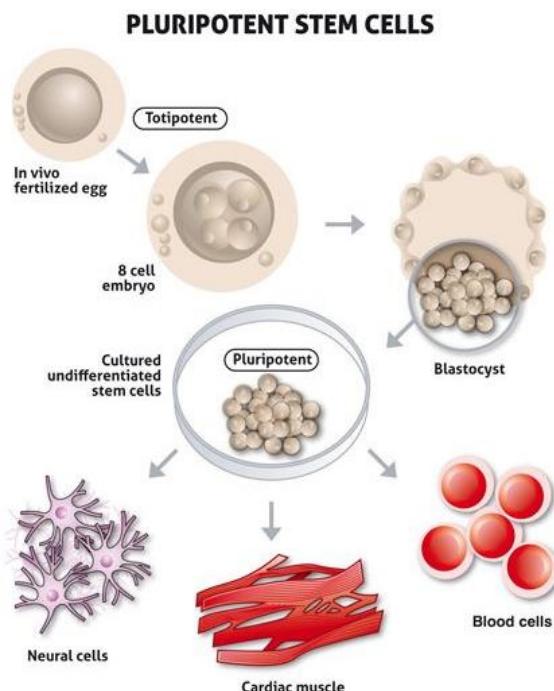
יצירת תא גזע עובריים

הפריה יוצרת ביצית, הביצית מתחלקת כאשר כל חלוקה לוקחת יומם, כאשר ארבעה ימים מתקבל הבלתיוצי המוחולק לשני סוגים של תאים: תא גזע עובריים (עתידיים להתפתח לעובר) והשליה. עד שלב המורולה אין דירוגציציה בין התאים ולא ניתן לגדל אותם בתרביה.

ברגע ששיבטנו גן מסוים לתוך פלסמיד עם פרומוטור שמאפשר ביטוי, צריך בעת להכניס את הפלסמיד לשלב המוקדם ביותר, בדיקן אחרי הפריה.

שלוש אפשרויות:

1. ה-DNA אכן ייחדר לגנים.
2. לא ייחדר ושהוא ייעלם.
3. אפשרות נוספת היא שה-A-DNA לא הצליח לחדר בשלב הביצית המופרת אבל נשאר שם, וחצי מהתאים יכולו אותו. כדי לוודא שהם אכן מכילים את הגן חותכים חתיכה מהזנב ועושים לזה PCR لأن שרצינו. נעשה הכלאה נוספת של F1 עם wt ואם הוולד מבטא את הגן בזנב זה אומר שהעכבר שייצרנו מכיל את המקטע בכל התאים וכן הצלח להעביר אותו לוולד.



האטגרים: אנחנו לא יודעים כמה עותקים נוכנסו ולאן נוכנסו. עד הקrisepr, השתמשו תא גזע עוברים. התאים העוברים תוך שלושה שבועות יהפכו כבר לעכבר, יכולות לכל תא יש יכולות להפוך לכל סוג תא. תהו האם ניתן לשמור את היכולת הזאת בצלחת, ואכן הצלחנו ושימרו את **התכונות הפלוריופוטנטיות** – להתמיין לאנדודרם, מזודרם, אקטודרם. בשלב זה הם נקראים **inner cell mass**, ורצו לשמור אותם במצב הזה, ללא ממוןיהם.

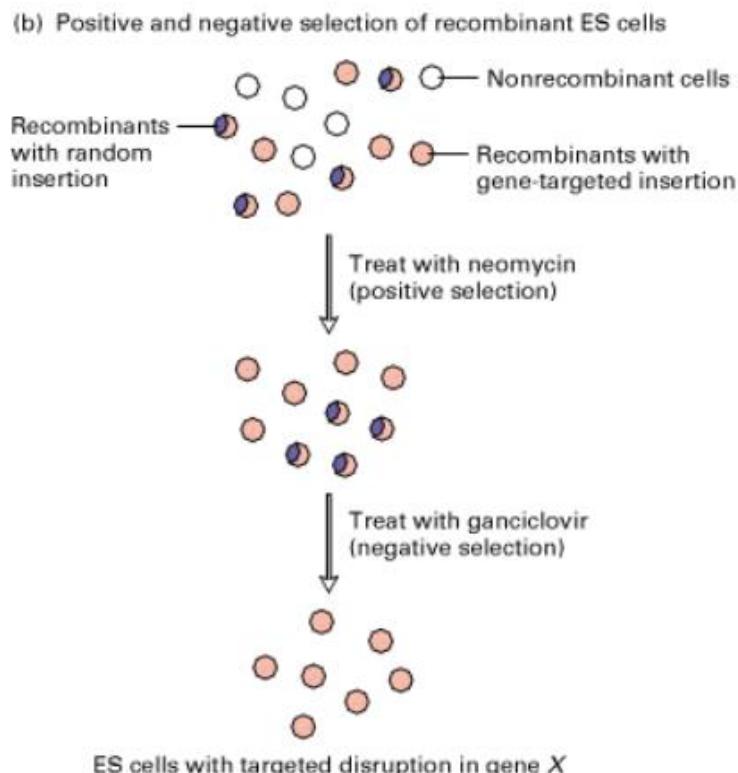
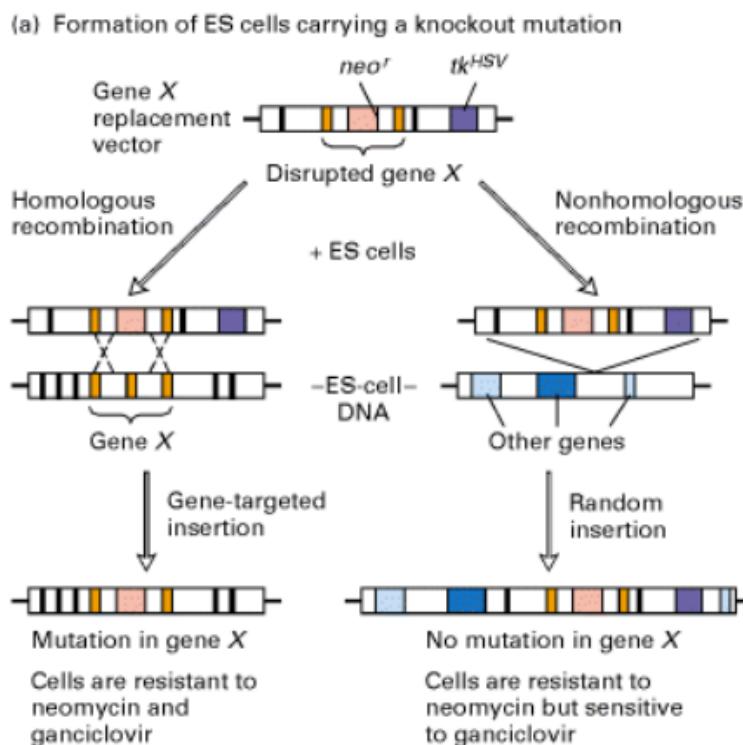
התאים אוחבים ליצור מושבות ולגדול על מצע של תאים אחרים (פיברובלסטיים למשל). למה להשתמש בהם? בהזרקה לא נובל לעשות knockout לגן ספציפי.

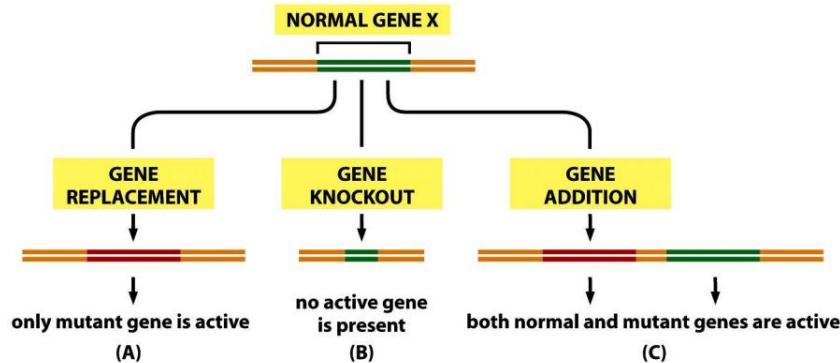
negative positive selection

עד תקופת הקrisepr, ביצעו רקומבינציה הומולוגית (שנועדה כדי לבצע שינוי נקודתי בגנים) - הינדוס מקטוע עם טרנסג'ן לגנים בתחום החקר הhomolog (רצפים זהים לאזור בגנים בו נרצה לעשות את השינוי, וכך שתרחש רק מה שביןazarות יעברו).

הסוג תא היחיד שתמך זהה תא גרע עוביים עבריים אבל בתדרות נמוכה. לכן עשו selection selection. **חיובית:** (שלב a) בהינתן גן נחדיר אליו עמידות לאנטי-בוקטיקה בין זרעות הרקומבינציה. כאשר נחדיר את-hDNA לתאים נעשה סלקציה. התאים שעברו רקומבינציה הומולוגית ישארו (1 ל-10,000). **הבעיה:** כל תא שקיבל את העמידות גם לא עבר את הרקומבינציה יהיה عمיד (או נקבע שביבול קיבלו את המ שרצינו אבל בעצם הרסנו אותו). רקומבינציה הומולוגית הוא נדיר וכן בעייתי לעשות סלקציה חיובית בלבד. כדי לדעת איזה תהליך של רקומבינציה התרחש נוסיף גן נוסףழרות הhomolog.

בהתחלת היי סורקים את הכל עד שהחלטו לעשות סלקציה **הפוכה** (שלב b בשרטוט) – להרעל את התאים שבהם המקטוע נכנס לא ברקומבינציה הומולוגית. הושיבו אלמנטழרעות הhomolog של משאנו מווירוס שהופר את הרפליקציה ומפנה וגישה לתאים. בלומר תאים עם רקומבינציה הומולוגית לא יובילו אותו בין זרעות הרקומבינציה, אך שכמושיפים את-h-zincovir זה הרעל את כל התאים שלא עברו רקומבינציה הומולוגית.

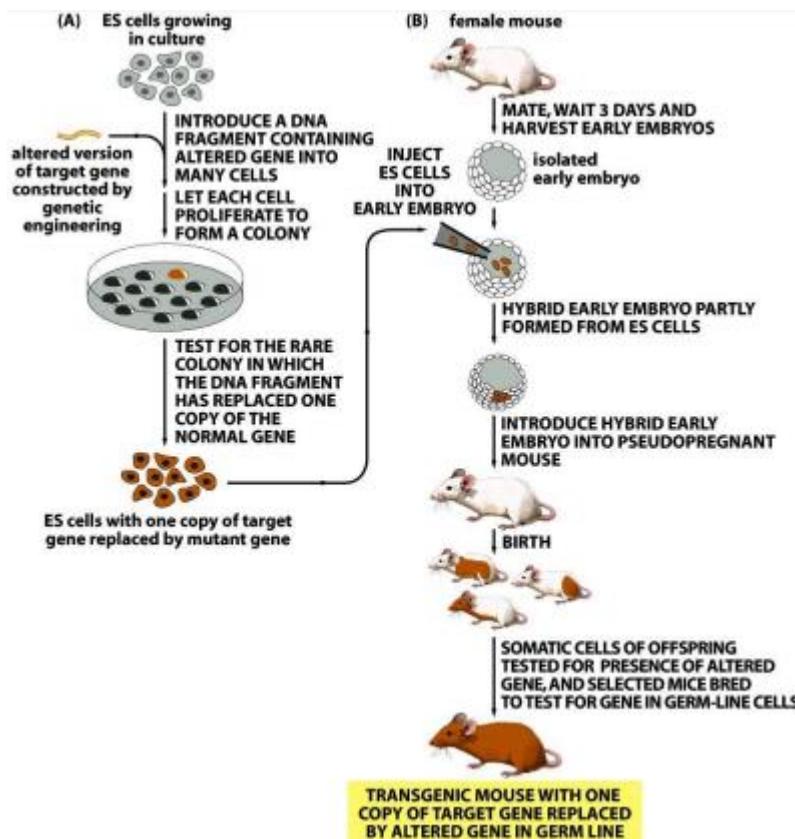




אך ראיינו שכדי להכין עכברים מוטנטיים ניתן:

1. הוספה גן ע"י הזרקה לביצית.
2. Knockout של גן.
3. החלפת גן עם מוטציה נקודתית אחת.

הכנת עכבר מתאי הגזע



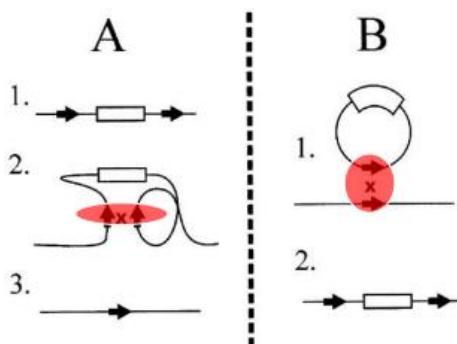
נרצה להזrik את תאי הגזע העוברים לתוך הבלסטוציט ביום 3 וחצי, לפני ההשרשה ברחם. בעת העבר מכל גם את התאים שלו וגם את התאים המהנדסים, ובעת יצא עכבר בימרה. מודדים שצבי הפרווה של העכברים יהיו שונים וזה תלוי בתרומה של התאים המושתלים.

~ כל מיי סרטונים ומהשאות במצגת ~

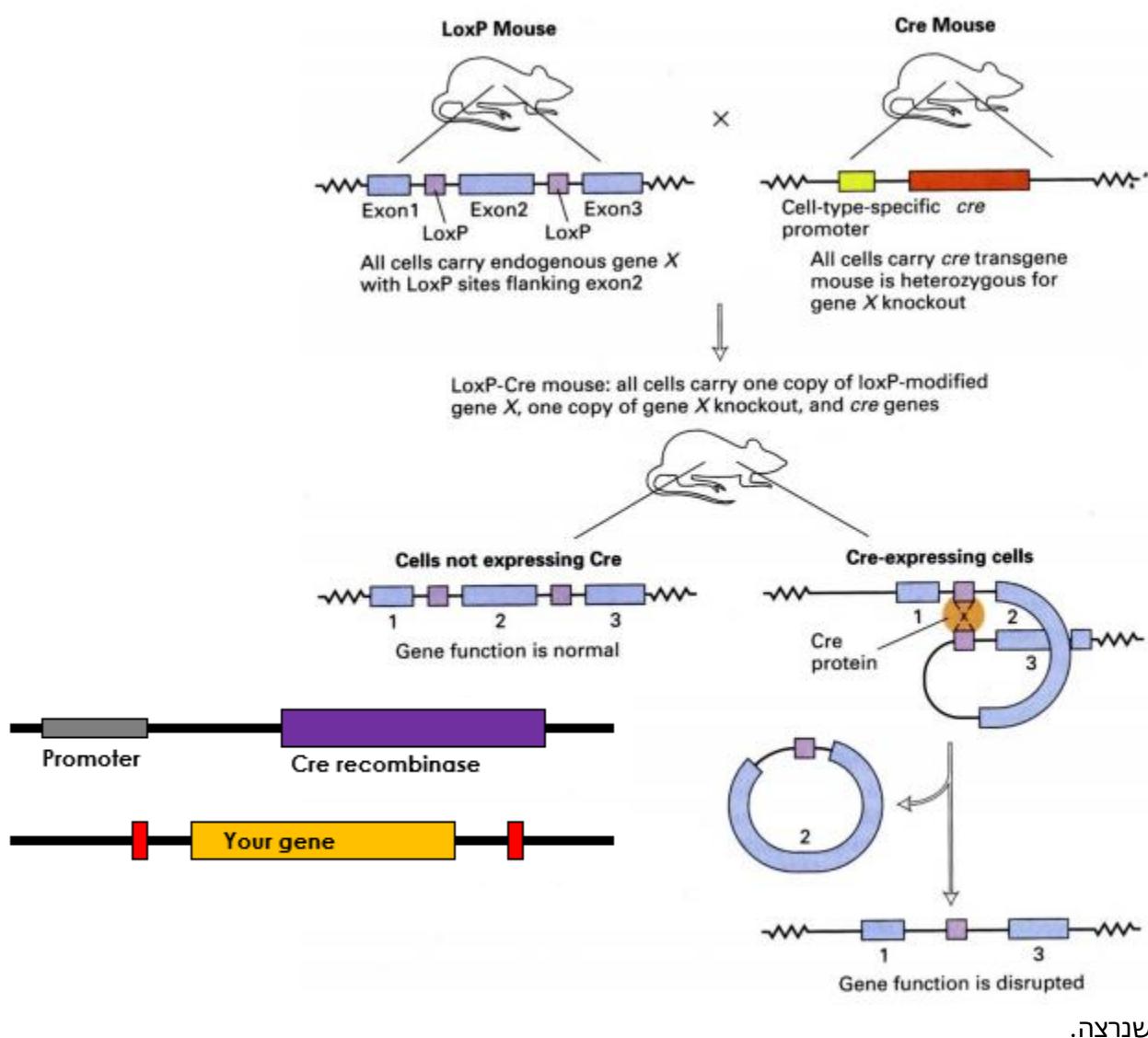
כדי לקבל עכבר טרנסגני נבצע הכלאה בין העכברים הכיררים לבין עכברי *h-wt*. למה *h-wt*? נרצה עבשו שմוביל את המוטציה בתאי הנבט, אם נקבל עכברים מוטנטיםណ לפי הפרווה שלהם אם המוטציה הועברה? הם יהיו הטרזיגוטים. כדי שנדע מי נתן את התרומה לא נבצע הכלאה עצמאית של הכיררים.

פרומוטורים אינדוקטיביים inducible promoters

כשיש פונטייפ לתלי, נרצה שהוא יבטא את הטרנס-גן לפי החלטנו. הפרומוטור ה-*inducible* מאפשרים הפעלת גנים בתנאים מסוימים לפי שליטה. מזרקיים משהו/נותנים לו לשותה משהו כך שהוא מפעיל את הפרומוטור. Constitutive promoter – פרומוטר שתמיד פעיל.

Cre-Lox

שיטת לביצוע נוקאוט ברקמה ספציפית. כי קיימים מקרים בהם עושים נוקאוט לגן מסוים והעכבר לא מתפתח. שימוש באנזים רקומבינאנץ Cre (מבקטריופאג') שמצהה אתרים בשם P-Lox ועושה בכך שתוחום ביןיהם רקומבינציה. אם יש שני אתרים כאלו הוא יבצע ביניהם רקומבינציה לקבלת אלמנט אחד (ומה שבפנים יוצא?).
בעכבר, עושים הכלאה בין שני עכברים. מייצגים עכבר knockin של אתרי P-Lox מסביבו לאותו גן שרוצים להוציא.
מכילאים אותו עם עכבר שמቤט את Cre עם פרומוטור שמתבטא רק ברקמה שאנו רוצים (למשל במוח).
בסוף דבר מההכלאה תתקבל רקומבינציה ובها נקבע עם נוקאוט/אין לגן שנרצה רק ברקמה



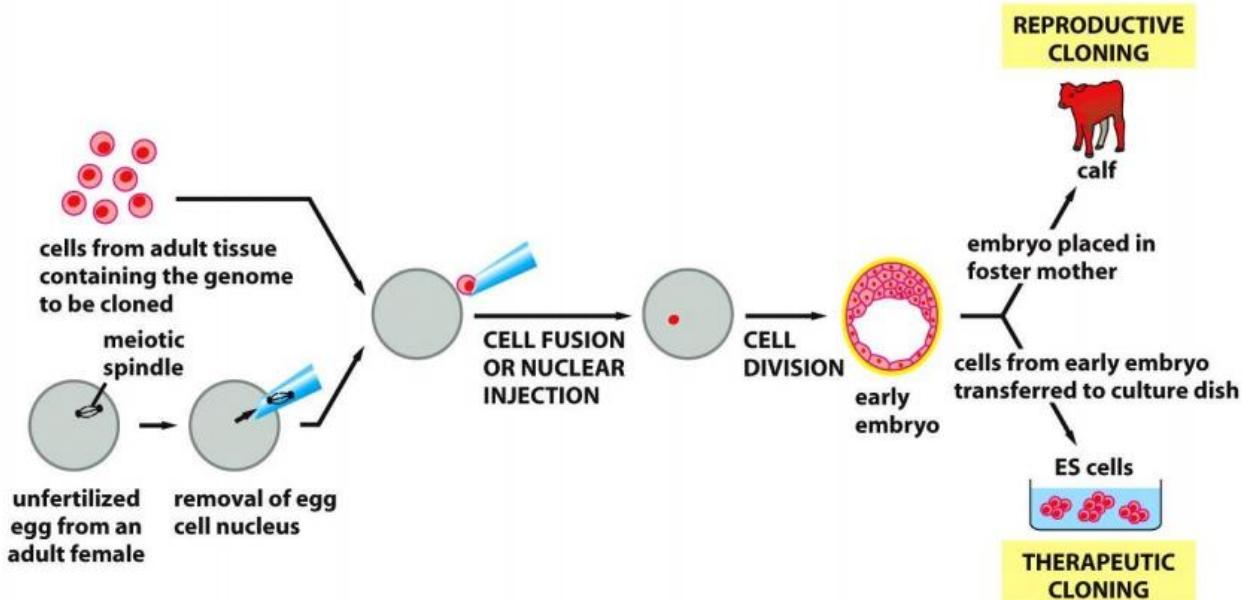
שילוב בע"ח

לקיחת ביצית והוצאת הגרען ממנה. היא בעצם נהנית סבירה חסרת DNA שמשרת התפתחות עוברית. לוקחים גרעין מתא של כבשה אחרת ומשתווים בביוץ כאשר בשלב זה היא טוטיפוטנטית, יכולה לייצר את כל הרקמות.

כדי לגרום לשילוב זהה להצלחה (גרעין מתא סומטי שמוכנס לתא מין) מקטבים עם פולס חשמלי ומגדלים את הביצית עד רמת הבלבסטוציט שמכיל תאים פלוריפוטנטיים – יודעים לייצר את רקמות העובר, ואת התאים יודעים לייצר את השליה.

בעת הביצית היא עצמה מופרית, יש גרעין דיפלאידי. הבלסטוציט גדל במעבדה ולאחר כך מוחדר בניתו לשחלות.

במקום להשתיל בחיה אחרת, אפשר גם לייצר מה-*Inner cell mass* תא גזע בצלחת.



כמה دولי היה רק 6 שנים?

בהתחלת חשבו שהזה בגל הטלומרים – בתאים סומטיים הטלומר מתקצר וייתכן שמכיוון שלקחו תאים סומטיים מבבשה בת 6 זה קרה. בדקנו את העניין, ומסתבר שהיא חלה בסרטן. הוא לה עשרה צאצאים שחיו חיים מלאים

**יצירת תא גזע עובריים אנושיים**

באמצעות אותו מעבר של תאים סומטיים, יצרו תא גזע אנושיים עובריים – לקחו ביצית של אדם, הבניסו לתוכה גרעין של תאים סומטיים ומה-*Inner Cell Mass* (Inner Cell Mass) לייצר תא גזע עובריים אנושיים למחקר.

iPSCs

עד להמצאה של השיטה הזאת היה צריך בהזקמת גרעין של תא סומטי לביצית. בשיטה זו מدلגים על ההזרקה, לוקחים ישר את התאים והופכים אותם לתאי גזע עוברים ע"י שילוב של ארבעה פקטוריים (TF), החדרה שלהם

בטרנס-גנים, כך שהם **משרים חזרה למצב פלוריפוטנטי**. הפקטורים: Oct 4, Sox2, Kif4, c-Myc

כדי לבדוק שזה עובד הכניסו גן עמידות לאנטיביוטיקה G418 Um פרומוטור של *Fbx15* זהה גן שנדרך רק במצב פלוריופוטני באשר נקשרים אליו פקטורי השעטוק שהוזכרו קודם. ברגע שמאקטיבים את הפקטורים האלה, רק התאים עם הגן עמידות לאנטיביוטיקה שרודדים.

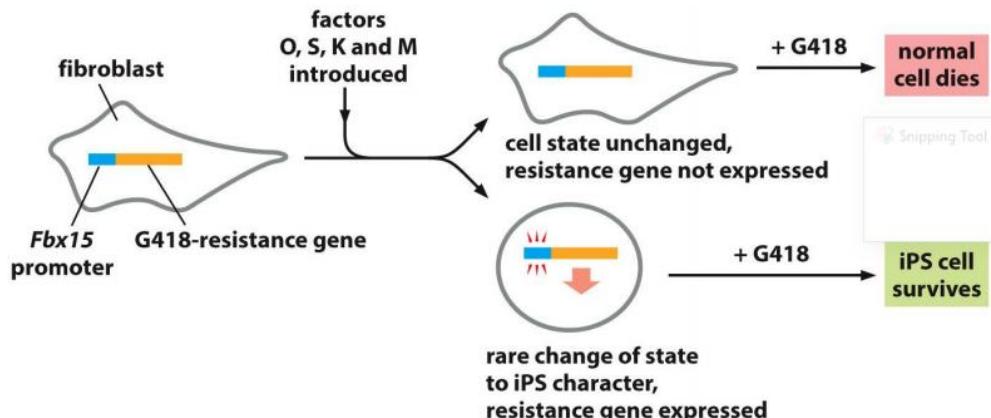


Figure 22-42 Molecular Circuitry of the Cell Fate © Garland Science 2015

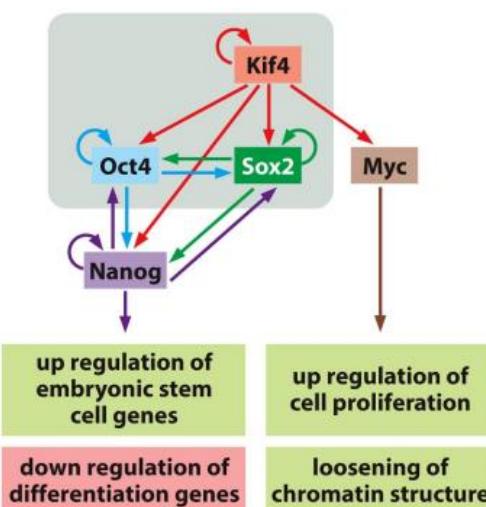


Figure 22-41 Molecular Biology of the Cell 6e © Garland Science 2015

הפקטורים הפלוריופוטניים:

- **Myc** לא קשור ישירות לפלוריופוטניות:

הוא מאפשר חלוקה יותר מהירה של פיברובלסטים (תאי שריר) שמתחלקים יחסית לאט, וגורם לריפוי מבנה ברומטין שאפת זה תאים פלוריופוטניים צריים.
הוא בעצם עוזר לתהיליך ההתמיינות, התהיליך אומנם יכול לתרום בלבד ביעילות פחותה יותר.

- **Oct4, Sox2, Kif4** עושים upregulation של גנים של תא גרע עוביים, ו-downregulation של גנים של התמיינות.
• **Nanog** הוא מרכיב למצב פלוריופוטני נאיבי, מצב שהוא הכידונה לה-Inner Cell Mass. הרבה תאים פלוריופוטניים יכולים לא להראות **Nanog** גבוה ועדין להיות פלוריופוטניים. לא הכרחי להתמיינות.

וככל לאחר מכן לעשות התמיינות של תא הגזע לסוגים שונים.

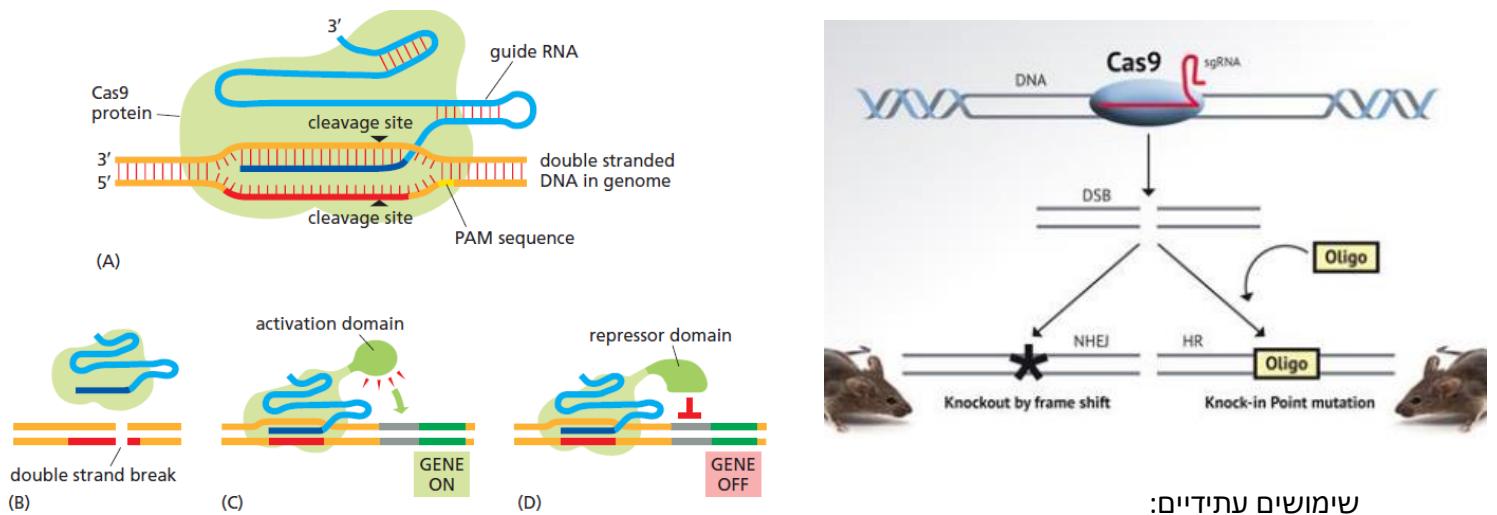
CRISPR CAS9

מערכת שומרבת משני חלקים:

1. חלבון **CAS9**, אנדרונוקלאז שיודע לחותך את **ה-DNA**.
2. מולקולה **RNA (guide)** שיודעת להצביע את החלבון למקום מסוים בגנום. (פירוט בפרק 7)

אחרי שהחלבן חותך את **ה-DNA**:

1. ניתן לייצר לגציה של שתי החתיכות השבורות, תמיד ייצור מוצואה וככה נעשה **knock-out**.
2. הכנסת מקטע **DNA** הומולוגי לנק' השבירה כך שבאמצעות רקוביננציה הומולוגית נעשה **in**-**knock**.

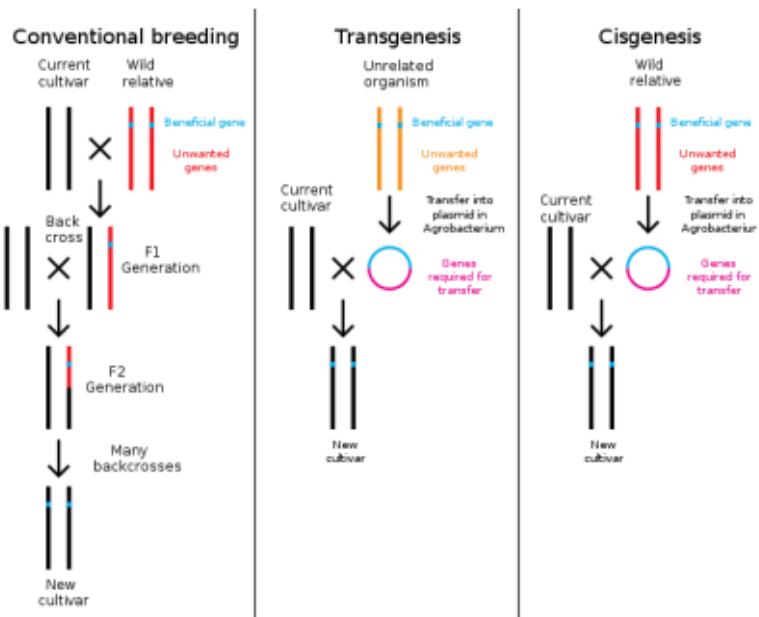


שימושים עתידיים:

- באמצעות שיטה זו ניתן להזריק לביצית את החלבון עם ה-RNA שתכוין את המוציאה.
- הזרקה לרקמה תאית כדי לתיקן מוטציה גנטית.
- עריבה גנטית על תא גרעיני והכנסתם לגוף חדש.

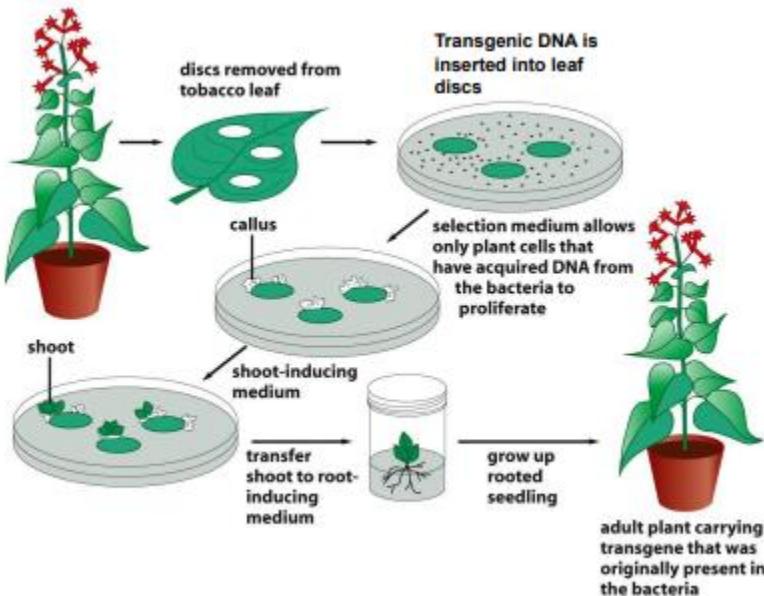
צמחים טרנסגנריים

ההפקה הירוקה – ב-1961 הייתה פריצה בחקלאות ויכלו לקבל יותר יבול. המצאה הכיל גדלה – פיתוח חיטה ואורז שיבולים לתת יותר גרעינים. **מודל טוב** – זמן חיים קצר, גנים קטן, קל לגדל
שינויי DNA בצמחים – ניתן לשנות גן ספציפי בצמח, וכן לחתך גן מצחץ אחד (או אורגניזם) ולהכניס לצמח אחר. יודעים לבדוק מה מבנים.



טרנסגנרים לעומת ציסגנרים
הכלאה קלאסית – הכלאה של גן עם גן בר עם תכונה אוכולוסייה (פיתוח אוכולוסיות של עגבניות עם גן בר שעמיד ליושב). אחר כך עושים הרבה דורות של הכלאות עם הגן הרצוי. בדורות הבאים, מכיוון שתהיה רקובינציה, נקבל מקטעים קטנים והולכים מזמן הבר בטוך הגן שלקחנו. ע"י סלקציה לתוכנה, רק החטיבה שתקנה את העמידות תהיה.
הכלאה טרנסגנית – DNA ממין שלא קשור למין התרבותי (למשל מחידק).
הכלאה ציסגנית – DNA ורקביננטי שמוכנס לתוך המין התרבותי (מאותו מין או ממין קרוב). לדוגמה אנחנו יודעים מה אנחנו מבנים.

לרוב צמחים יהיו טרנסגנרים.



זה-Dİפרנציאציה וורה-Dİפרנציאציה בצמחים

הרבייה המינית בצמח מייצרת 'יחורים' – צמח + מים מייצרים שורשים.

בעצם הצמח יכול להפוך רקמה ממוינת לרקמה לא ממוינת (callus) ולמיין אותהשוב. (יכול לקותה ברוח הרקמות)

בצמחים טרנסגנום: לוקחים רקמה (הדייסקיות בשרטוט) ← מכניםים אליה DNA ← הופכים אותה ל-callus ← הלבנים בשרטוט) ← ממיניהם בחזרה.

החזרה: החזרה אקראית לגנים

אגרובקטיריה יודע להדביק צמחים והוא בעל יכולת להעביר את-h-DNA שלו לתא הצמח ולכן הוא יכול חזק בעריכת גנים בצמחים.

מקטע T-DNA בבקטריה תחום ב-Barrier והוא מורכב מ-25 נוקלאוטידים ומה שבתוכו מועבר לצמח. נוכנס בין Barrier איז הген שנרצה, גן סלקציה וכו'.

Floral dip transformation

ニיצנים לא מופרים מושרים בתמיישה עם אגרובקטיריה והכנסת ביציות לא מופרות לצמח. קבלת זרעים ועשית סלקציה לזרעים עם הגן. החזרה אקראית.

Particle bombardment method

ציפוי חלקי זהב בפלסמיד, הטענתה במכשיר שיודיע לירוחת את החלקיקים לתאי הצמח מה שמוביל להחדרתם. אינטגרציה רנדומלית לגנים, גידולם בסלקציה ושתילה. אקראית.

תוספות מתרגול 12

איך מכינים בעברים

השיטות לייצור בעברים:

החדרת DNA לתוך גמיטה
1. תא גזע עובראים

השלבים (לפני ה-CRISPR):

1. יצירת הגן הרצוי
2. החדרתו אל הגנום
3. יצירת עברם

החדרת DNA לגמיטה

הזרקת פלסמיד מהונדס עם הגן שאנו רוצים לביצית מופנית בהסתמך על העובדה שהוא עבר אינטגרציה עם רkomבינציה לא הומולוגית בגנים.

הבעיה: החדרה רנדומלית, לא יודעים אם חדר ובייזה שלב (בשלבים מסוימים יתכן שהמעבר לא יוכל את הטרנסג בכל).

איך לבדוק אם התביעה החדרה? הכלאות גנטיות או PCR לגן שהחדרנו מדגימה של העובר. לא נדע אם חדר לתאי הנבט של העובר.

CRISPR

מערכת הדבקה מגנה ויראלית. הבakterיה יודעת לחזור מקטע קצר מה-DNA הזר שמשמש ב-template guide RNA שמת לחבר עם ה-CAS ומוביל אותו ל-DNA הוויראלי, ה-CAS חותך אותו ומוביל לדגרציה. חוסך שלבים וזמן לעומת שימוש בתאי גזע עובראים.