



בקרת הביטוי הגנטי

סיכום החומר בקורס "בקרת הביטוי הגנטי" בטכניון

סיכום: אור גלעד

המרצה: פרופ' גדי שוסטר ופרופ' יעל מנדל-גוטפרוינד

מסמך זה הורד מהאתר <http://www.underwar.co.il>

אין להפיץ מסמך זה במדיה כלשהי, ללא אישור מפורש מאת המחבר.

מחברי המסמך עשו כל שביכולתם למנוע טעויות. עם זאת, מחברי המסמך אינם אחראיים לכל נזק, ישיר או עקיף, שיגרם עקב השימוש במידע המופיע במסמך, וכן לנכונות התוכן של הנושאים המופיעים במסמך.

הבהרה: מסמך זה מסתמך במידה רבה על הקורס "בקרת הביטוי הגנטי" בטכניון, אך אינו חומר רשמי של הקורס, אלא סיכום אישי בלבד. המקורות לכתובת המסמך הם הרצאות הקורס, והזכויות שמורות לפקולטה לביולוגיה בטכניון ולמוריה.

בקרת הביטוי – סיכום החומר (אביב תשס"ח)

מבוא – תכולת הגנום

גנום – מכלול כל האינפורמציה שחבויה ב-DNA. אורכו של הגנום האנושי הוא כ-3 מיליארד זוגות בסיסים.

הרכב הגנום האנושי –

- 1% מכיל את אזורי הקידוד לחלבונים.
- 24% הם האינטרונים, אזורים לא מקודדים שמסולקים בתהליך ה-splicing. אורכו הממוצע של אינטרון הוא כ-3365bp, כאשר אורכו הממוצע של כל אקסון (האזור המקודד לחלבון) הוא כ-145bp.
- מספר קטן מאוד של גנים לא מקודד לחלבונים אלא ל-ncRNA, שהם מולקולות של RNA בעלות תפקיד נוסף, כמו rRNA, tRNA.
- 5% מהווים את הפסאודוגנים – עותקים של גנים שאיבדו את הפונקציונליות שלהם ולכן לא מקודדים לחלבון. עם השנים חלק מהגנים האלו נעלמים, ונכנסים בהם הרבה יותר שינויים שמבטלים כל דרך לזהות שהיו שם גנים. לרובם אין פרומוטורים ולכן הם לא מקודדים לחלבון.
- 53% מורכבים מאזורים שחוזרים על עצמם. הם מתחלקים לרצפים קצרים (10 עד כמה מאות בסיסים) שחוזרים על עצמם בגנום, ולרצפים של חזרות קטנות מאוד (5-6 בסיסים) שחוזרים על עצמם במספרים גדולים.
- שאר הגנום מורכב מאזור שלא מתאים לאף אחת מההגדרות האחרות והם אינם מקודדים.

לאזורים הלא מקודדים יש מספר תפקידים עיקריים:

- בקרה על התרגום ועל השעתוק.
- בקרה על ביטוי הגן בהתפתחות.
- סידור וארגון של הכרומוטין.
- ייצוב הכרומוזום והמבנה הגרעיני.

כדי לגלות איזה אזורים חשודים כ"זבל", ניתן להשוות את הרצף עם רצפים מקבילים מגנום אחרים. בדרך כלל, אזורים חשודים הינם אזורים שמורים בכל הגנומים.

גודל = מורכבות?

C-value – ערך המבטא את משקל הגנום לחלק בגודלו (בצורה האפלואידית). באדם, הערך הוא כ-3pg, בשמר 0.05.

פרדוקס ה-C - הטווח של גודל הגנום שונה אצל יצורים מורכבים יותר ומתפרש על טווח רחב יותר, כך שאין התאמה של ממש בין גודל הגנום למורכבות היצור ואין קשר בין מס' הכרומוזומים למורכבות הגנטית.

יש מגמת עליה בין מורכבות הייצור למס' הגנים אך לא התאמה. אצל פרוקריוטים DNA הוא מעגלי, קומפקטי ומכיל רק אזורים שמקודדים לחלבון. לעומתם, הגנום באאוקריוטים מסודר בתוך הגרעין בכרומוזומים ואפשרות ליצור Alternative splicing. כמות הגנים עולה ככל שהייצור מורכב יותר, אולם לא מצאו יצור מורכב יותר עם יותר מ-25 אלף גנים (למשל, השוואה בין גנום של אדם לגנום של שימפנזה העלתה כי מדובר בהבדל של 1.23%).

דרך לבדוק שינויים בין גנומים היא באמצעות השוואה בביטוי הגנים ע"י השינויים בחלבונים שמקודדים מאותו אזור באמצעות שני ערכים:

- Ks – מספר המקומות שבהם חומצת האמינו לא השתנה.
- Ka – מספר המקומות שבהם חלק שינוי בחומצת האמינו.

ערך של $\frac{Ka}{Ks}$ קטן מאוד מ-1 מעיד על שמירות גבוהה ברצף החלבון ועל לחץ סלקטיבי לא לשנות את הרצף. לעומת זאת, ערך קרוב ל-1 מעיד על שינוי בחלבון. נמצא שבין בני אדם וקופים, הערך קרוב יחסית ל-1. ערך של Ks המחושב מאקסונים מאוד קצרים לא מייצג נכון את הלחץ האבולוציוני המופעל על החלבון.

ההבדלים בין היצורים באים לידי ביטוי ברמת הביטוי של הגנים, איזה גן מתבטא, מתי ואיפה. השינוי בין יצורים יכול להתבטא גם ע"י גנים מבקרים שיכולים לזרז ביטוי של גן אחד ולעכב את הביטוי של גן אחר, וביטוי שונה של אותו גן מבקר ישפיע בצורה אחרת על יצורים שונים. ככל שהיצור יותר מורכב, כך עולה כמות הגנים המבקרים.

משפחות גנים

גן ייחודי – גן שאין לו עוד ביטויים נוספים בגנום, או כזה שמייצג קבוצה של גנים דומים (משפחת גנים).

התגלה כי מספר הגנים הייחודיים ביצור לא עולה באותו יחס כמו העלייה במספר הגנים הכולל ביצור. חלק גדול מהגנים עבר תהליך של הכפלה כך שנוצרו משפחות של גנים שמקורם בגן בודד עתיק יותר. הגנים יכולים להיבדל ביניהם באזור מסוים אבל לכולם תהיה פונקציונליות דומה ואותם גנים יכולים להיות מפוזרים על פני כל הגנום כך שלא ניתן לראות אינדיקציה למקור שלהם.

משפחות גנים נוצרות מהכפלה כלשהי בגנום שלא הביאה להשתקת האזור שהוכפל. האזורים המוכפלים יכולים לעבור מוטציות נוספות, אבל לא כולן מתקבעות בגלל שהמוטציות יכולות להביא ללתליות. אם זה לא קורה, העותק יכול לצבור מוטציות נוספות בגלל היעדר לחץ סלקטיבי, ובמצב הזה יכול להיות שהגן יאבד את הפונקציונליות שלו או שיווצר גן חדש שדומה למקור אבל עם ביטוי אחר. בצורה הזו ניתן לעקוב אחרי ההתגלגלות של משפחת הגנים ויצירתה לאורך האבולוציה.

גנים פראלוגיים – גנים שבאו ממקור אבולוציוני משותף (אותו יצור) אבל לכל אחד יש תפקיד מעט שונה.

גנים אורתלוגיים – גנים שבאו מיצורים שונים והם בעלי פונקציונליות דומה.

גנים הומולוגיים – שם כולל לשתי הקבוצות. על כל אחד מהסוגים יש לחץ סלקטיבי מסוג אחר.

המכאניזם של ההכפלה

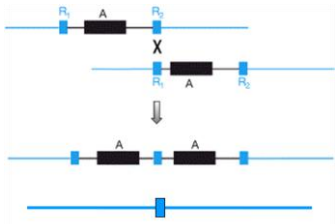
דופליקציות

לעיתים, תקלות בשכפול יוצרות מצב טטראפלואידי בגלל שלא התרחשה הפרדה מלאה לאחר ההכפלה. במרבית היצורים מצב זה לא רצוי וכל אחד מהעותקים עובר סלקציה כאשר אחד העותקים נשמר והשני עובר שינויים. בסופו של דבר, מספר הגנים הוכפל ונוספו גנים עם תכונות דומות שגורמות לירידה בלחץ הסלקטיבי.

שחלוף – Crossing over

שחלופים נוצרים כתוצאה מהחלפה של מקטעי DNA בין כרומוסידות לא אחיות. הם יכולות לגרום למעבר של חלקי גנים בין הכרומוסידות ליצירת גן כימרי, המורכב משני הגנים המקוריים. קיימים 2 סוגים של שחלופים:

- **Equal** – הכרומוזומים ההומולוגיים מסתדרים אחד במקביל לשני, ואז מתרחש שחלוף של חומר גנטי בין 2 כרומוסידות לקבלת תוצר שונה מהמקור.
- **Unequal** – מצב שנוצר מריבוי אזורים רפטטיביים בגנום. הם מהווים עוגן לקומבינציה לא הומולוגית, ע"י התיישבות של כרומוזומים לא זהים בדיוק אחד מתחת לשני (בגלל אזורים דומים בשניהם) ואז תתרחש רקומבינציה לא זהה בין הגנים. התוצר שמכיל את מירב הגנים ישרוד והשני יעלם.



Transposition

תהליך הטרנספוזיציה הוא תהליך בו אלמנטים מסוימים בגנום הנקראים **טרנספוזונים** מבצעים "קפיצה" ועוברים לאזור אחר בגנום. התהליך מסוגל להתרחש ישירות דרך ה-DNA או דרך RNA.

DNA transposons – מורכבים מאזור מרכזי שמקודד לאנזים טרנספוזאז המאפשר את ביצוע הקפיצה. מסביב לאותו איזה קיימים רצפים מקבילים באורך של 9-50bp. האזור המקורי שבו הטרנספוזון נמצא נקרא Donor site. הטרנספוזון מסוגל להתקפל ללופ (בגלל אזורי ה-inverted terminal repeats) ואז הטרנספוזאז מזהה את הטרנספוזום שלו והוא חותך אותו מתוך רצף ה-DNA בצורה ישירה (blunt ended cut) ולוקח אותו איתו. רצף המטרה (Target DNA) הוא אזור של 5-11bp המזוהה ע"י הטרנספוזאז (אין הכרות ספציפית עם אתר המטרה). מתבצע חיתוך בצורה של sticky ends, כאשר ייתכן שהחיתוך יבוצע ע"י אנזים רסטריקציה אחר, ואז הטרנספוזון נכנס לאזור החיתוך והתיקון מתבצע ע"י אמצעי התיקון של התא. במצב הזה נוצר Donor site חדש, אולם ייתכן ומוטציה אחת תמנע מכל התהליך להתרחש.

שכפול באמצעות DNA – קיימים 2 סוגים של קפיצות:

1. **Replicative** – (Copy and paste) במהלך הקפיצה, אזור היעד לא משתנה ונשאר כמו שהוא. מתרחש בדרך כלל ע"י קיפול של ה-DNA ובתהליך מורכב יחסית מתבצעת העתקה בין האזורים. נפוץ בעיקר בבקטריות והוא נדיר מאוד.
2. **Non Replicative** – (cut and paste) ה-Donor site נחתך מהגדיל המקורי ומועבר לאתר היעד. ברוב המקרים האתר מתוקן ואין בעיה אבל במקרים מסוימים לא מתבצע תיקון והתא לא ישרוד. התהליך יכול לקרות בכל שלב בחיי התא, אולם מנת שהתא ישרוד משערים שהשלב האופטימלי הוא במהלך שלב S שבו התא עובר חלוקה. העותקים נוצרים כאשר ה-Donor site הספיק לעבור הכפלה ואתר היעד עדיין לא הספיק, ואז מתרחשת קפיצה וייתכן שלאחר החלוקה המיטוטית נקבל תא עם 2 עותקים מאותו איזור בשני מקומות שונים, ובתא השני רק עותק אחד.

יש זמנים באבולוציה שזיהו שהתרחשו בהן קפיצות בקצב מוגבר יותר מזמנים אחרים. הקפיצות גורמות בין השאר ליצירת של הומולוגיות בין חלקים של כרומוזומים או אפילו למעבר של גנים שלמים מכרומוזום לכרומוזום. המערכת יכולה לבצע קפיצה של 2 טרנספוזונים ביחד ולכלוא ביניהם עוד מקטע (גן או אקסון) שיעבור למיקום אחר וייצור גן חדש במשפחה.

DNA מובילי

החלק המשמעותי בין כל הרצפים החוזרים בגנום מורכב מטרנספוזונים מסוג RNA. המכניזם של התהליך הוא פשוט: אלמנט מסוג Ty הנמצא ב-Donor site עובר תעתוק ל-RNA. לאחר מכן הוא עובר reverse transcription ל-DNA, מגיע לאתר היעד ונכנס לתוכו.

הניסויים הראשונים עם טרנספוזונים מסוג RNA היו בשמרים וחדשו שה-Ty elements דורשים שעתוק לצורך הקפיצה. כדי להוכיח זאת, לקחו את האלמנט שמצוי בעותקים רבים בגנום השמר והכניסו אותו לפלסמיד ליד פרומוטור Gal (עוברים ביטוי רק אם יש גלקטוז במצע). בנוסף, הוסיפו אינטרון בתוך האלמנט כדי לבדוק אם מערכת ה-splicing תזהה את האינטרון ותחתך אותו החוצה.

ההשערה הייתה שאם התהליך עובר דרך RNA, תהיה הגברה של הביטוי של Ty elements ללא האינטרון. תוצאות הניסוי הראו שהייתה הגברה משמעותית בביטוי, והאינטרון לא התבטא.

קיימות 2 קבוצות עיקריות דרכן מתבצעת טרנספוזיציה דרך RNA:

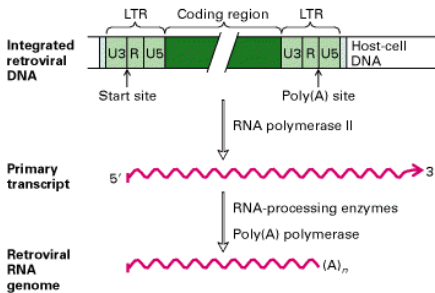
טרנספוזונים – Retrotransposons

מתחלקים ל-2 קבוצות עיקריות: כאלו שמכילים LTR (Long Terminal Repeats), וכאלו שלא. המשותף ל-2 הקבוצות ששתיהן מקודדות בפנים לגן RT (reverse transcriptase) שמקורו בגן של וירוס שנכנס לתוך הגנום (לא קיים בגנום אאוקריוטי).

1. מכילים LTR

מבנה – בקצוות אזור הקידוד מצוי אלמנט ה-LTR המופיע באופן זהה בשני הצדדים.

אופן הפעילות –



1. RNA פולימראז משעתק את כל האזור בין אלמנטי R- עד לקבלת mRNA בוגר שאחד מתוצריו יתורגם לחלבון RT.
2. החלבון מזהה mRNA שקידד אותו ומבצע לו RT.
3. ה-target site direct repeats מזהים את אתר היעד (רנדומלית) ובעזרת integrase מתבצע חיתוך של אתר היעד שאליו נכנס הטרנספוזון.
4. ה-DNA מתוקן בעזרת אמצעי התיקון של התא.

2. לא מכילים LTR – LINES

מבנה –

- ORF1 – אזור המקודד לחלבון שנקשר ל-DNA.
- ORF2 – מקודד לאנדונוקלאז ו-RT.
- מכיל רצף לא מדויק בקצוות שעשיר באדנין ותיאמין.
- הפרומוטור נמצא לפני הטרנספוזון והוא נחוץ לצורך תעתוק שלו, אבל הוא אינו צמוד לחלוטין לטרנספוזון, ולכן הטרנספוזונים יכולים לקפוץ ליד פרומוטורים אחרים כדי להפיץ את עצמם.

אופן הפעילות –

1. החלבון שנוצר מ-ORF2 מזהה RNA שטרם תורגם ונקשר אליו בעזרת ORF1.
2. ORF2 חותך גדיל של DNA ומכניס ה-RNA לשם ומבצע RT.
3. מנגנוני התיקון משלימים את הגדיל השני לפי התבנית ומתקנים חורים.

אחרי קפיצה אחת אין המשכיות. תדירויות ה-LINES גבוהה מאוד, ומשערים שהסיבה לכך היא שהם קופצים ליד פרומוטורים ורק כך הם יכולים להמשיך. הצליחו להוכיח באופן סטטיסטי שכנראה יש העדפה של ORF2 להתקרב לפרומוטורים.

Exon shuffling – מצב שבו אקסון עבר (או הועתק) מגן אחד לגן שני.

יתכן וכשה-LINE יעבור תעתוק, סיגנל הפולי-אדנילציה שלהם יהיה חלש יותר והפולימראז ימשיך לשעתק עד לסוף הגן (תחת ההנחה שלפני ה-LINE קיים פרומוטור). ה-LINE החדש יכיל גם את האקסון הנוסף ויעביר גם אותו לגן אחר והדבר יכול להשפיע על ביטוי הגן השני. מוצאים אקסונים בגנים שקרובים ל-LINE שהם שונים מהאקסונים האחרים באותו גן. הסיכוי שאותו אקסון יתבטא הוא נמוך מאוד כי הוא יכול לשנות את מסגרת הקריאה של הגן בצורה דרסטית שתשפיע על ביטוי הגן (עד למצב של לתליות).

רטרופסאודוגנים - Retropseudogenes

ה-SINEs מאופיינים בכך שאין להם RT אבל יש להם אזור פרומוטור שמוכר ע"י פרומוטור של RNA פולימראז 3 והוא מצוי בתוך הטרנספוזון. הפרומוטור שלו הוא פנימי ולכן הוא מתועתק ביחד איתו. הוא משתמש ב-RT של LINE כלשהו, כאשר אפיניות הקישור של ה-RNA מה-SINE ל-RT יכולה להיות גבוהה יותר מהאפיניות של ה-RNA של ה-LINE המתאים לאותו RT. למרות של-SINE יש פרומוטור פנימי, הוא מאוד חלש וכמעט לא פעיל והוא לא נותן לו עדיפות להתפשט בצורה עדיפה בגנום. משערים שהוא גם מעדיף ליפול באזור של פרומוטורים והעובדה שהוא נפוץ הרבה יותר היא בגלל ההכרה הטובה יותר שלו ל-ORF2.

אלמנט ה-Alu

תת קבוצה של SINE שהצליח להתפשט בגנום האנושי ויש לו תפקידים חשובים בעיצוב הגנום. הם ספציפיים לפרמטים (קופים) ולא לפני זה. ה-Alu יכולים להשפיע על תהליך של Exon shuffling באמצעות רקומבינציה ע"י כך שהם גורמים לרקומבינציה לא הומולוגית והם משתמשים כעוגן לאותה רקומבינציה. ייתכן ואקסון מגן אחד יתחלף עם אקסון מגן אחר. הסתבר שלחלק מהאקסונים בגנום יש מקור של Alu ויש להם דמיון אליו (אבל אין ביניהם דמיון). נראה שלאותם אקסונים יש דמיון ל-Alu אם משווים אותם לרצף של ה-Alu שלא מקודד. בנוסף, גילו שבמקטע של ה-Alu יש פוטנציאל ליצירת אתרי splicing לאחר מוטציות עד שתיווצר מסגרת קריאה בתוך המקטע. אחת המוטציות שהתרחשו בתוך אזור ה-Alu יצרו אתרי splicing, כך שהמערכת יכולה לכלול את אותו מקטע בתוך ה-mRNA הבוגר ואז קיבלנו גן אלטרנטיבי חדש. קיימים כ-1000 גנים שנוצרו בצורה הזו בגנום האנושי.

מוטציות כתוצאה ממוביליות של DNA

- חוסר בתיקון של אזור שקפץ ולא חלק חיבור מחדש, דבר הגורם להרס הכרומוזום.
- כניסה לאזור מקודד.
- השפעה על שחבור (Splicing) כתוצאה מהוספה או הסרה של אקסון.
- הכנסה של פרומוטור שגורם לביטוי של גן שלא אמור להיות מבוטא.

זיהוי אתרי קישור בין DNA וחלבון

חלק מפעילות הבקרה על ביטוי ה-DNA נעשה בעזרת חלבון שנקשרים ל-DNA ומפעילים פקטורים שונים. החלבונים מסוגלים לזהות את הרצף הספציפי בעזרת מעבר על פני הרצף (למעשה, הם "קוראים" אותו). הבעיה העיקרית היא שה-DNA קיים במבנה של סליל כפול ולרוב הוא בצורה מקופלת שמקשה על הקריאה. רוב פקטורי השעתוק לא צריכים לפתוח את ה-DNA כדי לקרוא אותו, והם משתמשים ב-major groove וה-minor groove כדי להיכנס למבנה ולזהות את הרצף. הזיהוי מתבצע לפי אינטראקציות הידרופוביות או אלקטרוסטטיות, לרוב ע"י קשרי מימן.

האלמנטים העיקריים שלפיו מתבצע הזיהוי הם האקספטורים והדונורים של קשרי המימן על גבי הנוקליאוטידים, כאשר הסיידור שונה בין T-A ובין G-C. צורת הקישורים יכולה לשמש כקוד לזיהוי הזוגיות, היות ולכל זוג יש דגם משלו ב-major groove בכל אחד מארבעת האפשרויות (בניגוד ל-minor groove). לכל אתר קישור של אנזים רסטריקציה יש אתר משלו לפי קשרי המימן, דרכם הוא יודע לזהות ולחתוך.

ההיכרות עצמה אינה ספציפית אחד לאחד, וכדי שחומצת אמינו מסוימת תיקשר, יש צורך בקשר מימני כפול. אספרגין מתאים בדרך כלל לאדנין, ואילו ארגינין נוטה להיקשר יותר לגואנין (Accepto מתאים ל-Donor ולהיפך). קשרי המימן מהווים מרכיב עיקרי באינטראקציות בין פקטורי השעתוק וה-DNA, אולם אם מדובר בקשר מימני בודד יש צורך באינטראקציות נוספות במקביל.

ההתאמה בין החלבון וה-DNA חייבת להיות מדויקת וספציפית. ההתאמה מושגת באמצעות מספר דרכים:

- **התאמה אלקטרוסטטית** – ה-DNA טעון שלילית ולכן כל החלבונים שנקשרים אליו הם בעלי מטען חיובי באזור הקישור (הם לא חייבים להיות טעונים חיובית לגמרי). חלבונים שאינם בעלי מטען חיובי יידחו ע"י ה-DNA.
- **התאמה מבנית** – מימדי ההליקס של החלבון צריכים להיות מותאמים למרחקים הנדרשים ב-major groove כדי לא לגרום להפרעות סטטיות. למשל, הקישור של TBP ושל CAP היא לאזור שהוא קצת יותר מכופף. ה-TBP לא נקשר דרך ה- α הליקס אלא דרך β -sheet אל ה-minor groove במקום ל-major groove. הוא צריך לזהות את הרצף באופן מאוד ספציפי והוא יכול לזהות את הכיפופים (קריאה לא ישירה, לא דרך קשרי המימן). ההיכרות היא דרך הצורה של ה-DNA והיציבות לא נעשית ע"י הקשרים עליהם דיברנו עד עתה.
- **הכרה ישירה** – זיהוי של רצף ספציפי בעזרת אינטראקציות בין החלבון ל-DNA (למשל, ע"י קשרי מימן).
- **הכרה לא ישירה** – זיהוי של רצף ספציפי בעזרת מאפיינים מבניים של הרצף (כלומר ההיכרות היא לא דרך קשרי המימן). הסתבר שה-TBP מכיר את מבנה ה-DNA ולא את הרצף עצמו. המבנה של ה-TATA-box דומה מאוד בצורתו למבנה של הקומפלקס של ה-DNA יחד עם ה-TBP, ולכן ה-TBP יכול לזהות בקלות את האזור הזה (יש שוני במבנה לעומת ה-B-DNA רגיל). לכיפוף של ה-DNA יש גם חשיבות ביולוגית ע"י קירוב של אלמנטים של שעתוק אחד לשני.

יש מספר מוגבל של אלמנטי קישור כשכל אחד עושה היכרות שונה, אולם כולם מתבססים על אותם מאפיינים. יש 10 מוטיבים, אנחנו נדון ב-4 המרכזיים:

- **Helix-Turn-Helix (HTH)** – מופיע רק בחלבונים פרוקרויטים עם בדיוק אותה זווית בין ההליקסים. המוטיב הזה יכול להופיע כחלק מחלבון או בתוך קומפלקס של חלבונים. החלבון תמיד מופיע כדימר, כאשר המוטיב מופיע בו פעמיים. ניסויים הראו כי החלבונים האלו יוצרים ביניהם קשר בצורות שונות, אבל המרחק של הליקסי ההכרה (אחד מה- α הליקס משמש כאתר ההכרה לקישור) בין שני חלבונים זהה תמיד (כ-3.4nm), וזה מרחק מתאים להיכנס בין שני major groove עוקבים. לרוב, הרצף של ההליקסים הוא פלינדרומי לא מלא, דבר היוצר סימטריה כמעט מלאה בין 2 חלקי הרצף. ברגע שנעשית ההיכרות הספציפית ויש התאמה, נוצרים עוד קשרים (בעיקר קשרי מימן) שתפקידם לייצב את הקישור. הם בעיקר בין שלד החלבון ושלד ה-DNA. המבנה של חלבונים מהמשפחה הזו הוא של פלינדרום כמעט מלא היות והחלבונים נקשרים לרצף ההכרה כהומודימרים והדימרציה בין החלבונים היא ראש לראש.
- **Homeodomain** – דומה ל-HTH במבנה שלו ומופיע רק באוקרויטים. ההבדל העיקרי ביניהם הוא בהליקס נוסף דבר המאפשר הרבה יותר קומבינציות הכרה. הם מאופיינים בהליקס שמייצב אינטראקציות של חלבון-חלבון (הראשון בסדר), הליקס מייצב והליקס הכרה ארוך.
- **Zinc fingers** – מכילים גם α הליקס וגם β -sheet. הליקס ההכרה נכנס ל-major groove ושני β strands מוחזקים ע"י מולקולה של אבץ שיוצרת צורה של אצבע. האצבעות מלפפות את ה-DNA ולכל חלבון יש מספר אצבעות שונה.
- **Leucine zippers** – דימר בעל 2 הליקסים ארוכים שלא חייבים להיות זהים. ההליקסים יוצרים אינטראקציות הידרופוביות ביניהם ובקצה יש חומצות אמינו להכרות ספציפית עם רצף ה-DNA.

חומצת אמינו אחת לא תמיד תזהה את אותו בסיס, וחלבון לא תמיד ייקשר לאותו רצף DNA ספציפי.

בקרת הביטוי ברמת הגנים – הקדמה

בקרת הביטוי מתמודדת עם כמות אדירה של תאים ביצורים חיים. כל התאים מכילים את כל המידע הגנטי על גבי הכרומוזומים, אולם הם נבדלים בביטוי שלו, בין השאר בגודל התאים הסופי (למרות שכולם התחילו מאותה צורה).

כדי להוכיח שכל תא בגוף מכיל את כל הסט של הגנים לקחו ביצית של צפרדע והרסו את הגרעין שלה בעזרת קרינת UV והשתילו בתוכה גרעין מתא עור. לאחר מכן הצליחו לגדל עובר שהתפתח בהצלחה לראשן. לעומת זאת, בצמחים ניתן להשתמש בכל חלק של הצמח כדי לבצע רגנרציה של צמח שלם (ייחור). ביונקים הסיפור מעט יותר מסובך, וכדי לשבט יונק השתמשו בניסוי בתאי עור מפרה אחת וביצית של פרה אחרת. שואבים את הגרעין של הביצית ומכניסים במקומו את הגרעין מתא העור ואז משתילים אותה בפרה שהוכנסה להריון מדומה. בצורה הזו נולדה עגלה שזהה באופן מלא לאימה.

כל רקמה תלויה באיזה חלבון נוצר ובכמות שלו. בזמן נתון כמעט כל תא מבקר סט אחר של חלבונים, וקיימים לא מעט גנים שיכולים להיות להם תוצרים שונים בגלל השחבור האלטרנטיבי (alternative splicing). חלק מהגנים לא מקודדים לחלבון אלא ל-RNA בעל תפקיד מסוים. ניתן להשוות ביטוי חלבונים בין 2 רקמות שונות לפי משקל מולקולרי ודרגת חומציות ובכך ללמוד מה התפקיד של כל חלבון.

הבקרה על יצירת החלבון נעשית בכל שלב של הדוגמה המרכזית:

1. בקרה על השעתוק של ה-DNA ל-RNA.
2. בקרה על העיבוד של ה-RNA ויצירת mRNA (באוקריוטים).
3. יציאה של ה-mRNA הבוגר מהגרעין רק כאשר הוא תקין. כ-90% מה-RNA המשועתק לא יוצא מהגרעין ומפורק בשלב העיבוד.
4. בקרה על תרגום תקין בריבזום, ופירוק RNA שלא מתאים לתרגום.
5. בקרה על החלבון שנוצר. אם הוא לא מצליח להתקפל כמו שצריך או שהוא לא מתפקד כמו שמצופה, הוא מועבר לפירוק.

בקרת התעתוק בפרוקריוטים

בפרוקריוטים, mRNA יכול לקודד למספר חלבונים ולרוב מדובר במספר אנזימים שמשותפים לאותו תהליך.

אופרון – יחידת תעתוק שמקודדת ליותר מחלבון אחד, כאשר mRNA שמתועתק מאופרון נקרא מולטי ציסטרוני.

פרומוטור – רצף ב-5' לגן שמגדיר אם הוא יבוטא או לא. מופיע בעיקר ב-(-35) עד (-150) לאזור ממנו מתחיל התעתוק של ה-RNA פולימראז. רצף האופרטור בתוך הפרומוטור קובע אם הרצף יבוטא או לא.

הדרך הכי פשוטה לשלוט בתעתוק היא ע"י חלבון שנקשר ספציפית לאופרטור (רפרסור/דכאן). הוא קשור אליו גם לליגאנד ספציפי ורק אז הדכאן נקשר ל-DNA ומונע מהפולימראז להיקשר ולשעתק. אם החיידק נמצא במקום שאין בו את הליגאנד, הדכאן מוסר והפולימראז יכול לשעתק. **דוגמא:** רפרסור לטריפטופן – הרפרסור של הטריפטופן בנוי משני דימרים שהמוטיב המרכזי בו הוא מבנה של HTH שמתאים את עצמו ל-DNA בעזרת שני אתרי קשירה.

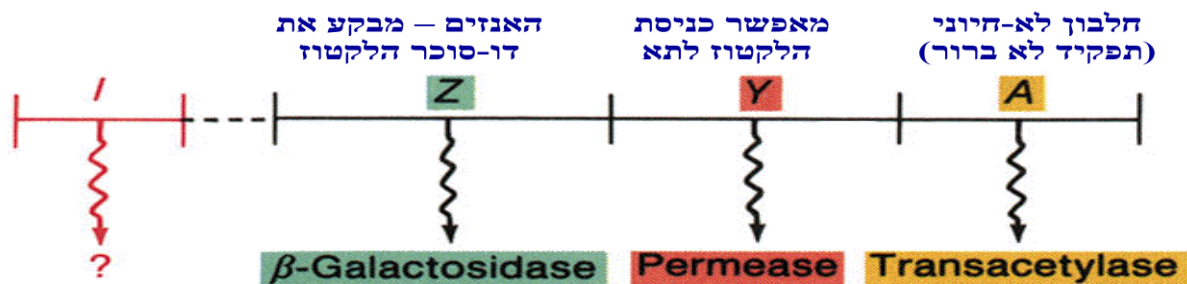
בקרה שלילית – משתמשת בדכאן שמונע את התעתוק. הליגאנד שנקשר יכול לגרום לרפרסור להיקשר ל-DNA או שהוא נקשר לרפרסור כדי שייקשר לאופרטור.

בקרה חיובית – פעולת בעזרת משרן/אקטיבטור שהקשירה שלו לאופרטור נחוצה לקשירה של

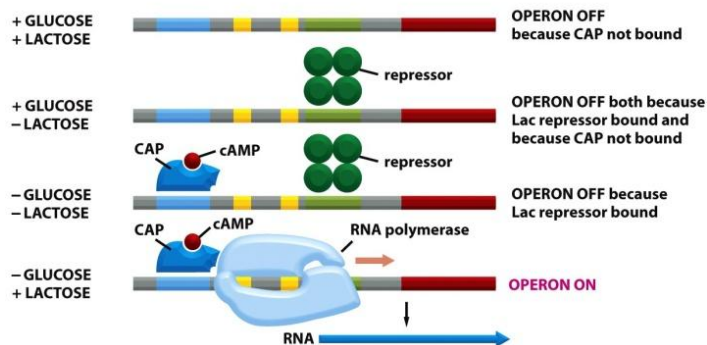
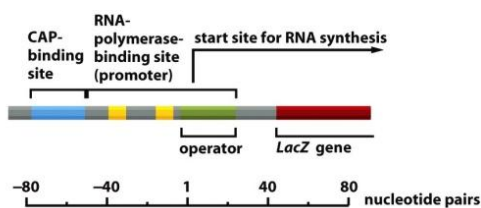
הפולימראז כדי שיתרחש תעתוק. גם הוא יכול לפעול באמצעות ליגאנד ב-2 אופנים: נקשר לאופרטור בעזרתו או שקשירה של הליגאנד גורמת למשך לא להיקשר לאופרטור. *דוגמא*: וירוס λ יוצר רפרסורים כדי שהתא אליו הוא נכנס יבטא רק את הגן הויראלי. בחלק מהמקרים הוא מתפקד כרפרסור ובחלק אחר כאקטיבטור, ומה שמשנה זה המרחק מהפרומוטור לפולימראז.

אופרון הלקטוז

אופרון ב-*E. coli* שיועד לווסת את רמת התרגום של mRNA לפי הצורך בלקטוז. הכמות היחסית של mRNA המקודד לאנזים Lac תעלה תוך דקות ברגע שמוספים לקטוז למצע, ולאחר מכן תעלה גם כמות החלבון. לאחר הסרת הלקטוז, רמת ה-mRNA תחזור למינימום, אולם החלבון לא מפורק (אבל כל 20 דקות החיידק מתחלק וזה גורם למיהול של החלבון).



אופרון הלקטוז מופעל הן ע"י בקרה חיובית והן ע"י בקרה שלילית:



קשור וגורם לו לא להיקשר ולהפר את שיווי המשקל בין הקשורים לחופשיים או בגלל שהלקטוז נקשר לדכאן קשור ומנתק אותו (עדיף אנרגטית לפי זמן תגובה).

האופרטור נמצא ליד הפרומוטור, וניתן להעביר דרכו ציר סימטריה שהוא אתר קשירה לחלבון או חלבונים. את האזור שאליו הדכאן נקשר גילו בעזרת foot printing ובכך ראו שמספיק שינוי של נוקלאוטיד בודד שימנע מהדכאן להיקשר. הדכאן נקשר לפרומוטור עצמו ובכך הוא מונע ממנו להתקדם על ה-DNA. נוצר בו מבנה מורכב של טטרמר ממונומרים כאשר לכל טטרמר יש 2 אזורים קשירה ל-DNA, ובסך הכל יש 4 אתרי קשירה ל-2 אזורים במקביל. הדכאן תמיד קשור ל-DNA אבל לא תמיד לאתר הספציפי שלו (במקרה הזה, הפולימראז יכול לתעתק). כשהלקטוז לא נקשר אליו, 96% מהדכאנים קשורים לאופרטור של Lac, לעומת 3% בלבד אם הלקטוז קשור (ירידה של פי 1000).

בקרת התעתוק באאוקריוטים

קיימים 3 סוגים של RNA פולימראז באאוקריוטים, כאשר לכולם מבנה דומה:

1. **פולימראז I** – מתעתק ל-3 סוגים של RNA ריבוזומלי (5.8S, 18S, 28S rRNA). הוא הפולימראז העיקרי היות ו-90% מה-RNA בתא הוא ריבוזומלי.
2. **פולימראז II** – מתעתק ל-mRNA, mRNA, snoRNA, snRNA (האחרונים קשורים בבקרה בגרעין).
3. **פולימראז III** – מתעתק ל-tRNA, rRNA, 5S, snRNA וכל שאר ה-RNA הקטנים.

בבני אדם, כ-10-5% מהגנים (1500-3000) גנים אחראים על הבקרה של המערכת ומדובר בחלק לא קטן מהמערכת. למרות המספר הרב, לא צריך כמות גדולה של התוצרים שלהם היות והם צריכים להיקשר רק למספר קטן של גנים כדי לדכא או להגביר.

בפרוקריוטים, 500 הבסיסים שלפני תחילת הגן מהווים את אזור הבקרה שלו. לעומת זאת, באאוקריוטים המצב הרבה יותר מסובך. מסביב לפרומוטור יש אזור בסיסי, אליו נקשרים רצפים ספציפיים לאזור (כמו ה-TBP) ומכינים אותו לקשירה של הפולימראז. רצפי בקרה ששייכים לפרומוטור המורחב יכולים להיות במרחק גדול מאוד מאזור תחילת התעתוק (אפילו אלפי בסיסים במעלה הגדיל או אחרי האתר) ואליהם נקשרים חלבוני בקרה מתאימים. כל חלבוני הבקרה נקשרים לקומפלקס גדול הנקרא mediator (מתווך) המורכב מ-30-40 חלבונים שיכול להשתנות בין גן לגן, שגורם לקיפול של ה-DNA ומייצב את כל הקומפלקס הזה. רק אחרי שכל החלבונים נקשרים (120 במספר) והקומפלקס מתייצב, הפולימראז יכול להיקשר ולהתחיל בתהליך התעתוק. ה-mediator נקשר ל-activation domain שמשפעל את כל התהליך, ואם הוא יישאר קשור אליו כל הזמן, הגן יבוא קונסטיטוטטיבית. האקטיבטורים נקשרים לפקטורי התעתוק הכלליים ועוזרים להם להתארגן באזורי תחילת התעתוק, ואז הפולימראז יכול להיקשר בצורה המיטבית. הבקרה היא בדרך כלל חיובית והיא נפוצה יותר.

פקטור שעתוק או חלבון שנקשר ל-DNA יכול לשפעל או לעכב את התהליך, והוא חייב להיקשר לרצף ספציפי. ניתן להפריד את החלבונים האלו ל-2 דומיינים, כאשר חלק אחד יודע להפעיל את הפולימראז והחלק השני יודע להכיר את אתר הקשירה של החלבון. בצורה הזו ניתן ליצור חלבון כימרי (חלבון מהונדס גנטי המורכב מ-2 חלבונים אחרים) ואז ליצור פקטור שעתוק חדש שיפעיל את התהליך. למרחק בין אתר הקשירה לאתר תחילת התעתוק יש השפעה על יעילות התהליך. ככל שהמרחק רחוק יותר, היעילות של הדכאנים והמשרנים יורדת, אולם מהצד השני, קרבה לאתר לא תמיד אופטימלית. כתוצאה מהקשירה ה-DNA מתקפל ליצירת הקומפלקס, ובדרך הזו מגיע לצורה האופטימלית להתחלת התהליך.

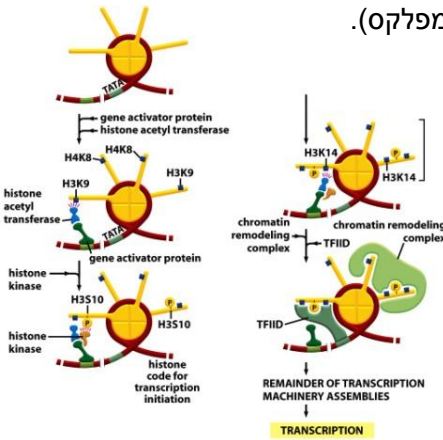
בקרת הביטוי ברמת הכרומטין

למבנה הכרומטין יש חשיבות עצומה בבקרה על תעתוק ה-DNA ברמת המבנה והדחיסה של החומר הגנטי. כדי שפקטורי שעתוק יוכלו להיקשר ל-DNA, יש צורך בביצוע remodeling להיסטונים על מנת להפריד את ה-DNA מהם ואז הפקטורים יוכלו להיקשר. אחרי הפעילות, הפקטורים משתחררים וה-DNA מסתדר מחדש על ההיסטונים. הם עוברים מודיפיקציות לאחר התרגום בנקודות מפתח בזמן ה-remodeling, כאשר חומצות האמינו של ההיסטון עוברות פוספורלציה, אצטילציה (שתיהן ביחד או לחוד מעודדות ביטוי או מתילציה במקומות ספציפיים (משתיק ביטוי). קשירה של יוביקוויטין מביאה לתחילת התהליך.

עדיין לא ברור מה המטרה של המודיפיקציות, אבל אם ההיסטון לא יעבור מודיפיקציה, הגן יושתק. חלק מהמודיפיקציות מסמנות על ביטוי הגן, שינוי במבנה הכרומטין, סימון לחלוקת תא או לביצוע מיטוזה או מיוזה.

קיימות מספר אפשרויות לפתיחת השרשרת:

1. הקומפלקס שמבצע את ה-remodeling פותח את הנוקליאוזומים לצורה שקל יותר להתחבר אליה.
2. צ'פרונים מתאימים מוציאים את ההיסטונים מתוך השרשרת ובכך מאפשר גישה ל-DNA.
3. ההיסטונים מוחלפים בהיסטונים שמאקטבים אנזים שמבצע מודיפיקציה.
4. אנזים נקשר להיסטונים ומבצע מודיפיקציה ע"י פתיחה שלהם (בלי הקומפלקס).



דוגמא: סדרת תהליכים שפרומוטור מפעיל ליצירת אינטרפרון

1. אקטיבטור נקשר לגן ולאחר מכן נקשר אליו גם האנזים היסטון אצטיל טרנספראז (לא ייקשר בלי קישור של החלבון). הוא נקשר בהיסטון 3 לליזין המצוי בעמדה 9 ולהיסטון 4 בעמדה מס' 8 (מדביק שם ליזין).
2. היסטון קינאז מזרחן את סרין 10 בהיסטון 3.
3. האצטיל טרנספראז מדביק עוד ליזין בהיסטון 3 וגורם לחשיפה של ה-TATA.
4. TFIIID נקשר ל-TATA, והקומפלקס שמבצע remodeling משנה את המבנה ומאפשר לתהליך התעתוק להמשיך.

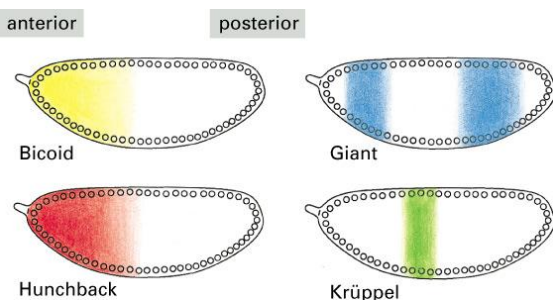
כמעט כל גן מאוקטב ע"י מספר פקטורים המשפיעים על כמות הפעילות. ייתכן ופקטור אחד גורם לרמה מסוימת של תעתוק, פקטור שני יגרום לרמה כפולה אולם ביחד הם יגרמו לרמת תעתוק גבוהה מאוד.

בקרה שלילית – יכולה להיעשות באמצעות מספר דרכים:

- בגלל תחרות על אתר קשירה בין אקטיבטור ורפרסור כך שאם האקטיבטור יהיה באפיניות גבוהה יותר, הוא ימנע מהאקטיבטור להיקשר.
- הרפרסור נקשר לאקטיבטור ולא מאפשר לו להיקשר ל-mediator.
- הרפרסור יכול להיקשר ל-mediator או ל-TFIIID ומונעת מהאקטיבטור להיקשר ע"י הרחקתם מהאקטיבטור או תפיסת המקום שלו.
- הרפרסורים יכולים למנוע מה-remodeling complex או לנתק אותו כך שהכרומטין יחזור למצב הרגיל (הבלתי קשיר).
- הרפרסור יכול לקשור אנזים שיבצע דה-אצטילציה ויגרום לסגירת הכרומטין.
- רפרסור יכול לקשור אנזים שיבצע מתילציה להיסטונים כך שהאזור ייסגר הרמטית בפני תעתוק.

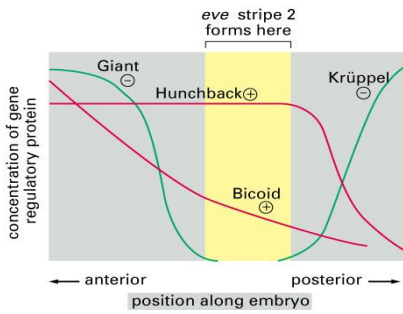
קיימת משפחה של חלבונים שנקשרים לפקטורים קשירה ל-DNA הנחוצים להפעלה של התעתוק (קו-אקטיבטורים) או השתקה שלהם (קומפרסורים). התוספת שלהם מוסיפה אפשרויות בקרה למערכת והם מעלים את רמת המורכבות של המקרה.

Enhancesome – קומפלקס המכיל חלבונים הנקשרים לאתרים מסוימים ב-DNA ומכיל קו-אקטיבטורים וחלבונים שמכופפים את ה-DNA. רק לאחר שכל הקומפלקס התחבר, חל זיכרון שמתחיל את כל התהליך.



התפתחות עובר הדרוזופילה

לאחר ההפריה, העובר של הדרוזופילה מתחיל לקבל צורה עם כמות גדולה של תאים שנוצרו מחלוקות. לאחר כמה שעות חל איחוי של כל התאים לתא אחד גדול עם הרבה גרעינים ליד הדופן. לתא שנוצר כבר מוגדרים חלק קדמי (anterior) וחלק אחורי (posterior). בתוך התא הזה באים לידי ביטוי 4 גנים שונים (Bicoid ו-Hunchback בקדמי, Giant ו-Krüppel באחורי)



בתוך הגרעינים בצורה של מפל לפי אזורים. תהליך הבקרה קובע את הביטוי של הגנים. נוצרות 7 רצועות של הביטוי של אותן גנים ובעזרת סימונים מיוחדים ניתן לראות היכן כל גן מתבטא. הרצף נחוץ ומספיק לביטוי במקומות מדויקים בעובר, ויש כאן שימוש בעקרונות קומבינטוריים ושילובים של פקטורי שעתוק שונים.

לכל אחד מארבעת הגנים יש אתר קשירה מיוחד משלו, ואם יש אתרים חופפים, ייקשר זה הדומיננטי יותר. הגנים הקדמיים מאקטבים את התהליכים השונים, בעוד אלו מהחלק האחורי מעכבים אותו. מכאן ניתן להסיק שהמעכבים משפיעים בצורה חזקה יותר ובאזורים שבהם הם נמצאים בריכוז גבוה יותר, לא יהיה ביטוי.

הרגולציה על אקטיבציה של הגנים נעשית באמצעות חלבונים ספציפיים. קיימות שיטות שונות לאקטיבציה ולאינאקטיבציה שמשפיעות על רמות התרגום השונות. האקטיבציה תבצע ע"י חלבונים פעילים, קשירה של ליגאנד שיפעיל את החלבון, פוספורלציה או קישור של חלבון אחר. אינאקטיבציה תבצע ע"י הורדה של מעכב ע"י זירחון, הסרה של חלבון מעכב כדי להיכנס לגרעין או פירוק מחלבון ממברנלי.

דוגמא: הגן ל-β-globin באדם

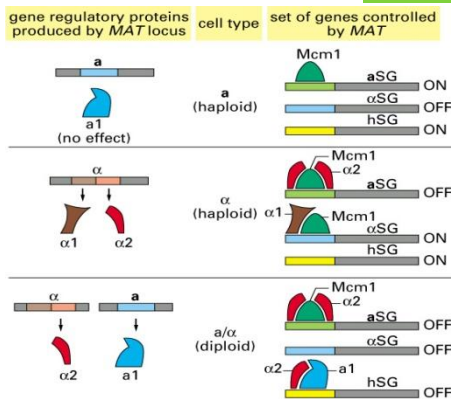
הגן מכיל שני אזורי בקרה, בתחילתו ובסופו. כל הגלובינים מבוקרים בעזרת אותו אתר בקרה, אולם לכל אחד מהם יש אתר בקרה משל עצמו שקובע מתי כל אחד מהם יתבטא. ההבדל בביטוי הוא בעיקר בהתפתחות העוברית, כאשר גלובינים מסוג γ מתבטאים עד ללידה, ואז הם מוחלפים ע"י ה-β-globin, בהתאם לסביבה בה העובר שרוי.

מבודדים (Insulators) – במהלך האבולוציה התפתח אלמנט נוסף, האינסולטור, שאליו נקשרים חלבונים ותפקידו לבדוד בין enhancers ובין הגנים שצמודים אליהם כדי שהגן הספציפי יופעל.

בקרה על חלוקה של שמרים

השמרים הינם יצורים אאוקריוטים המסוגלים להתרבות בצורה מינית וא-מינית. בשלב מסוים השמרים מתחלקים לשני סוגים האפלואידים, α ו-a, כאשר הקביעה נעשית בעזרת פקטורי שעתוק מסוימים על גבי הלוקוס MAT ב-3 מקומות שונים. הטבלה מציגה איזה פקטור נקשר לאיזה מקום:

hSG	αSG	aSG	מיקום על הגן / זן השמר
אין קשירה	אין קשירה	Mcm1	a (האפלואיד)
אין קשירה	α1, Mcm1	α2, Mcm1	α (האפלואיד)
a1, α2	אין קשירה	α2, Mcm1	a/α (דיפלואיד)



הפקטור α1 מהווה אקטיבטור, ואילו α2 הוא רפרסור. שמרים מסוג a יכולים להתחבר עם שמרים מסוג α, ליצור דיפלואיד ואז לעבור מיזוג ולהתרבות, ובצורה הזאת ליצור מגוון גנטי גדול יותר.

מודל הקסטות – מודל שהוצע שלפיו לשמר יש 3 "קסטות" שקובעות מאיזה מין הוא. שתיים מהן לא מתבטאות ומתאימות לכל אחד מהמינים, ואילו הקסטה של הלוקוס MAT ניתנת להחלפה ע"י שתי האחרות ותגרום לביטוי של הזן. בתדירות מסוימת יש כל הזמן החלפה של הקסטות המושתקות שגורם לשינוי הפנוטיפ.

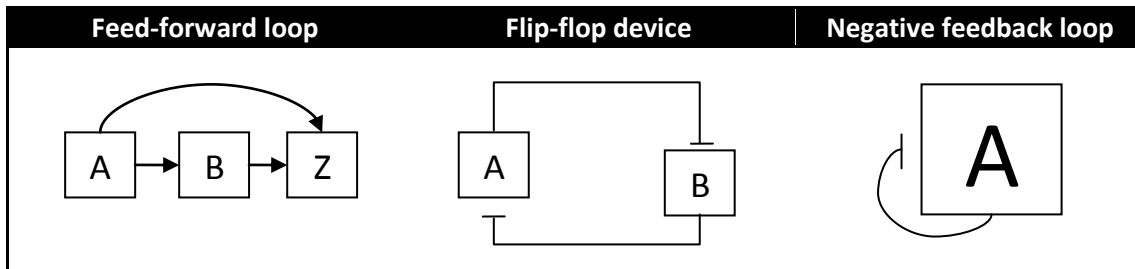
מחזור החיים של הפאג' λ

וירוס מסוג λ נכנס לתא של חיידק ומדביק אותו. לרוב הוא נשאר בתא וגורם לו להיות נשא, כך שהגן הויראלי לא מתבטא עד לטריגר מסוים. ברגע שזה קורה, מתחיל ייצור של פאג'ים חדשים, עד להתפוצצות של החיידק המאכסן (ליזיס) ויצאה של הפאג'ים החדשים החוצה. לפאג' יש שני מצבים יציבים במהלך מחזור החיים שלו:

1. **שלב הפרופאג' (נשא)** – קיים רפרסור מיוחד (רפרסור λ) שסוגר את הגן שמשתק את הוירוס על גבי האופרטור ומונע את הייצור שלו.
2. **השלב הליטי** – הרפרסור נעלם ובמקומו מגיע cro λ שהוא תוצר של הגן הויראלי שמגביר את קצב השעתוק של הגן (הגן מגביר בעצמו את קצב הייצור שלו).

זיכרון תאי

אם יצירת האקטיבטורים היא בעודף, אז גם בתאים שמתפתחים מאותו תא נקבל עודף מהאקטיבטור, דבר שיגרום לגן להיות מבוטא תמידית. הביטוי תלוי גם בכמות הסיגנל ובזמן שלו (סיגנל קצר מדי לא יראה תוצאה). שלושה סוגי פידבק:



בצורה הזו הגנים יכולים ליצור מחזוריות בפעילות התאית. באדם המחזור הוא כל 24 שעות לפי היום והלילה, ופגיעה במחזור הזה מביאה לתופעה של ג'ט לג. אצל זבובי הדרוזופילה פועל מנגנון דומה של דימר הפועל כרפרסור על הגנים שלמעשה גורמים לעיכוב של התעתוק. הגן tim מייצר דימר שיוצא מהגרעין ועובר דרגציה באור (סיגנל חיצוני) ויוצר חלבון מסוג tim. במקביל, הגן per מייצר חלבון שעובר פוספורלציה ודרגציה לקבלת חלבון Per. שני החלבונים יוצרים בחושך הטרודימר חדש שנכנס חזרה לגרעין ומעכב את הפעילות של שני הגנים.

סיכום מנגנוני זיכרון תאי

1. בקרה חיובית – תוצר הגן מגביר את התעתוק שלו.
2. שינויים על גבי ההיסטונים – גורמים לאינאקטיבציה של אזור בכרומוסין.
3. מתילציה.
4. אגרגציה של חלבונים שלא הצליחו להתקפל כמו שצריך, כדי לקבל מבנה חדש של חלבון.

רצפטורים המפעילים חלבונים של גנים רגולטורים

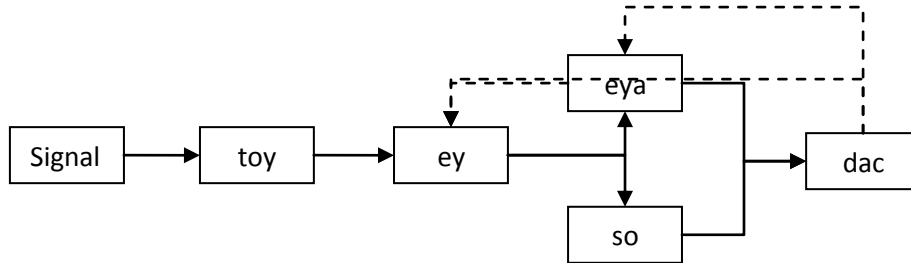
מולקולות סיגנל שונות (הורמונים) נקשרות לרצפטור שנמצא על הממברנה. הקשירה מפעילה מערכת של סיגנלים תוך תאיים שמפעילה חלבוני מטרה, כאשר כל אחד מהחלבונים הללו משפיע על רמת התעתוק של גן מסוים.

דוגמא – Glucocorticoid receptor (GR) מצוי במצב מסיס בתא. קשירה לקורטיזון משחררת את החלבונים שקשורים אליו, ואחרי דימריזציה הוא משמש כאקטיבטור או כרפרסור לפקטורים שונים.

קיימת משפחה שלמה של רצפטורים שדורשים ליגאנד לצורך הקשירה שלהם ל-DNA. קשירה של ליגאנד גורמת לשינוי קונפורמטיבי שמאפשר את הקשירה הזו. הרצפטור יכול להפעיל גנים שונים בנוכחות חלבונים שונים ואז נקבל אפשרויות ביטוי רבות ומגוונות.

דוגמא: מבנה העין בדרוזופילה

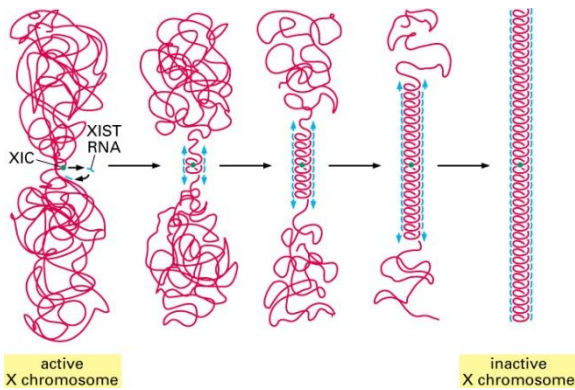
העין בדרוזופילה מורכבת מהרבה תאים (בניגוד לעדשה באדם), אולם המסלול ליצירתה דומה. כדי לבדוק זאת, השתילו תאי עין באזור אחר בגוף של הזבוב והתאים התפתחו לעין שלא מתפקדת (כי אין קשר עם המוח). התפתחות העין תלויה במסלול גנטי מסוים:



הגן *dac* גורם לפעילות מוגברת של *eya*, ושניהם ביחד מגבירים את *ey*, ולכן קבוצת התאים שבהם הם מתבטאים יגרמו ליצירת רקמת עין באותו אזור.

אם חלבון אחד או יותר קשורים, זה משרה קשירה של חלבונים נוספים וימנע ביטוי של הגן. אם הגן לא מכוסה, הוא יתבטא.

אינאקטיבציה של כרומוזום X



כרומוזום X הוא אחד מהכרומוזומים הגדולים בגנום ומכיל מעל ל-1000 גנים. לעומתו, כרומוזום Y הוא אחד הקטנים עם כ-100 גנים בלבד. בגלל שאצל הגברים יש רק כרומוזום X אחד, אצל הנשים יש צורך באינאקטיבציה של אחד מהם כדי שלא יהיה ביטוי כפול של הגן. אחד מכרומוזומי ה-X עוברים דחיסה וכיווץ שגורם להם לחוסר פעילות, ואז מתרכז בצידי התא.

המנגנון שגורם לאינאקטיבציה של הכרומוזום מתבצע ע"י הגן *XIST* שמתחיל את פעולתו ליד הצנטרומר של אחד הכרומוזומים (לא ידוע למה הוא בוחר בו ספציפית). הכרומוזום הזה משתכפל בהכפלות תאים אבל מיד מושחק ולא מתבטא. ה-RNA מתחיל

לכסות את הכרומוזום עם חלבון ומונע את הביטוי שלו. התגלה שגם הגן המשלים של *XIST* מתבטא ל-RNA. מדובר כאן במערכת של RNA-i שאחראית על מתילציה של הגדיל בעזרת היסטונים.

מתילציה של ה-DNA

גדילי ה-DNA עוברים מתילציה (הוספת שייר מתיל CH_3) לצורך שימוש במנגנוני הבקרה. המתילציה מתבצעת על עמדה 5 של הציטוזינים (C), וזה גורם שאחריו תמיד יופיע גואנין (G). לאחר הכפלת ה-DNA, אנזים מיוחד מזהה את הגדילים שלא עברו מתילציה, ומבצע גם שם את התהליך. בצורה הזו מתאר המתילציה של הסליל נשמר.

המתילציה יכולה למנוע ביטוי של גנים שונים. חלבונים מסוימים נקשרים לאזורים שעברו מתילציה וגורמים לדחיסת ה-DNA כך שה-remodeling complex לא יכול לפתוח את הגדיל, ואז הגן עובר אינאקטיבציה. למרות שאין פקטורי שעתוק, עדיין יש סיכוי לביטוי חלש של הגן. בעקבות המתילציה נקשרים חלבונים למתילים וסוגרים לגמרי את האפשרות לשעתוק.

הטבעה גנטית – תורשה כאשר החלקים בין האללים בין האב והאם לא אקראית (למשל, זה גורם להבדלים בין פרד ופרדה, שני יצורים שונים). משערים שהדבר נגרם בגלל שינויים במתילציה בין היצורים השונים. התופעה נצפתה אצל תאומים זהים שלהם יש בדיוק את אותו מטען גנטי. מחקר הראה שככל שהתאומים התבגרו, הם גילו שוני בהתנהגות שככל הנראה מושפע מהמתילציה על ה-DNA. ייתכן וההטבעה נגרמת בגלל שיתכן שאצל פרט מסוים גן ספציפי ממותל רק על אלל אחד

וכנ"ל אצל בן הזוג. לא בטוח שהצאצא יקבל את אותה הקומבינציה כמו ההורים ויכול להיות שהגן יגיע מושתק מראש ע"י האצטילים.

תקלות במתילציה יכולות לגרום למחלות. מתילציות בתאים סרטניים גורמות לביטוי של החלבון הלא נכון, דבר שיפגע במהלך החיים התקין של התא בתוך הרקמה.

איי CG - רצפי ה-CG מופיעים באזורים מסוימים, בעיקר בפרומוטורים. הם מאורגנים בתוך רצפים צפופים מאוד של CG שחוזרים על עצמם, ולכן מכונים "איי CG". מניחים שבמהלך האבולוציה הרצפים האלו היו מפוזרים בצורה שווה ב-DNA, אולם נוצר מצב שבו ציטוזין עבר דה-אמינציה והופך לאורציל (U), דבר שיגרום למערכת התיקון להפוך אותו לתיאמין (T). התופעה הזו מתרחשת בכל מקום פרט לאיי CG, ואם היא מתרחשת באזורים לא מקודדים, אין השפעה על הביטוי. אם הדבר התרחש באזור תרגום, ייתכן והחלבון יאבד את פעילותו. אם הדבר התרחש באזור של פרומוטור, ייתכן והתעתיק לא יעבוד. כתוצאה מכך, הציטוזינים הלא חשובים נעלמו במהלך האבולוציה. שכיחות רצפי CG גבוהה בגנום מהמצופה לפי חישובים סטטיסטיים לעומת כלל הגנום כי הם אלו שעוברים מתילציות, אולם הכמות היחסית שלהם נמוכה מהמצופה מבחינה סטטיסטית.

Tumor suppressor – מתילציה שבה מונעים מהתא להתרבות באופן לא מבוקר במטרה לדכא את הרצון של התא להתרבות בלי הפסקה (סרטן). המתילציה מתפשטת מהאזורים הלא מתורגמים האזורים המתורגמים, דבר שיכול לגרום להפסקת הביטוי של חלבון מסוים. התופעה יכולה לגרום לסרטן אם החלבונים שנמצאים שם מסולקים. המתילציה יכולה לחסום את הביטוי הגנטי באזור מסוים וככל שיש יותר ממנה, יש סיכוי גבוה יותר למוטציות. האזורים הממותלים קולטים קרינת UV בצורה חזקה יותר, ויכולים לעבור לגנים אחרים ולהגביר את הסיכון לסרטן. לעיתים גם אנזימים יוצרים לחץ וממתלים אזורים נוספים, ולכן ככל שמזדקנים הביטוי על החלבון יורד עד כדי שינוי פנוטיפי (שינוי בתפקוד או התחלקות לא מבוקרת). ניתן באמצעות microarrays להשוות בין רקמה תקינה לרקמה חשודה כחולה ואז לדעת אם האדם חולה לא לפי הפנוטיפ שלו.

אפיגנטיקה – תופעה של שינוי בהתנהגות שקשורה בגנים.

כדי לחקור את התופעה, חקרו עכברים שגדלו לאמהות חרדות, וראו שהם גדלים להיות חרדים בעצמם ולא רק בגלל הסביבה. הם ראו שאמא לא חרדה דואגת לצאצאים שלה יותר מאמא חרדה ואז הצאצאים לא חרדים בעצמם, ואם יקחו צאצאים לאם חרדה ונותנים להם לשהות אצל אמא לא חרדה, הם פחות רגישים לחרדה (אבל צאצאים לא חרדים לא יראו השפעה אם הם היו אצל אם חרדה). החוקרים שיערו שהתכונות של האפיגנטיקה הועברו ע"י ההתנהגות של האם והטיפול שלה גרם להגברת ביטוי הגן. הטיפול שלה העלה את רמת הסרטונין, דבר שמעלה את הביטוי של פקטורי שעתוק שונים. במקביל, מתבצעת דה-מתילציה לאזור של GR, ובסיכומו של דבר מתקבלים יותר רצפטורים לחלבון ולכן גם הצאצא יבצע התנהגות טיפולית (לא חרד) כשיגדל.

בקרה לאחר התעתוק

80-90% מה-RNA המתועתק לא מגיע לציטוזול בגלל מערכת בקרת איכות נוספת. ה-RNA האאוקריוטי עובר תהליכי עיבוד שמייצבים אותו, ורק לאחריהם הוא יוצא החוצה. תהליכי העיבוד הם:

1. **Capping** - הדבקה של ציטוזין שעובר מתילציה בתחילת הגדיל. בעל תפקיד בהגנה מפני פירוק.
2. **פוליאדנילציה** – הוספת שרשרת של אדנינים בסוף השרשרת לאחר הוספה של Poly(A) בקצה.
3. **שחבור אלטרנטיבי (alternative splicing)** – הסרה של מקטעים מתוך ה-RNA.

מולקולת ה-RNA פחות יציבה מה-DNA וזמן מחצית החיים שלה נמדד בשעות. לכן יש חשיבות גדולה שהשרשראות שיווצרו תהיינה מספיק טובות לצורך התרגום בריבוזומים. בנייה ופירוק של חלבונים נעשית כל הזמן (אצל האדם יש תחלופה של 15 חלבונים כל 24 שעות).

Riboswitch – מולקולה המורכבת מ-RNA שיכולה לבצע התערבות בביטוי בלי חלבון. הוא מסוגל למנוע תרגום של חלבון והיא נתונה להשפעה ולקשור מטבוליט ובעקבות הקשירה היא משנה את הביטוי הגנטי ע"י עיכוב השעתוק או חיתוך של ה-DNA. המבנה של הריבוסוויץ' מונע מהפולימראז להתחיל תהליך של תעתוק, אולם כשגואנין נקשר אליו, הוא משנה את המבנה ומשחרר את הפולימראז מה-DNA. הריבוסוויץ' מצוי בעיקר בחיידקים ובצמחים.

פוליאדנילציה

במהלך תהליכי העיבוד, נוסף ל-RNA זנב המורכב מאדנין. קודם לו שלב שבו מזהה אתר קישור בסוף השרשרת ולאחריו מתבצע חיתוך כדי להכין את הוספת הזנב. בעזרת הדומיין הזה ניתן לזהות האם ה-mRNA תקין. בנוסף, התהליך גורם למולקולה ליצור צורה של מעגל שבה פקטורי-poly-A binding protein נקשרים ל-Cap בעזרת חלבון ופקטור שעתוק. הדבר הזה מאפשר לריבוזומים שסיימו את התרגום להתחבר מחדש במהירות לתחילת השרשרת ולתרגם שוב, וכדי לבצע בקרת איכות ששני הקצוות תקינים ושה-RNA תקין.

שלבי המנגנון

1. קומפלקסים חלבוניים מסוג CPSF, CStF, CFI, CFII סביב אזור הפולי-A, דבר שגורם לכיפוף של ה-mRNA.
2. פולי-A-פולימראז (PAP) נקשר ל-RNA בלב הקומפלקס וחותר את השרשרת באופן פרוטאוליטי.
3. האזור שנחתך מסולק, וזנב הפולי-A מתחיל להתווסף באופן איטי ע"י ה-PAP.
4. בשלב הזה קיימים שני סוגים של חלבונים שנקשרים לאזור: PABPI שנקשר מחוץ לגרעין ומבצע כיפוף, ו-PABII שנקשר בתוך הגרעין. הקישור של האחרון גורם להגברה של הוספת האדנין.

פוליאדנילציה חשובה לבקרה הגנטית. בדוגמא שראינו, ה-RNA מקודד לנוגדנים ואם מגיע אנטיגן, הסינתזה גדולה יותר מהחלבון והוא הופך למסיס. האנטיגן גורם לשינוי ב-splicing שחושף אתר פוליאדנילציה אחר, ואז נוצר mRNA קצר יותר. החלבון שנוצר יותר הידרופובי ולכן לא נדבק לממברנה ומופרש החוצה.

עריכת RNA

שינוי נוקליאוטידים ב-RNA ממה שקודד ב-DNA מתרחש בשלב שלאחר התעתוק. יכול לקרות ע"י הוספה, הסרה או שינוי של נוקלאוטידים ומאוד נפוץ באורגנלות, וגם קצת בגנים גרעיניים. הדוגמא השכיחה לעריכה ביונקים היא היצירה של אינוזין מאדנין בתהליך של דה-אמינציה. הדבר מבוצע ע"י אנזים על האדנוזין שמחליף קבוצה אמינית בחמצן. הוא מזהה מבנה של stem & loop בעזרת רצפים ב-RNA ואז משנה את הנוקלאוטידים (לרוב A→I, אבל גם C→U). העריכה מתבצעת ע"י משפחה שלמה של אנזימים שמצבעים את העריכה. האנזימים מסוג ADAR, מכילים דומינים לדה-אמינציה ואתרים לקשירת DNA.

כדי לבדוק את תפקוד ה-ADARs, לקחו עכברים טרנסגנים שאין להם את האנזימים שמבצעים מודיפיקציות והתברר שהם קצרי חיים (שרדו לכל היותר 30 יום). בנוסף, התגלה ששינוי מסוים של גלוטאמט השפיע באופן דרמטי על אותם עכברים. בעזרת alignment גילו שהעריכה מחזירה את התרגום למשהו דומה ליצורים אחרים כדי להתגבר על מוטציות שקרו במהלך הדורות.

העריכה יכולה ליצור תפקיד אחר לאותו גן. הגן apoB לא עובר עריכה בכבד ולכן הוא מעורב בטרנספורט של כולסטרול בדם. לעומת זאת, במעיים הוא עובר עריכה כך שנוצר stop codon במרכזו ואז הוא מתפקד כסופח שומנים מהאוכל.

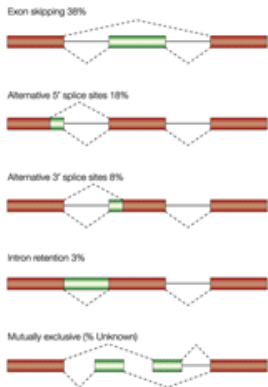
Trypanosomes – חד תאיים הגורמים למחלות שחיים אצל יתושים ובדם של בני אדם. גילו אצלם רשתות של DNA בתא ועדיין לא מבינים מה הסיבה לכך. בתוך המיטוכונדריה שלהם מתרחשים תהליכי הוספה והסרה של אורדינים ל-mRNA כאשר ה-guide RNA עובר שם תהליכים של היברידיזציה שגורמים לכך. אותם גנים עוברים עריכה מסיבית כאשר 80% מהנוקלאוטידים מוכנסים לאחר השעתוק ואין הסבר לתופעה.

שחבור אלטרנטיבי – Alternative splicing

גנים אאוקריוטים מכילים מקטעים הנקראים אינטרונים שמוסרים במהלך תהליכי העיבוד. תהליך זה מורכב מאוד ודורש דיוק כדי להבטיח את יצירת החלבון הנכון. קיום האינטרונים מאפשר קומבינציות רבות של אקסונים שיופיעו בגן הסופי וכך נקבל תוצרים חלבוניים רבים. השחבור יכול להיות אלטרנטיבי, כלומר ייתכן ולא תמיד נקבל את כל האקסונים, אולם הסדר שלהם על גבי הגן נשמר תמיד. ניתן לחלק את האקסונים לשתי קבוצות שונות: האקסונים הקונסטטיטוטיביים שתמיד יתבטאו לאחר השחבור, והאקסונים האלטרנטיביים שיכולים להיחתך החוצה. אין דרך ודאית כדי לקבוע אם האקסון הוא קונסטטיטוטיבי או אלטרנטיבי, וכל עוד לא הוכח אחרת מתייחסים לאקסונים כקונסטטיטוטיביים. מגן אחד של דרוזופילה ניתן לקבל פי 2.5 יותר גנום מכל הגנום הזבובי ביחד.

בוורוסים הגנום קטן ולכן השחבור יכול ליצור שונות וגיוון (פתרון טוב עבורם). בפועל ביצורים פשוטים יש פחות שחבור מאשר המורכבים יותר אולם גודל ומורכבות היצור לא יכולים ללמד על התרחשות התהליך עצמו (פרדוקס C).

המנגנון מתרחש ע"י התקפה נוקליאופילית של אתרים בקצוות האינטרון שיוצרת חיתוך ולולאה. התקפה נוספת מנתקת את הטבעת מהשרשרת ואז מדביקים את שני הקצוות לקבלת mRNA בוגר. דרושים 3 אלמנטים: שני אתרים בקצוות האינטרון (5' splicing site ו-3' splicing site) ו-BP point (המכילה אדנין באופן ספציפי שאחראי על ההתקפות הנוקליאופיליות).



תהליכי ה-alternative splicing האפשריים

1. Exon skipping
2. Alternative 5' splice site
3. Alternative 3' splice site
4. Intron retention
5. Mutually exclusive (בעיקר בצמחים)

הבקרה על התהליך

התהליך תלוי ב-ATP ובלעדיו לא יתרחש החיתוך. הרבה חלבונים נוספים נקשרים לספלייסוזום ומשתתפים בבקרה ובחיתוך בעזרת אינטראקציות של חלבון-חלבון או חלבון-RNA. חלבוני הבקרה יכולים לשנות את התכונות לפי המקום בו הם נקשרים וכך להשפיע על כל התהליך. חלבון בקרה שלילית מונע מהספלייסוזום להגיע לאתר החיתוך ולזהות אותו ולכן התוצר הסופי לא יכיל את האקסון האלטרנטיבי. חלבון בקרה חיובי פועל בדיוק ההיפך כשהוא מאפשר לאקסון להופיע בתוצר הסופי.

התהליך בדרך כלל ספציפי לרקמה מסוימת עד לרמת הבקרה, כאשר אלמנטי הבקרה רבים יותר על האקסונים מאשר על האינטרונים (הבקרה על האינטרונים היא רק באזור החיתוך). היא מתבצעת על ידי חלבוני SR המכילים מוטיב של סרין וארגינין שחוזרים על עצמם, ומסוגלים להיקשר ל-RNA. הם מבצעים אינטראקציה ישירה עם הספלייסוזום ונוטים להיות חלבוני בקרה חיוביים. לעומתם קיימים

ה-hnRNP שנטים להיות חלבוני בקרה שליליים. חלבונים נוספים גורמים לשינויים בקונפורמציות, עוזרים בקירוב החלקים לצורך החיתוך ומחזקים ומייצבים את התהליך. בקרה עקיפה תתרחש בעזרת השתקה של חלבוני בקרה שליליים. כל החלבונים נקשרים ל-4 אתרי בקרה: ESE (מאקטב חיתוך) ו-ESS (מעכב חיתוך) על האקסונים ו-ISE ו-ISS המקבילים להם על האינטרונים. רוב החלבונים נקשרים לשניהם בלי ספציפיות.

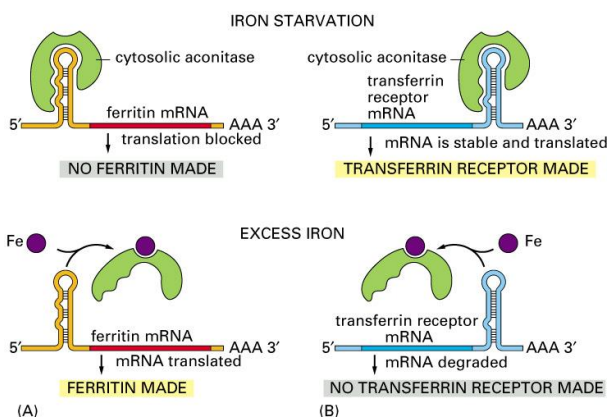
Looping out – דוגמא לשני חלבוני בקרה שלילים, up ו-down, שיושבים על ה-ISS. הם יוצרים אינטראקציות חלבון-חלבון ביניהם כך שנוצרת לולאה שכולאת את האקסון האלטרנטיבי. החלבונים גורמים לאקסון לצאת מהתהליך היות ואין זיהוי ע"י הספלייסוזום.

בקרה חיובית מושגת ע"י:	בקרה שלילית מושגת ע"י:
<ul style="list-style-type: none"> • גיוס פקטורי שחבור. • עיכוב של ה-hnRNP silencing 	<ul style="list-style-type: none"> • הפרעה פיזית לפקטורי השחבור. • Looping out

דוגמא – אצל זבוב הדרוזופילה הזוויג נקבע ע"י שלושה גנים שמשפיעים אחד על השני: Sex (Sex), tra (transformer), dsx (double-sex). הגנים מבקרים אחד את השני וההבדלים בין הצורות של השחבור יכולים להביא ליצירת איברים זכריים בהתאם לביטוי. אם יש תקלה במנגנון עוד בשלבים ההתחלתיים ויווצר exon skipping, האורגניזם שאמור להיות זכרי יתחיל לפתח איברים נקביים. משערים שהמנגנון הוא שריד מעולם ה-RNA שבו הייתה חשיבות ל-riboswitch יחד עם ה-alternative splicing.

NMD – מנגנון בקרת איכות שמזהה mRNA שלא עבר שחבור נכון ויודע לבצע דגרגציה לחלבונים באזור שבו הפולי-A עובר תרגום. משערים שהתרגום הראשון של ה-mRNA נועד לבקרת איכות כך שאם נשארים אינטרונים, נשארים עליהם גם junction complex שהריבוזום אמור לנקות. אם קיים קודון סיום בדרך ומתגלה קומפלקס שלא הוסר, ה-mRNA נשלח לפירוק (כי נמצאה מוטציה), אחרת הוא נכנס למבנה המעגלי ומתחיל בתרגום.

הומאוסטזיס של הברזל



הגוף צריך לווסת את רמות הברזל בדם, הנחוץ לשימוש בהמוגלובין. הברזל משתמש בנשא טרנספרין כדי להיכנס לתא, ואם יש יותר מדי ממנו, תיווצר הרעלה בגלל הופעה של רדיקלים של חמצן שיכולים לגרום לנזקים ל-DNA או לחלבונים (קישור קוולנטי בין ח"א).

הברזל המחומצן מגיע לרצפטור והוא תלוי בכמות של הטרנספרין כדי להיכנס. אם ייווצר עוד של רדיקלים, הוא יכול להתמודד עם זה. הברזל נאגר בעזרת Ferritin, שמשחרר אותו אם מתגלה חוסר בברזל. חוסר בברזל גורם לביטוי מוגבר של הטרנספרין והפסקה בביטוי של הפריטין. עודף בברזל ייצור הרעלה, ולכן יש צורך במערכת שתחוש כמה

ברזל יש בתא ולפי זה תשנה את מערך הרצפטורים והפריטין בתוך התא. הדבר נעשה בעזרת רצף ספציפי ב-mRNA המכיל 115 קודונים שנמצאים כ-150 מקומות לפני המתיונין הראשון. במקרה של חוסר בברזל, חלבון מסוג אקוניטאז ייקשר ללולאה של הפריטין וימנע ממנה להתבטא. במקביל ייקשר עוד אקוניטאז ללולאה נוספת שתגביר ייצור של טרנספרין. אם יש עוד ברזל, מולקולה של ברזל תיקשר לאקוניטאז ותמנע ממנו להיקשר למבנה ה-RNA, וכך נקבל את התוצאה הפוכה. בצורה כזו המערכת מבוקרת ומצליחה להתמודד עם השינויים. הכנסת חומרים קרצינוגניים (למשל ע"י עישון) יכולה לפגוע במנגנון הזה. ללא פריטין, התאים יהיו יותר רגישים לנזקים של מחסור בברזל.

RNAi

מנגנון שמעורב בבקרת ביטוי גנטי לאחר התעתוק וגורם לכך שלא נראה את תוצרי הגנים. הם התגלו לראשונה בשנת 1990 כאשר ראו שאם משתמשים בפרומוטור חזק מדי, לא מתקבל ביטוי בכלל. בתוך התאים קיים מנגנון שבודק אם ה-RNA לא טוב או שיש יותר מדי ממנו ואז מפרקים אותו לאחר סימון מיוחד. המנגנון הזה נועד להוריד טרנספוזונים שקטים, כדי להגן כנגד וירוסים ולבקרה גנטית.

התהליך מתחיל עם החלבון Dicer, שתפקידו לחתוך את ה-RNA הדו-גדיליים לחתיכות המכילות 21 נוקלאוטידים על שני הגדילים. בצמחים הגדילים האלו מוכפלים בעזרת פולימראז מיוחד. בשלב הבא (Effector step) מצטרף קומפלקס חלבוני שנקרא RISC activation והוא מכניס לתוכו את הגדיל הקטן ויודע לבחור את הגדיל שמתאים לו מבין השניים. הוא מתחבר למקום המתאים ב-RNA וגורם לפירוק שלו. בצורה הזו הוא יודע לזהות גן תקול ולפרק אותו.

מנגנון ה-RNA interference - מנגנון שעובד לאחר השעתוק, ומשתמש בכלים טבעיים ובגדילים קטנים של RNA.

גדילים של miRNA נוצרים מגנים קצרים מאוד שמסוגלים להתקפל לצורה של stem & loop כך שה-dicer יחתוך אותו במקומות ספציפיים עבור ה-RISC באותה צורה כמו קודם. בנוסף, הם נקשרים ל-3' UTR וקובעים שליחה לדגרגציה. זהו מנגנון נוסף לבקרת ביטוי בעזרת גנים אחרים שמבוקרים ע"י פרומוטורים והם מבקרים את הבקרה של גנים ספציפיים. החלבון Argonaute נקשר ל-mRNA ול-miRNA והוא זה שקובע את הספציפיות והוא זה שבודק אם נוצרים קשרי מימן מתאימים.

גדילים של siRNA משפיעים גם על מבנה ההטרוכרומטין. הם מסוגלים להיקשר לפולימראז ובכך לגרום לו לעבור מתילציה להיסטונים בגן המסוים ולמנוע את התעתוק שלו. הם נוצרים מאותו RNA שאותו הם יפרקו, בניגוד ל-miRNA.

השוואה בין siRNA ו-miRNA

miRNA	siRNA	
<ul style="list-style-type: none"> אתר גנומי אחר, לא זה שיפורק. 	<ul style="list-style-type: none"> mRNA. טרנספוזונים. וירוסים. DNA הטרוכרומטי. 	נוצרו מ-
<ul style="list-style-type: none"> פרקורסורים שנוצרים ממבנים מקומיים של hairpins. נוצרים מצד אחד של ה-hairpins. שמורים בין יצורים שונים כשהם עובדים על אותה המטרה. 	<ul style="list-style-type: none"> מולקולות ארוכות של dsRNA או מ-hairpins ארוכות מולקולות רבות של siRNA שנוצרו משני הגדילים כמעט ולא שמורים 	מעובדים מ-
<ul style="list-style-type: none"> זמני ומותאם לאותה רקמה. מבקרים את הביטוי הגנטי ברמת ההתפתחות. גן מבקר גנים אחרים. 	<ul style="list-style-type: none"> לא ספציפי. משתיק את אותו הגן ממנו נוצר 	דפוס ביטוי

תרגולים

Molecular Cloning & DNA libraries

שיבוט – העברה של מקטע DNA מאורגניזם אחד לאלמנט גנטי המסוגל להכפיל את עצמו כמו פלסמיד.

מה נחוץ לפלסמיד?

1. אתר התחלת שכפול (ORI).

2. סמן סלקציה (עמידות לסוגי אנטיביוטיקה).
3. אתרי רסטריקציה יחודיים (MCS – Multi Cloning Site).
4. פרומוטור לביטוי הגן המשובט (אופציונלי).

שלבי השיבוט

1. בידוד מקטע ה-DNA הרצוי בעזרת PCR ואנזימי רסטריקציה.
2. ליגציה – חיבור המקטע למולקולת נשא.
3. טרנספורמציה – החדרת המולקולה הרקומביננטית לתאי פונדקאי ע"י חשמל או heat shock.
4. סלקציה – בחירת התאים הפונדקאים המכילים את המולקולה המבוקשת (גידול על מצע המכיל אנטיביוטיקה).

אנזימי רסטריקציה – חותכים DNA דו גדילי בין קשרי הפוספט, כאשר כל אנזים מותאם לרצף מסוים (4 או 6 בסיסים, לרוב פלינדרומי). החיתוך יכול להשאיר קצוות דביקים או מיושרים (Blunt ends).

ספריות DNA

ספריות גנומיות - מכילות מקטעי DNA רבים ממקורות שונים, אולם אותו סוג תאים. הם ארוזים בתוך בקטריות ומשתמשים בהם כדי לבצע שכפולים רבים של אותם גנים. הספרייה לא תלויה בסוג הרקמה, בשלב ההתפתחותי או בתנאי הסביבה. ניתן לקבל בה חזרות ומקטעים חופפים. כדי ליצור ספרייה, מפיקים DNA מרקמה ולא מתא בודד. מפרידים את ה-DNA מהגרעינים וחותכים אותו בסוניקציה (גלי קול) ליצירת blunt ends. כל המקטעים החתוכים מוכנסים לפלסמידים (כל פרגמנט בפלסמיד משלו).

ספריית cDNA – נוצרת מ-DNA קומפלמנטרי שמבוסס על mRNA. מזהים את ה-mRNA לפי זנב הפולי-A, יוצרים cDNA בעזרת אנזימי RT ומוסיפים פרומוטור שיאפשר ביטוי של הגנים. הספרייה מכילה רק רצפים שמבוטאים בתא ותלויה בסוג הרקמה, בתנאי הסביבה ובשלב ההתפתחות. משתמשים בספריות cDNA כדי להשוות בין רקמות, בין רמות ביטוי של גנים מסוימים ולגלות חלבונים בעלי תפקידים ספציפיים.

ריצוף DNA

שיטת Sanger – כדי לרצף DNA משתמשים בתבנית של DNA, פריימר לתחילת הסינתזה, הרבה dNTPs (להוספת עוד נוקלאוטידים) ומעט ddNTPs (לעצירת הסינתזה ולסימון כדי לדעת מה הרצף המתקבל). את הסיגנל שמתקבל מה-ddNTPs המסומנים בצבע פלואורסנטי מכניסים למחשב שמזהה את הרצף. בקצוות מתקבל רעש שלא מאפשר לקרוא בצורה טובה (בגלל הצטברות של בנדים בקצוות הג'ל).

בשיטה הזו יש 3 בעיות מרכזיות: היא מוגבלת לריצוף מקטעים בגודל 750bp~, דורשת לדעת את רצף ה-DNA במספר אזורים על המקטע תחת ריצוף כדי לתכנן פריימרים ולא ניתן לנצל מקטעים מרוצפים כפריימרים כי הדבר לוקח הרבה זמן.

שיטת Shotgun – השיטה העיקרית היום לריצוף.

שוברים את הגנים בצורה אקראית באמצעות סוניקציה ומריצים בג'ל. בוחרים פרגמנטים בגודל של 1.6-2.0bp ובונים מהם ספרייה חוזרים על התהליך כמה פעמים עד שמכסים את הגנום המלא של היצור. לאחר מכן מבצעים PCR וריצוף לפי פריימר שנמצא על הווקטור ולא על האינסרט, ובסיום מכניסים למחשב שמחבר את הרצפים (קונטיגים) לפי התאמה ביניהם. קיימים 2 סוגים של פערים בין הקונטיגים:

1. **Sequence gaps** – מרווחים של רצפים שנמצאים במאגר אבל לא הצליחו למקם אותם בקונטיג. כדי לסגור אותם מבצעים PCR כאשר הפריימרים נמצאים בקצוות של הקונטיגים ואם יש תוצר בין 2 פריימרים, הפער נסגר.
2. **Physical gaps** – שייכים לרצפים שחסרים ולא נמצאים בספריה (יכול להיות שהם הורגים את החיידק הנושא או שווקטורים מסוימים דוחים אינסרטים מסוימים). כדי לסגור את הפער בונים ספריה נוספת עם וקטור אחר ואז מבצעים את ההשלמה. מגיבים את כל הפריימרים עם כל הספריה ואם 2 פריימרים הגיבו באותו מקום, מבצעים PCR ובודקים אם הם ביחד.

כדי לרצף את הגנום האנושי, השתמשו בשתי שיטות שונות:

1. חיבור פזלים קטנים ואחר כך ביניהם (איטי אבל פחות בעייתי).
2. חיבור פזל אחד גדול אחרי הפרדה של כל הגנים למקטעים קטנים (מהיר אבל בעייתי).

מוטיבים

הגדרה - מוטיבים הינם תבניות נוקליאוטידים (או חומצות אמינו) אשר חוזרות על עצמן במקומות שונים בגנום (או בחלבונים שונים). הם בדרך כלל קצרים (3-20aa, 6-20bp), פונקציונליים ושומרים באבולוציה. אם הם מופיעים באזורים לא מקודדים, הם בדרך כלל משמשים כאלמנטים רגולטורים (כמו פרומוטורים), ואם הם מופיעים באזורים מקודדים, הם באים לידי ביטוי ברמת החלבון (אתרים פעילים).

Microarrays

הגדרה - טכנולוגיה המאפשרת ביצוע של מאות ניסוי היברידיזציה בו-זמנית. במיקרו-מערכים שמים על פרום מולקולות של DNA והם עוברים היברידיזציה עם mRNA המסומן פלואורסנטית. קיימות שתי שיטות עיקריות:

- **Microarray on slide** – כדי להכין את דוגמת ה-DNA, מבודדים מולקולה של DNA או של RNA (עדיף cDNA כי הוא יותר יציב) וביצוע PCR עם סימון פלואורסנטי של המולקולות. כדי ליצר את ה-microarray לוקחים DNA גנומי ומבצעים עליו PCR. תוצרי ה-PCR מודבקים על ה-slide והם יהיו ה-probes בניסוי (מסומנים פלואורסנטית). מבצעים היברידיזציה של הדוגמיות וה-microarray בעזרת רובוט, מנרמלים את התוצאות לצורך השוואה ומנתחים. ניתן לקבוע בשיטה הזו רק כמויות רלטיביות בין 2 דוגמאות. השיטה הזו זולה וקל להשתמש בה.
- **Microarray on a chip** – משתמשים בטכנולוגיה ש"מדפיסה" נוקליאוטידים על גבי צ'יפ. מדפיסים כ-25 שכבות של DNA בעזרת אור (שיטה פוטוליתוגרפית). כל chip מכיל חצי מיליון ספוטים, כאשר כל ספוט מכיל מאות פרובים באורך של 25 נוקליאוטידים, דבר המגביר את הספציפיות. עבור כל מיקום בצ'יפ, יש מיקום מקביל עם מוטציה נקודתית, וההיברידיזציה הספציפית נקבעת ע"י חישוב ה-perfect match פחות ה-mismatch. הערכים הנקבעים הינם אבסולוטיים ולכן היא טובה יותר אולם היא יקרה יותר.

שימושים לשיטה

- השוואה של ביטוי גנים בין תאים ורקמות.
- חקירת ההתפתחות.
- השוואה בין גורמים סביבתיים או כימיים.
- השוואה של ההשפעה של חיידקים על תאים.

Two hybrid system

הרעיון המרכזי בשיטת two-hybrid system הוא לקשור גן מדווח שנקשר לפקטור שעתוק במעלה הרצף המבוקש. היא מבוססת על העובדות שהפולימראז לא נקשר בצורה ישירה לפרומוטור ושלאקטיבטורים יש שני דומיינים פונקציונליים. פולימראז פרוקרוטי לא יודע לזהות בעצמו את

הפרומוטור ולכן יש צורך בפקטורי שעתוק. הפקטורים מייצבים את הפולימראז על הגדיל ומאפשרים לו להיקשר בצורה הטובה ביותר ולהתחיל את השעתוק. לפקטור שעתוק יש שני דומיינים: אחד שנקשר לרצף פרומוטור ספציפי (BD), ושני שנקשר לפולימראז ומייצב אותו על ה-DNA (AD). שתי תכונות חשובות של פקטורי השעתוק:

- שני הדומיינים לא חייבים להיות על אותו חלבון. אם נפריד אותם פיזית, הוא יוכל להתבטא באופן עצמאי ולתפקד כמו שצריך.
- הדומיינים ידעו להיקשר לאתר היעד שלהם, אבל לא יוכלו להפעיל ללא השני את כל התהליך.

אנחנו רוצים לזהות קומפלקס חלבוני של פקטור שעתוק ולנסות למצוא קשר בין החלבונים. אנחנו קושרים חלבון אחד ל-BT וחלבון אחר ל-AD ומנסים להפעיל את המערכת. אם המערכת פועלת, סימן ששני החלבונים התחברו. השיטה פועלת רק בשמרים, כי זה הכי קל ופחות מסובך. חייבים להשתמש בשמר מסוים עם BD לפרומוטור מסוים שגורם להפעלה של גן מדווח.

כדי לבצע שיבוט לוקחים גן שאותו רוצים לחקור. לאחר מכן, חותכים פלסמיד ליד רצף של BD ופותחים אותו. מכניסים את הגן האנימלי. חשוב לבדוק שמסגרת הקריאה נשמרת מבצעים את אותו הדבר גם עבור ה-AD ומגדלים שמר שיודעים שיגדל עם שני הפלסמידים האלו ביחד ומשתמשים בפרומוטור חיידיקי-שמרי חזק (שמתבטא בכמות גבוהה). רק שמרים שקיבלו את שני הפלסמידים יגדלו (הם מבטאים את שני הגנים ויכולים לגדול על המצע).

השיטה טובה כדי לייצר ספריה של פלסמידים שאליהם הוכנסו BD. אם חוקרים חלבון מסוים ורוצים לבדוק אם הוא AD, משתמשים בספריה ובודקים אותו מול השמרים (השמר לא ישרוד אם לא תתרחש אינטרקציה בין החלבונים. כדי לדעת איזה חלבון התחבר לאיזה חלבון, מוסיפים עמידות כנגד חיידיקים מסוימים.

יתרונות השימוש בשיטה

- מאפשר זיהוי, אפיון ומניפולציה של הקישור בין שני החלבונים.
- מגלה קשרים in vivo.
- גם קשרים זמניים ולא יציבים מתגלים.
- לא מושפע מרמת הביטוי הטבעית של החלבונים.

חסרונות השיטה

- הביטוי כ-fusion protein עלול להפריע לאינטראקציות התלויות בקונפורמציה וקיפול נכון של החלבונים הנבדקים.
- רק 2 חלבונים נבדקים בו זמנית - לא יימצאו קשרים התלויים בקואופרטיביות.
- האינטראקציה מתבצעת בגרעין - חלבונים רבים לא יהיו בסביבתם הטבעית.
- מגלה קשרים אפשריים בלי קשר למצב הפיזיולוגי.
- במידה והאינטראקציה תלויה במודיפיקציה שמתרחשת בתא האנימלי ולא בשמר לא נוכל לראות אותה.

אלמנטים רגולטורים

Trans factors – חלבונים שמבקרים ביטוי גנים.
Cis elements – רצפי DNA ספציפיים שקושרים את פקטורי ה-trans. אלמנטי cis- וה-trans יכולים לתפקד כמעכבים או כמשפעלים, יכולים להיות ספציפיים או כללים.

כדי לזהות cis elements מקצצים חלקים מהפרומוטור ומשווים את רמת הביטוי. כשמזהים שרמת הביטוי יורדת, יודעים שהסרנו אלמנט רגולטורי.

כדי לזהות חלבון שקשור ל-DNA מסנתזים את הרצף החשוד שמכיל אלמנטים ולסמן אותו רדיואקטיבית. מערביים אותו עם החומרים הדרושים לפעילות בתא ומקבעים בעזרת קרינת UV. החלבונים שנקשרים ל-DNA נצמדים אליו חזק בקשר קוולנטי (בגלל הקרינה) ואז ניתן לראות מי נקשר לרצף. לאחר מכן מריצים בג'ל וככל שהפקטור גדול יותר, החלבון גדול יותר ואז צריך לנקות בעזרת קולומה של ריכוזי מלח להפרדה.

שיטה נוספת לניקוי חלבונים משתמשת באפיניות של הקשירה בעזרת שני שלבים: בהתחלה משאירים רק את החלבונים שקשורים ל-DNA ואחר כך משאירים רק את החלבונים שנקשרים לרצף הספציפי. מבצעים זאת בשני שלבים כדי לא לקבל רעש.

כדי להעשיר מוטיבים משתמשים בשתי שיטות שונות:

- **SELEX** – מעלים את ריכוז המלח כדי להפריד בין רצפים ספציפיים ללא ספציפיים. מבצעים את זה מספר סיבובים עד שנקבל רק את הרצוי. שיטת *in vitro*, קלה להכנה אבל דורשת כמויות גדולות של החלבון.
- **ChIP on chip** – מדביקים חלבונים ל-DNA ואז מפרקים אותו בעזרת סוניקציה למקטעים בגודל של 1000bp. מפרידים את החלבונים הספציפיים ע"י נוגדן וקובעים את הקונצנזוס. שיטת *in vivo*, צריכה נוגדן ספציפי שייקשר לחלבון (לא קל להכין) ודורש תאים חיים.

שיטות RNA

Mapping transcription start site (TSS)

רוצים לזהות את ה-5' UTR היות והוא מכיל אלמנטים רגולטורים שמשפיעים על התרגום ועל יעילותו. מבנים שונים ב-RNA יכולים לעכב תרגום או שחלבונים ייקשרו לאזור ויגרמו לפירוק ה-RNA. כל השיטות משתמשות ב-S1 Probe שמכיל חלק מה-ORF וה-UTR. משתמשים בנוקליאז ל-S1 שאוכל את כל מה שלא עבר היברידיזציה ואז מודדים את הפרוב ע"י הרצה בג'ל והשוואה בין האורכים. לאחר מכן מאריכים את הפריימר בעזרת RT. מכאן יש מספר שיטות:

1. **RACE** – משתמשים בפריימר ספציפי על ה-mRNA. מוסיפים אדפטור לרצפים שמתאימים לנו ולהם מבצעים PCR. היתרון של השיטה הוא שלא צריך להשתמש במקטעים מסומנים והרצות בג'ל. מצד שני, השיטה לא יעילה כי ה-RT יכול ליפול בדרך.
2. **שיפור של RACE** – מסמנים את ה-RNA ומקבלים רק cDNA ספציפי ורצוי.
3. **SMART RACE** – משתמשים ב-RT של הווירוס MMLV שמוסיף 3 בסיסים של C לפני שהוא נופל ואז ניתן להוסיף אדפטור שיתאים בצורה הכי טובה.

mRNA translation analysis

הפרופיל הריבוזומלי של התא מראה על קצב פעילות התא. מפרידים את ה-RNA לפי כמות הריבוזומים שעליו בעזרת גראדיאנט סוכר.

RNA interference

הגדרה – בקרת תרגום שנעשית ע"י RNA דו גדילי שמעכב mRNA ע"י פירוק. בניסוי שנערך ב-1990 ראו שעודף ב-mRNA לא תורם והוא מפורק. מטרת הניסוי הייתה להוריד את רמת הביטוי של הגן.

המכניזם של RNA interference – וירוס מחדיר dsRNA לתא. הוא מזוהה ע"י ה-dicer שחותך אותו לחתיכות קטנות של siRNA באורך של 21-25 נוקליאוטידים. קומפלקס ה-RISC מזהה את ה-antisense ומפריד בין הגדילים. הוא מחפש את כל ה-mRNA ההומולוגיים וגורם להם להתחבר ביחד, וזה גורם להם להישלח לדגרגציה.

קיימות 2 שיטות ליצירה של siRNA:

- **Oligos** – סינתזה של sense ו-anti sense בתא (דו גדילי). משתמשים בשני פרומוטורים של פולימראז 3 וזה גורם לשעתוק של שני הגדילים שעוברים אחר כך היברידיזציה. בשיטה הזו לא ניתן לבקר את הכמות שהוכנסה ביעילות.
- **Plasmid** – שמים את הגדיל על פלסמיד ומשעתקים את 2 המקטעים ביחד כאשר מוסיפים ביניהם אזור שיגרום להם להתקפל אחד על השני אחר כך.

miRNA

מנגנון רגולטורי דומה שנוצר באופן טבעי בגוף ע"י פולימראז 2 (בניגוד ל-siRNA שמקורם מחוץ לגוף) והעקרונות שלו זהים לאלו של ה-siRNA. הם מופיעים בתהליכי גדילה, אחראים למבנה הגנום ומשתתפים ברגולציה של התעתוק והתרגום. הם לא יוצרים זיווג בסיסים מושלם עם המטרה, דבר שמעלה את היכולת לקשור אבל הזיווג לא מושלם.