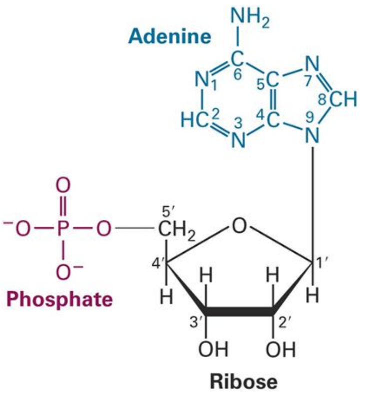
מבנה ה-DNA

הנוקליאוטיד:



מרכיביו של ה-DNA הם נוקליאוטידים, הם בנויים מ-3 מרכיבים: בסיס חנקני, מולקולת פוספט ומולקולת סוכר המקשרת בין שניהם.

נוקליאוזיד: חלק מן הנוקליאוטיד- רק הבסיס והסוכר.

המספור של האטומים במולקולת סוכר מסומן ע"י טאגים מעל המספר כדי להבדיל ממספור האטומים בבסיס החנקני.

קיימות שתי קבוצות של בסיסים:

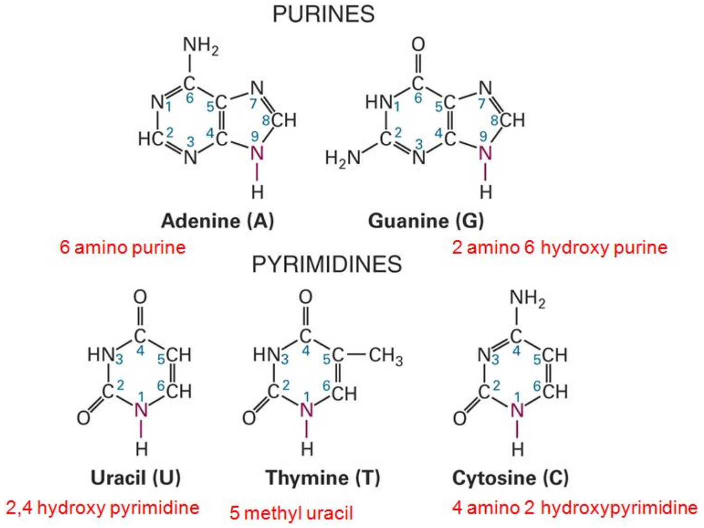
פירימידינים: בנויים מטבעת אחת בעלת 4 פחמנים ושני חנקנים.

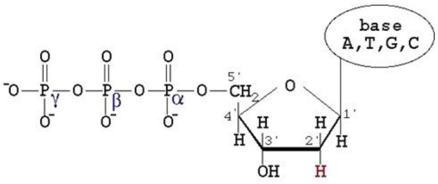
פורינים: בנויים משתי טבעות, מחומשת ומשושה.

הסוכר ב-DNA: דיאוקסי-ריבוז (יש H במקום OH בעמדה 2).

הסוכר ב-RNA: ריבוז.

קשר גליקוזידי: הקשר בין הבסיס לסוכר.





בתא שורר pH ניטראלי וזאת בעקבות ריאקציות בופר רבות המקבעות את ה-pH, אך יש אזורים בעלי pH שונה. הפוספאט טעות במטען שלילי ב- pHפיזיולוגי ולכן ה-DNA טעון במטען שלילי ולכן הנוקליאוטיד הוא חומצה (מוסר H^+).

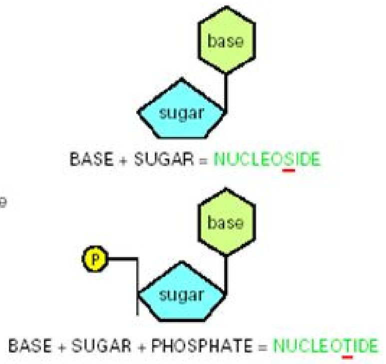
לפי מספר הפוספאטים ישנם שמות שונים למולקולות:

NOMENCLATURE The names can be confusing, but the abbreviations are clear.

BASE	NUCLEOSIDE	ABBR.
adenine	adenosine	A
guanine	guanosine	G
cytosine	cytidine	C
uracil	uridine	U
thymine	thymidine	T

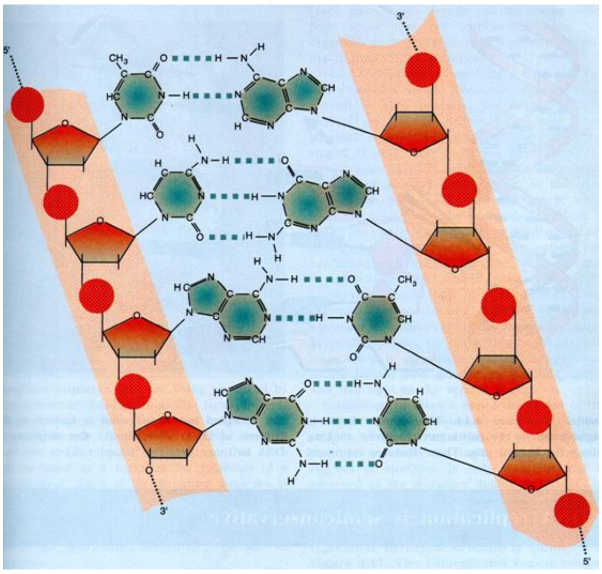
Nucleotides are abbreviated by three capital letters. Some examples follow:

AMP = adenosine monophosphate
dAMP = deoxyadenosine monophosphate
UDP = uridine diphosphate
ATP = adenosine triphosphate



©ענת עציון

מבנה ה-DNA:



ה-DNA הוא דו-גדילי: שתי שרשראות ארוכות של סוכרים המחוברות לפוספאטים.

back-bone: השרשראות של הסוכרים.

ל-back bone יש כיווניות: מפחמן '5 לפחמן '3.
שתי השרשראות הן בכיוונים הפוכים אחת לשנייה: **antiparallel**. זוגות הבסיסים מחוברים זה לזה בעזרת קשרי מימן:

G ו-C יוצרים 3 קשרי מימן.

A ו-T יוצרים 2 קשרי מימן.

קשרי המימן מייצבים את המבנה.

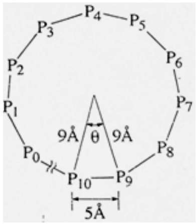
קשר פוספו-דיאסטרי: הפוספט יוצר קשר אסטרי- בין פחמן לחמצן. מחובר לפחמן בעמדה 5 מלמטה ולפחמן בעמדה 3 מלמעלה.

כלל צ'רגרף: מספר ה-A שווה למספר ה-T.
מספר ה-G שווה למספר ה-C. מספר ה-A לא שווה למספר ה-G.

הערה: על גדיל אחד כמות ה-A לא בהכרח שווה לכמות ה-T.

לפי כלל זה, הזיווג הוא פורין-פירימידין. לפי הקוטר של המולקולה ווטסון וקריק יכלו לדעת מהו חיבור הבסיסים: A עם T ו-G עם C. (הקוטר צריך להיות זהה בשני סוגי החיבורים).

מולקולת ה-DNA היא אמפיפאטית: הפוספט טעון שלילית והידרופילי והבסיסים הם הידרופוביים. ולכן 2 מולקולות אמפיפטיות (סליל כפול) נוטות ליצור קשר ביניהן כדי להימלט ממים.

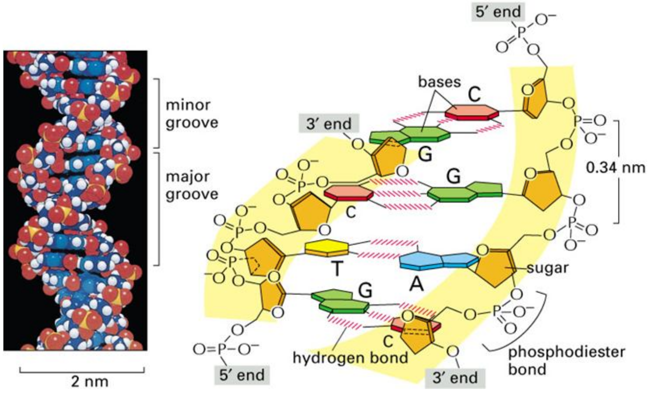


סיבוב שלם: נחוצים 10.5 בסיסים כדי להשלים סיבוב שלם של ה-DNA (360 מעלות).

שאלה: יש 10 בסיסים שיושבים אחד מעל השני. אם לוקחים מולקולה קטנה שמסוגלת להיכנס בין 2 זוגות הבסיסים וגורמת להרחקה בין הזוגות, כמה זוגות בסיסים צריך כדי להשלים סיבוב?

תשובה: הזווית בין זוגות הבסיסים קטנה ולכן צריך יותר בסיסים כדי להשלים סיבוב.

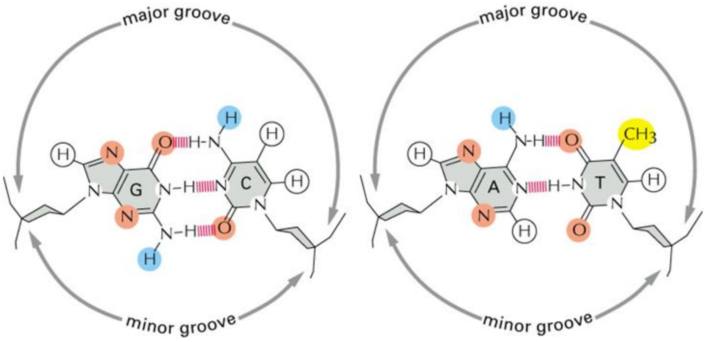
מבנה מרחבי:



מבחינה מרחבית- הבסיסים מאונכים או כמעט מאונכים לציר ההליקס. מבנה זה קרוי: B-DNA.

בכל נקודה על-גבי ה-DNA יש מצד אחד minor groove ומהצד השני major groove והם מתחלפים ביניהם ביחד עם סיבוב ה-DNA.

ל-DNA נקשרים הרבה מאוד חלבונים באזור ה-major groove כי: יש שם יותר מקום וגם כי יש שם מגוון רב יותר של קבוצות אטומים ולכן אתרי קשירה ספציפיים רבים יותר.



הסוכרים לא נמצאים בזווית של 180 מעלות אחד כלפי השני, וזה יוצר שני צדדים שאינם זהים ב-DNA.

כל זוג הוא ב-34 מעלות הטייה ימינה מהזוג הקודם.

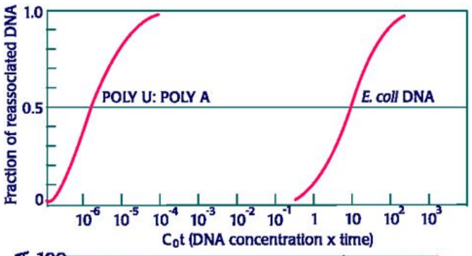
©ענת עציון

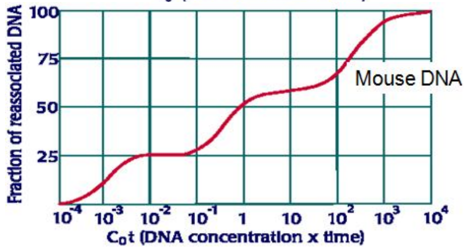
הרכב הגנום:

% ה C-G משתנה בין אורגניזמים שונים. כשיש יותר G-C, זיווגי הבסיסים יותר חזקים (כי אלה 3 קשרי מימן לעומת 2) וזה אולי מאפשר חיים בסביבות יותר קיצוניות.

Table 3-2 Data Leading to the Formulation of Chargaff's Rules

Source	Adenine to Guanine	Thymine to Cytosine	Adenine to Thymine	Guanine to Cytosine	Purines to Pyrimidines
Ox	1.29	1.43	1.04	1.00	1.1
Human	1.56	1.75	1.00	1.00	1.0
Hen	1.45	1.29	1.06	0.91	0.99
Salmon	1.43	1.43	1.02	1.02	1.02
Wheat	1.22	1.18	1.00	0.97	0.99
Yeast	1.67	1.92	1.03	1.20	1.0
Hemophilus influenzae	1.74	1.54	1.07	0.91	1.0
E-coli K2	1.05	0.95	1.09	0.99	1.0
Avian tubercle bacillus	0.4	0.4	1.09	1.08	1.1
Serratia marcescens	0.7	0.7	0.95	0.86	0.9
Bacillus schatz	0.7	0.6	1.12	0.89	1.0





מורכבות הגנום נבדקה ע"י מדידת הקצב שבו שני גדילים עוברים היברידיזציה.

ככל שהרצפים מורכבים ומגוונים יותר, אז הגרף ינוע ימינה כי הזיווג של הבסיסים ייקח יותר זמן.

לגנום של יצורים עילאיים יש מעין 3 גרפים בגרף אחד, כלומר: ישנם 3 סוגי מורכבות של הגנום.

<u>מורכבות נמוכה:</u> רצפים קצרים עם הרבה חזרות.

<u>מורכבות בינונית:</u> רצפים החוזרים על עצמם הרבה ומקורם מוירוסים שחדרו לגנום.

<u>מורכבות גבוהה:</u> מופיעים פעם אחת או פעמיים, רצפים מאוד ארוכים.

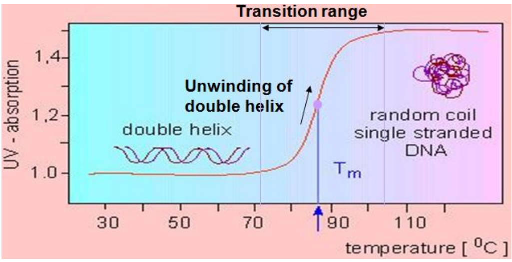
<u>הערה:</u> אין קשר בין מספר הבסיסים ב-DNA לגודל האורגניזם או רמת המורכבות שלו (זו שאלה שמעסיקה חוקרים, מדוע אין קשר כזה).

©ענת עציון

דנטורציה ורנטורציה:

דנטורציה: פירוק קשרי המימן והפיכת הסליל הכפול לשני גדילים נפרדים.

חימום:



גורם לרעידות במולקולה אשר מביאות לתזוזה ולהיפרדות שני הגדילים.

ניתן להבדיל בין גדיל יחיד לשני גדילים לפי בליעה של אור- DNA בולע אור באורך גל 260nm (UV). בליעת האור של ssDNA גבוהה ביותר מ-40% מזו של ה-dsDNA.

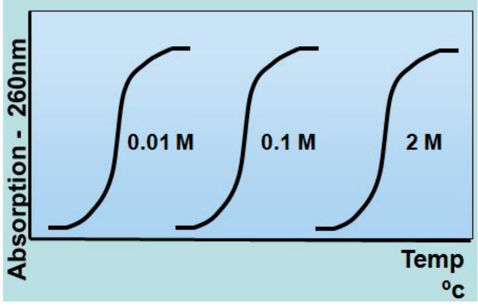
Stacking: האינטראקציה בין זוגות בסיסים סמוכים במישורים מקבילים בתוך מבנה ה-double helix גורם לירידה בבליעה האופטית.

T_m: טמפרטורת ההתכה של מולקולת DNA ספציפית (כאשר 50% כבר במצב חד-גדילי). \

מושפע מיחסי AT:GC, ככל שאחוז ה-GC גבוה יותר, T_m גבוה יותר. עליה של 1% בGC תגרום לעליה ב-0.4 מעלות. ה-T_m תלוי באורך המולקולה **רק** במולקולות קצרות (עד 30~ זוגות בסיסים). ככל שהמולקולה ארוכה יותר, ה-T_m גבוה יותר.

הערה: פתיחת הסליל הכפול נעשית בכמה מקומות בו-זמנית.

חשיפה לריכוזי מלח נמוכים/גבוהים:



קבוצות הפוספט במולקולת ה-DNA טעונות שלילית וגורמות לדחיהה בין שני הגדילים ב-dsDNA.העלאת ריכוז המלח בתמיסה גורמת למיסוך המטענין השליליים ומגדילה את יציבות מבנה ה-Double-helix.

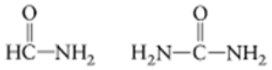
ריכוז המלח בתא: 0.2M~.

הערה: עלייה בריכוז המלח מעלה את ה-T_m.

השפעת שינויי pH:

גם pH בסיסי מאוד (גדול מ-10) וגם pH חומצי מאוד (קטן מ-2.3) גורמים לפגיעה ביכולת ליצור קשרי מימן לייצוב מבנה ה-double helix ובכך נגרמת דנטורציה. pH חומצי יכול לגרום לנזקים לקשר הפוספו-דיאסטרים בסליל ולכן מעדיפים לעבוד עם pH בסיסי.

ריאגנטים:



Formamide Urea

ריאגנטים כמו פורמאמיד, אוריאה ואמוניום (NH4+) מורידים את יציבות ה- dsDNA משום שהם מתחרים עם הבסיסים במולקולת ה-DNA על יצירת קשרי מימן.

רנטורציה: קישור בין שני גדילים קומפלמנטריים.

Nucleation: אזורים קומפלמנטריים נמשכים זה לזה ומתחילים להיווצר אזורים קצרים של סליל כפול. שלב זה הוא **שלב קובע מהירות** ברנטורציה, והוא תלוי בריכוז ה-ssDNA בתמיסה.

Zippering: האזור הדו-סיבי מתפשט באפקט דמוי ריץ'-רץ' ליצירת אזורים ארוכים של dsDNA.

הערה: רנטורציה אופטימאלית תתרחש בטמפרטורה נמוכה ב-20 מעלות מה-T_m.

דנטורציה פשוטה דורשת שינוי בתנאי הסביבה כגון העלאת טמפרטורה או שינוי ריכוז המלחים. שינויים מסוג זה יגרמו לשיבושים בפעילות התא ואף להרס התא במקרים קיצוניים.

תהליכי הפרדה מקומיים של סיבי ה-DNA לצורך הכפלה או תעתוק מבוקרים ומבוצעים ע"י אנזימים ספציפיים שמאפשרים הפרדת סיבים ללא שינוי בתנאי הסביבה.

©ענת עציון

היברידיזציה:

רנטורציה בד"כ מתייחסת לשני גדילים שהיו קודם ביחד וחוזרים להיות מחוברים.

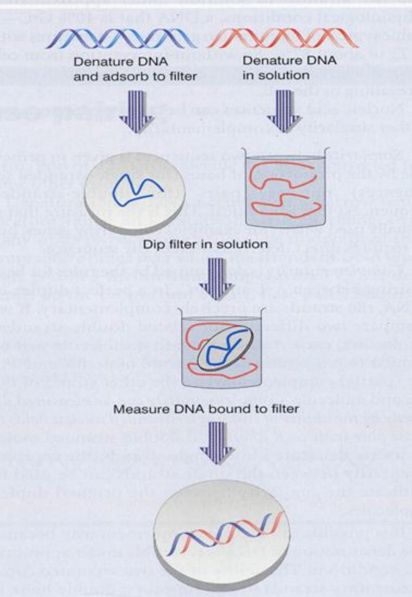
היברידיזציה מתייחסת גם לחיבור שני גדילים משלימים שלא בהכרח היו קודם ביחד.

היברידיזציה על פילטר:

גלאי (Probe): מקטע DNA מסומן (רדיואקטיבי/פלורוסנטי) בעל רצף ספציפי קומפלמנטרי לרצף המטרה. הגלאי משמש לזיהוי רצפים ספציפיים מתוך אוכלוסייה מעורבת של מקטעי DNA או RNA.

היברידיזציה יכולה להתבצע ע"י מבחנה שאליה מכניסים מקטעי DNA וגם מקטע קצר וידוע-probe. את הגלאי סופחים לפילטר (הגלאי טעון שלילית והפילטר טעון חיובית) ואז לאחר היברידיזציה, שלופים את הפילטר החוצה.

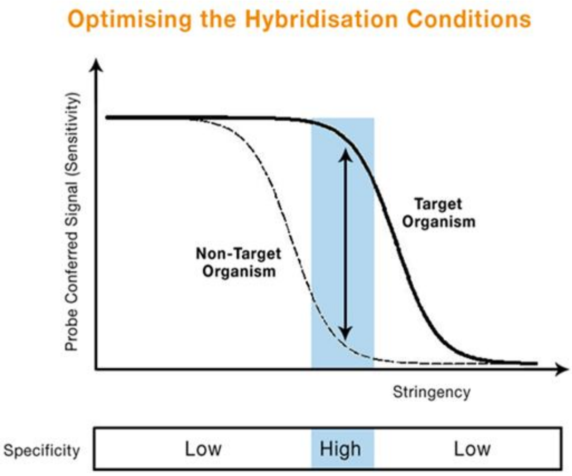
Figure 1.14 Filter hybridization establishes whether a solution of denatured DNA (or RNA) contains sequences complementary to the strands immobilized on the filter.



דרישות לקיום רנטורציה/היברידיזציה:

1. ריכוז מלח מתאים- 0.15-0.5M.
2. טמפרטורה שמחד תאפשר היברידיזציה של ssDNA שאינם בהכרח קומפלמנטריים ב-100% (כי ישנן מוטציות שיכולות מעט לשנות גדילים שבמציאות הם בכל-זאת משלימים) ומאידך תמנע היברידיזציה בלתי ספציפית לחלוטין.

Stringency (מידת החמרה): שליטה על ספציפיות ההיברידיזציה.



טמפ' נמוכה: הספציפיות של הגלאי לכל DNA היא די דומה.

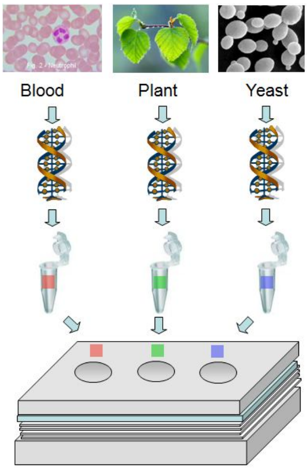
ככל שמעלים את הטמפרטורה הספציפיות ל-DNA משלים עולה עקב חיזוק הקשר ע"י קשרי מימן מתאימים.

טמפ' גבוהה: גם גדילים משלימים לא יתחברו (יעברו דנטורציה).

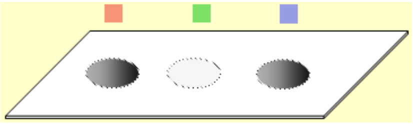
ריכוז מלח גבוה: גם גדילים לא כל-כך מתאימים יתחברו.

Dot Blot:

שיטה ניסויית לזיהוי רצפים ספציפיים של RNA/DNA בדוגמאות היברידיזציה.



1. DNA מופק ממקורות שונים המשמשים להשוואה.
2. ה-DNA הנקי "מוספג" באמצעות דיפוזיה באזורים מוגדרים על-גבי ממברנה. אחרי שה-DNA נספח לפילטר מקלפים את הממברנה.
3. גלאי לרצף ספציפי עובר היברידיזציה עם רצפים משלימים ב-DNA שעל-גבי הממברנה. אם לא קיימים בדוגמה רצפים משלימים לרצף הגלאי אז לא תתרחש היברידיזציה. ואז לאחר שטיפות חושפים את הממברנה לפילם.
4. האזורים אליהם צמוד הגלאי מזוהים וניתן לקבוע באילו מדוגמאות ה-DNA קיימים רצפים משלימים לרצף הגלאי.

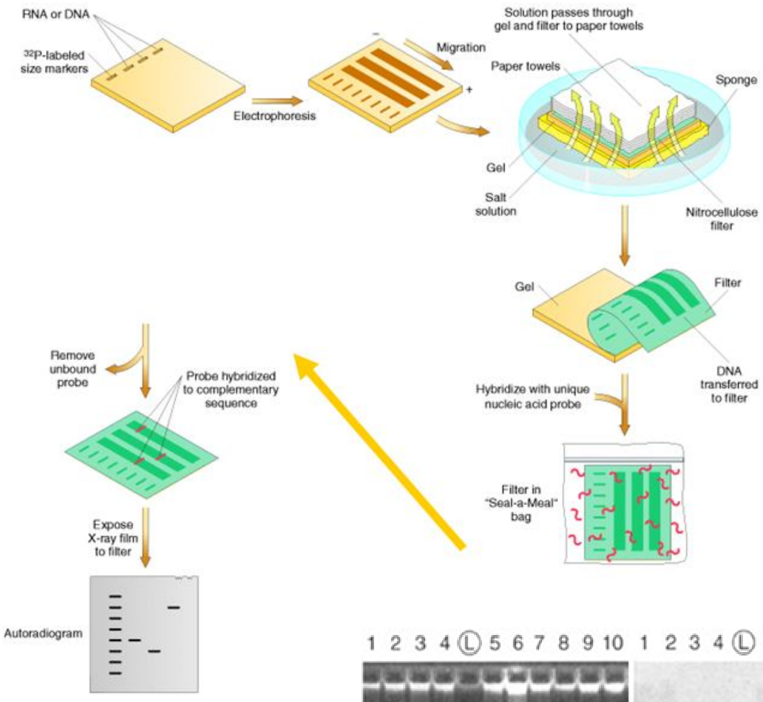


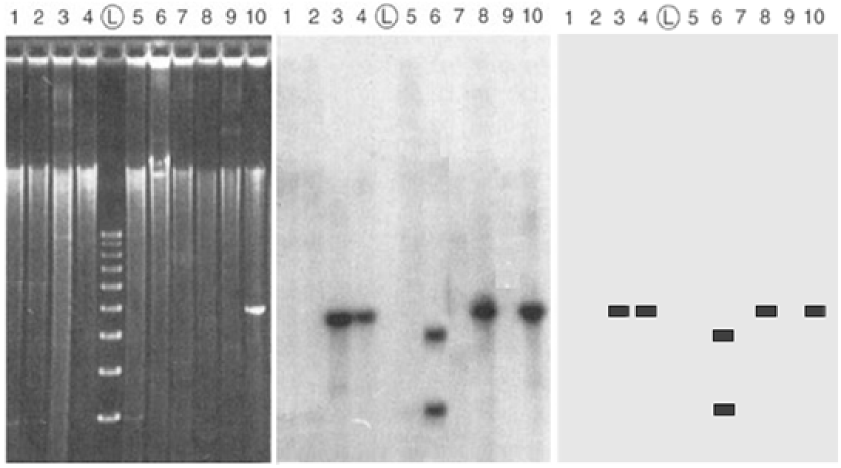
©ענת עציון

Southern blot:

שיטה דומה ל-dot blot. ההבדל בין השיטות: הטיפול ב-DNA לפני.

1. מפיקים את ה-DNA וחותכים אותו ע"י אנזימי רסטריקציה.
2. מריצים את ה-DNA בתוך ג'ל (אלקטרופורזה). מולקולה קצרה תרוץ רחוק יותר ומולקולה ארוכה תישאר יותר בהתחלה.
3. לוקחים את ה-smears מהג'ל ולהן עושים blot-ים. הנוזל לוקח את ה-DNA ומעביר אותו אל הממברנה מהג'ל.
4. מגיבים עם גלאי מסומן.
5. חשיפה לפילם ואנליזה של התוצאות.





על-גבי הג'ל מקבלים מריחה- smear בגלל שישנן הרבה מולקולות DNA בהרבה מאוד גדלים.

FISH:

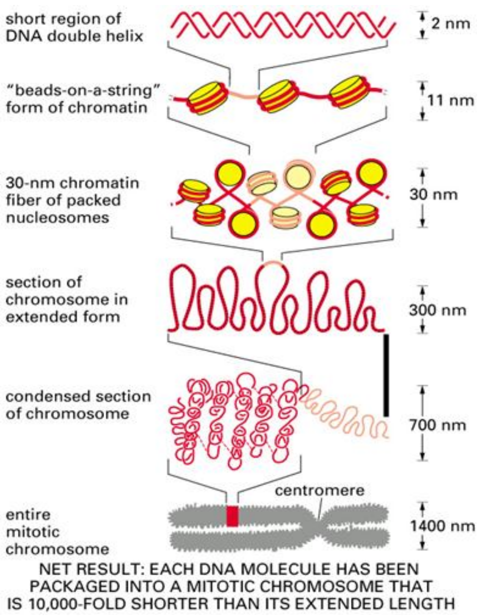
היברידיזציה של גלאי פלואורוסנטי לרצפים שלמים בכרומוזום ארוז שלם.

שיטה זו מאפשרת לעקוב אחר שינויים ברצף ה-DNA בתאי הרקמה ולקבוע אם חלו חסרים או תוספות בחומר הגנטי.

©ענת עציון

דחיסת הכרומוזום:

כל כרומוזום הוא מולקולה מאוד גדולה שיש צורך לדחוס אותה לגודל מאוד-מאוד קטן. כיווץ ה-DNA בגרעין מתרחש במספר רמות.

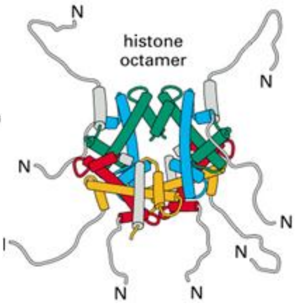


"Beads on a string": הסליל הוא DNA וגם הטבעת מורכבת מ-DNA ומחלבונים שנקראים: היסטונים.

נוקליאוזום: סליל ה-DNA שמקיף פעמיים את ההיסטונים.

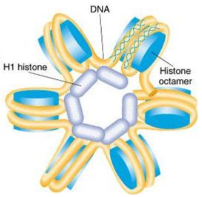
היסטונים: חלבונים די קצרים, ב- pH פיזיולוגי הם טעונים חיובית. חלבונים אלה מאוד נפוצים בתא, וישנם 4 סוגים עיקריים: H_2A, H_2B, H_3 ו-H_4. ובכל-אחד מהם יש בין 102 ל-135 חומצות אמינו. הם מאוד שמורים באבולוציה.

ה-DNA נצמד מסביב לחלבון בצורה טובה וכאשר צריך שה-DNA ינותק מהחלבון לצורך שכפול או תעתוק, החלבונים עוברים אצטילציה והמשיכה שלהם ל-DNA יורדת.



סיב DNA שבו כל "חרוז" הוא נוקילאוזום מורכב מאוקטמר של היסטונים, כלומר: 8 היסטונים-2 מכל סוג ואוקטמר זה הוא ליבת הנוקליאוזום.

סביב הנוקליאוזום יש בערך 146 זוגות בסיסים ובין הנוקילאוזומים יש כ-200 זוגות בסיסים. קיימת דינמיות במיקום הנוקליאוזום, אך יש אתרים מועדפים לליפוף (אתרים הרוויים בזוגות T-A קלים יותר לליפוף מאזורים עם הרבה C-G).



30 nm fiber: הנוקילאוזומים מצויים בסיב הדומה להליקס של נוקילאוזומים: ישנם 6 נוקליאוזומים בסיבוב אחד.

נוקילאוזום H1 קובע את מידת הקומפקטיות. זהו חלבון שמופיע בווריאציות שונות בתאים שונים, זהו סמן חשוב לשוני בביטוי גנים.

300 nm: לפופים מאוד גדולים של ה-30 nm fiber.

1400 nm: הכרומוזומים במהלך חלוקת התא. ברוב חיי התא, רמת כיווץ ה-DNA מסתיימת ב- 30 nm fiber.

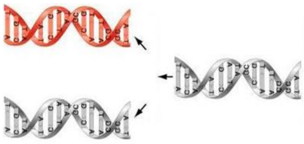
<u>חישוב מספר הנוקליאוטידים ב-50 סיבובים:</u>

50 (# סיבובים) * 6 (# נוקליאוזומים בסיבוב) * 200 (# נוקליאוטידים בנוקליאוזום) = 60,000.

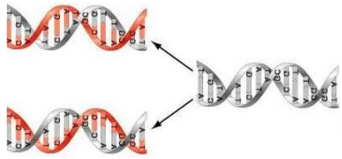
©ענת עציון

שכפול ה-DNA

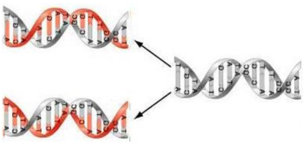
3 מודלים אפשריים לשכפול:



Conservative: כל סיב "אם" משמש כתבנית על-גביה מסונתז סיב "בת" קומפלמנטרי. בסיום התהליך שני סיבי "האם" מתחברים ליצירת סליל כפול אחד ושני סיבי הבת מתחברים ליצירת סליל כפול שני.



Semi-Conservative: כל סיב "אם" משמש כתבנית על-גביה מסונתז סיב "בת" קומפלמנטרי. נוצרים שני סלילים כפולים, שכל אחד מהם מכיל סיב "אם" אחד וסיב "בת" אחד.



Dispersive: כל אחד משני הסלילים הכפולים, המתקבלים בסופו של התהליך, מכיל מקטעים מסיב ה"אם" ומקטעים מסיב ה"בת".

מסלסון ושטהל גילו שזו המודל הסמי-קונסרבטיבי.

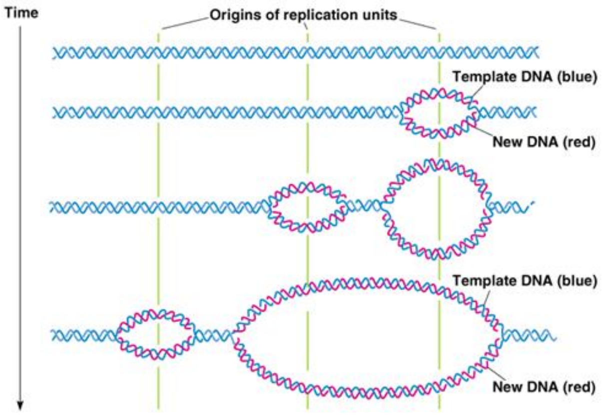
תהליך ההכפלה מתקדם לשני הכיוונים במקביל.

ניסוי שבו התגלה שההכפלה היא דו-כיוונית:

מכיוון שהתקבלו סימנים גם מצד ימין וגם מצד שמאל של מזלג ההכפלה, המסקנה היא: הכפלה דו-כיוונית.

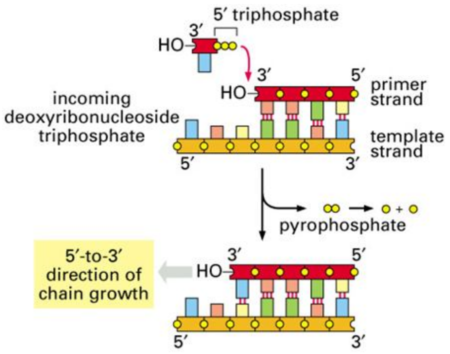
יתרון: השכפול הוא יותר מהיר.

חיסרון: ישנן שתי מערכות שנעות בו-זמנית וצריך פי-2 חלבונים והשקעת אנרגיה וגם צריך לתזמן בין שתיהן.



באאוקריוטים ישנם כמה מקומות בהם מתחיל השכפול, והם לא בהכרח מתחילים ביחד.

היתרון בכך שיש נקודה מוגדרת להתחלה הוא שניתן לתזמן מתי להתחיל את השכפול ובאיזה קצב.



שכפול ה-DNA הוא מכיוון '5 לכיוון '3 של הגדיל המסתנתז.

תוך כדי החיבור משתחררים שני פוספטים.

במהלך סינתוז הגדיל יש התקפה נוקליאופילית של OH על הפוספט.

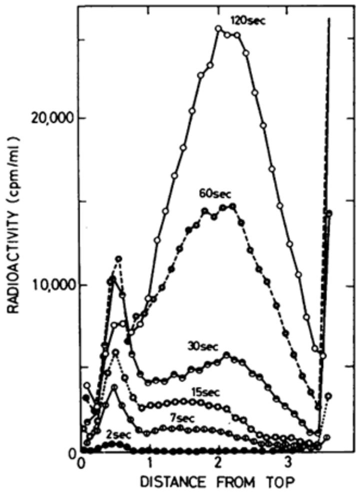
במציאות אין סינתזה של הגדיל התחתון מכיוון '3 לכיוון '5 כי במקרה כזה נזדקק לשני אנזימים שונים לשני סוגים שונים של שכפול.

©ענת עציון

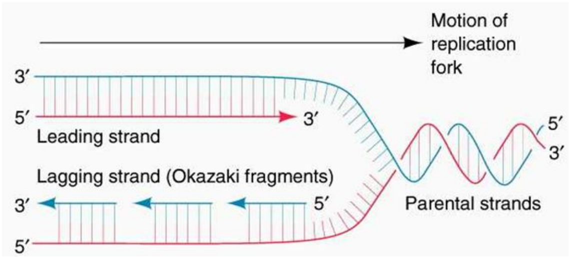
<u>הניסוי של אוקזאקי:</u>

באותו הזמן חשבו ששני הגדילים מתארכים באותו כיוון אבל לא נמצאה פעילות אנזימטית מכיוון '3 ל"5. ולכן אוקזאקי מעלה את ההשערה כי יש הכפלה של מקטעים. ואם אכן ההכפלה בלתי-רציפה, אז נקבל מקטעים קצרים.

המקטעים הקצרים נקראים מקטעי אוקזאקי.



כל מולקולת טמפלייט יכולה לשמש כטמפלייט לגדיל leading (בצד אחד של מזלג ההכפלה) או לגדיל lagging (בצידו השני של מזלג ההכפלה).



<u>הכפלת DNA ב-E.Coli:</u>

E.Coli מכפיל את עצמו כל 20 דקות, אבל לפי הנתונים שכאן, ה-DNA שלו מכפיל את עצמו כל 80 דקות. זה בגלל שתוך כדי ההכפלה (בערך לאחר רבע מהשכפול) מתחיל מחזור נוסף של הכפלת DNA על אותה מולקולה. כך כל חיידק שנוצר מקבל כרומוזום שהוא באמצעו של תהליך ההכפלה.

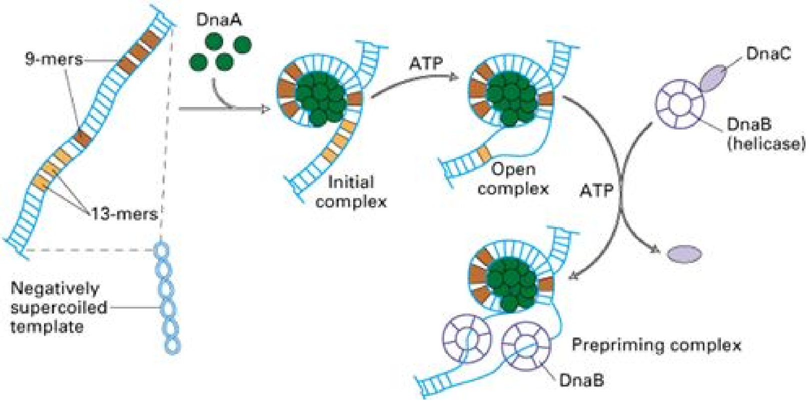
	Replication Process	
	E. coli	Human
DNA content, number of nucleotide pairs per cell	3.9×10^6	ca. 10^9
Rate of replication fork progression, μm/minute	30	3
DNA replication rate, nucleotides/second per replication fork	850	60–90
Number of replication origins per cell	1	10^3–10^4
Hours required for complete genome replication	0.67	8
Hours required for one complete cell division	0.33	24

<u>תהליך השכפול:</u>

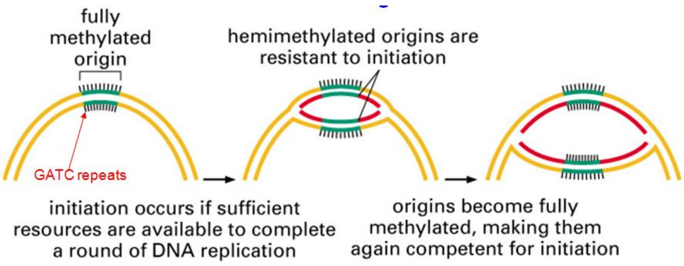
<u>תחילת פתיחת ה-DNA:</u>

ישנו רצף של כ-250 נוקליאוטידים בהם 4 חזרות של 9 נוקליאוטידים (חום כהה) ועוד 3 חזרות של 13 נוקליאוטידים (חום בהיר). הרצפים הללו משמשים כאתר קישור לחלבון DnaA.

הוא נקשר בעיקר לרצפים של החום כהה ויוצר קומפלקס של 20-30 חלבונים. ובשימוש ב-ATP יש כיפוף של ה-DNA ופתיחה ראשונית של הגדיל. הרצפים הללו מכילים הרבה מאוד T-A כי כך קל יותר לפתוח אותם (2 קשרי מימן).

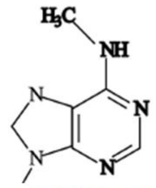


©ענת עציון



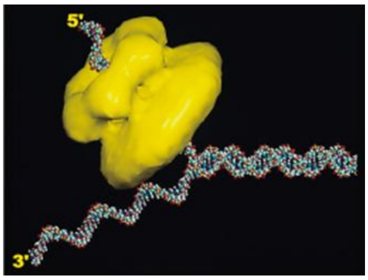
DnaA לא מסוגל להיקשר ל-DNA שלא עבר מתילציה (וגם לא מסוגל להיקשר לגדיל שהוא רק חצי ממותל). רק כאשר המתילציה ב-origin הושלמה, ה-DnaA יוכל להיקשר ודבר זה הוא צוואר בקבוק מבחינת הקצב, זוהי עוד בקרה על קצב השכפול.

המתילציה נעשית ע"י האנזים DAM אשר מוסיף קבוצת מתיל לחנקן בעמדה 6 באדנין.



6 methyl Adenine

האנזים הליקאז:



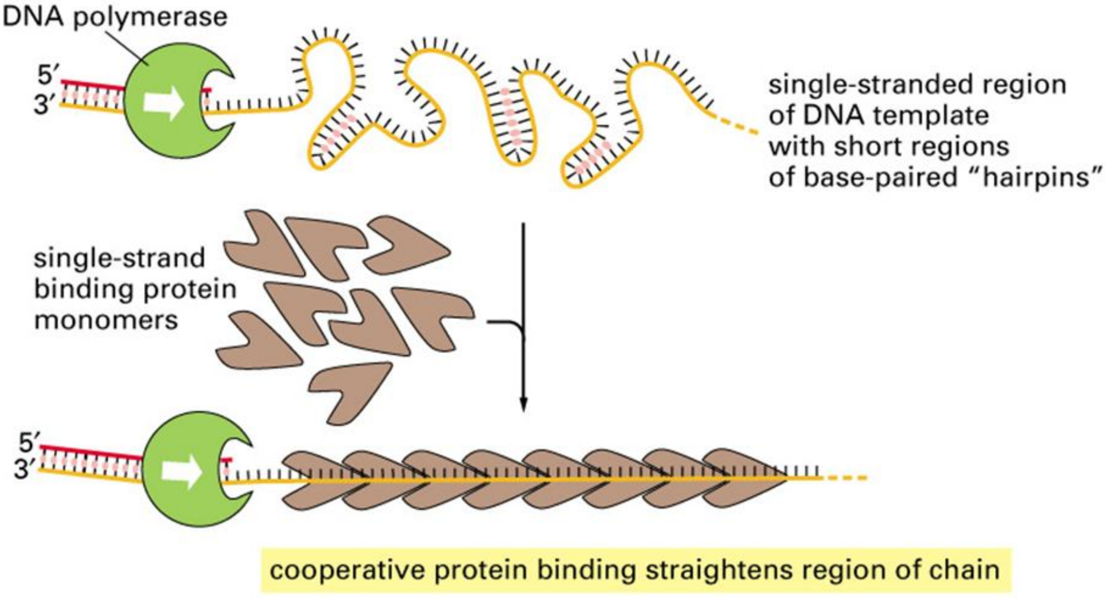
אנזים שצורך ATP לפעילות שלו. הוא בנוי מ-6 תת-יחידות שכל אחת קושרת מולקולת ATP אחת. כל מולקולת ATP עוברת הידרוליזה שגורמת לשינוי מבנ ולסיבוב של ההליקאז.

ההליקאז מסתובב על-גבי ה-DNA ופותח אותו. הוא עובד בד"כ על גדיל ה-lagging שזהו הגדיל האיטי, גם כדי להתאים את השכפול לקצב הסינתזה של האיטי (באופן עקרוני הוא יכול לעבוד על שני הגדילים).

כל תת-יחידה של ההליקאז יוצרת קשרי מימן עם ה-back-bone של ה-DNA וכאשר יש הידרוליזה של ה-ATP, התת-יחידה דוחפת את ה-DNA אליו היא קשורה והוא משתחרר ממנה וכעת היא פנוייה לקשור עוד ATP ועוד DNA.

SSB:

Single Strand Binding Protein. התפקיד של ה-SSB הוא למנוע יצירת מבנים שניוניים בתוך הגדיל.

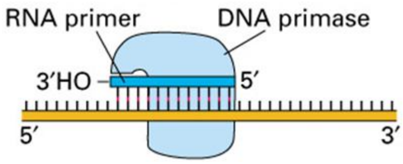


אותו אזור ב-SSB שנקשר לקשר הפוספו-דיאסטרי טעון במטען חיובי. וישנו אזור נוסף המסוגל לעשות אינטראקציה עם SSB שכנים. השלב שקובע את קצב הקישור (השלב קובע מהירות) הוא קישור ה-SSB הראשון. האחרים כבר נקשרים אליו וגם אל ה-DNA השני (שתי נקודות קישור). זהו קישור קואופרטיבי ולכן הם נקשרים מהר יותר.

©ענת עציון

פרימאז:

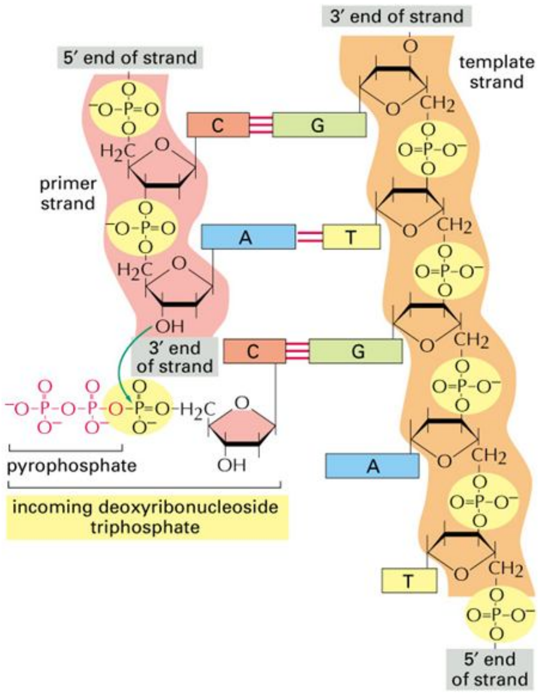
חלבון שמייצר את הפריימר על ה-DNA. הוא מייצר פריימר של RNA. אורך הפריימר 10-20 בסיסים והוא יאפשר לDNA-פלימראז להמשיך את הסינתזה.



הארכת ה-DNA:

האנזים לוקח נוקליאוטיד עם 3 פוספטים, ממקם אותו במיקום אופטימאלי להתקפה נוקליאופילית.

ואז תוך כדי ההתקפה הנוקליאופילית שני פוספטים מתפרקים תוך שחרור הרבה מאוד אנרגיה, והיא זו שמאפשרת לאנזים להמשיך ולהתקדם הלאה.

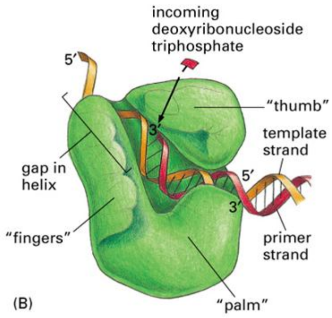


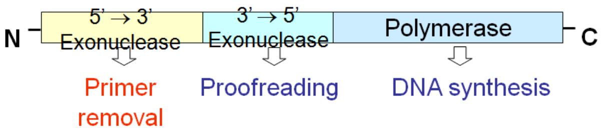
DNA polymerase I:

מבנה האנזים מתואר ככף יד וה-DNA עובר דרכו.

באזור מסוים של האנזים ישנו האתר הקטליטי שבו תתבצע הוספת הנוקליאוטיד. בנוסף לאתר הקטליטי יש אתר proofreading.

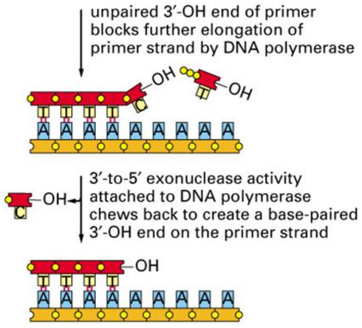
בתוך האנזים קיים שקע שבו מתיישבת קבוצת ה-OH וזה גורם למבנה מרחבי שבו ה-OH של הנוקליאוטיד קרוב ממש לפוספט אותו הוא יתקוף. כאשר אין זיווג בסיסים מתאים, המרחק בין הOH לפוספט אינו אופטימאלי ולכן לא ייווצר קשר ביניהם.



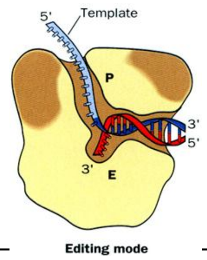


Proofreading:

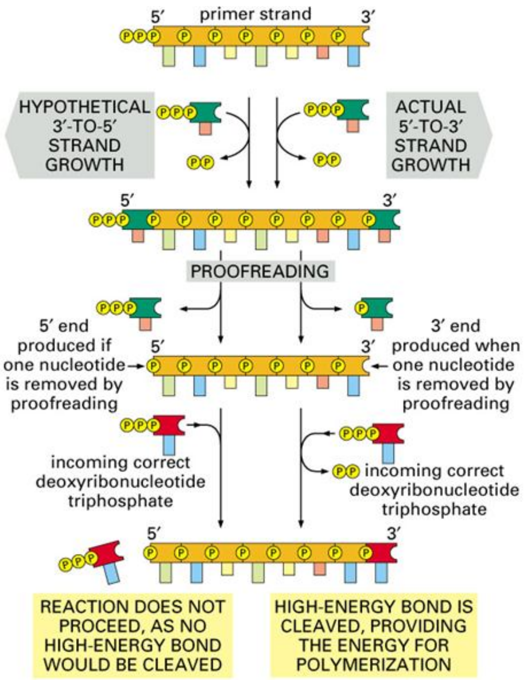
ברגע שהאנזים מכניס נוקליאוטיד לא נכון, הוא מזהה אותו ופשוט מוציא אותו החוצה. ולשם-כך האנזים זקוק ליכולת הוצאת נוקליאוטידים בכיוון הפוך '3 ל-'5. יכולת זו משפרת את הדיוק של האנזים בעוד שני סדרי גודל (טעות פעם ב 10^8).



ישנה הסטה במהלך הסינתזה של האזור שסונתז אל אזור ה-exonuclease באנזים ושם הנוקליאוטיד מתפרק ויוצא החוצה.



©ענת עציון



<u>סיבה נוספת לכך שאין סינתזה מכיוון '3 לכיוון '5:</u>

בצד שמאל- נניח שההארכה הייתה לכיוון השני, אז נשארים 3 פוספטים על הנוקליאוטיד בגדיל שמתארך. ואז אם מתחבר נוקליאוטיד לא נכון, לאחר שהוא מסולק נשאר נוקליאוטיד עם פוספט אחד על הגדיל המשלים ואז האנזים לא יכול להמשיך לסנתז.

אם לא הייתה יכולת proofreading אז לא הייתה בעיה להאריך את ה-DNA גם לכיוון השני.

נוקליאוטיד רגיל שאינו deoxy: נוצר עיוות עקב קבוצת ה-OH הנוספת ואז אין קרבה מספקת ולא נוצר הקשר הפוספודיאסטרי.

נוקליאוטיד di-deoxy: אין OH בעמדה 3 של הסוכה שיכול לבצע התקפה נוקליאופילית ולכן אין הארכה של השרשרת.

בשיטת הריצוף של סאנגר משתמשים באנזימים שלהם יכולות proofreading חלשות כדי שה-DNA-פולימראז לא יוציא את הנוקליאוטידים ה-di-doxy מהרצף.

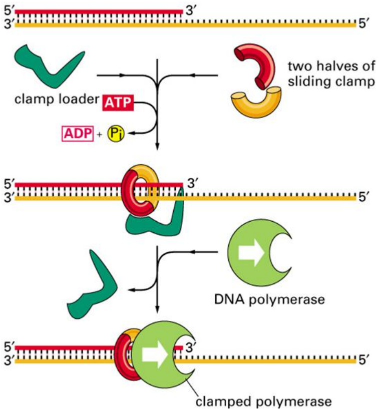
<u>נתונים טכניים על האנזימים:</u>

Characteristic	Polymerase I	Polymerase II	Polymerase III
Structural gene	*polA*	*polB*	*polC*
Molecular weight	103,000	90,000	130,000
Number of molecules/cell	400	100	10
V_{max}, nucleotides/second	16–20	2–5	250–1000
3′ exonuclease	Yes	Yes	No[a]
5′ exonuclease	Yes	No	No
Processivity[b]	3–200	10,000	500,000
Mutant phenotype	[c]$UV^s MMS^s$	None	*dna*^{ts}
Biological function	DNA repair, RNA primer excision	SOS DNA repair?	Replicative chain elongation

DNA polymerase I: פרוסיסיביות נמוכה מידי (כמה יחידות הוא מסוגל לצרף לפני שהוא נופל), הקצב שלו נמוך מידי ויש גם יותר מידי מולקולות בתא (400).

DNA polymerase III הוא זה שמשכפל את ה-DNA בתא.

הוא מהיר, פרוסיסיביות גבוהה, יש לו יכולת proofreading



<u>DNA polymerase III:</u>

ישנם 3 חלבונים שמרכיבים את ה-core:

<u>α:</u> אחראי על הוספת נוקליאוטידים '5 ל-'3.

<u>ε:</u> אחראי על proofreading: פעילות '3 ל-'5 אקסונוקילאז.

<u>θ:</u> עוזרת ליחידה ε ב-Proofreading.

ויש שתי תת-יחידות מחוץ ל-core של האנזים:

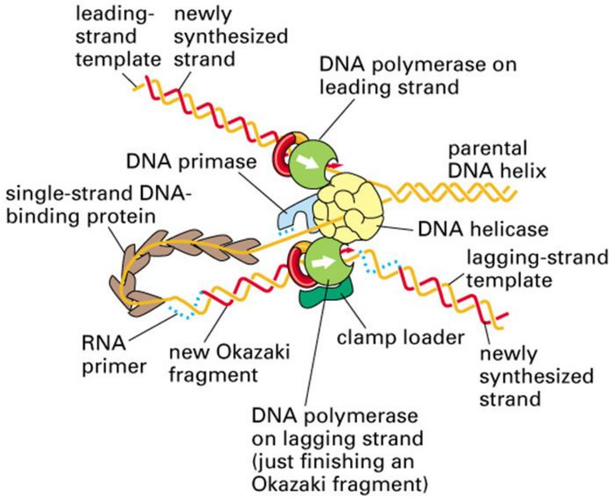
<u>β:</u> עוזר לאנזים להתחבר ל-DNA.

<u>γ:</u> clamp loader עבור ה-Lagging strand: עוזר לשתי יחידות β ליצור יחידה אחת לקשירת ה-DNA.

בגדיל ה-lagging ה-clamp loader (ירוק כהה) נשאר גם במהלך סינתזת מקטעי אוקזאקי.

©ענת עציון

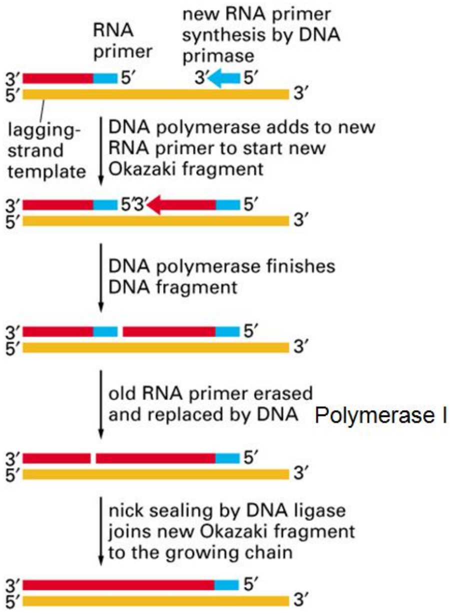
להליקאז יש אנטראקציות עם חלבונים סמוכים: מצד אחד עם ה-clamp loader, וזה מאפשר להליקאז להבדיל בין ה-leading ל-lagging. זה מאפשר בקרה על שני הפולימראזות.



<u>**החלפה של פריימרים למקטעי אוקזאקי:**</u>

מוחלפים ע"י DNA polymerase I, אשר משתמש במקטע ה-DNA כפריימר. הוא מתיישב על הגדיל ומתחיל לפרק את הפריימר RNA תוך סינתז DNA במקומו. הוא מפרק מכיוון '5 לכיוון '3 (הפוך מ-proofreading). אנזים זה גם מסוגל לפרק DNA ולכן הוא מפרק עוד קצת גם מהחלק האדום של ה-DNA עד שהוא נופל מה-DNA וזה מסביר את הפרוס סיביות הנמוכה: שלא יסנתז מחדש את כל שעשה הפולימראז III. הקצב שלו צריך להיות איטי כדי שלא ישיג את DNA polymerase III.

ל-DNA polymerase III אין יכולת לסילוק פריימרים.

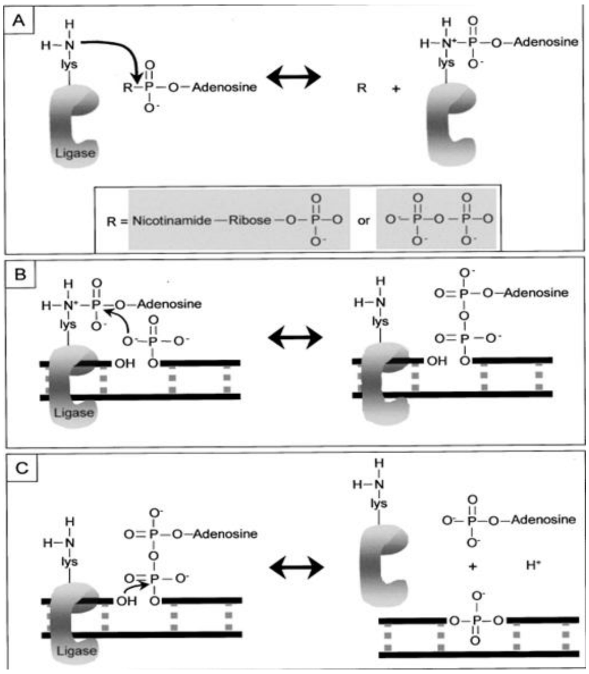


<u>**ליגאז:**</u>

ליגאז מחבר שני מקטעי DNA הוא עושה זאת ב-3 שלבים:

1. ATP עובר הידרוליזה כך שבסופו של דבר, AMP מתחבר לאנזים תוך יצירת קשר קוולנטי ביניהם.
2. ה-AMP מועבר מהאנזים ליצירת קשר עם הפוספט שברווח של ה-DNA. נוצר קשר בין פוספט בעמדה '5 לפוספט נוסף בעמדה '5. הקשר הזה הוא שונה מהקשר הרגיל שנמצא ב-DNA.
3. זה משפעל את הפוספט שהיה בגדיל מלכתחילה, וה-OH שברווח תוקף אותו וכתוצאה מכך ה-AMP משתחרר ונוצר קשר בין שתי המולקולות במקום הרווח שהיה.

האנזים מזרז ריאקציה שתקרה בכל-אופן, אך הוא מסייע לעבור מחסום אנרגטי שכנראה קיים.



©ענת עציון

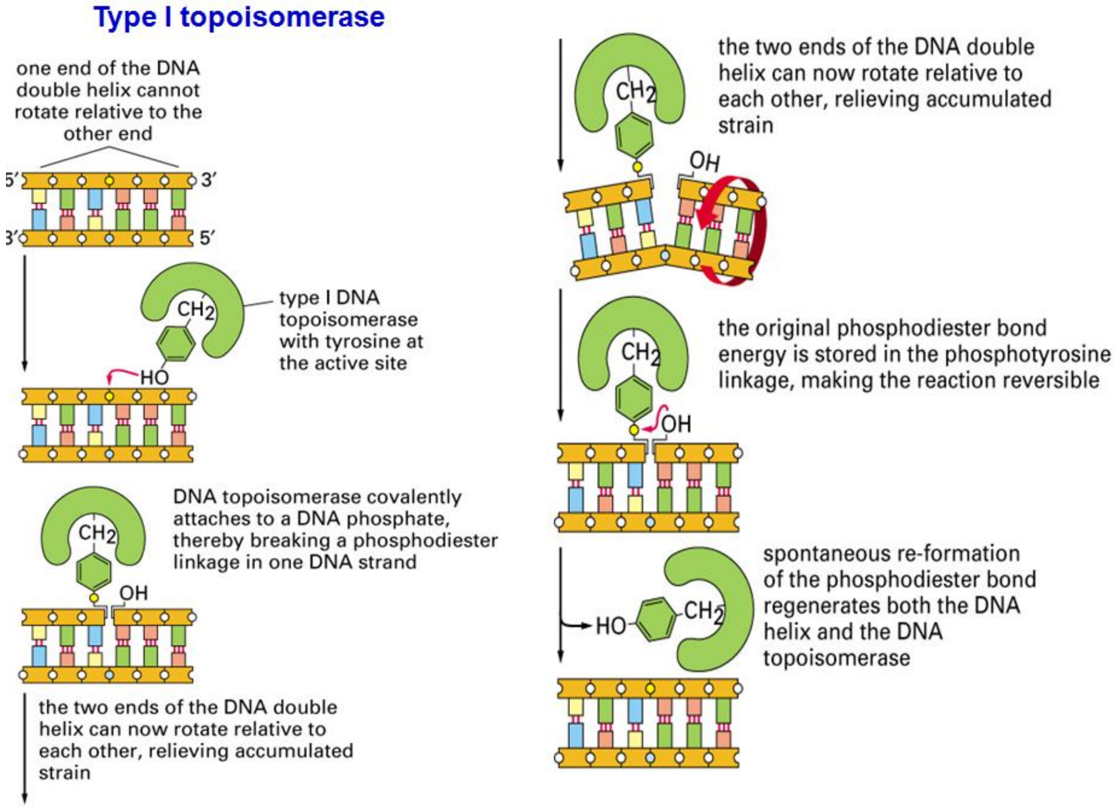
טופואיזומראזות:

בזמן תהליך השכפול כאשר יש פתיחה של שני הגדילים, נוצר מתח מוגבר ב-DNA שעדיין סגור באזורים הקרובים למקום הפתיחה. זה יכול לגרום לשברים ב-DNA או לעצירת מזלג ההכפלה.

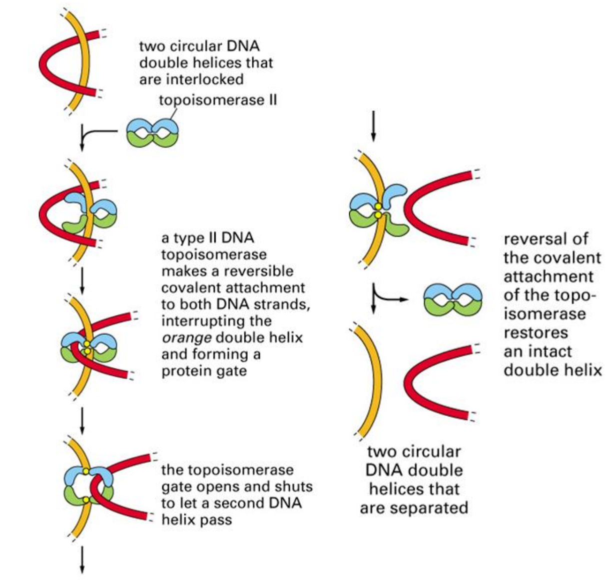
טופואיזומראזות מרגיעים את המתח ב-DNA ע"י חיתוך המולקולה שגורם לשחרור המתח.

הם יודעים לזהות ב-DNA את אזורי הקיפול ולהיקשר אליו.

סוג I: באתר הקטליטי יש לו קבוצת תירוזין שפותחת את הקשר הפוספו-דיאסטרי ליצירת חתך ב-DNA (nick). החתך הזה מאפשר לאותו הגדיל שנחתך להסתובב על צירו והמתח שקיים בו נרגע במידה מסויימת. לאחר הרגעת המתח, הטופו-איזומראז מחזיר את הפוספט אל החמצן שלו (כלומר ממקם אותו כך שהראקציה הכימית תתבצע בצורה יעילה) ואז הוא משתחרר מה-DNA.

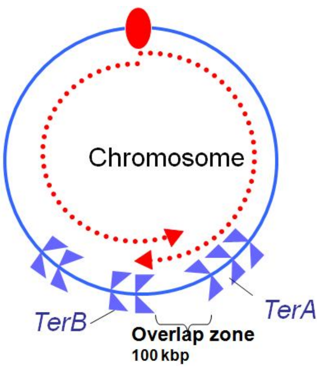


סוג II: ישנה פתיחה של שני הגדילים בסליל הכפול ואז ליגציה של שניהם.



©ענת עציון

טרמינציה בכרומוזום פרוקריוטי:



כל כרומוזום של E.Coli מכיל שני אתרי טרמינציה: TerA, TerB.

TerA: תפקידו לעצור את התקדמות מזלג ההכפלה שמגיע נגד כיוון השעון.

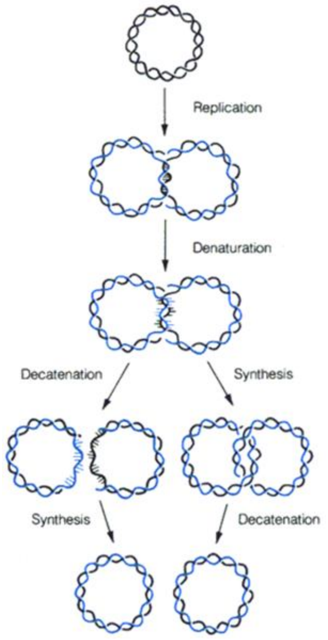
TerB: תפקידו לעצור את התקדמות מזלג ההכפלה שמגיע עם כיוון השעון.

לאזורי הטרמינציה יש כיווניות (הם מתעלמים ממזלג ההכפלה בכיוון המנוגד).

אזר החפיפה: לא משוכפל פעמיים, אך יכול להיות משוכל ע"י כל אחד ממזלגות ההכפלה (מי שמגיע ראשון). מיש מגיע ראשון נעצר ומחכה לשני ואז שני האנזימים משתחררים מה-DNA.

כאשר אחד ממזלגות ההכפלה מתקדם לאט יותר באופן מהותי, זה מצביע על בעיה ב-DNA וכך אם שניהם הגיעו בערך באותו הזמן לאזור הטרמינציה זה מסמן לתא שההכפלה נעשתה בצורה תקינה. ואם לא, אז משהו לא תקין ואין טעם להמשיך את ההכפלה (ואת חיי החיידק).

לאזורי ה-Ter נקשרים חלבונים מסוג: Tus.

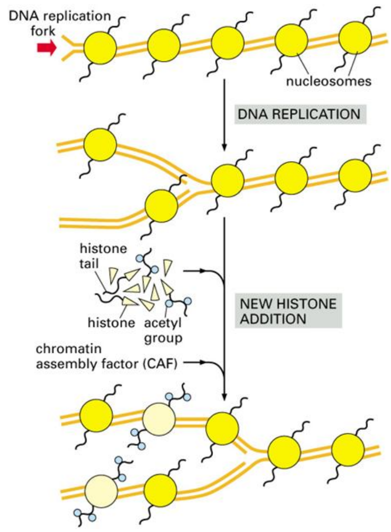


בסוף תהליך השכפול, שתי הטבעות שנוצרות נשארות במצב של "טבעות משולבות" וטופואיזורמאז II פותח את הטבעות האלה.

הבדלים בין אאוקריוטים לפרוקריוטים:

1. אאוקריוטים: יש הרבה יותר DNA-פולימראזות שמערבות בתהליך.
2. DNA-פולימראז אלפא: מתחיל את הסינתזה מהפריימר. אבל לאחר כמה עשרות-מאות בסיסים הוא נופל ומחליף אותו פולימראז דלתא.
3. התקדמות מזלג הכפלה היא יותר איטית מאשר בפרוקריוטים (משערים שזה בגלל קיומם של ההיסטונים).
4. עד היום לא התגלה מי עושה פעילות אקסונוקליאז מכיוון '5 לכיוון '3 ולא ברור מי מחליף את הפריימרים של ה-RNA.

סינתזה באאוקריוטים:



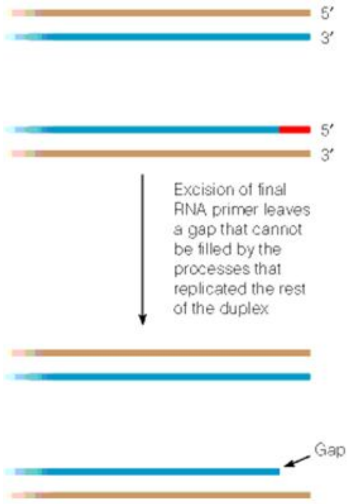
כאשר מכפילים את כמות ה-DNA צריך גם להכפיל את כמות ההיסטונים. בזמן סינתזת ה-DNA ישנו ייצור מוגבר של היסטונים (צהוב בהיר) שמשתלבין ב-DNA ביחד עם ההיסטונים הישנים (צהוב כהה).

ההיסטונים החדשים עוברים אצטילציה (כחול בהיר) שהיא הוספת קבוצת אצטיל לאחד הליזינים. ואז הליזינים כבר לא כל-כך חיוביים. וזה מסמן את החדשים לעומת הישנים יותר.

ההשערה היא שיש השפעה אפיגנטית על ביטוי הגנים כתלות באציטלציה של ההיסטונים.

©ענת עציון

בעית הטלומרים:

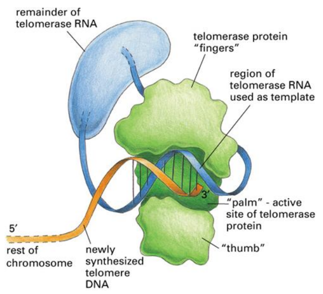


בגדיל ה-leading ההכפלה מגיעה עד לסוף הגדיל .

ב-lagging יש פריימר RNA ואחרי התפרקותו יש מקטע שלא סונתז.

בהכפלה הבאה גם לא נגיע עד הסוף ולכן ה- gapהזה יגדל ויגדל ובכל פעם נקבל DNA קצר יותר.

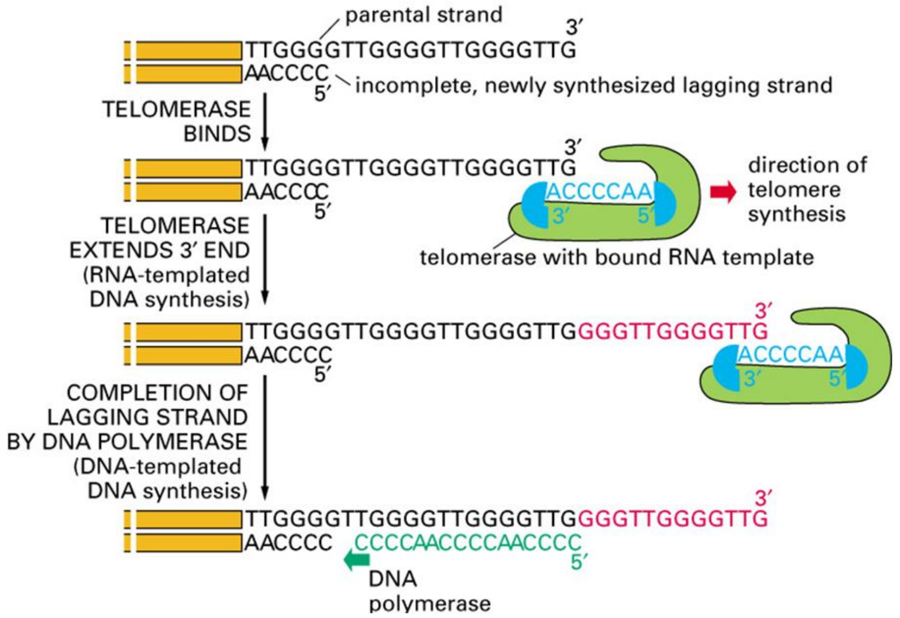
האנזים טלומראז:



אנזים המרוכב מחלבון ומ-RNA שיש לו פעילות רוורס-טרנסקריפטאז: יצירת DNA מ-RNA.

מקטע ה-DNA שנמצא בסוף הכרומוזומים מאופיין ברצף קצר שחוזר על עצמו. אותו רצף כמעט בכל הכרומוזומים.

האנזים טלומראז, ל-RNA שבו יש יכולת ליצור זיווג בסיסים עם הרצפים החוזרים שבטלומרים. וכך האנזים נקשר ל-DNA שבקצה. לאחר הקשירה האנזים מתחיל בסינתזת DNA על-סך הRNA-טמפלייט, ומסנתז את הרצף החוזר (מסומן בורוד). ואז הוא מחליק ימינה, יוצר זיווגי בסיסים עם הרצף שהרגע יצר ואז הוא ממשיך לסנתז את אותו הרצף שוב ושוב וכך הוא מאריך את ה-DNA. הוא מסנתז בערך 500 בסיסים בקצה הכרומוזום. הוא מאריך את הגדיל הארוך גם ככה. ואז קורית בגדיל הקצר מידי סינתזה רגילה: פרימאז נקשר ומסנתז פריימר ו-DNA פולימראז ממשיך את הסינתזה שלו עד הסוף. בסופו של דבר כן יישאר חסר ב-DNA אך הוא יקביל לרצפי הטלומרים ולא יחפוף לרצפים חשובים.



<u>השערה:</u> לתאים יש אורך חיים מוגדר, התלוי באורך הטלומרים.

©ענת עציון

תיקון פגמים ב-DNA

מוטציות ספונטניות:

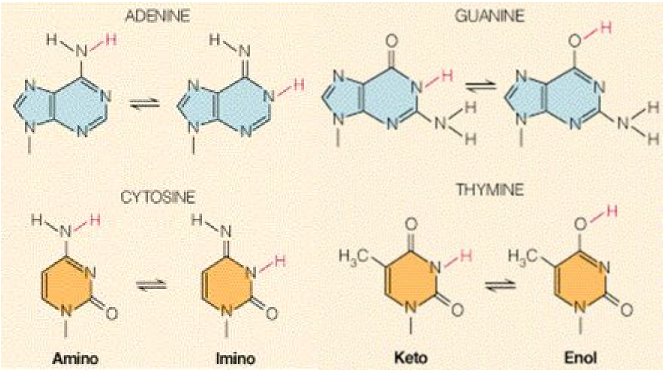
טעויות של DNA polymerase:

יכולת ה-proofreading אמנם משפרת את הדיוק אבל עדיין יש טעויות. כלומר- בכל מחזור הכפלה מוכנסות 300 טעויות באופן אקראי. במצבים מסוימים (סטרס) מוכנסות יותר מוטציות.

טאוטומריזציות:

טעויות שנובעות מהכנסה במהלך ההכפלה של טאוטומרים לא נכונים של ה-DNA. הבעיה היא שהטאטומר לא נכנס בזיווג בסיסים מתאים.

<u>דוגמא:</u> A-Imino יכול להיכנס גם בזיווג בסיסים עם C.



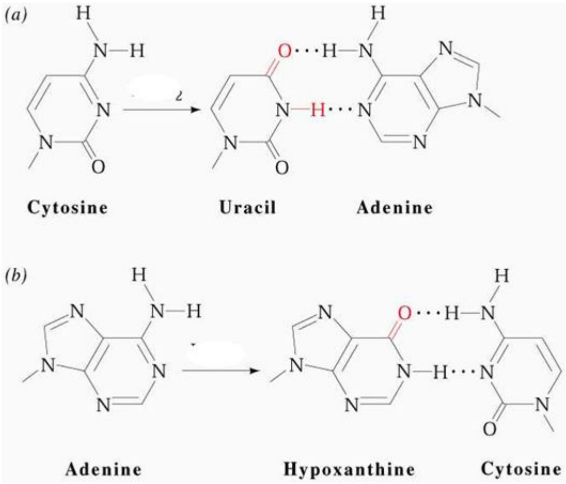
דיאמינציה:

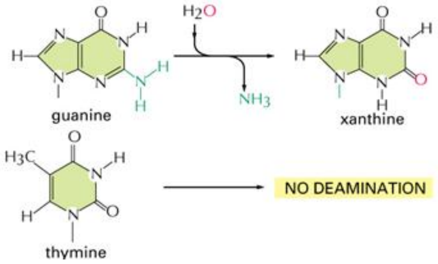
ב-C: סילוק קבוצת האמינו גורם לו להפוך ל-U שיכול לעשות זיווגי בסיסים עם A.

ב-A: הופך להיפוקסנטין שיכול לעשות זיווגי בסיסים עם C.

G: הופך ל-xantine.

רק ל-T אין די-אמינציה.

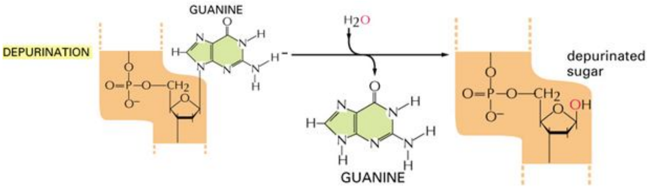




כל אלה שמתקבלים לא קיימים באופן טבעי ב-DNA. באופן זה הם מסמנים למערכת התיקון שיש בעיה. וזוהי גם ההשערה מדוע U לא מופיע ב-DNA למרות שהוא כל-כך דומה ל-T.

דה-פורינציה:

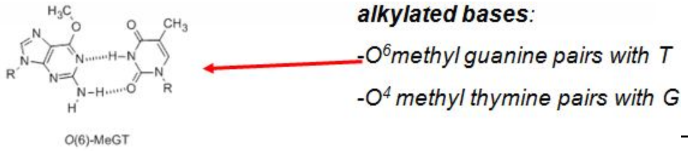
סילוק של פורין G/A כתוצאה מהידרוליזה של הקשר הגליקוזידי. ואז מתקבל אזור ב-DNA שלא מכיל שום בסיס.



אוקסידציה:

הוספת חמצן לבסיס ב-DNA ואז הוא יכול ליצור זיווג בסיסים לא נכון. מאפשר ל-G ליצור זיווג בסיסים גם עם A ולא רק עם C.

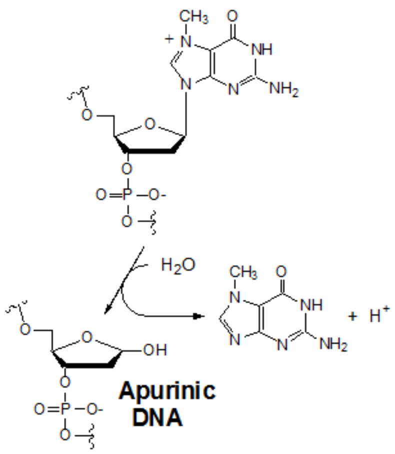
אלקילציה:



©ענת עציון

הוספת קבוצות מתיל לנוקליאוטידים. זה גם גורם לזיווגי בסיסים לא נכונים.

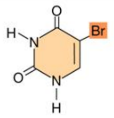
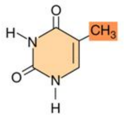
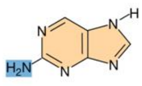
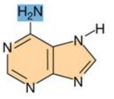
אלקילציה יכולה לגרום לשפעול הבסיס והפיכתו לקבוצה עוזבת טובה ואז הוא עוזב ונוצר אתר א-פוריני.



מוטציות סביבתיות:

Base analogs:

חומרים כימיים אשר דומים במבנה לנוקליאוטידים מסויימים אך מסוגלים לעשות זיווגי בסיסים לא נכונים.

Base analog pairs with	Base analog structure	normal Base
Keto form: -A Enol form: -G	 5-Bromouracil	 Thymine
-T -C	 2-Aminopurine	 Adenine

Intercalating agents:

חומרים שלהם מספר טבעות שטוחות ולכן מסוגלים להיכנס בין זוגות הבסיסים וגורמים להרחקה ביניהם. באופן כללי שינויים ב-DNA יכולים לפגוע בשכפול.

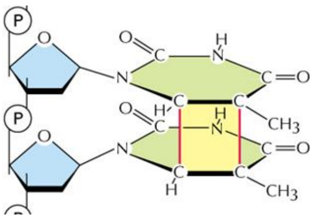
Ployaromatic hydrocarbon:

מולקולה שנמצאת בסיגריות, רב-טבעתית שיכולה ליצור קשרים קוולנטיים עם ה-DNA.

כימיקלים נוספים:

קבוצת חומרים שלא יוצרת קשר ישיר עם ה-DNA. חומרים הגורמים לזירוז יצירה של reactive oxygen's שאמנם נוצרים באופן טבעי בגוף, אך ייצור מוגבר שלהם מזיק ל-DNA.

קרינה:



קרינות אולטרא-סגול הן מאוד חזקות. קרינת UV גורמת ליצירת דימרים של פירימידינים סמוכים. כתוצאה מכך, המרחק ביניהם קצר יותר וזה יפגע בפעילות DNA polymerase.

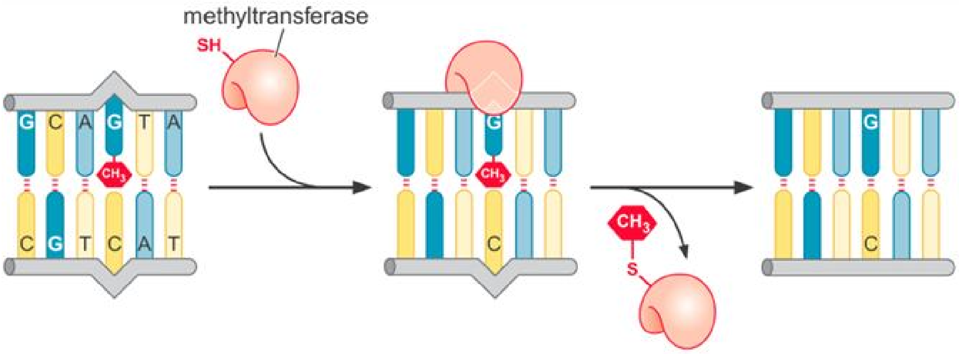
©ענת עציון

מגנוני התיקון:

Direct repair:

אנזים שמזהה באופן ספציפי את הבעיה ב-DNA ופשוט מתקן אותה.

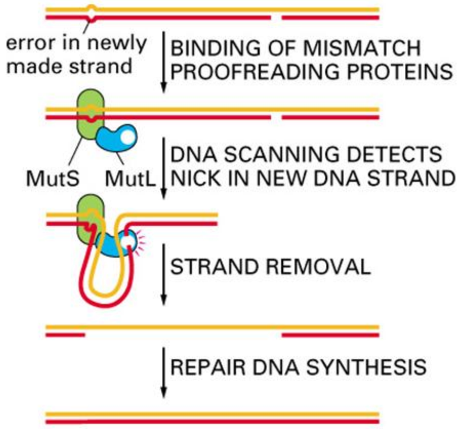
1. אנזים photolyase ב-E.Coli אשר גורם לפירוק דימרים של פירימידינים.
האנזים פועל בתנאי אור, ושזה הגיוני כי האור הוא זה שגורם למוטציות מסוג זה.
2. האנזים methyltransferase אשר מזהה מתילציות ב-DNA ומעביר אותן אליו.



Mismatch repair (MMR):

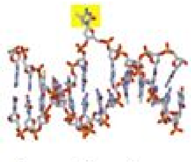
מנגנון שעובד זמן קצר לאחר ההכפלה. ישנם חלבונים המזהים אזור של mismatch- הכנסת נוקליאוטיד לא מתאים. כתוצאה ממנו מבנה ה-DNA לא אופטימאלי וכך האזור מזוהה. החלבון נקשר לאותו אזור, סורק את גדיל ה-DNA החדש שנוצר, מפרק אותו עד נקודת ה-mismatch, ואז נוצר רווח ש: DNA polymerase יכול למלא מחדש.

איך הוא יודע לזהות את הגדיל הנכון? באאוקריוטים לא מצאו מנגנון של המי-מתילציה ומניחים שהגדיל החדש מכיל הרבה יותר רווחים מהגדיל הישן וכך אולי ניתן להבדיל ביניהם.



Base Excision Repair (BER):

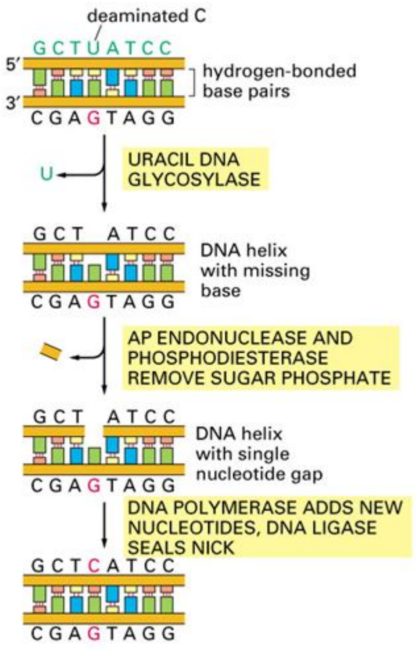
מנגנון שעובד על פגיעות קטנות ב-DNA.
הוצאת בסיס ותיקון שלו- הבסיס הלא נכון עובר flipping החוצה מה-DNA.



Base flipping

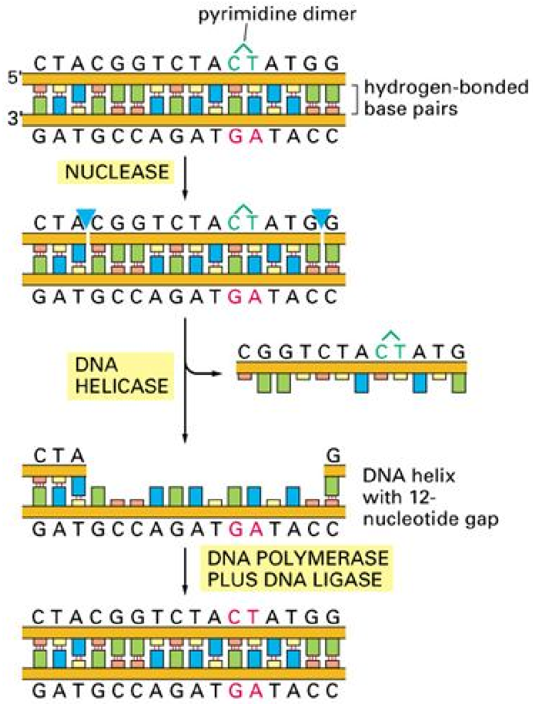
ישנו אנזים גליקוזילאז שסורק את ה-DNA לאורך ה-minor groove U מזהה את הפגם. לכל פגם ישנו גליקוזילאז ספציפי שמזהה אותו.

האנזים הזה מפרק את הקשר הגליקוזידי (בין הסוכר לבסיס) ואז מתקבל אזור ב-DNA שלא מכיל בסיס. כאשר אין בסיס זה סימן לאנזימים נוספים: אנזים אנדונוקילאז שחותך את גדיל ה-DNA משני הצדדים ואז האנזימים הרגילים מוספים נוקליאוטיד ומחברים אותו לגדיל.



©ענת עציון

Nucleotide Excision Repair (NER):



נועד לטיפול בפגמים גדולים יותר ב-DNA. ישנו זיהוי של אזור שבו נוצר הדימר בין הבסיסים: כתוצאה משינוי במבנה המרחבי של ה-DNA. ואז ישנ אנדונוקליאז שחותך מספר נוקליאוטידים מהמקטע, המקטע מסולק החוצה ע"י הליקאז.

ולאחר-מכן יש סינתזה מחדש של הקטע.

אין זיהוי של מיקום הפגיעה הספציפי ולכן האנזים מוריד כמה בסיסים כדי להוריד בוודאות את הבסיסים הפגועים.

UV-Response ב-E.Coli:

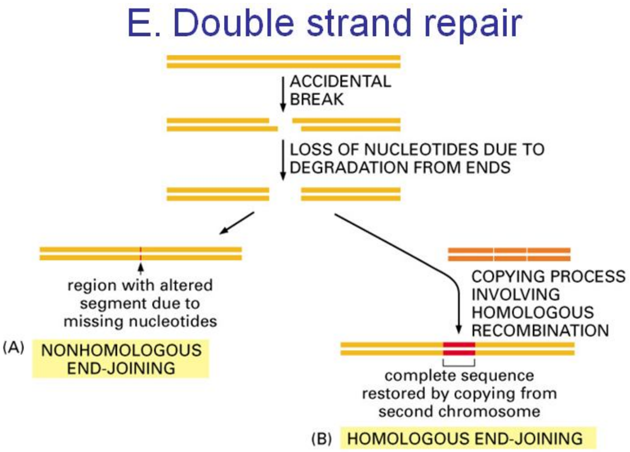
1. UvrA ו-UvrB סורקים את ה-DNA ומחפשים את הפגם.
2. UvrA עוזב את הקומפלקס ו-UvrB פותח את ה-DNA ליד הפגם.
3. UvrC יוצר קומפלקס עם UvrB ויוצר nicks בשני הצדדים (כ 7 בסיסים upstream ו-downstream).
4. DNA helicase UvrD משחרר את הגדיל הפגום ו-DNA Pol I וליגאז מתקנים את הרווח.

באאוקריוטים ישנם חלבונים רבים אחרים שמעורבים בתהליך.

תהליכי תיקון באאוקריוטים:

יש אנזימים רבים שיודעים לסנתז DNA שמעורבים בתהליכי התיקון. לכולם ישנה פרוס סיביות מאוד נמוכה. הדיוק שלהם לא מאוד גדול. משערים ששיש לתא אינטרנס להכניס מוטציות בזמן התיקון שאולי ייתנו לתאים יתרון אבולוציוני.

Double strand repair:



מגנון שמטפל בשבירת ה-DNA בשני הגדילים בו-זמנית. כתוצאה מהשבר הגדילים עשויים להתרחק וליצור בעיות. נגרם פירוק נוסף של אזור השבר ע"י אנזימים, נוקליאוטידים בודדים.

ואז קורית ליגציה ע"י אנזימים מיוחדים שמחברים את מקטעי ה-DNA זה לזה: " end joining".

(A)תיקון הפגם עולה במספר בסיסים שפורקו ולא יסונתזו, וההשערה היא כי אזור אשר מכיל בעיות עדיף שיסולק.

(B) לפעמים האזור החסר מושלם לפי הכרומוזום ההומולוג.

תיקון ע"י DNA-פולימראזות: מעין מנגנון תיקון אחרון. ישם פולימראזות שיודעים להתמודד עם בעיות ולסנתז למרות הפגיעות.

©ענת עציון

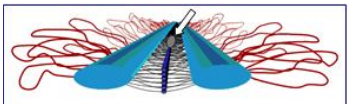
רקומבינציה

<u>במיוזה:</u> החלפת DNA.

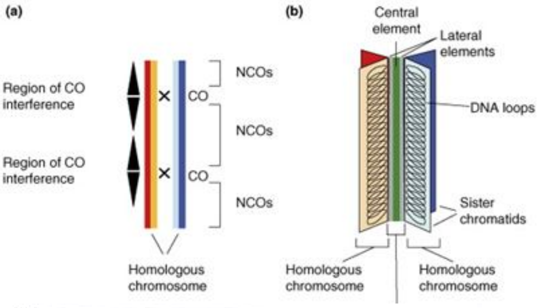
<u>בתיקון:</u> כאשר ישנה שבירה של שני הגדילים ובתיקון שכפול חסום.

תוצאה: מידע מכרומוזום אחד מועבר לכרומוזום השני.

בכל שחלוף מעורבות שתי כרומטידות לא אחיות. מספר שחלופים יכולים להתרחש לאורך אותו **ביוולנט**, כך שכל 4 הכרומטידות עשויות להיות מעורבות.



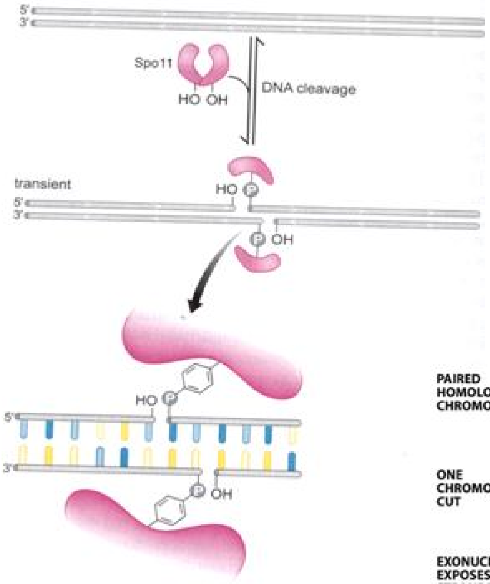
Synaptonemal complex: קומפלקס חלבוני גדול הנבנה בחלק הראשון של פרופאזה I ומתווך את הזיווג בין הכרומוזומים ההומולוגים.



הקומפלקס מגדיר באיזה איזורים בכרומוזם תתבצע רקומבניציה: NCO-Non Cross Over, אזורים בהם לא תתבצע רקומבינציה. וביניהם אזורים קטנים שבהם היא כן תתרחש.

התהליך:

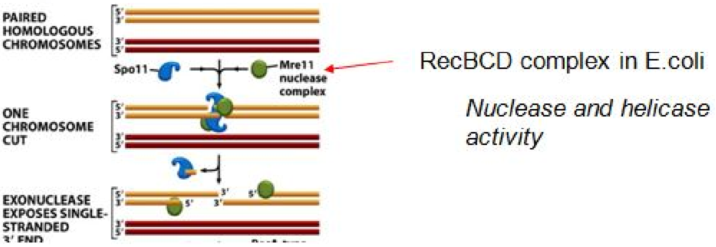
חיתוך ה-DNA הדו-גדילי:



לחלבון Spo11 יש קבוצת טירוזין באתר הפעיל והטירוזין חותך את הקשר הפוספו-דיאסטרי. החלבון חותך את שני גדילי ה-DNA תוך יצירת קשר קוולנטי ביניהם.

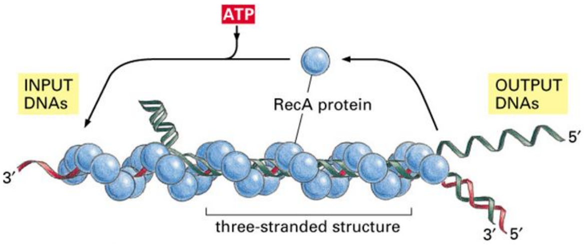
יצירת גדיל יחיד:

עיכול ה-DNA נועד ליצור DNA חד-גדילי שיכול לעשות invasion אל ה-DNA השני.



פלישת הגדיל:

חלבון RecA הוא זה שאחראי להשחיל את ה-DNA החד-גדילי אל תוך ה-DNA של הכרומוזום השני וליצור D-loop.



<u>RecA:</u> חלבון שיוצר מולטימר, היחידות שלו נקשרות אל ה-DNA ויוצרות קומפלקס מאוד גדול שמצידו האחד נכנס DNA דו-גדילי ומציד האחר DNA חד-גדילי ותוך כדי שימוש באנרגית ATP, RecA מחליף את זיווגי הבסיסים.

הגדילים הם מאוד דומים ברצפם כי הם כרומוזומים הומולוגים ולכן החלפת זיווגי

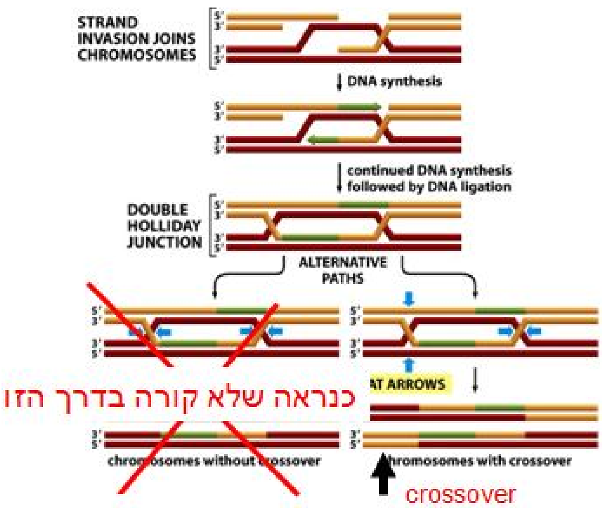
©ענת עציון

הבסיסים אינה כל-כך בעייתית.

ישנה אפשרות שגם גדילים רחוקים יעברו שחלוף.

Holiday Junction: החיצים הכחולים מציינים מי התחלף עם מי.

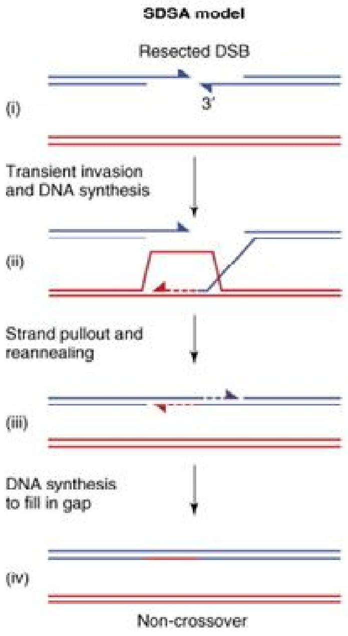
המודל השמאלי מתאר מצב שבו בסופו של דבר אין שחלוף, והסתבר שהמודל הזה אינו נכון. המודל היחיד שמתאר מצב שבו אין שחלוף הוא SDSA (מופיע מתחת).

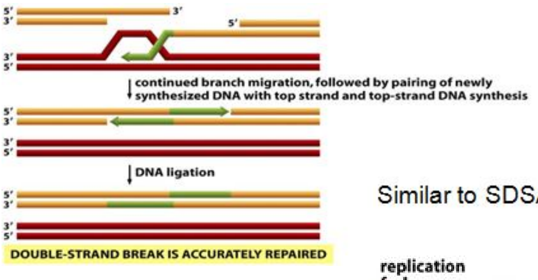


:Gene conversion

לפעמים ישנו גן בדיוק באזור השחלוף ואז מתקבלת החלפה. מערכת התיקון תגרום להחלפת רצף מהומולוג אחד על סמך התבנית של ההומולוג האחר. ההחלפה תהיה אקראית.

תהליכי תיקון במהלך הכפלת ה-DNA משתמשים במנגנון זה לסינתזה לפי הכרומוזום ההומולוג.

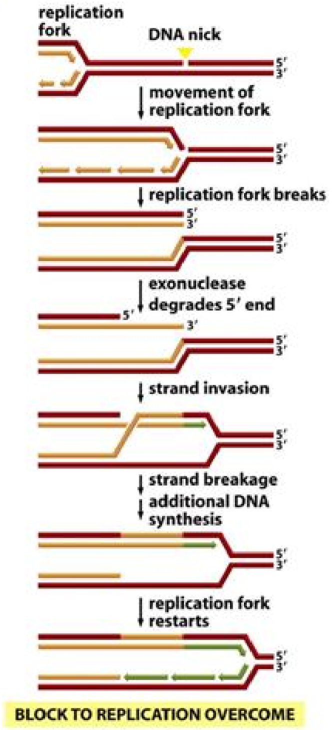




<u>תיקון פגיעות במזלג ההכפלה:</u>

ישנו פירוק של ה-DNA לחד-גדיל אשר פולש אל הכרומוזם השני. תהליך ההכפלה שוקם ע"י רקומבינציה הומולוגית.

Similar to SDSA



©ענת עציון

טרנספוזונים:

מקטעי DNA שיכולים לעבור ממקום למקום.

CLASS DESCRIPTION AND STRUCTURE	SPECIALIZED ENZYMES REQUIRED FOR MOVEMENT	MODE OF MOVEMENT	EXAMPLES
DNA-only transposons			
short inverted repeats at each end	transposase	moves as DNA, either by cut-and-paste or replicative pathways	P element (*Drosophila*) Ac-Ds (maize) Tn3 and Tn10 (*E. coli*) Tam3 (snapdragon)
Retroviral-like retrotransposons			
directly repeated long terminal repeats (LTRs) at each end	reverse transcriptase and integrase	moves via an RNA intermediate produced by a promoter in the LTR	Copia (*Drosophila*) Ty1 (yeast) THE1 (human) Bs1 (maize)
Nonretroviral retrotransposons			
Poly A at 3′ end of RNA transcript; 5′ end is often truncated	reverse transcriptase and endonuclease	moves via an RNA intermediate that is often produced from a neighboring promoter	F element (*Drosophila*) L1 (human) Cin4 (maize)

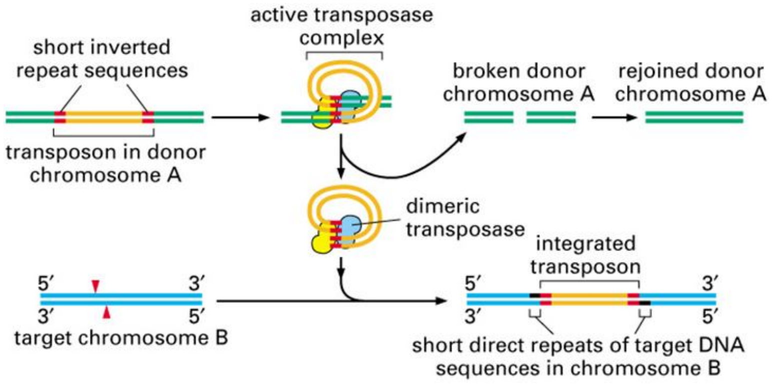
Also called poly A transposons

DNA only transposons:

מקטע DNA שבקצוותיו יש רצפים קצרים של כ-20 בסיסים זהים ובכיוונים הפוכים.

בתוך המקטע הזה מקודד גן אחד לפחות הנקרא: transposase. הדבר הז יכול לדלג ברחבי הגנום. ישנם כאלה שבנוסף אליו מכילים גנים נוספים המפורסמים ביותר הם גנים המקנים עמידות לאנטיביוטיקה.

המעבר בגנום:

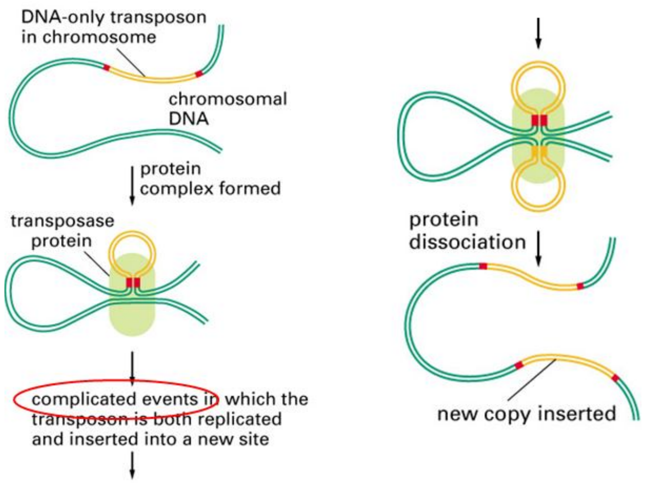


ברגע אחד מתחיל להיווצר החלבון transposase (על-סמך הגן הזה) הגורם לחיתוך ה-DNA בקצוות (החלבון חותך לעצמו את ה-DNA) ואז מקטע ה-DNA עובר למקום אחר.

התזוזות האלה גורמות להפעלה/השתקה של אזורים שונים בגנום.

תכונה זו מגדילה את השונות של אותו אורגניזם ויכולה לאפשר לאורגניזם עמידות יותר גבוהה במהלך האבולוציה.

הערה: ב-DNA המטרה (אליו המקטע עובר) הקטעים אינם inverted אלא הם לאותו הכיוון.



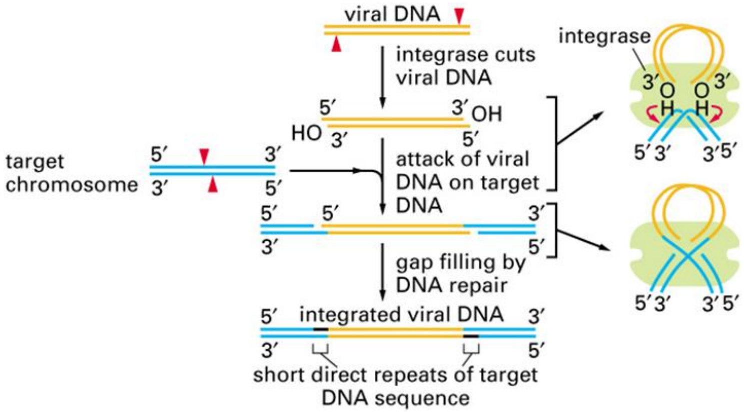
התהליך הזה יכול לקרות גם תוך כדי הכפלה: ואז הטרנזפוזום משכפל את עצמו למקום נוסף באותו הכרומוזום.

©ענת עציון

Retroviral like transposomes:

מבוסס על רטרו-וירוסים.

ידוע שיש לנו בגנום שאריות של וירוסים המסוגלים להפיץ את עצמם בגנום. DNA מייצר RNA וגם אלת האנזים רוורס טרנסקריפטאז. ה-RNA הופך ל-DNA תוך שימוש באנזים רוורס-טרנסקריפטאז, ואז הוא נכנס לגנום וחודר למקום אחר.

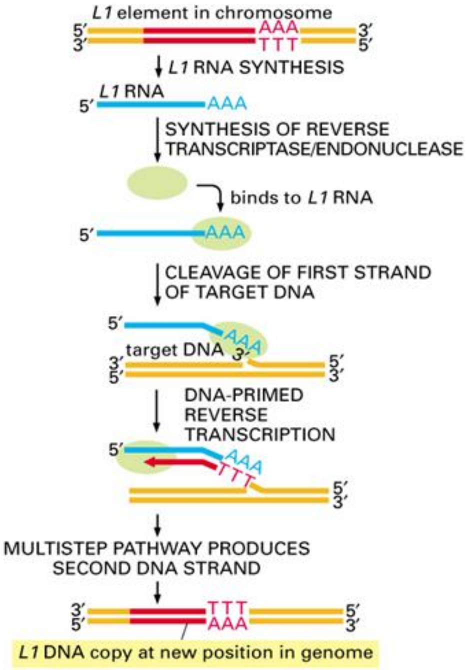


Nonretroviral retrotransposons:

תחילה ישנו שעתוק RNA, ה-RNA מתחבר לאזור מסוים ב-DNA ומשמש כבסיס לאנזים רוורס טרנסקריפטאז. ואז נוצר DNA שנכנס פנימה לתוך הגנום.

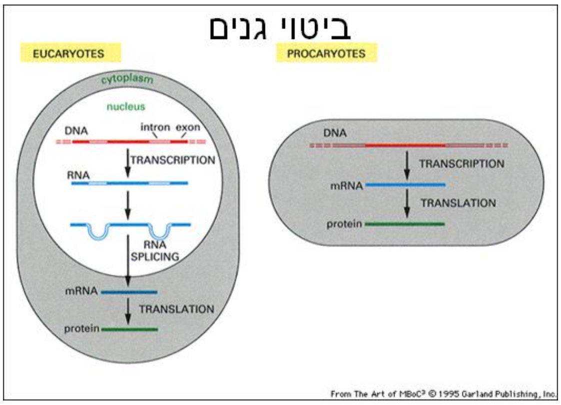
ההבל בין השיטה הזו לשיטה הקודמת:

1. ה-RNA הוא זה שמתחבר אל ה-DNA ורק אח"כ הוא משמש כתבנית לרוונס טרנסקריפטאז.
2. ה-RNA לא מקודד לרוורס טרנספיקריפטאז אלא מקבל אותו מאזורים אחרים בגנום שמקודדים לאנזים.



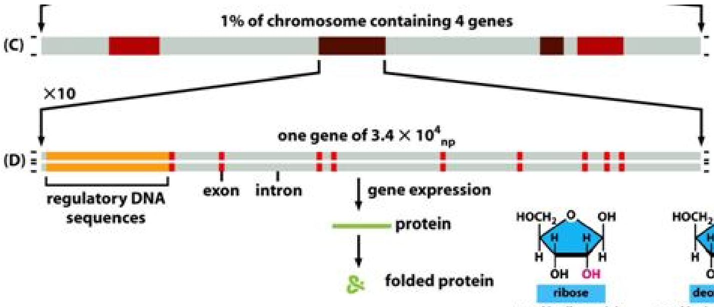
©ענת עציון

תהליך השעתוק



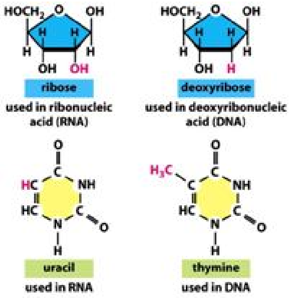
בתאים פרוקריוטי יש שלב אחד של שעתוק RNA אשר ממשיך ליצירת חלבון. באאוקריוטים יש גרעין ובו מתרחש שעתוק ה-RNA אשר יכול לעבור אח"כ מספר תהליכים שונים על-מנת להפוך ל-RNA בוגר, ואז הוא יוצא החוצה מהגרעין אל הציטופלסמה ושם הוא מתורגם.

למעשה ישנה הפרדה בין שני שלבים: שלב ההתבגרות ושלב יצירת החלבון. סבורים כי מעטפת הגרעין התפתחה כדי להבדיל בין RNA שאינו בוגר ל-RNA שכבר עבר את כל התהליכים. RNA לא בוגר לא ראוי להיות מתורגם ולכן יש צורך להפריד אותו מהמערכת שמתרגמת.



גן: יחידה תורשתית שמעבירה תכונה מדור לדור. זהו אזור בחומר הגנטי אשר יוצר מולקולה פעילה. המודל הקלאסי: מכל גן מקבלים חלבון אחד.

למעשה רק אזור מאוד קטן מהגנום ייצור בסופו של דבר חלבון, כ-1%.

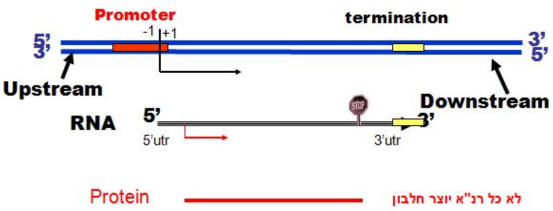


הבדלים בין DNA ל-RNA:

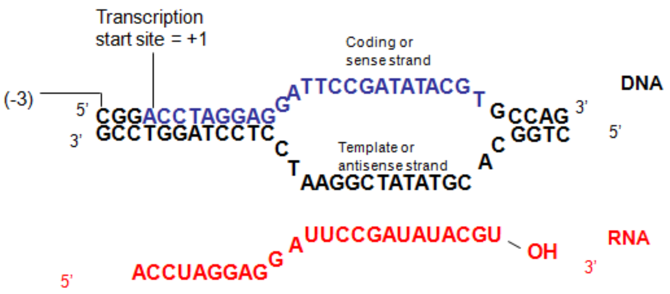
ב-RNA קיים U במקום T ב-DNA.

ב-RNA הסוכר הוא ריבוז במקום דיאוקסיריבוז ב-DNA.

שעתוק בפרוקריוטים:



לא כל מקטע ה-RNA שנוצר הופך לחלבון. בשני צידי ה-RNA ישנם שני אזורים: 5'utr ו-3'utr שאינם מתורגמים.



מבין שני גדילי ה-DNA, אחד הוא גדיל הטמפלייט- antisense.

השני הוא גדיל ה-coding והוא זהה למולקולת ה-RNA שנוצרת (מלבד ה-U במקום ה-T). נקרא גם: sense strand.

הנקודה ב-DNA שבה מתחיל להיווצר RNA נקראת: +1. הנוקליאוטיד שלפניו נקרא: -1 (אין עמדה מספר 0).

©ענת עציון

<u>מגוון סוגי ה-RNA:</u> מתוך כל מולקולות ה-RNA בתא, כ-3% הם mRNA ו-70% הם rRNA (ריבוזומים). התא לא זקוק להרבה mRNA כי על סמך אחד ניתן לייצר כמה חלבונים. כמו-כן, כמות ה-mRNA בתא הינה דרך נוספת לבקר את הפעילות ע"י שליטה בכמות החלבונים שמיוצרים.

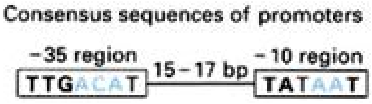
<u>תכונות RNA:</u> RNA יכולים להתקפל למבנה שניוני ואפילו למבנה שלישוני (למשל ה-tRNA). RNA יכולים לקטלז ריאקציות כימיות.

<u>Initiation:</u>

Cis elements: כל האזור ב-DNA שנמצא מעל לנקודת ההתחלה נקרא: promoter והוא יקבע את כיוון סינתזת ה-RNA ואת הכמות שלה. הוא למעשה מגדיר איזה גדיל ייצור את ה-RNA.

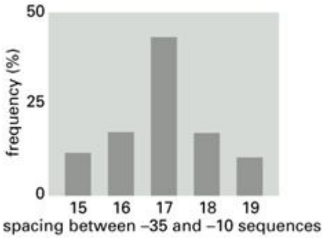
בפרוקריוטים הפרומוטור הוא מבנה מאוד פשוט והוא מאופיין בשני רצפי קונצנזוס:

1. TATA box: נמצא כ-10 בסיסים upstream לתחילת השעתוק ויש בו הרבה רצפי TA.
2. -35 box: נמצא 35 בסיסים upstream לתחילת השעתוק.



האלמנט השלישי החשוב בפרומוטור הוא המרחק בין שני ה-boxes האלה (שאינו תמיד קבוע).

התפלגות המרחק בין שני ה-boxes:



<u>RNA polymerase:</u>

בתאים פרוקריוטי יש רק RNA-פולימראז אחד אשר מסנתז את כל סוגי ה-RNA שיש.

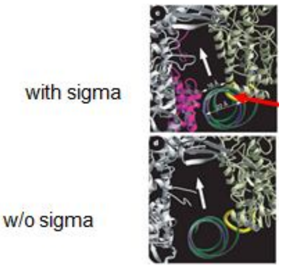
אנזים זה מורכב מכמה תת-יחידות חלבוניות. זהו הולואנזים (האנזים ביחד עם סיגמא).

Subunits of RNA polymerase from *E. coli*

Subunit	*Gene*	*Number*	*Mass (kd)*	*Role*
α	*rpoA*	2	37	Binds regulatory sequences
β	*rpoB*	1	151	Forms phosphodiester bonds
β'	*rpoC*	1	155	Binds DNA template
σ^{70}	*rpoD*	1	70	Recognizes promoter and initiates synthesis

יש לו פרוססיביות גבוהה, אך הוא עושה טעויות בתדירות גבוהה יותר מ-DNA polymerase. לא זקוק לפריימר על-מנת להתחיל סינתזה.

<u>תת-היחידה סיגמא:</u>



סיגמא נקשרת מצד אחד ל-RNA polymerase ומצד שני אל רצפי cis בפרומוטור (ה-boxes) ובכל היא מביאה את האנזים אל המקום הנכון לפעילות. כאשר סיגמא נמצאת היא יוצרת קשר עם ה-DNA ומקבעת אותו אל האנזים.

פרומוטורים בהם המרחק בין ה-boxed הוא בדיוק 17, האפיניות של סיגמא תהיה אופטימאלית אל ה-DNA. ככל שרצף הפרומוטור יותר קרוב לרצף הקונצנזוס, יהיו יותר קשרי מימן שמחזקים את הקשר ומגדילים את האפיניות.

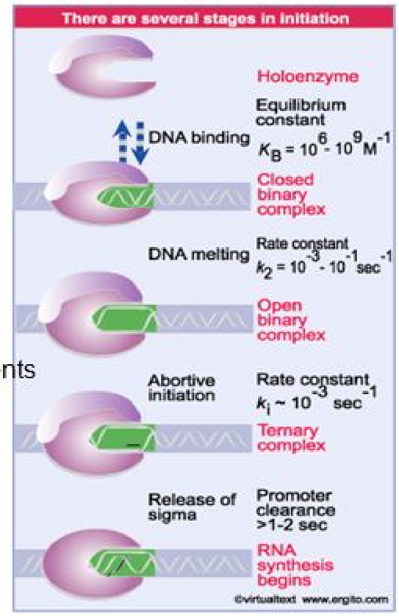
<u>תפקידי סיגמא:</u>

- הגברת האפיניות של RNA polymerase לרצפי פרומוטור מסויימים.
- הקטנת האפיניות של RNA polymerase לאזורים שאינם פרומוטורים.
- סיוע בפתיחת הסליל הכפול של ה-DNA ("פעילות הליקאז").

©ענת עציון

בתא פרוקריוטי יש יותר מסוג אחד של סיגמא.
ברוב הגנים יש σ^{70} אבל גילו שישנם גנים שאליהם נקשרת סיגמא מסוג אחר.

σ factor	Genes transcribed	Consensus sequence -35	-10
σ^{70}	Many genes	TTGACA	TATAAT
σ^{54}	Nitrogen metabolism	None	CTGGCACNNNNNTTGCA
σ^{38}	Stationary phase	Not known	TATAAT
σ^{32}	Heat shock	CTTGAA	CCCATNTA
σ^{28}	Flagellar synthesis	TAAA	GCCGATAA



Between -11 to +3

Of about 10 nts fragments

Sigma release

לאחר שהאנזים מתיישב על ה-DNA יש-DNA melting: פתיחה של הסליל הכפול.

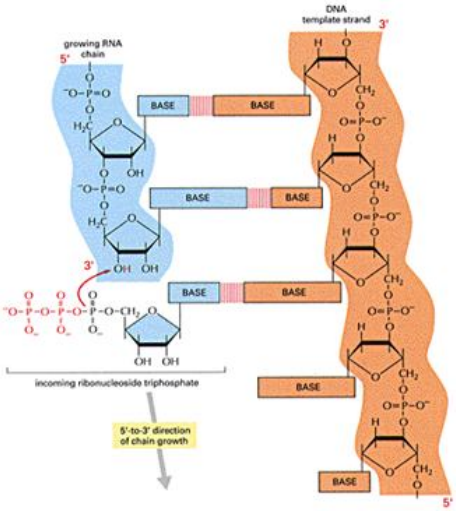
נפתחת בועית שעתוק של 14~ נוקליאוטידים. הסיגמא גורמת לאנזים להתחבר מאוד חזק לאזור הפרומוטור ורק לאחר שעתוק של 8-9 bp שסיגמא משתחררת ממנו והוא יכול להמשיך הלאה בשעתוק.

:Elongation

ה-RNA polymerase מתקדם, פותח מקטע קצר, מוסיף נוקליאוטיד מתאים ומאריך את שרשרת ה-RNA. גם כאן הסינתזה היא מכיוון '5 לכיוון '3.

הפוספט בעמדה אלפא מתחבר עם ה-OH בקצה הגדיל בקשר פוספו-דיאסטרי. התהליך דומה ברמה המולקולארית למה שקורה ב-DNA.

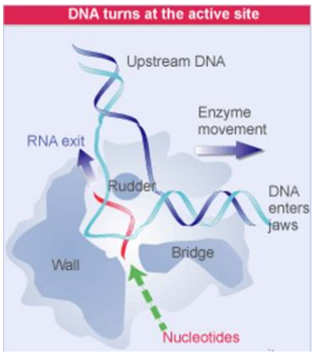
לאנזים אין יכולות proofreading טובות, אבל זוהי מולקולה עם זמן חיים קצר, וישנן מולקולות RNA נוספות שייווצרו באופן תקין.



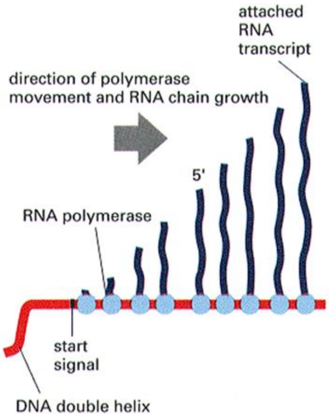
מתח ב-DNA: נוצר מתח ב-DNA הדו-גדילי עקב פתיחת בועית השעתוק.
במהלך שכפול ה-DNA ישנן טופו-איזומראזות להרגעת המתח, ואילו בתהליך זה אין כאלה אנזימים. משערים שלא צריך כי המתח שנוצר ב-DNA הוא זמני וגם בד"כ ה-RNA polymerase מסנתז מקטעי RNA לא מאוד ארוכים ולכן לא נגרם מתח רב ל-DNA.

כניסה ויציאה מהפולימראז: ה-DNA מגיע מכיוון מסוים ועושה תפנית של 90 מעלות. הסיבוב הזה כנראה מקל על פתיחת הסליל הכפול. באזור הפתיחה יש Rudder- חלבון המחזיק את הגדילים פתוחים.

באתר אחר של האנזים נכנסים נוקליאוטידים אל האתר הקטליטי (בכיוון החץ הירוק) ומתחברים אל גדיל ה-RNA המתארך. האזור הפתוח- בועית הכפלה של 25~ bp. האנזים מכסה כ-40 bp ב-DNA, זהו אנזים מאוד גדול.



©ענת עציון



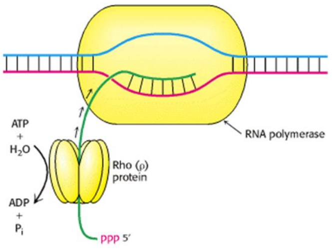
בזמן ש- RNA polymerase אחד כבר עזב את הפרומוטור, יכול לבוא ולהתיישב RNA polymerase נוסף ולהתחיל גם את הסינתזה. בדרך-כלל לגן אחד יש כמה אנזימים שמסנתזים אותו אחד אחרי השני.

גן שצריך ממנו הרבה חלבון, הפרומוטור שלו יהיה מאוד פעיל: הרבה אנזימים ייקשרו לאורכו והאפיניות של סיגמא תהיה מאוד גבוהה אליו.

:Termination

שני סוגים של טרמינליות:

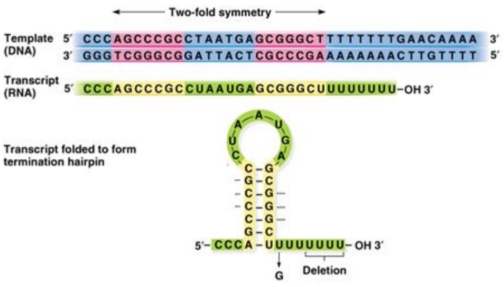
:Rho dependent



החלבון רו הוא הליקאז הנקשר אל ה- RNA המסתנתז ומתקדם לאורכו תוך כדי ניצול ATP. ואז הוא מגיע לבסוף לקומפלקס ומושך את ה-RNA מתוכו וכתוצאה מכך גם ה- RNA polymerase משתחרר.

גילו שרו נקרש אל ה-RNA polymerase כבר בתחילת השעתוק. בשלב מסוים (עדיין לא ברור מתי) הוא מתחבר אל ה-RNA שנוצר ומתחיל להתקדם לאורכו. מעניין לראות שהפקטור הקשור לסיום התעתוק מתיישב על האנזים כבר בתחילת השעתוק. יש פה מעין בזבוז של חלבון שיושב על האנזים מתחילת התהליך.

:Hairpin loop



בסוף הגן יש מקטע DNA שמקודד ל-RNA אשר יכול ליצור מבנה שניוני של stem&loop, ואחריו רצף נוקליאוטידים מסוג U.

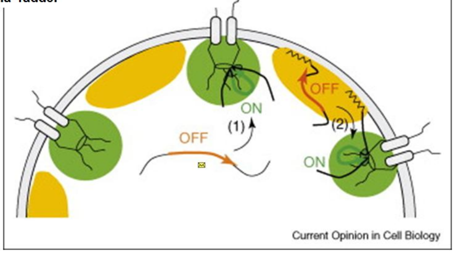
הלולאה גורמת לחוסר יציבות בין הRNA polymerase לבין ה-DNA, שכן זהו מבנה שמפריע מרחבית. בנוסף, רצף ה-U באזור הלולאה הינו זיווגי בסיסים בעלי קשר חלש יותר בין ה-DNA ל-RNA (פחות קשרי מימן) ושני אלה גורמים לשחרור של האנזים מהקומפלקס עם ה-DNA.

שעתוק באאוקריוטים:

באאוקריוטים יש גרעין תא, והשעתוק נעשה בתוכו. ה-RNA נוצר כ-pre-mRNA אשר צריך לעבור עיבודים שונים.

מיקום השעתוק:

Active genes at the nuclear pore complex
Angela Taddei



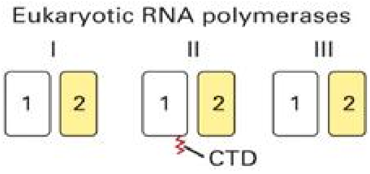
בגרעין יש אזורים כהים- בהם ה-DNA יותר דחוס לעומת אזורים בהירים בהם הוא פחות דחוס. איפה שהוא פחות דחוס השעתוק יכול לקרות.

ה-nuclear pores מכילים בסביבתם DNA פחות דחוס. וישנה העדפה לאזורים אלה עבור תהליך השעתוק (צבע ירוק). האזורים הרחוקים יותר (צבע צהוב) מכילים DNA שאינו משועתק, למשל ה-origin of replication שלא מייצר חלבון וגם אזורי הטלומרים. למעשה, מרבית ה-DNA אינו משועתק.

מודל-1: עקב אקטיבציה של גן מסוים תהיה הסטה של ה-DNA מאזור ה-OFF לאזור ה-ON. באזור ה-ON מצויים כל הגורמים הדרושים לשעתוק.

מודל-2: יותר פשוט להזיז את החלבונים אל ה-DNA מאשר להפך ולכן ה-DNA המשועתק כבר מצוי באזורי ה-ON.

©ענת עציון



<u>מספר אנזימי פולימראז:</u>

RNA polymerase I: מסנתז rRNA (ריבוזומים)

RNA polymerase II: מסנתז mRNA

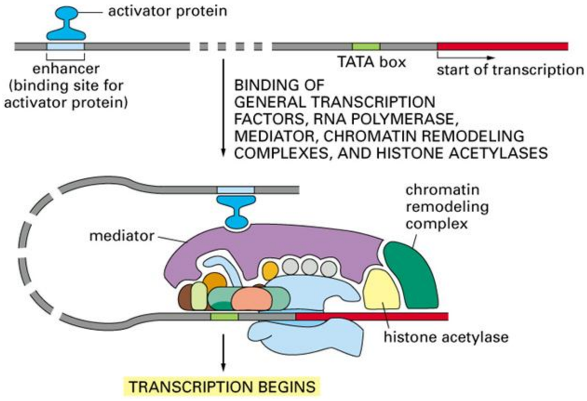
RNA polymerase III: מסנתז tRNA.

לכל אחד מהם יש חלבונים שספציפיים לו והשעתוק ע"י שלושתם מאוד דומה. ההבדל המשמעותי: זנב ה-CTD שיש בסוג II: 20-50 חזרות של 7 חומצות אמינו אשר יכולות לעבור זרחון.

<u>Initiation:</u>

ה-DNA האאוקריוטי מקופל בעזרת היסטונים. בהתחלה יש פתיחה של הקיפול ולא ברור האם ההיסטונים מסולקים לגמרי או רק בחלקם. להיסטונים יש שני תפקידים:

1. מונעים שעתוק (ולכן צריכים להיות מסולקים).
2. עוזרים לאנזים למצוא את מקום תחילת השעתוק.

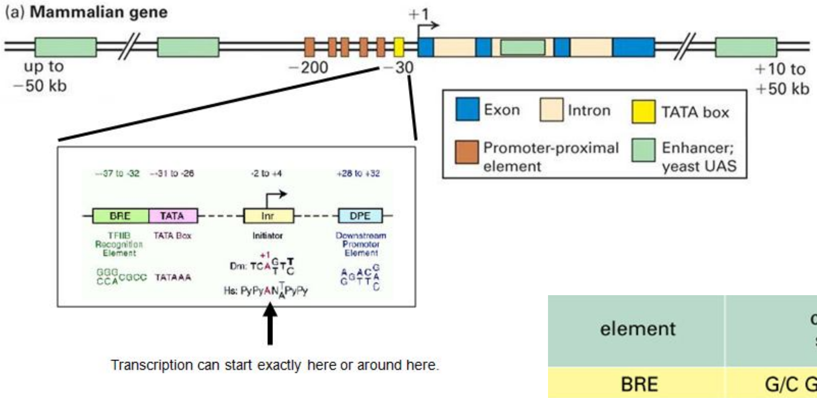


<u>אלמנטים בטרנס:</u> חלבונים שנקשרים ל-DNA ומבקרים את פעולתו (ומה שמקודד אותם מצוי רחוק ממקום הגן). יכולים להיות אלמנטים מאוד רחוקים שקיפול ה-DNA מביא אותם לקרבה פיזית למקום השעתוק.

<u>Mediator:</u> חלבון שלא נקשר ל-DNA אלא מתווך בין כל שאר הפקטורים האחרים לבין מערכת השעתוק.

<u>הערה:</u> בדרך-כלל הפקטורים בטרנס נקשרים אל ה-major grooves ב-DNA כי יותר קל להיקשר לשם ויש שם יותר קבוצות פונקציונאליות.

<u>אלמנטים ב-Cis:</u> כמו בפרוקריוטים יש רצף TATA box בפרומוטור. לידו יש BRE, הרצף אליו נקשר TFIIB. אנהנסורים או רפרסורים יכולים להיות רחוקים מאוד מהגן, בתוך אינטרונים, וגם downstream לגן.

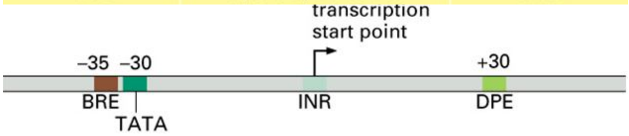


בתוך הגן עצמו יכולים להיות אזורים שמבקרים את השעתוק. הcore promoter ייקבע האם בכלל יהיה שעתוק ואם כן אז לאיזה כיוון.

האלמנטים המרוחקים יותר יקבעו את כמות השעתוק.

element	consensus sequence	general transcription factor
BRE	G/C G/C G/A C G C C	TFIIB
TATA	T A T A A/T A A/T	TBP
INR	C/T C/T A N T/A C/T C/T	TFIID
DPE	A/G G A/T C G T G	TFIID

אף פרומוטור לא מכיל את כל ארבעת האלמנטים.



<u>TATA box:</u> בד"כ נמצא 25-35 בסיסים upstream לתחילת השעתוק. כאשר יש סטייה מהמרחק האופטימאלי, זה יפגע בשעתוק ונקבל פחות תעתיקים. לפעמים נקבל התחלת שעתוק לא בנקודה הזו, אלא האנזים חפעמים יתחיל לשעתק ב 2+, 2-, 1-. ישנה התפלגות מסוימת של נקודת תחילת

©ענת עציון

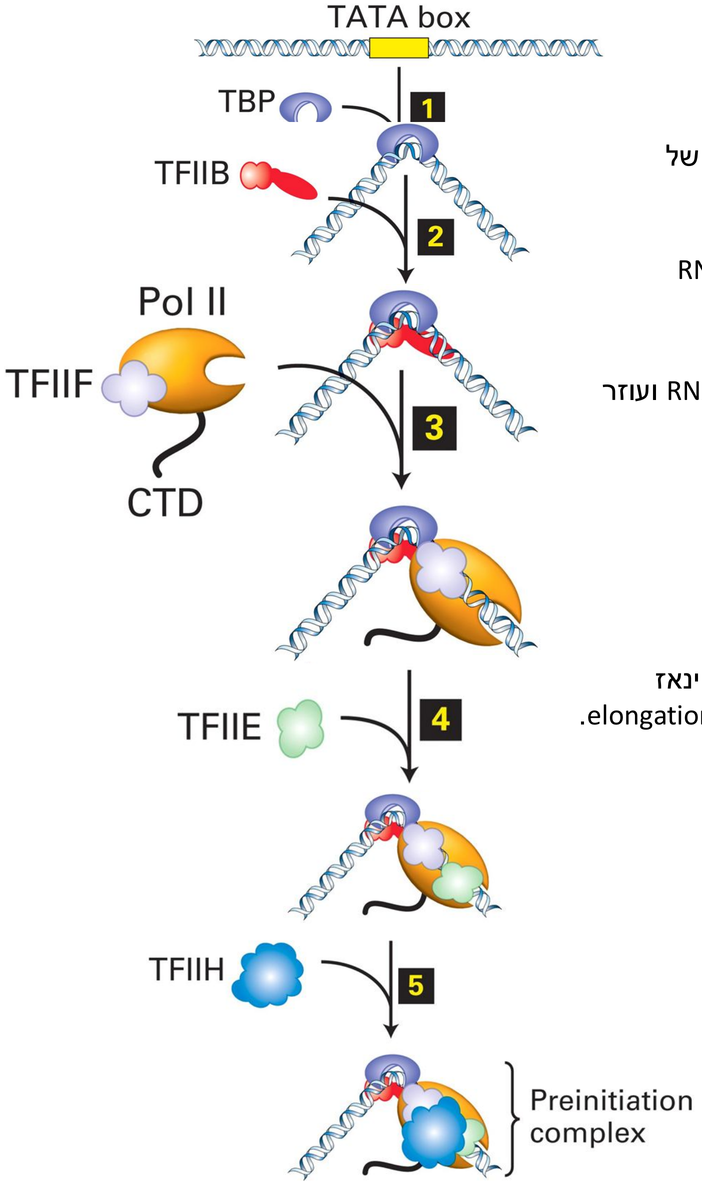
השעתוק. דיוק ברמה הזו אינו כל-כך חשוב. אבל יכולים להיווצר תעתיקים השונים באורכם (בגלל העיבוד הנוסף ל-pre-mRNA שנוצר).

<u>הערה:</u> בחלק מהגנים אין TATA box אבל הם מכילים הרבה חזרות של C ו-G באזורי הפרומוטור ומניחים שיש להם קשר לתחילת השעתוק. הם מסוגלים להתחיל שעתוק בכמה אתרים שונים.

<u>התהליך:</u>

הפקטורים שמעורבים בתהליך שייכים למשפחת ה-TFII. הם בונים קומפלקס חלבוני שיאפשר ל- RNA polymerase להגיע ולהיקשר ל-DNA.

<u>TFIID:</u> מכיל בתוכו את ה-**TBP**=TATA Binding Protein אשר נקשר ל-TATA box וגורם לכיפוף ה-DNA ופתיחתו. ישנם גם TAF=TBP Associated Factors שתפקידיהם:



1. עוזרים ל-TBP למצוא את ה-TATA box.
2. מסייעים להבי את הפקטורים הבאים בתור.

היסטונים מסומנים נקשרים ל-TAF.

<u>TFIIA:</u> מגיב עם ה-TBP של TFIID ומייצב את הקישור של TBP ל-TATA box ע"י חסימת repressors של פקטורי שעתוק.

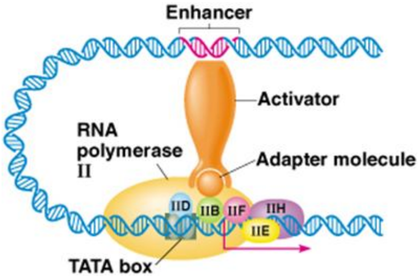
<u>TFIIB:</u> נקשר ל-BRE ומסייע בקישור TFIID לאנזים RNA polymerase II.

<u>TFIIF:</u> מגיע בקומפלקס עם האנזים RNA polymerase II ועוזר לקישור בינו ובין FTIIB.

<u>TFIIE:</u> מסייע לקשירת TFIIH ומאפשר את פעילותו כקינאז והליקאז. נחוץ גם לשחרור האנזים למעבר לשלב ה-elongation.

<u>TFIIH:</u> מבצע פתיחה של אזור השעתוק ("פעילות הליקאז"). מזרחן את שיירי הסרין והטירוזין בזנב ה-CTD, פוספורילציה מורידה את האפיניות של האנזים לאזור הפרומוטור כדי לאפשר לאנזים להמשיך הלאה לשלב ה-elongation. מרבית מפקטורי השעתוק משתחררים בתהליך פוספורילציה.

<u>הערה:</u> זיהוי שמוטציות ב-TFIIH גרמו לבעיה במנגנון התיקון NER.



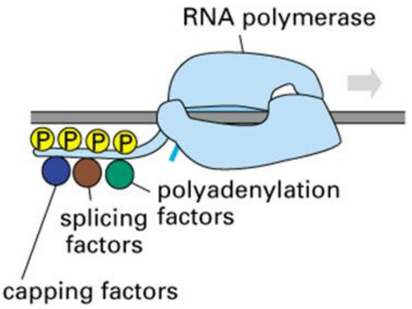
ה-DNA מתקפל ונקשר לאחד מפקטורי השעתוק, וזה עוזר לייצוב הפרומוטור ולהגברת/האטת תהליך השעתוק.

©ענת עציון

:Elongation

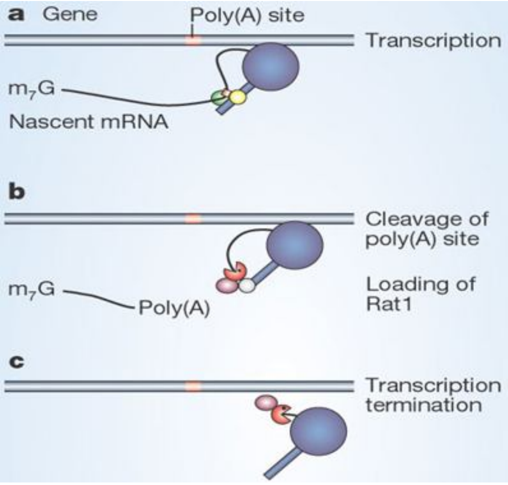
האנרגיה לפתיחת הקשר בין פוספט אלפא היא הכוח המניע את הסינתזה.

:Termination

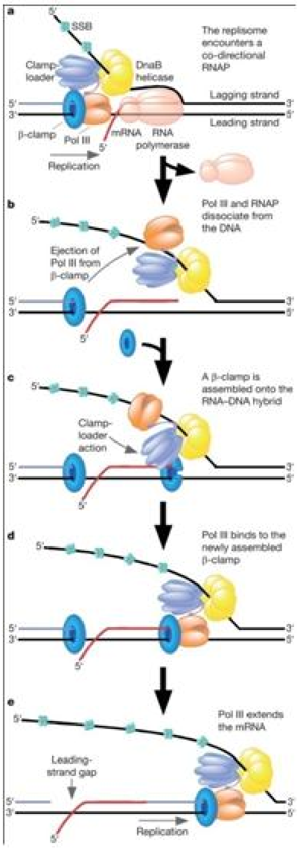


CTD: הרבה מאוד פקטורים חלבוניים נקשרים אליו.

הפקטורים שאחראים לטרמינציה מתחברים ל-CTD כבר בתחילת השעתוק. ברגע שהאנזים מגיע לאזור הטרמינציה ל- & cleavage poly-A signals (רצף נוקליאוטידים קצר יחסית: 5-6 בסיסים) הפקטורים מזהים אותו ונקשרים אליו ב-RNA שסונתז. לאחר הקישור, הפקטורים מבצעים חיתוך של מולקולת ה-mRNA, downstream לאתר הקישור שלהם (וכך רצף הטרמינציה מוכל ב-mRNA).



ה-RNA polymerase לא מודע לכך שה-mRNA נחתך ממנו והוא ממשיך בסינתזה. לאחר חיתוך ה-mRNA נקשר חלבון נוסף (פקמן אדום) שיש לו פעילות אקסוקטליטית: הוא מתחיל לאכול את ה-RNA ולפרק אותו. כשהוא מגיע מספיק קרוב אל האנזים, הפירוק שלו גורם לערעור של הקומפלקס ואז האנזים נופל מה-DNA.



תופעה מפתיעה:

בנוסף לתעתיק הארוך והמוכר של הגן, נוצרים גם קטעי RNA קצרים באזור הפרומוטור. ובנוסף אליהם, גם תעתיקי RNA קצרים לכיוון ההפוך (בגדיל השני!). זה מפתיע כי ידוע שהפרומוטור קובע את כיווניות השעתוק (The antisense transcription).

התנגשות DNA ו-RNA פולימראז:

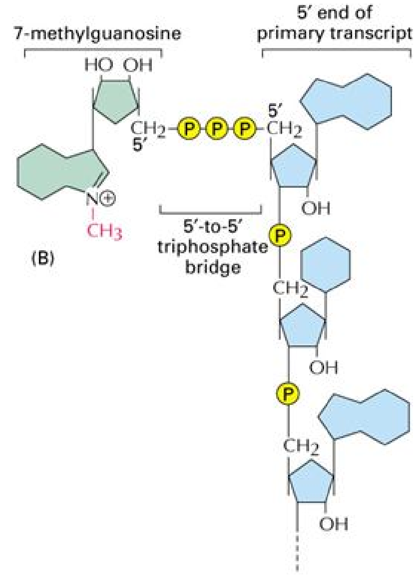
אם ה-DNA polymerase מתקדם ובמזלג ההכפלה הוא פוגש RNA polymerase שמסנתז RNA כלשהו אז הוא גורם לנפילה של ה- RNA polymerase מה-DNA והוא גם לוקח את מולקולת ה-RNA שהוא סינתז ומשתמש בה כפריימר לסינתזה שלו.

©ענת עציון

עיבוד mRNA

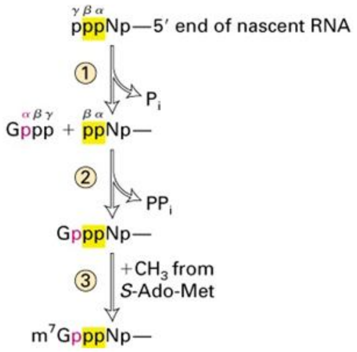
תהליכים שבהם מידע שלא היה קיים בגנום מוסף אליו, או מידע שכן היה קיים מורד מה-mRNA.

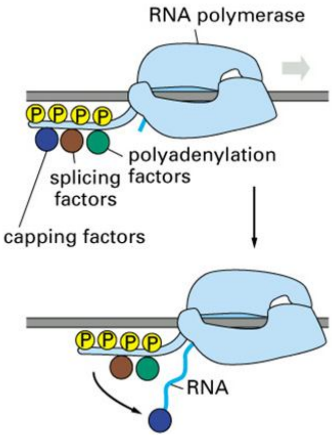
Capping:



מתווסף לאחר השעתוק מבנה בקצה '5 שבו גואנין שמכיל מתיל בעמדה 7. שלבי הוספת ה-cap:

1. סילוק של פוספט גאמא מהקצה ה'5 ב-DNA (phosphohydrolase)
2. חיבור קשר בין הפוספט של הגואנין לפוספט ביטא שב-DNA (guanylyl transferase).
3. הוספת קבוצת מתיל בעמדה 7 של הגואנין (methyl transferase).

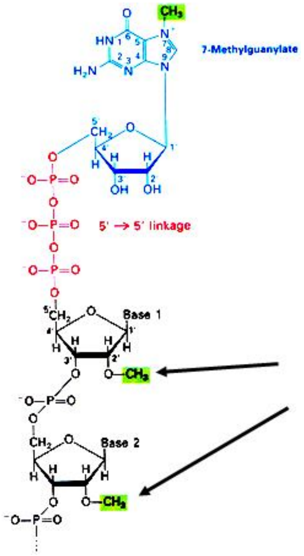




תהליך ה- capping קורה כבר כשה-mRNA מבצבץ החוצה מה- RNA polymerase.

כל ה-CTD יש פקטורי capping, וברגע שתחילת ה-RNA יוצא החוצה מהאנזים, הם מתיישבים עליו, עושים לו פירוק של פוספט גאמא ומוסיפים גואנין ומתילציה.

<u>הערה:</u> ה- rRNA וה-tRNA לא מכילים cap כי ל-RNA polymerase שלהם אין זנב CTD ולכן אין להם חלבונים שיוצרים capping.



ישנם mRNA שמוספות להם קבוצות מתיל גם על הסוכרים

<u>תפקידי ה-cap:</u>

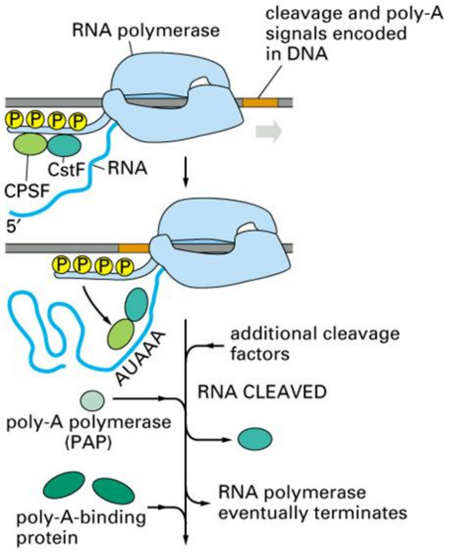
- מעכב פירוק RNA מכיוון ה-'5 בגלל שנקשר חלבון: cap binding protein.
- ה-cap ממריץ splicing ותרגום.

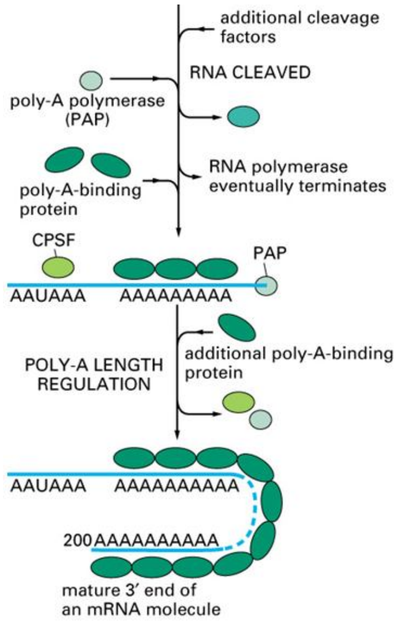
©ענת עציון

:Poly Adenylation

הוספת זנב ארוך של A בקצה ה3' של ה-RNA.

בסיום תהליך השעתוק, מתיישבים על ה-RNA פקטורי CPSF=Cleavage and Polyadenylation factors על ה-RNA ו-CstF= Cleavage stimulating Factor וגורמים לחיתוך שלו מה-RNA polymerase.





ואז מגיע האנזים: poly-A polymerase (PAP) המסנתז רצף של A שיכול להגיע ל200-250 בסיסים בקצה ה-3'.

תוך כדי הסינתזה מגיע החלבון: poly-A binding protein והוא נקשר לרצפי ה-A (כל חלבון נקשר ל-12 A) וכל החלבונים מצפים את הזנב של ה-A.

תפקידי ה-poly-A:

- שומר על יציבות ה-mRNA
- מונע פירוק ע"י אנדונוקליאזות מכיוון ה3'.

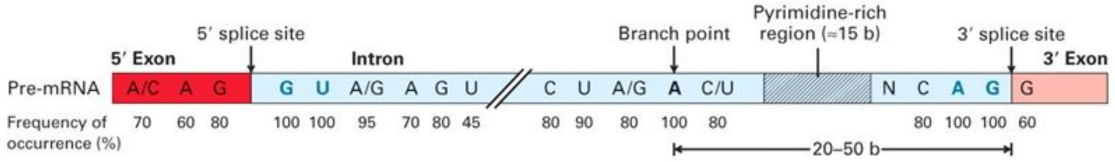
שחבור- splicing:

אינטרונים: המקטעים המסולקים. אורך ממוצע: 2000 בסיסים ואפילו יותר.

אקסונים: המקטעים שנשארים ב-mRNA. אורך ממוצע: 200 בסיסים.

הניסוי שבו גילו את תופעת השחבור: לקחו RNA ועשו לו היברידיזציה עם ה-DNA. בתאים אאוקריוטים בניגוד לפרוקריוטים, לא הייתה היברידיזציה מלאה וגילו שישנם מקטעי DNA מאוד גדולים שלא עוברים היברידיזציה עם ה-RNA (r-loops).

אלמנטים בציס:



1. רצף GU בקצה ה-5' של האינטרון ליד ה: 5' slice site.
2. רצף AG בקצה ה-3' של האינטרון ליד ה: 3' slice site.
3. Branch point: רצף נוקליאוטידים שמור נוסף שיש בו A.

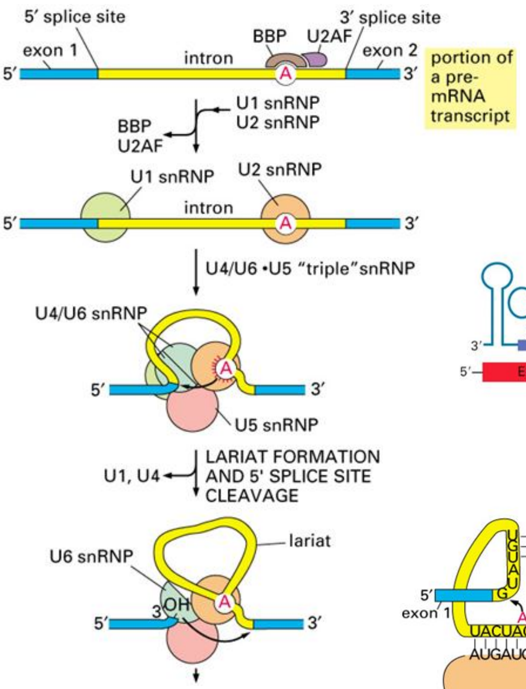
ההבדלים בין אינטרונים שונים נמצאים בין ה-branch point ל-5' splice site.

©ענת עציון

<u>אלמנטים בטרנס:</u>

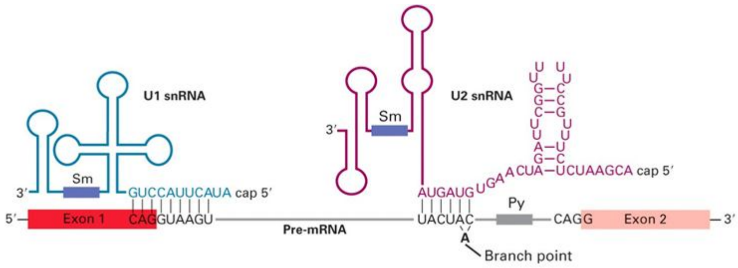
חלבונים אשר מבצעים את ה-splicing הם: snRNPs- U1, U2, U4, U5, U6. בכל אחד מהם יש RNA שאורכו כ-150 נוקליאוטידים ומחוברים אליו בין 8 ל-10 חלבונים שונים.

<u>תפקידיהם:</u> זיהוי האלמנטים בציס, הבאתם לקרבה פיסית וקטליזה של הריאקציות.



קישור U1 ל-5' splice site וקישור U2 ל-branch point.

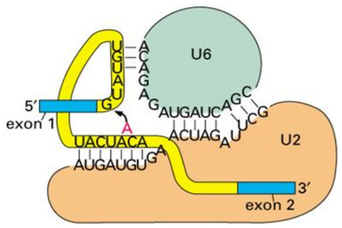
הם יוצרים זיווגי בסיסים עם האזורים אליהם הם נקשרים. ב-U2 ה-A השמור אינו יוצר זיווג בסיסים אלא בולט החוצה מהקומפלקס.



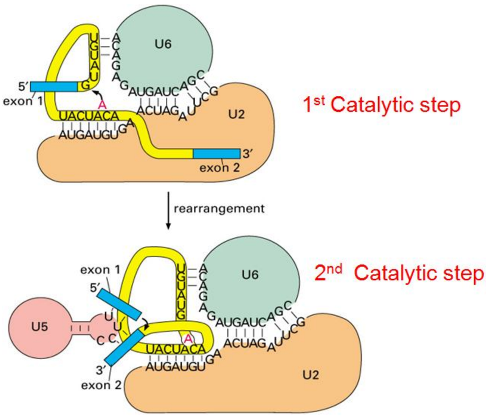
U4, U5, U6 מגיעים ונוצר קומפלקס שלהם עם U1, U2.

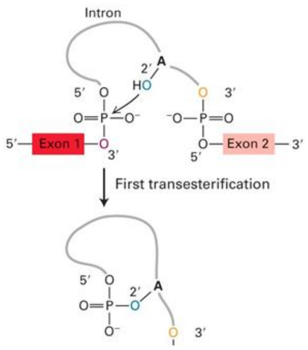
ואז U4 מסולק ו-U6 מחליף את U1.

מולקולת ה-RNA שב-U6 יוצרת זיווגי בסיסים משני צדדים: נקשרת ל-U2 ומושכת אותו ומביאה אותו לקרבה פיסית. ה-A שלא יצר זיווג בסיסים בולט החוצה והוא במיקום לביצוע ריאקציה קטליטית ראשונה.



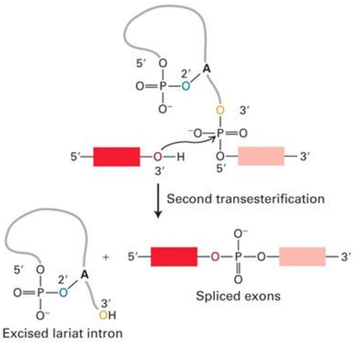
<u>ריאקציות הטרנסאסטריפיקציה:</u>





<u>ריאקציה-1:</u> A הגיע למיקום פיסי המאפשר התקפה נוקליאופילית ליצירת קשר-טבעת. הריאקציה לא הייתה קורית ב-dATP כי אין בו OH בעמדה '2 שלמעלה.

נוצרת טבעת: lariant intron.



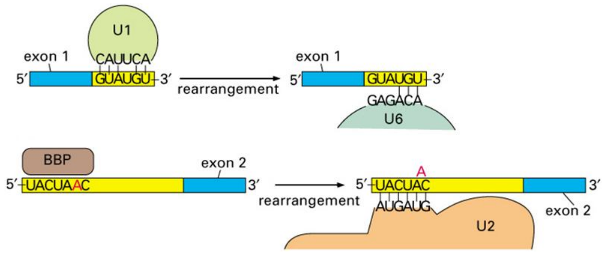
<u>ריאקציה-2:</u> U5 יוצר זיווגי בסיסים עם האקסון הראשון והאקסון השני. והוא מאפשר לקבוצת ה-OH שבאקסון-1 לבצע התקפה נוקליאופילית על הפוספט שנמצא בחיבור לאקסון-2 ליצירת הקשר ביניהם.

כתוצר מתקבלים שני אקסונים שהתחברו זה לזה והטבעת שהשתחררה מהגדיל.

טבעת האינטרונים תפורק בתוך הגרעין וה- snRNPs ימוחזרו לריאקציות נוספות.

©ענת עציון

החלפות ו-re-arrangements במהלך ה-splicing:

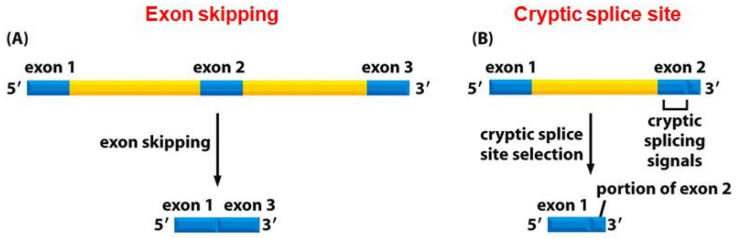


מבחינה ביולוגית ההחלפות הללו נחוצות כי:

1. U1 תפקידו זיהוי מיקום הקישור ואח"כ u6 מזהה את הרצף. אלו הן שתי רמות של הכרה, ספציפיות יותר גבוהה.
2. תזמון. התהליך גורם לשרשרת אירועים שתקרה בסדר הנכון: עד ש-U6 לא סיים להחליף את U1, תהליכים אחרים ב-splicing לא יכולים לקרות.

דוגמא נוספת: עד ש-U4 לא משתחרר מ-U6 ועוזב אותו, התהליך לא יכול להמשיך.

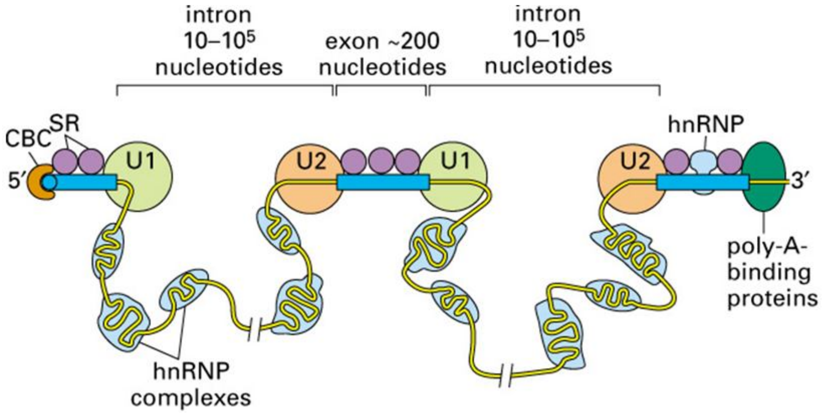
אפשרויות לטעויות בשחבור:



1. בטעות מדלגים על אקסון אחד.
2. Cryptic splice site: אתר שדומה ברצפו לאתר splicing רגיל באמצע האקסון ואז חלק מן האקסון נזרק החוצה.

מניעת טעות-1: תהליך ה-splicing מתרחש כבר תוך כדי השעתוק. ה-splicing factors נקשרים ל-mRNA תוך כדי ולכן ברגע שכבר יצאו מהאנזים אקסון-1 ואקסון-2 האינטרון ביניהם עובר splicing ושזה ימנע את הטעות של חיבור שני אקסונים שאינם סמוכים זה לזה.

מניעת טעות-2: חלבוני SR נקשרים לאזורים בתוך האקסונים ובעצם מסמנים את האקסון והם מסייעים לחלבוני ה-U להבחין בין אזורים של אקסונים לאזורים של אינטרונים.

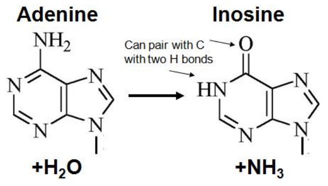


עריכת ה-mRNA:

שינויים לנוקליאוטידים ב-RNA אשר משנים את הקידוד לחלבון.

סוגים עיקריים:

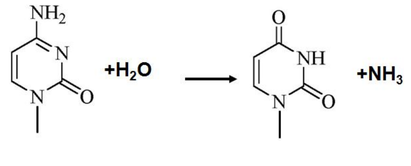
1. U רבים מתווספים או מוסרים לתעתיק.



2. חלק מה-A עוברים דה-אמינציה ל-I.

I יכול ליצור זיווג בסיסים עם C (שני קשרי מימן).

3. חלק מה-C עוברים דה-אמינציה ל-U.



©ענת עציון

תהליך התרגום

הקוד הגנטי:

First letter	Second letter: U	C	A	G	Third letter
U	UUU, UUC Phenyl-alanine UUA, UUG Leucine	UCU, UCC, UCA, UCG Serine	UAU, UAC Tyrosine UAA Stop codon UAG Stop codon	UGU, UGC Cysteine UGA Stop codon UGG Tryptophan	U C A G
C	CUU, CUC, CUA, CUG Leucine	CCU, CCC, CCA, CCG Proline	CAU, CAC Histidine CAA, CAG Glutamine	CGU, CGC, CGA, CGG Arginine	U C A G
A	AUU, AUC, AUA Isoleucine AUG Methionine; start codon	ACU, ACC, ACA, ACG Threonine	AAU, AAC Asparagine AAA, AAG Lysine	AGU, AGC Serine AGA, AGG Arginine	U C A G
G	GUU, GUC, GUA, GUG Valine	GCU, GCC, GCA, GCG Alanine	GAU, GAC Aspartic acid GAA, GAG Glutamic acid	GGU, GGC, GGA, GGG Glycine	U C A G

Redundancy: יכול להיות יותר מקודון אחד לחומצה אמינית מסוימת.

אין חפיפה של קודונים וישנה רק דרך אחת לקרוא את השלשות.

בכל רצף של נוקליאוטידים נוצרות 3 מסגרות קריאה אפשריות.

ב-DNA שבו יש שני גדילים ישנן 6 אפשרויות למסגרות קריאה: 3 מכל גדיל.

מי שיקבע מהי מסגרת הקריאה הוא ה-start codon: AUG שמקודד למתיונין.

:Codon bias

ברמת הגן: ישנן הטיות לגבי קודון ספציפי לחומצה אמינית על-פני קודונים אחרים המקודדים אליה. ישנם גנים שבהם רק קודון אחד מועדף והקודונים האחרים כמעט ולא קיימים.

Amino acid	Code	Gal4	ADH1
Gly	GGG	0.21	0
Gly	GGA	0.17	0
Gly	GGT	0.38	0.93
Gly	GGC	0.24	0.07

ברמת האורגניזם: העדפה לקודונים מסויימים על-פני אחרים.

<u>סיבות אפשריות להטייה:</u>

1. ישנם חיידקים שחיים בסביבות קיצוניות (חמות/מלוחות) שבהן ההטייה היא מאוד ברורה לגבי קודונים שעשירים ב-G,C עקב חוזק הקשר.
2. קודון שמולקולות ה-tRNA שלו נפוצות יותר יאפשר תרגום מהיר יותר וברמה יותר גבוהה.

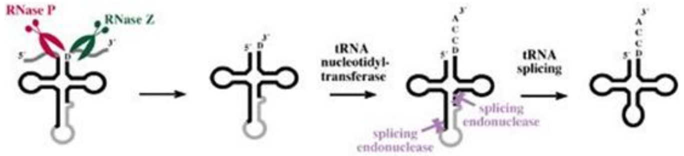
Codon	Human	Drosophila	E.coli
Arginine:			
AGA	22%	10%	1%
AGG	23%	6%	1%
CGA	10 %	8%	4%
CGC	22 %	49%	39%
CGG	14 %	9%	4 %
CGU	9 %	18%	49%
Total number of arginine codons	2403	506	149
Total number of genes	195	46	149

©ענת עציון

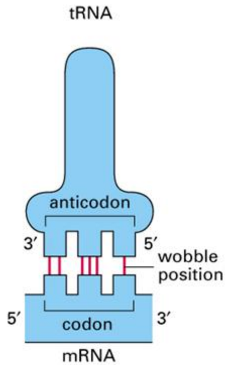
:tRNA

מולקולת RNA שאורכה 70-100 נוקילאוטידים. tRNA מקבל מבנה שניוני של "עלה תלתן" בגלל זיווגי בסיסים מסוימים. ה-tRNA גם מתקפל למבנה שלישוני.

ה-tRNA מסונתז כמולקולה ארוכה יותר אשר עוברת תהליכי חיתוך ועיבוד שונים. יש במקום בלופ התחתון שנחתך החוצה ואז מתקבל ה-anti-codon הנכון.



:codon ו-anti-codon



הקודון נקרא מכיוון '5 לכיוון '3 והאנטי-קודון בכיוון ההפוך '3 ל-'5.

3 עמדות- 2 רגיליות ועמדה שלישית: wobble position. היא יכולה להכיל זיווגי בסיסים בין יותר משני נוקליאוטידים, מאפשרת זיווגים נוספים:

bacteria

wobble codon base	possible anticodon bases
U	A, G, or I
C	G or I
A	U or I
G	C or U

כך tRNA אחד יכול להכיר למשל 3 קודונים שונים, לאותה חומצה אמינית. לא יקרה מצב ש-tRNA יזהה קודונים של חומצות אמיניות שונות. ישנם tRNA שמכירים רק קודון אחד.

העיקרון זה הוא שנותן את ה-redundancy.

<u>הערה:</u> אינוזין נוצר מדי-אמינציה של אדנין.

eucaryotes

wobble codon base	possible anticodon bases
U	G or I
C	G or I
A	U
G	C

:tRNA charging

ישנם 20 אנזימים מסוג Aminoacyl-tRNA synthetase, אחד ספציפי לכל חומצה אמינית. האנזים הזה מטעין את החומצה האמינית המתאימה על ה-tRNA המתאים.

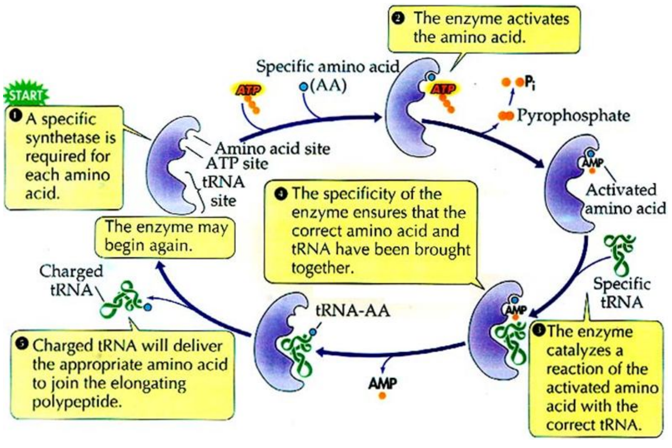
ישנם יותר מ-20 tRNA שונים כי לכל חומצה אמינית ישנם כמה tRNA שה-anti-codon שלהם מתאים לה. ולכן ישנם אנזימים שיודעים לזהות יותר מ-tRNA אחד.

<u>באנזים ישנם 3 אתרי קישור:</u>

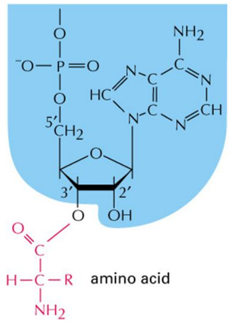
1. קישור ל-ATP, 2. קישור ל-tRNA,
3. קישור לחומצה אמינית.

נוצר קשר בין קבוצת הקרבוקסילי של החומצת אמינו לפוספט אלפא ב-ATP, השניים האחרים משתחררים ומתקבלת באנזים חומצה אמינו טעונה ב-AMP.

חומצת האמינו מוטענת ל-tRNA בקצה ה-'3 שלו תוך כדי שחרור ה-AMP.



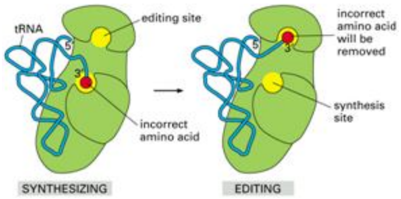
©ענת עציון



חומצת האמינו מחוברת דרך הצד הקרבוקסילי שלה לקצה ה-3'OH של ה-tRNA. אבל לפעמים גם לקצה ה-2'OH.

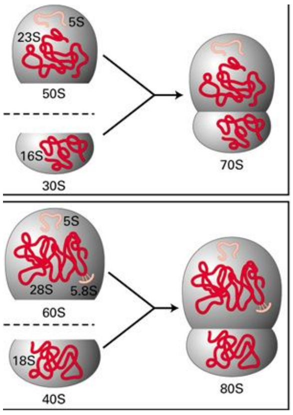
<u>בחירת חומצת האמינו הנכונה:</u> הטענת חומצה אמינית נכונה היא שלב קריטי בתהליך התרגום. טעות בהטענה תיגרר בכל המשך התהליך ולא תתוקן בהמשך. ה- tRNA יכניס את החומצה האמינית המחוברת אליו בתהליך התרגום, לא משנה מה היא.

רק חומצות אמינו שיש להן גודל ומטען מתאימים, יצליחו להיכנס לאתר הפעיל של האנזים שמבצע את חיבור החומצה האמינית. לאחר שחומצת האמינו נכנסת ומתחברת אל ה-tRNA היא מוסטת לאזור אחר באנזים, אזור של-editing, ובתוך הכיס הזה, חומצות אמינו לא מתאימות ייחתכו ויסולקו החוצה. החומצה האמינית הנכונה לא מצליחה להיכנס לאתר הקטליטי ולכן היא לא נחתכת החוצה.



<u>בחירת tRNA נכון:</u> ישנו אזור באנזים שיודע לזהות את ה-anti-codon ולכן רק זה המתאים יתחבר לאנזים.

<u>הריבוזום:</u>



הריבוזום הוא מולקולה שמורכבת מחלבונים ומ-RNA. זהו קומפלקס מאוד-מאוד גדול.

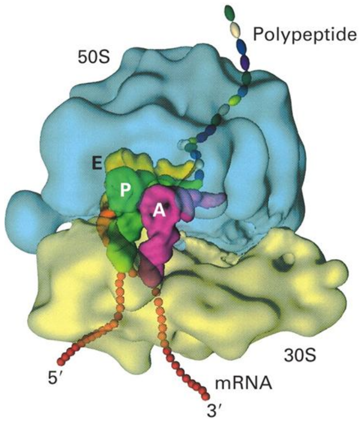
בתאים פרוקריוטי הריבוזום השלם נקרא: 70S.

בתאים אאוקריוטים הריבוזום השלם נקרא: 80S.

כל אחד מהריבוזומים מרוכב משתי תתי-יחידות: גדולה וקטנה.

תת היחידה הגדולה מורכבת משתי מולקולות RNA. תת היחידה הקטנה מכילה RNA קצר יותר.

<u>מבנה הריבוזום:</u>



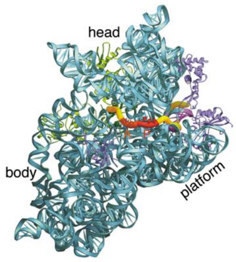
כחול= תת-יחידה גדולה.   צהוב= תת-יחידה קטנה.

mRNA- חלק מן הנוקליאוטידים שלו שקועים בתוך התת-יחידה הקטנה של הריבוזום (30-40) ומתוכם 3 נמצאים בתחתיתו של ה- A site.

בקצה העליון של ה-P site מתחילה תעלה ארוכה שעוברת דרך כל תת-היחידה הגדולה וזוהי תעלת היציאה של החלבון.

<u>קריסטלוגרפיה:</u>

הריבוזום זה מבנה מאוד גדול, הסיכוי לגבש אותו כך שכל הריבוזומים יסתדרו בדיוק באותה צורה הוא מאוד-מאוד קטן. גם לאחר הגיבוש, התוצאות של הקריסטלוגרפיה יהיו כל-כך מסובכות שלא ניתן יהיה לפענח אותן. עדה יונת פיתחה הרבה מאוד כלים של קריסטלוגרפיה. היא התחילה לעבוד עם חיידקים מים המלח שהריבוזומים שלהם מאוד יציבים ועמידים. היכולות החישוביות שהתפתחו במהלך השנים עזרו בניתוח נתוני הקריסטלוגרפיה.



<u>תת-היחידה הקטנה:</u> ה-mRNA מגיע מצד אחד, מקיף את היחידה ויוצא מהצד השני שלו. התת-יחידה משמשת כבסיס ל-mRNA. היא מזהה אותו והוא עובר דרכה. כל קשר בין הריבוזום השלם לבין ה-mRNA נעשה דרך תת-היחידה הקטנה.

<u>תת-היחידה הגדולה:</u> במרכזה נמצא הכיס הקטליטי. בתוכה תהיה יצירת הקשר הפפטידי. התוך תת-היחידה הגדולה יצא החלבון החוצה. השליטה על קצה התהליך נעשית בתת-היחידה הגדולה.

©ענת עציון

יצירת הריבוזום:

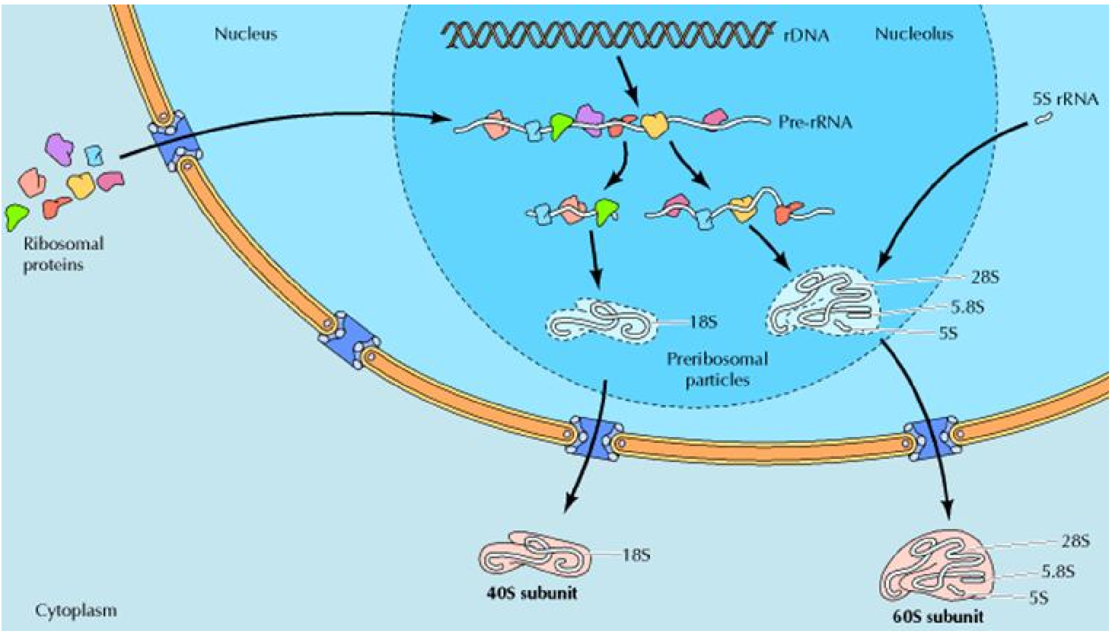
היווצרות הריבוזום כרוכה בהתארגנות של חלבונים וRNA ריבוזומאלי ביחד. בתוך הגרעין יש גרעינון ובתוכו יש חלק מה-DNA הנקרא: rDNA שמקודד ל-rRNA. התהליך עיבוד ה-pre-rRNA מעורבים חלבונים שבאים מהציטופלסמה, נכנסים לגרעין, משם לגרעינון, נקשרים אל ה-pre-rRNA ומעורבים בחיתוך ובקיפול הנכון שלו לקבלת תתי-היחידות של הריבוזום.

הגנים המקודדים לחלבוני הריבוזום מקודדים מחוץ לגרעינון ע"י RNA polymerase II ומתורגמים בציטופלסמה. לאחר-מכן החלבונים עוברים טרנספורט אל הגרעין ושם הם עוברים assembly עם ה-pre-rRNA.

5S-rRNA מתועתק ע"י RNA polymerase III מחוץ לגרעינון ועובר אריזה ביחד עם שאר המרכיבים בתוך הגרעינון.

התרכבות חלבוני הריבוזום נעשית כבר בשלב ההתחלתי כאשר ה-pre-rRNA עדיין מסונתז. עד לשלב הביקוע יותר ממחצית החלבונים כבר בקומפלקס עם ה-rRNA. שאר החלבונים מתרכבים איתו תוך כדי שלבי הביקוע. בשלב האחרון יהיה טרנספורט של כל המרכיבים החוצה מהגרעין ובציטופלסמה ייווצרו תתי-היחידות של הריבוזום הבוגר והפעיל בתאים אאוקריוטים.

מדוע החלבונים פוגשים את ה-rRNA כבר בגרעינון? זה מאפשר שליטה טובה יותר על כמות הריבוזומים שמיוצרים ע"י הכנסה או אי הכנסה של החלבונים מהציטופלסמה. החלבונים הללו משמשים כמתווכים בין מה שקורה בציטופלסמה מבחינת צורכי סינתזת החלבונים, לבין כמה ריבוזומים צריך לייצר בתוך הגרעינון.

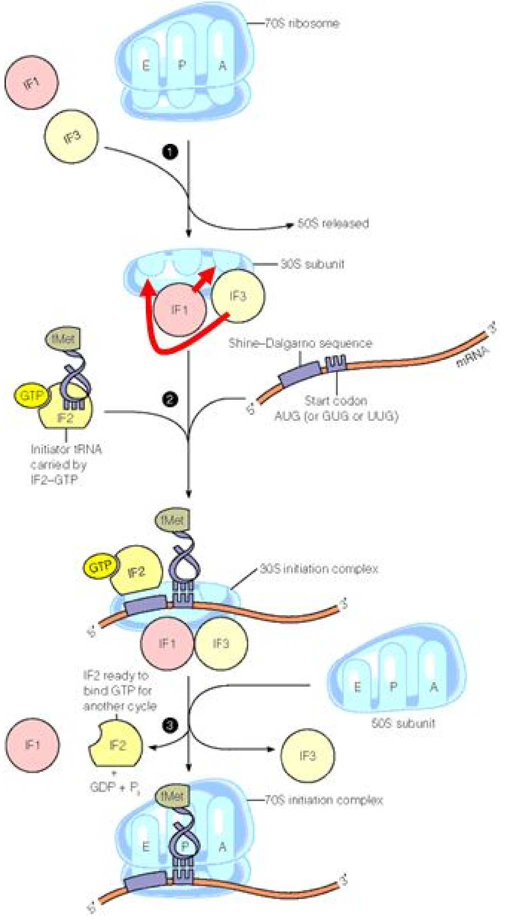


©ענת עציון

תהליך התרגום:

תרגום בפרוקריוטים:

Initiation:



IF-1 נקשר ל-A site וחוסם אותו. נחוץ להיקשרות IF-2.

IF-3 נקשר ל-E site וחוסם אותו. מייצב את הקשר בין ה-tRNA וה-P site.

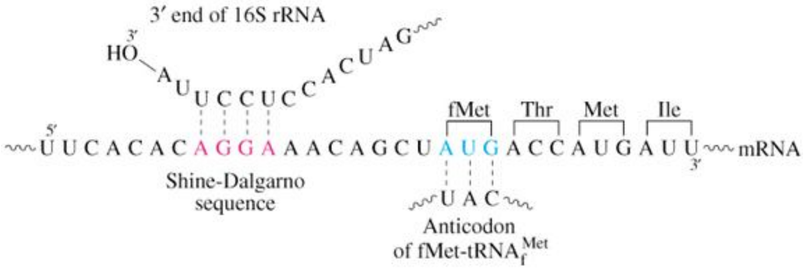
כאשר תת-היחידה הקטנה נקשרת ל-mRNA, אתרי ה-A וה-E חוסמים. ואז מגיע IF-2 מחובר ל-tRNA עם מתיונין שנקשר ל-P site שהוא היחיד שחשוף ופנוי.

כל עוד ה-IF בקומפלקס, תת-היחידה הגדולה לא יכולה להתחבר. ולכן ישנה הידרוליזה הגורמת לשחרור של שלושתם ואז תת-היחידה הגדולה נקשרת ונוצר קומפלקס שלם של הריבוזום.

וכעת ה- A site פנוי.

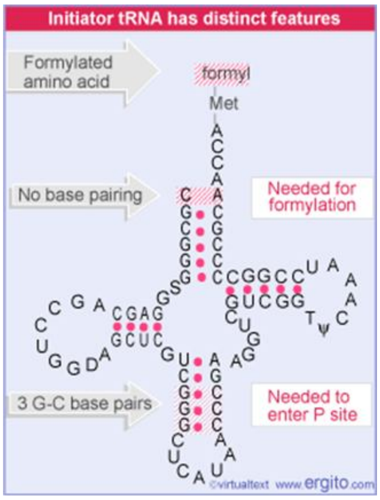
ל-mRNA יש רצף שנקרא: Shine-Dailgarno. רצף זה יכול ליצור זיווגי בסיסים עם אזור 16S בריבוזום (תת-היחידה הקטנה) כדי להביא לקישור למקום הנכון. רצף ה-Shine Dailgarno קצת שונה בין כמה mRNA שונים וגם מרחקו מה-AUG.

ככל שהרצף ארוך יותר, הוא ייצור הומולוגיה טובה יותר ל-16S ולכן היעילות שבה תת-היחידה הקטנה תגיע אל ה-mRNA תהיה גדולה יותר (תבוא יותר בקלות אל המקום הנכון). ככל שהמרחק ל-AUG יהיה רחוק יותר מ-11 נוקליאוטידים, יעילות הקישור תהיה נמוכה יותר.



<u>הערה:</u> ב-mRNA שיש בו כמה גנים, ישנו אתר קישור לריבוזום לפני כל אחד מהם

initiation-tRNA:



בתאים פרוקריוטי המתיונין שעל ה-tRNA בשלב האיניציאציה הוא מתיונין שעבור פורמילציה (נוספה לו קבוצת פורמיל). ה-tRNA הזה יגיע עם IF-2.

מולקולת ה-tRNA מיוחדת ובעלת שתי תכונות:

1. מסוגלת להיכנס ל-P site של הריבוזום (עקב הנוקליאוטידים השמורים באזור הלופ).
2. קבוצת המתיונין שלה עוברת פורמילציה.

<u>סימון:</u> $fmet\text{-}tRNA^{Met}$.

ה-tRNA הזה לא יכול להיכנס באמצע הגן.

IF-2 מושיב את ה-tRNA ב-P site. הוא קושר את ה-tRNA וגם מולקולת GTP, והוא מתחבר לתת-יחידה הקטנה. ואז IF-1 ו-IF-3 משתחררים מהריבוזום.

©ענת עציון

Elongation:

A site: ה-tRNA עם החומצה האמינית (Amino acid).

P site: ה-tRNA ובו שרשרת פפטידית (Poly peptide).

E site: אתר היציאה (Exit).

ה- A site פנוי, מגיע tRNA מתאים עם חומצה אמינית

נוצר קשר פפטידי לחומצה האמינית הקודמת (שבאתר ה-P site).

ואז יש טרנסלוקציה- הריבוזום זז 3 נוקליאוטידים downstream וה-tRNA הקודם עובר ל-E site והחדש עובר ל-P site.

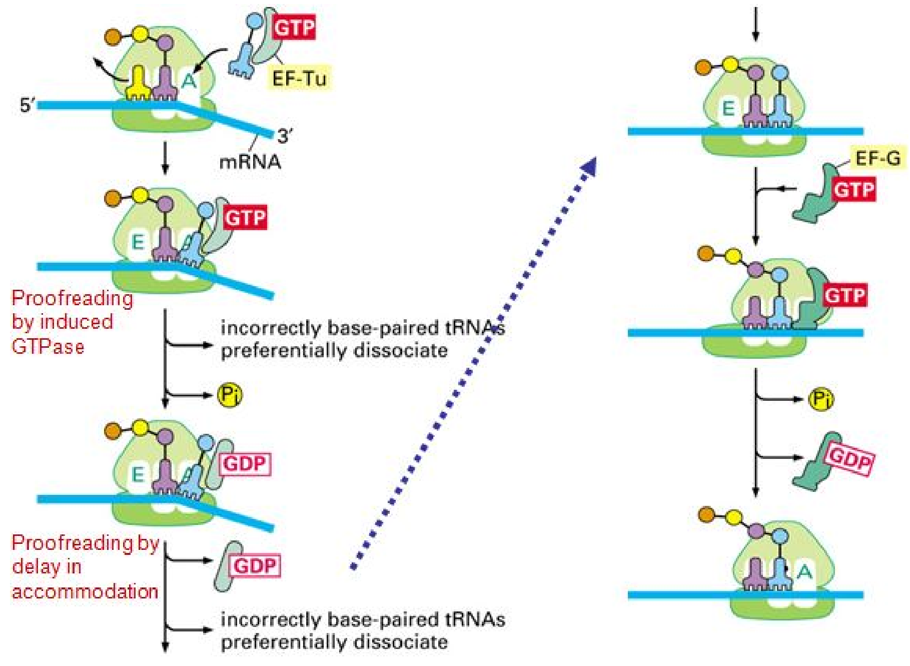
ישנם פקטורים שמסייעים לתהליך:

EF-Tu: מסייע ל-tRNA הנכון להתחבר למקום הנכון. הוא יודע לבדוק שה-tRNA והחומצה האמינית שמחוברת אליו מתאימים. אם הם לא, הוא מזהה זאת ולא מביא אותו אל אזור התרגום. אם זיווגי הבסיסים בין ה-tRNA לקודון מתאימים ישנה הידרוליזה של GTP שמקבעת את הקשר. אם הם לא מתאימים, אז אין הידרוליזה ואז ה-tRNA משתחרר.

שלב ה-accommodation: כל עוד ה-TF-Tu מחובר אליו, הוא לא יכול להתיישב בצורה הנכונה והישרה, המתאימה לקשר הפפטידי. הזמן שלוקח ל-EF-Tu להשתחרר מהקומפלקס הוא קריטי להחלטה האם זהו ה-tRNA הנכון. כאשר לוקח לזה זמן רב מידיד אז ה-tRNA כנראה לא מתאים ולכן הוא יוצא החוצה.

EF-G: מסייע בשינוי המבני של הריבוזום ובהתקדמות שלו קודון אחד downstream.

הערה: כל אחד מהפקטורים עושה שימוש ב-GTP, סה"כ: 2 GTP לכל קשר פפטידי.



©ענת עציון

<u>הסיבה לפורמילציה במתיונין הראשון:</u>

בקשר הפפטידי הראשון שנוצר, ייתכן מצב תיאורטי שבו חומצ האמינו הראשונה: מתיונין ה-NH2 שחה יתקוף את קבוצת הקרבוקסילי של החומצה האמינית השנייה, ולא להפך. וכך יסתיים התהליך של סינתזת החלבון. ולכן כדי למנוע זאת, המתיונין הראשון עובר פורמילציה.

קבוצת פורמיל על האמין היא לא ריאקטיבית ולא יכולה לתקוף את החומצה האמינית השנייה.

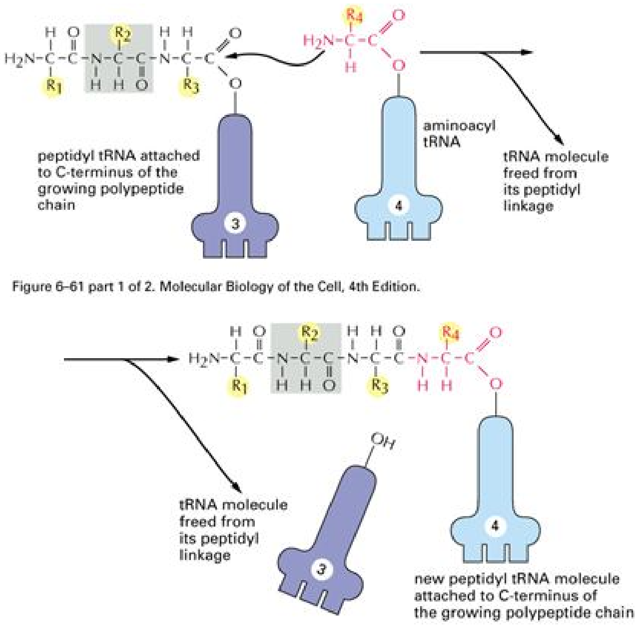
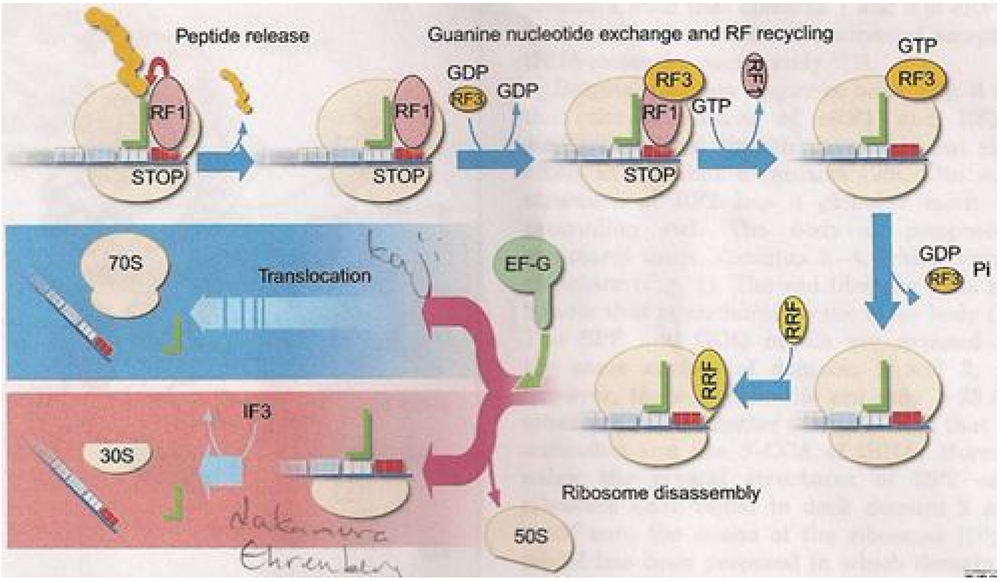


Figure 6-61 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

<u>Termination:</u>

הריבוזום מתרגם את ה-mRNA ומגיע לקודון טרמינציה. לקודון הזה אין tRNA שמתאים לו. ישנם פקטורי טרמינציה הנקראים: EF-1, EF-2. כל אחד מהם מזהה קודוני טרמינציה אחרים. בתאים אאוקריוטים יש רק RF אחד שמזהה את כל קודוני הטרמינציה. זהו חלבון שמאוד דומה למולקולת tRNA.

ישנה הידרוליזה של GTP שמשחררת החוצה את RF-1. ואז מתבצע פירוק של הריבוזום, ה-mRNA, ה-tRNA ומרכיביו. בפירוק הזה מעורבים 3 פקטורים: RRF, RF-G, IF-3. הריבוזום מתרפק לשתי התת-יחידות שלו בעזרת RRF.



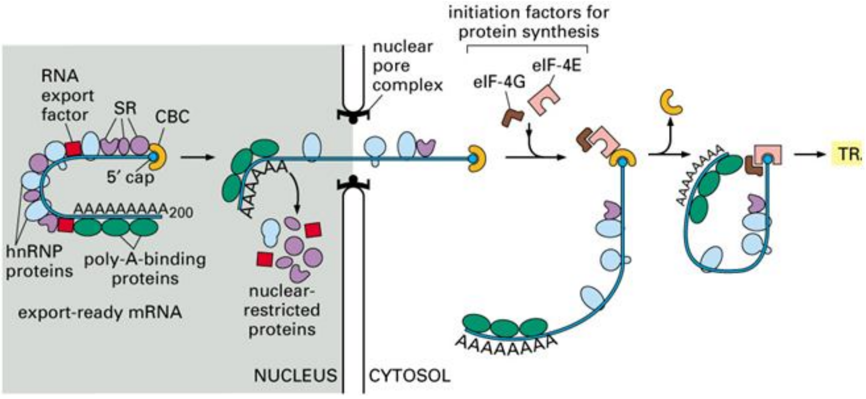
©ענת עציון

תרגום באאוקריוטים:

ה-mRNA מסונתז בגרעין וצריך לצאת החוצה דרך ה-nuclear pores.

היציאה מהגרעין היא לא סתם תהליך, זו נקודת בקרה לאיכות ה-mRNA. ה-mRNA מצופה בהרבה מאוד חלבונים. בנקודת החיבור יושב קומפלקס חלבוני EJC (Exon Junction Complex) אשר מסמנים שה-RNA עבר את תהליכי העיבוד שלו.

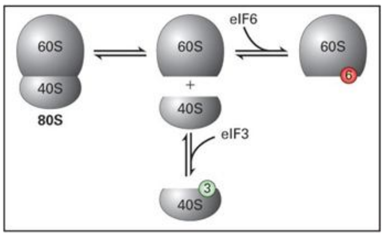
כשה-mRNA יצא מהגרעין החוצה, הוא יעבור בנקודת ביקורת ושם יהיה וידוא שהוא עבר את כל תהליכי העיבוד. המידור הזה בין תהליכי ההתבגרות ובין תרגום החלבון מגביר את יעילות ודיוק התהליך.



:Initiation

מערכת התרגום באאוקריוטים היא הרבה יותר מורכבת, ישנם יותר חלבונים אשר מעורבים בתהליך האיניציאציה.

ישנם שני פקטורים: eIF3 ליחידה הקטנה ו-eIF6 ליחידה הגדולה שתפקידם להחזיק את היחידות מופרדות זו מזו.



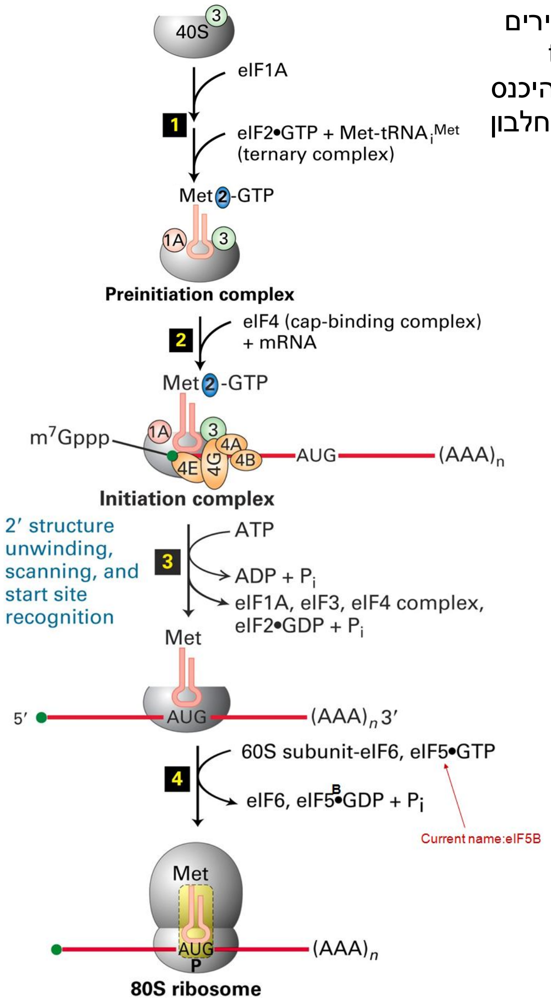
מצטרף גם eiF1A ושני הפקטורים חוסמים את אתרי A,E ומשאירים רק את ה-P site פנוי. ואז מגיע eIF-2 ביחד עם GTP וה-tRNA הראשון עם מתיונין (ללא פורמילציה!). ה-initiator tRNA יכול להיכנס רק ל-AUG הראשון, ההבדל בינו לבין tRNA למתיונין באמצע החלבון הוא למשל בזיווגי הבסיסים במבנה השניוני של הלולאה. כמו-כן פקטורי האלונגציה לא מזהים אותו ולכן הוא לא ייכנס באמצע החלבון.

ואז נקשרת קבוצת החלבונים eIF4. ל-4G תפקיד בקשירה ל-eIF3.

הריבוזום רחוק מנקודת ההתחלה ולכן מתחיל תהליך של סריקה שבו כל הקומפלקס הזה נע לאורך ה5' UTR עד שהוא מוצא את הקודון AUG הראשון. הוא מוצא אותו מכיוון שיש בקומפלקס tRNA המתאים ל-AUG הראשון.

בתהליך הסריקה מעורב חלבון: 4A שתפקידו לפתוח מבנים שניוניים (תוך שימוש ב-ATP) שנמצאים ב-5' UTR.

השלב האחרון זה הגעה של התת-יחידה הגדולה. ואז מתקבל ריבוזום שלם עם מתיונין ב-P site.

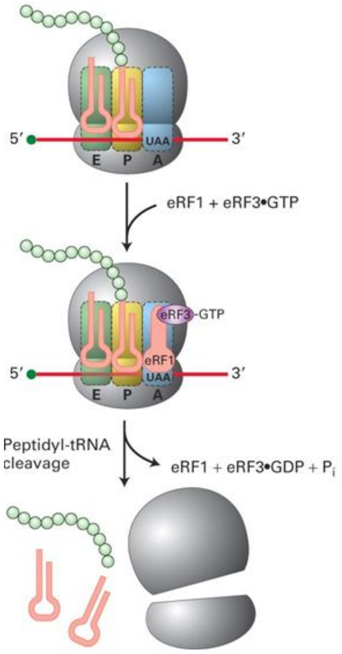


:Elongation

©ענת עציון

אותו תהליך כמו בפרוקריוטים. לפקטורים קוראים: EF-1 ו-EF-2.

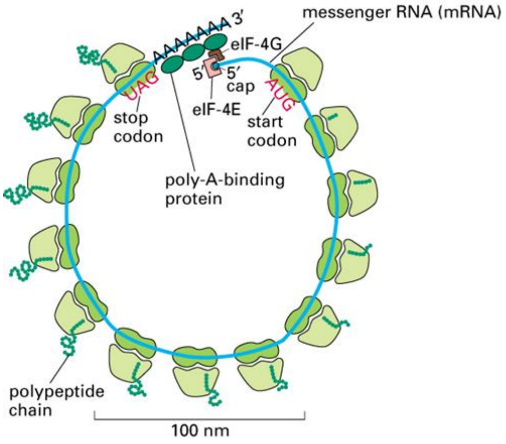
:Termination



באאוקריוטים יש רק release factor אחד שיודע לזהות את כל קודוני הטרמינציה. בעקבות כניסתו יש הידרוליזה של הקשר בין ה-tRNA האחרון חלבון כולו. לאחר עזיבת החלבון מגיע eRF3 וההידרוליזה של GTP גורמת לשחרור כל קומפלקס הריבוזום.

התהליך באאוקריוטים הוא הרבה יותר פשוט- יש רק RF אחד, וגם- באאוקריוטים לא קיים חלבון שנקרא: RRF, כאן ה-eRF3 מספיק לפירוק כל הקומפלקס.

:Polyribosome



ישנה אינטראקציה בין הקצה ה'3 לקצה ה'5. כשפוגעים בקשר ביניהם, רמת התרגום יורדת. מעבר לכך שהקשר הפיזי הזה מאפשר תרגום מהיר יותר, המבנים משני צידיד ה-mRNA מסמן שה-RNA תקין ולכן ראוי להיות מתורגם בצורה מוגברת.

אם ע"י אנזים חותכים את ה-RNA איפושהו באמצע כך שלא יהיה בצורת מעגל, אז ה-RNA הזה לא יתורגם כמו שצריך.

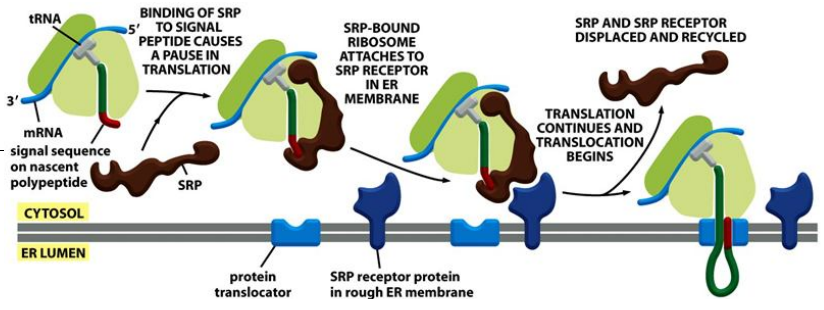
:ריבוזומים ו-ER

הריבוזומים צמודים ל-ER ומתרגמים חלבונים ישירות לתוכו. בתוך התא ישנן שתי אוכלוסיות של ריבוזומים:

1. צמודים ל-ER: יפרישו חלבונים החוצה.
2. ריבוזומים חופשיים שמהווים הרבה פעמים שרשרת של פולי-ריבוזומים.

The signal hypothesis: מודל שאומר שחלבונים שמיועדים להפרשה או לממברנה מכילים רצף חומצות אמינו אשר עובר תרגום, נמצא בקצה ה-N-terminus של החלבון. ה-mRNA מתחיל את התרגום שלו בציטופלסמה. לאחר שה-signal peptide מבצבץ החוצה מהתעלה של הריבוזום, מגיע קומפלקס חלבוני- SRP (Signal Recognition Particle). הוא נקשר אליו ואל הריבוזום, עוצר את התרגום שלו לקצת זמן ומוביל את הקומפלקס לקרבת ה-ER. ל-SRP יש רצפטור על ממברנת ה-ER שקושר אותו. ואז לאחר הקשירה ה-SRP משתחרר והתרגום ממשיך אל תוך ה-ER. וכך החלבון שמיועד אל ה-ER, רוב הסינתיזה שלו נעשית לתוך ה-ER.

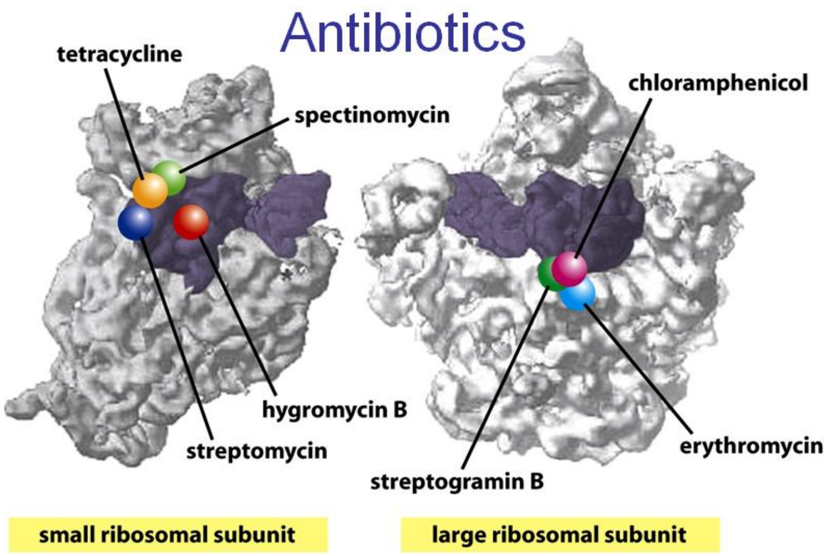
היתרון בכך: חלבונים ממברנליים מכילים דומיינים הידרופוביים. המערכת דואגת לכך שהם יסונתזו ישירות אל אזור היעד ולכן כל הבעיות הקשורות בקיפול לא נכון של החלבון נמנעות.



©ענת עציון

<u>מודל שני:</u> חלבונים שמגיעים ל-ER מסיימים את הסינתזה בציטופלסמה ומובאים ל-ER רק לאחר סיום התרגום. זה נעשה בעזרת צ'פרונים אשר דואגים לקפל את החלבונים רק כאשר יגיעו לאזור הממברנה.

אנטיביוקטיקות: בעיקר חומרים המיוצרים ע"י חיידקים. רבות מהן מתיישבות על הריבוזום ומונעות את תהליך התרגום.



©ענת עציון