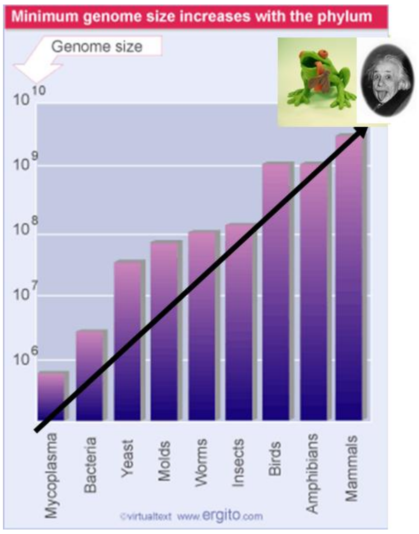
תכולת הגנום

2011- עשור לפענוח הגנום האנושי. ב-2001 לקח כ-10 שנים לקבל את רצף הגנום כולו. היום ניתן לעשות זאת במספר שבועות.



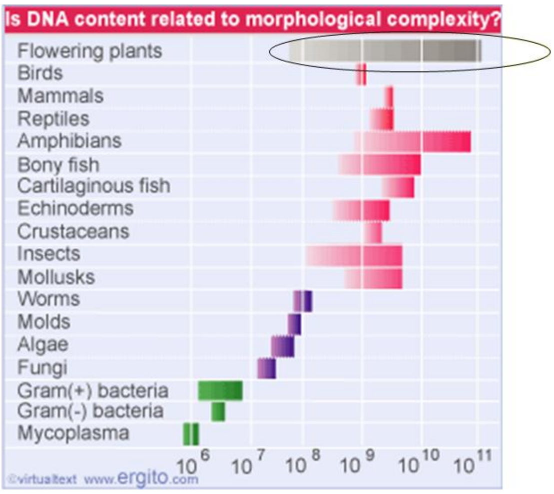
גודל הגנום האנושי: 3×10^9.

גודל הגנום נמצא במגמת עליה מהיצורים החד-תאיים המאוד פשוטים ועד ליצורים ברמת מורכבות גבוהה יותר.

העליה הזו היא די צפויה.

פחות צפוי: ההבדל בינינו לבין דו-חיים למשל אינו גדול.

הגודל המינימאלי של הגנום עולה ככל שעולה מורכבות האורגניזם.



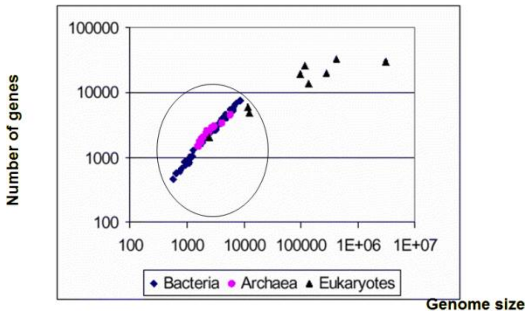
ישנם טווחים די גדולים של גנומים במחלקות השונות, חלקם גם חופפים. ישנם דו-חיים בעלי גנומים שגדולים מהגנומים של חלק מהיונקים.

שני דברים מפתיעים:

1. הגנום שלנו ושל הצפרדע הוא בגודל דומה.
2. גדלי הגנום של יצורים דומים הוא מאוד וריאבילי.

מסקנה: גודל גנום אינו פרמטר שמתאים להסתכל עליו להשוואה בין מורכבות של יצורים שונים.

The C paradox: אין התאמה בין גודל הגנום לבין מורכבות מורפולוגית.

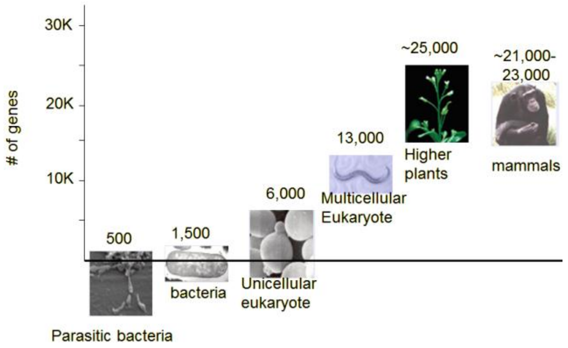


בדיקת קורלציה בין גודל הגנום למספר הגנים:

בגרף ישנם יצורים מ-3 ממלכות.

רואים קורלציה מאוד יפה בבקטריה ובארכיאה אבל באאוקריוטים אין קורלציה.

בגנומים האאוקריוטים ישנם הרבה דברים נוספים שלא מקודדים לגנים, בבקטריה ובארכיאה יש גנום מאוד מינימליסטי, הוא מקודד בעיקר לגנים ולכן יש התאמה ברורה בין מספר הגנים לגודל הגנום.



בדיקת קורלציה בין מספר הגנים למורכבות מורפולוגית:

יש עליה במספר הגנים כתלות במורכבות מלבד עובדה מפתיעה: בצמחים ישנו מספר גנים גדול יותר במעט מאשר ביונקים.

מספר הגנים באדם: 21,000 (והמספר הזה יורד ככל שחוקרים יותר). מספר הגנים באדם הוא פחות או יותר מספר הגנים בקופים. ישנה מגמת עלייה אבל אין קורלציה מדוייקת בין מספר הגנים לרמת מורכבות.

ההבדל בין קופים לאדם לא יכול להיות מוסבר ע"י מספר הגנים השונים (ההבדל מאוד קטן).

©ענת עציון

Synonymous change: הקודון השתנה אך הקודון החדש מקודד לאותה חומצה אמינית.

Ks: מספר ה-Synonymous change.

Non-Synonymous change: הקודון החדש מקודד לחומצה אמינית אחרת.

Ka: מספר ה-Non Synonymous change.

Ka/Ks - מדד שיכול ללמד על השינויים בחלבונים בין שני יצורים שונים.

$Ka/Ks = 1$: תהליך ניטראלי.

$Ka/Ks \ll 1$: תהליך מאוד סלקטיבי לשימור החומצה האמינית.

$Ka/Ks > 1$: סלקציה שאולי מכוונת דווקא לשינוי החלבון.

עובדה מפתיעה: ציפו ש- Ka/Ks של חלבונים הייחודיים לאדם יהיו גדולים מ-1, בהשוואה בין האדם לקוף (מה שמראה שהחלבון עבר מוטציות במהלך האבולוציה) אבל הם דווקא היו קטנים מ-1.
זה בגלל שההבדלים הם לא בהכרח כמותיים, לפעמים מעט שינויים יכולים ליצור הבדל גדול.
ישנם אזורים בגנום האנושי שהם אזורים בהם יש הרבה הבדלים בין האדם לקוף, אלה שינויים שקרו בגנומים אחרי הפיצול ביניהם.

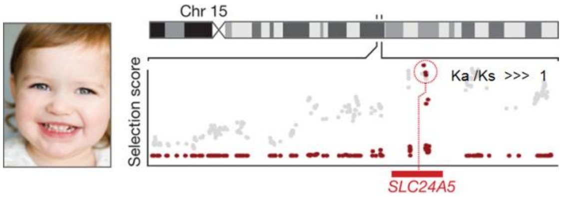
HAR (Human Accelerated Regions): אזורים בגנום בהם הקצב שבו נוקליאוטידים השתנו מאז הפיצול האבולוציוני בין האדם לקופים, הוא גבוה באופן יחסי.

דוגמא: הגמישות באגודל היא דבר שבו בני אדם נבדלים מכל הקופים- שינויים קטנים ב- HAR2.

:Human Evolution

מעריכים כי בין פרטים שונים באוכלוסייה יש מעל 1% שוני בגנום. כלומר, מבחינה מספרית ההבדלים בין בני-אדם שונים הם כמו ההבדלים בינינו לבין הקופים.

מה ניתן ללמוד מאזורים שהם שונים בין בני אדם?

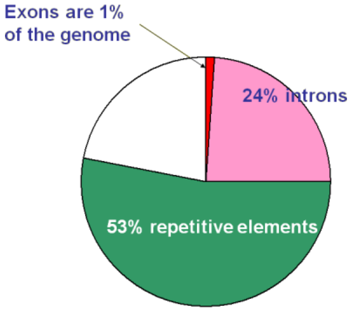


לדוגמא: ניתן לראות שברוב האזורים בכרומוזום-15 אין שינויים אבל ישנו אזור אחד ובו שינויים רבים. ניתחו את האזור ומצאו שהוא מכיל גנים ואזורי בקרה לגנים שאחראים לצבע העור.

ניתן לגלות אזורים בגנום שיש עליהם לחץ סלקטיבי חיובי חזק ($Ka/Ks \gg 1$).

:תכולת הגנום

האזור המקודד לחלבונים הינו 1% מכל הגנום. הגנים האאוקריוטים מכילים אינטרונים שהם הרבה יותר גדולים מהאקסונים. האקסונים והאינטרונים ביחד מהווים כ-25% מהגנום.



Non-coding RNA genes: גנים ל-RNA פונקציונאלי שאינו מקודד לחלבון למשל: rRNA, tRNA, miRNA, snRNA, snoRNA, Lincs.

פסאודוגנים: עותקים של גנים שכבר אינם פעילים, מאובנים שנשארו בגנום וכבר איבדו את תפקידם. אבל לחלק גדול מהם ישנו תפקיד בבקרה על ביטוי הגנים הפעילים.

Repetitive DNA: הקבוצה הגדולה ביותר. אלה רצפים שחוזרים על עצמם במספר גדול (מעל מיליון). בשלבים מסויימים אזורים אלה כונו: "**junk DNA**".

ככל-הנראה חלק גדול מהגנום אכן מכיל אזורים לא חשובים. בדקו זאת ע"י הוצאת קטעים מהגנום ובדיקה שאין לכך השפעה על היצור. אבל לא יודעים מה יקרה אם ניקח בבת-אחת ונוציא את כל האזורים האלה. העובדה שהם מצויים תורמת לגודל ולמסה של הגנום. ייתכן שהרצף עצמו לא חשוב אך עצם הימצאותו חשובה.

©ענת עציון

כיצד ניתן לזהות את האזורים הפונקציונאליים?

ניתן להשוות בין רצפים מאורגניזמים שונים ולזהות רצפים שמורים וכאלה שאינם שמורים. האזורים השמורים בדרך-כלל יהיו הרצפים הפונקציונאליים. בדרך-כלל נמצא את האזורים השמורים באקסונים ואת האזורים שאינם שמורים באינטרונים, אך דווקא מעניין לבדוק את החריגים: אזור שמור באינטרון, למשל. זה מאפשר לגלות פונקציות חדשות (כמו למשל: רצפים המקודדים ל-RNA פונקציונאלי ולא לחלבון).

<u>הערה:</u> גם באזורים מקודדים וגם באלה שלא מקודדים מצאו באופן מפתיע אותו יחס בין אזורים שמורים אזורים לא שמורים.

SNP (Small Nucleotide Polymorphism): שינויים ברמת הנוקליאוטיד.

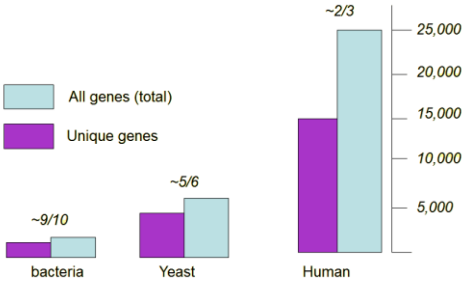
כיצד ניתן להסביר את ההבדל בין האדם לקוף?

ברמת הגנום ההבדלים לא נראים באזורים המקודדים אלא בעיקר באזורי הבקרה. שינוי קטן באזור הבקרה יכול לגרום לכך שגן ישמש כמעכב במקום כמאקטב. עקב שינוי כזה ניתן לקבל תבנית שונה של ביטוי גנים.

©ענת עציון

אבולוציית הגנום- משפחות גנים

במהלך האבולוצייה הייתה מגמת עליה מבחינת מספר הגנים. איך התפתחו הגנים החדשים? כשמסתכלים על גנים של יונקים, הרבה מהם שייכים למשפחות של גנים, שהתפתחו מאותו אב קדמון. אחת המשפחות המפורסמות: גנים לרצפטורים לריח, קיימים מעל 1000 גנים במשפחה זו.



כ- $2/3$ מהגנים בגנום מקודדים לפונקציות ייחודיות ו- $1/3$ הם משפחות של גנים. ולכן, חלק גדול מההתרחבות של הגנום היא כתוצאה מהתרחבות של משפחות. העליה במספר הגנים הייחודיים במהלך האבולוציה היא יותר מתונה.

התרחבות המשפחות:

בהתחלה הגן צריך לעבור הכפלה. לאחר שיש יותר מעותק אחד של הגן, העותקים יכולים לעבור שינויים ומוטציות. על עותק אחד יופעל לחץ סלקטיבי ולכן הוא יישאר דומה לגן המקורי אבל העותק השני יוכל להמשיך ולצבור שינויים. ואז יכול להיווצר גן עם פונקציה חדשה וטובה וגם ייתכן שהגן יהפוך לפסאודוגן ועם הזמן הוא ייעלם (יפסיק לקודד לחלבון), או יקבל פונקציה חדשה של בקרה.

גן פרלוג: גן שבא מאותו מקור אבולוציוני, שייך לאותה משפחה. גנים פרלוגים נמצאים באותו אורגניזם כתוצאה משכפול הגן.

גן אורתולוג: גן שנמצא בשני אורגניזמים שונים, כתוצאה מהתפצלות אבולוציונית.

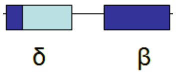
הערות:

- גנים הומולוגים הם פרלוגים או אורתולוגים.
- גנים פרלוגים הם בדרך-כלל יותר שונים ביניהם מאשר גנים אורתולוגים, וזאת עקב לחץ שיופעל לשינוי אחד העותקים של הגן במידה וקיימים שניים.
- ישנם גנים פרלוגים שהם כן דומים, למשל כאלה שזקוקים להם בכמות גדולה (כמו ההיסטונים) ואז הגוף מייצר כמות גדולה ממשפחה של כמה גנים במקום מגן יחיד.

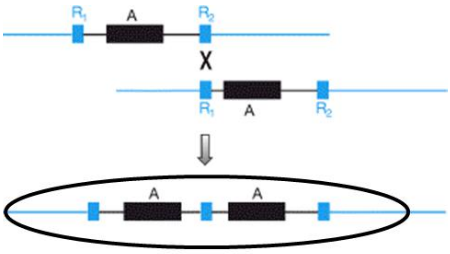
גנים השייכים לאותה משפחה מצויים פעמים רבות במקבצים, אבל הם גם יכולים להיות מאוד רחוקים אחד מהשני (זה תלוי בתהליכים שיצרו את משפחת הגנים).

המנגנונים לשכפול הגנים:

- **הכפלה של גנום/קטע מכרומוזום:**
קטע מאוד גדול מוכפל. אם ההפרדה בתהליך המיטוטי/המיוטי לא קורית באופן תקין (הסגרגציה), מקבלים תא-בת בעל כרומוזום עודף או סט שלם עודף של כרומוזומים. אם התא מצליח לשרוד למרות הכמות הכפולה, בדרך-כלל אחד מן העותקים יעבור הרבה מאוד שינויים והשני ישמור על הפונקציה המקורית.
- **שכפול תוך כדי שחלוף:**
Equal Crossing Over: שחלוף מאוזן. לאחר ההכפלה, ייתכן שחלוף בין קבוצות גנים שהן דומות גם כאשר הכרומוזומים הומולוגים וגם כאשר הם אינם הומולוגים. כתוצר מתקבלים גנים מאוחים שהם גנים חדשים.



דוגמא: במשפחת הגלובינים, δ הוא גן מאוחה (מכיל חלק מ- β).



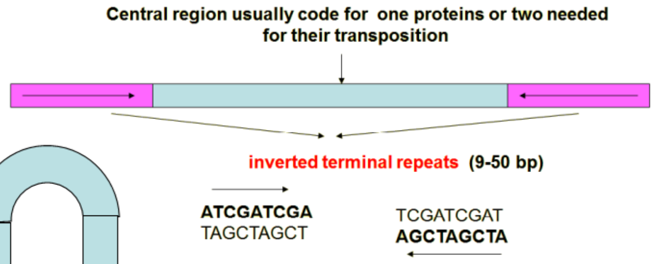
Unequal Crossing Over: מסביב לגן ישנם רצפים רפטטיביים,ואז ייתכן מצב שההומולוגייה בין הרצפים האלה תטעה את מערכת הרקומבינציה כך שייעשה שחלוף ביניהם וכך יהיו שני עותקים של הגן באותו הרצף.

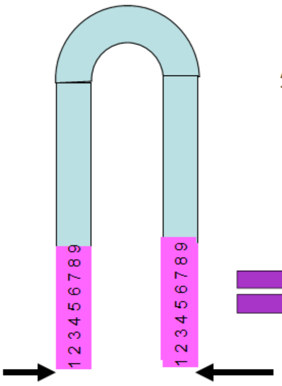
©ענת עציון

- **<u>טרנספוזונים:</u>**

<u>טרנספוזונים דרך DNA:</u>

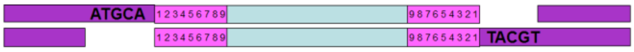
זהו תהליך שבו אלמנטים בגנום עוברים ממקום למקום. משערים כי הם הגיעו ממקור ויראלי (אך זה לא ודאי). לטרנספוזונים יש אזור המקודד לחלבון (ובו קידוד לפחות לחלבון אחד- לטרנספוזאז). ומשני הצדדים ישנם שני אזורים בעלי סימטריה הפוכה: **inverted terminal repeats**.





בשביל הקפיצה הטרנספוזון מתקפל על עצמו והאזורים החוזרים מזוהים ע"י החלבון טרנפוזאז. חלבון זה חותך את האלמנט (blunt edges). וזהו דימר של החלבון, כל תת-יחידה מזהה קצה אחר ואז נעשה החיתוך.

הטרנספוזאזים גם מבצעים חיתוך של אתר המטרה (שאינו ספציפי) ואז יש חיבור לקצוות הדביקים של אתר המטרה וגם תהליך של השלמת הבסיסים ברווחים שנוצרו מחיבור ה-blunt ל-sticky edges.



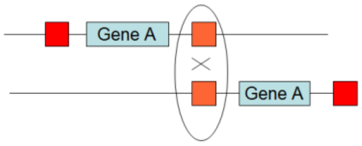
השלמת הרווחים גורמת ל: **direct target repeats**, חזרות באותו הכיוון.

<u>הערה חשובה:</u> רצף המטרה אינו ספציפי, רק הכרות הטרנספוזאז את הרצפים החוזרים הוא ספציפי.

<u>Replicative:</u> נשאר עותק באתר המקור ונכנס עותק לאתר המטרה ("copy&paste").

<u>Non-Replicative:</u> באתר המקור לא נשאר עותק והרווח מתוקן ("cut&paste").

באאוקריוטים קורה בעיקר המנגנון "cut&paste", וזה יכול לקרות בכל אחד משלבי מחזור התא. השכפול לשני עותקים יכול לקרות רק בזמן שלב ה-S, במקרה מאוד ספציפי שבו האתר המקורי כבר עבר שכפול ואתר המטרה עדיין לא, אם בשלב זה הטרנספוזון קופץ, ולאחר-מכן אתר המטרה עובר שכפול אז ישנו אחד משני תאי הבת המכיל שני עותקים של הגן. זהו חלון זמן קצר אך זה מאפשר הגברה גדולה של גנים בגנום.

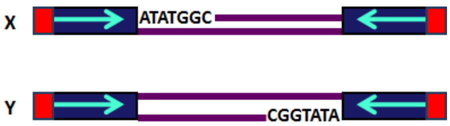


<u>עוגן ל-Unequal CO:</u> הרצפים החוזרים שלהם מזוהים כרצפים הומולוגים וזה גורם לשחלוף.

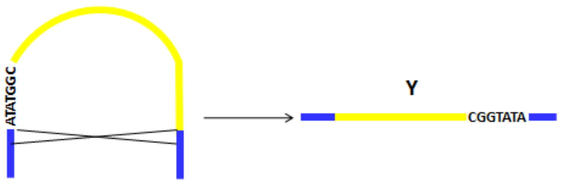
<u>תהליך חטיפה:</u> ייתכן מצב שבו ישנם טרנספוזונים מאותה משפחה משני צידיו של גן ואז חלבון הטרנספוזאז יכול לחתוך אותו ביחד עם שני הטרנספוזונים ולהעבירו למקום אחר בגנום.

<u>Hox genes:</u> גנים המקודדים לפקטורי שעתוק. הם מופיעים במקבץ בגנום והם מאוד שמורים. הדמיון בין שני גנים מקבילים ביצורים שונים גדול יותר מהדמיון של שני גנים על אותו מקבץ באותו יצור.

<u>שאלה מהתרגול:</u>



באנליזה של גנום של חיידק נמצא רצף X בעל תכונות אופייניות של טרנספוזון מסוג DNA ונמצא כי הרצף המרכזי שלו בעל דמיון גבוה לרצף טרנספוזון אחר Y אבל הפוך (inverted).

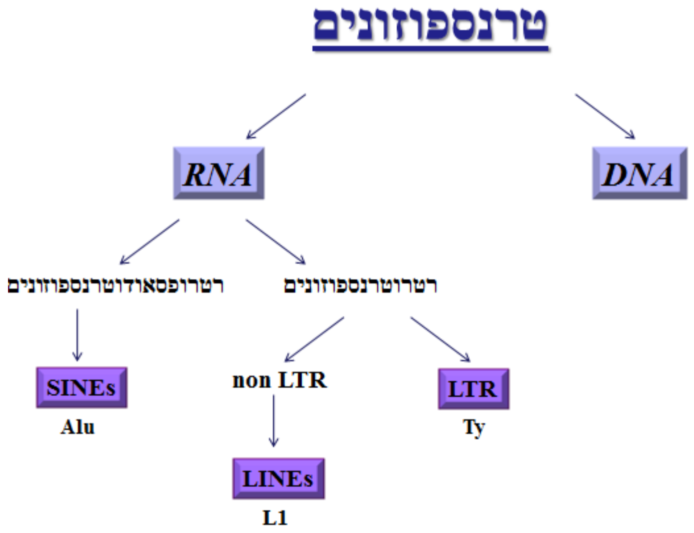


<u>פתרון:</u> במהלך יציאת הטרנספוזון יש קיפול והומולוגיה בין ה-inverted repeats ואז ייתכן שאירע באחד הטרנספוזונים אירוע רקומבינציה בין הרצפים ההפוכים החוזרים בקצוות הטרנספוזון.

©ענת עציון

ה-DNA הנייד

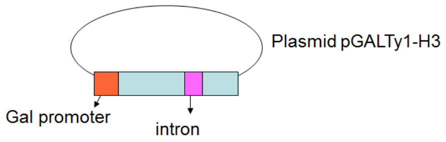
טרנספוזונים מסוג RNA מהווים מספר רב מהרצפים החוזרים בגנום, ונמצא שטרנספוזאז הוא הגן הנפוץ ביותר בטבע.



טרנספוזונים דרך RNA:

תחילה חשדו שאלמנט הנקרא: Ty בשמרים קופץ דרך שלב מעבר של RNA. זאת כי נמצאו עדויות שה-Ty מתועתק. כיצד הוכיחו שהטרנספוזון עובר דרך שלב מעבר של RNA?

לקחו את ה-Ty, הוסיפו לו פרומוטור חזק מאוד וגם קטע של אינטרון. ההנחה היא שאם ישנו תעתוק אז בשחבור האינטרון יצא החוצה ואז האלמנטים החדשים בגנום יהיו חסרים את האינטרון. הכנסת הפרומוטור החזק גורמת לתעתוק מוגבר באופן מלאכותי.

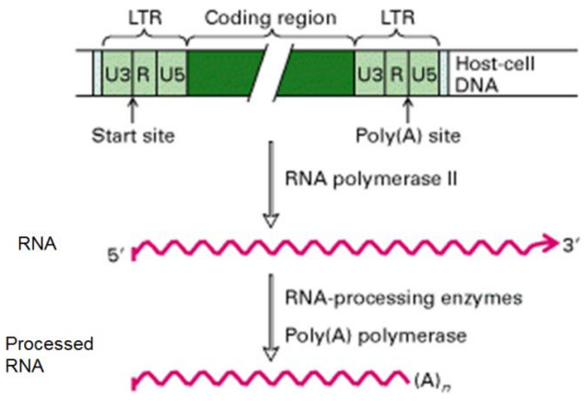


הפלסמיד הוכנס לתאי השמרים, לקבוצה אחת הכניסו גלקטוז ולקבוצה השנייה לא, כאשר הגלקטוז משפעל את הפרומוטור. בדקו האם ישנם Ty חדשים והאם הם מכילים את האינטרון.

<u>תוצאה:</u> בקבוצה עם הגלקטוז נוצרה הגברה של אלמנט ה-Ty ללא האינטרון ובקבוצה השניה קרתה פחות הגברה.

Retrotransposons:

ישנם שני סוגים שהמשותף להם הוא הגן באזור המרכזי שמקודד ל-RT, רוורס-טרנסקריפטאז, אנזים הקיים רק בוירוסים. יודעים כיום שבגנום האנושי, פעילות טרנספוזיציה מסוג RNA היא מאוד נמוכה, וישנם מנגנונים שמשתיקים את הטרנספוזיציה.



<u>1. מכילים LTR (Long Terminal Repeats):</u>

מזכירים טרנספוזונים מסוג DNA בגלל מבנה סימטרי. הסימטריה היא ישרה (ולא inverted). ישנו מקטע LTR המופיע משני צידי הטרנספוזון. אלה רצפים ארוכים (250-600 bp) ומשני הצדדים שלהם יש רצפים חוזרים באותו הכיוון (עקב החדירה של הטרנספוזון לגנום).

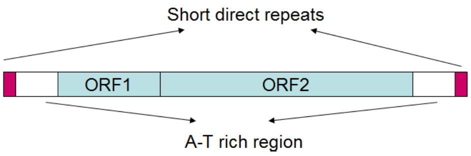
<u>אתר תחילת השעתוק:</u> בין U3 ל-R. סיגנל לפוליאדנילציה בין ה-R ל-U5 שבסוף. ה-RNA מתועתק באופן רגיל, אבל לאחר-מכן U3 משמאל

©ענת עציון

ו-U5 מימין יחסרו ל-DNA ש-RT יסנתז ולכן ישנו מנגנון שמשלים אותם לאחר השעתוק כדי שה-UTR המלא יסונתז ל-DNA שיקופץ (מנגנון מסובך שלא נלמד בקורס). גם כאן אתר המטרה הינו אקראי לחלוטין. הכניסה לאתר המטרה היא בעזרת האנזים: אינטגראז.

<u>הערה:</u> ב-LTR קיים פרומוטור ולכן המקטע יכול להיכנס לכל מקום בגנום.

2. LINE (Long Interspersed Repeats), לא מכילים LTR:



האלמנט מכיל שני חלבונים: ORF1, ORF2. ORF1 תפקידו לא לגמרי ברור, ויש לו תפקיד מינורי בקפיצה. ORF2 הוא בי-פונקציונאלי: אנדונוקליאז ו-RT.

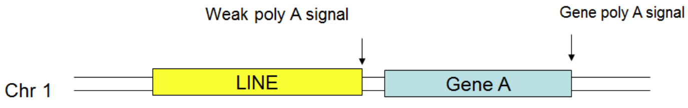
בנוסף, ישנם קצוות לא סימטריים עשירים בA-T.

ה-LINE עובר תעתוק ע"י RNA polymerase II. ה- RNA עובר רוורס-טרנסקריפציה: ORF2 מזהה את ה-LINE-RNA, ספציפית באזור ה-polyA, מביא אותו לאתר המטרה (אזור עשיר ב-T ב-DNA) בצורה של RNA ועושה חיתוך באתר המטרה (נוצרים קצוות דביקים). במקביל מתחיל תהליך של רוורס-טרנסקריפציה, תוך שימוש ב-DNA באתר המטרה כפריימר לסינתזה, וכך נוצר גדיל אחד של DNA. לאחר-מכן יש השלמה (ע"י אנזים אחר) של גדיל ה-DNA השני באתר המטרה וגם מול הקצוות הדביקים ואז מתקבלים האזורים הסימטריים משני הצדדים.

<u>הערה:</u> ל-LINE באתר החדש אין פרומוטור, ולכן לא יוכל להמשיך בשכפול. אבל גילו שה-LINE נוטים ליפול ליד פרומוטורים ב-DNA.

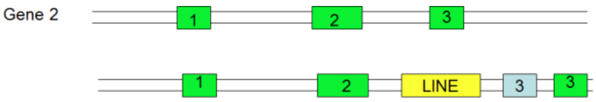
<u>"חטיפה של גנים" (כיצד נוצרות משפחות גנים):</u>

אם קופץ LINE לפני גן מסויים, ייתכן שהוא קפץ לפני הפרומוטור שלו או לפני פרומוטור שלפניו. בדרך-כלל ה-LINE עוברים מוטציות והחלשה- הסיגנל של הפוליאדנילציה נחלש אצלם ואז מערכת התעתוק ממשיכה לאחר תעתוק LINE לתעתק גם את הגן שאחריו. ואז ה-LINE קופץ למקום אחר ביחד עם הגן וכך נוצרת משפחה של גנים- עותקים שונים שכל אחד מהם עובר מוטציות אחרות במהלך הזמן.



<u>Exon shuffling:</u>

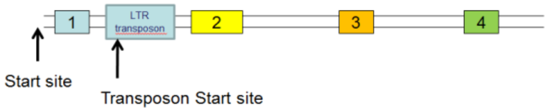
העברה של אקסונים או חלקים מתוך הגן ממקום למקום. התהליך מאוד דומה לתהליך שראינו קודם רק שה-LINE קופץ לתוך אינטרון וקופץ אחר-כך עם אחד האקסונים, למשל לתוך אינטרון של גן אחר שבעקבות הקפיצה נוסף אליו אקסון. כדי שתהליך זה יצליח הוא צריך לא לפגוע בדברים רבים בדרך.



<u>**Exon shuffling ע"י רקומבינציה:**</u> טרנספוזון כאמור יכול להוות עוגן לרקומבינציה ולגרום לשחלוף בין כרומוזומים/מקטעים לא הומולוגים.

<u>Alternative promoters:</u>

טרנספוזונים המכילים פרומוטור (מכילים LTR), כאשר הם קופצים לתוך אינטרון נוצר מצב שבו לגן ישנם שני פרומוטורים ואזי יכולים להתקבל שני תעתיקים אפשריים מאותו הגן, כל אחד התחיל בפרומוטור אחר.



<u>הערה:</u> ישנם מנגנונים בתא להשתקת הפרומוטורים של ה-LINE כדי שלא יביאו לחלבונים פגומים. בתאים סרטניים בהם המנגנון פגום יש תעתוק מוגבר מהפרומוטורים של ה-LINE.

©ענת עציון

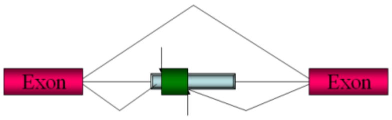
:(Short Interspread Nuclear Elements) SINE – Retropseudogenes

מופיעים בתדירות מאוד גבוהה בפרימטים. לא מכילים RT ולא יכולים לקפוץ בעצמם. ה-SINE מכיל פרומוטור פנימי המוכר ע"י RNA polymerase III, ולכן הוא מופיע גם בתעתיק. אך גילו שהפרומוטור הזה מנוון והוא לא מאפשר את הקפיצה. ה-SINE חיקה את המנגנון של ה-LINE כך שה-ORF2 שלו יזהה גם אותו, ואפילו באפיניות חזקה יותר, ובנוסף ל-SINE יש נטייה גדולה יותר מה-LINE ליפול ליד פרומוטורים ולכן הוא יותר נפוץ בגנום.

הערה: SINE למעשה העתיק את המנגנון של ה-LINE ושיפר אותו.

:Exonization of transposons

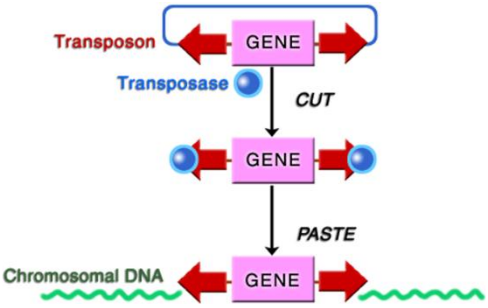
Alu elements: אלמנטים מסוג Alu היוו מקור לגנים חדשים בפרימטים. Alu הוא אלמנט SINE שלאחר שעבר הרבה מוטציות בהסתברות מסויימת נוצר בו אקסון שהכיל ORF וגם אתרי splicing שיוכרו ע"י מערכת השחבור. טרנספוזון Alu שקפץ לתוך אינטרון והכיל אתר אקסוני- האקסון התווסף לגן המטרה וכך נוצר mRNA חדש. ישנם מאות אקסונים שמקורם ב-Alu אשר מצויים כיום בגנום.



בעיות בתהליך:

- יציאה של טרנספוזון ללא תיקון- בעיה לתלית.
- כניסה של טרנספוזון לרצף קריטי בחלבון.
- כניסה של טרנספוזון לאינטרון שפוגעת בתהליך ה-splicing.
- כניסה של טרנספוזון לאזורים שהם בין הגנים אבל פונקציונאליים כמו פרומוטור או-enhancer.

שימוש ב-DNA נייד בריפוי גנים:

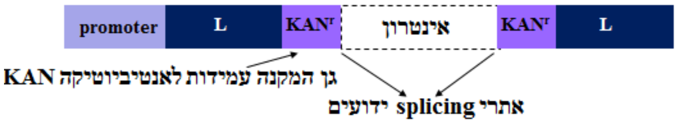


וקטור להעברת גנים- Sleeping Beauty: החליפו את הגן המקודד לטרנספוזאז בגן אותו רצו לייצר למטרות רפואיות. בנוסף, הוסיפו לפלסמיד את הגן לטרנספוזאז המתאים כדי לאפשר את הקפיצה. זה מאפשר לגן המסויים לקפוץ לתוך הגנום באופן מבוקר, למשל בתוך רקמה מסויימת.

שאלה מהתרגול:

חוקר מצא רצף בגנום הכבשה, אשר איננו אופיין עד כה. באנליזות שונות הוא גילה כי רצף זה חוזר על עצמו מספר פעמים רב בגנום הכבשה, ולכן חשד כי מדובר בטרנספוזון. כעת החוקר מעוניין לאפיין את הרצף הזה (המכונה L).

בניסוי הראשון הוא רצה לאפיין האם מדובר בטרנספוזון DNA או RNA ולצורך כך יצר את הקונסט רקט הבא, אותו ביטא בשמרים. השמרים גודלו על מצע המכיל את האנטיביוטיקה KAN.



הסבר על האלמנטים בפלסמיד:

promoter: דרוש לצורך שעתוק הטרנספוזון מהפלסמיד במידה ועליו לעבור תהליך זה.

KAN^r + אינטרון: החוקר חילק את הגן המקנה את העמידות ע"י אינטרון. רק במקרה בו יתרחש splicing "יתחבר" הגן, יתבטא, ותהיה עמידות לאנטיביוטיקה.

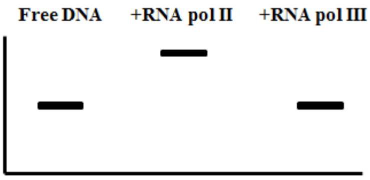
טרנספוזון DNA: לטרנספוזון מסוג זה אין נטייה להכנס תחת פרומוטור לכן קיימת סבירות גבוהה שהוא לא ישועתק ולא יהיה splicing, ולכן לא יהיה ביטוי של הגן לעמידות והשמרים לא יגדלו בנוכחות האנטיביוטיקה.

טרנספוזון RNA: יהיה splicing ויהיה ביטוי של הגן לעמידות, והשמרים יגדלו בנוכחות אנטיביוטיקה.

דרך נוספת: ניתן להסתכל אם הטרנספוזון שנכנס ל-DNA מכיל אינטרון או לא.

©ענת עציון

<u>המשך השאלה מהתרגול:</u>



השמרים אכן גדלו על המצע שהכיל את האנטיביוטיקה KAN (כלומר טרנספוזון RNA). כעת החוקר רצה להמשיך לאפיין את הטרנספוזון. הוא ביצע ניסוי EMSA ל-DNA ובדק קישור של RNA pol II לעומת RNA pol III.
<u>מסקנות החוקר:</u> לא מדובר בטרנספוזון מסוג SINE, כי כזה מכיל פרומוטור פנימי אליו יכול להיקשר RNA pol III ולכן זהו טרנספוזון מסוג LTR או LINE.

<u>לצורך אפיון סופי:</u> החוקר החליט לעשות מוטציה באתר ה-polyA של הטרנספוזון. החוקר הבחין כעת שהטרנספוזון מסוגל לעבור שעתוק, אך הוא איבד את יכולת ה"קפיצה" שלו.
<u>המסקנה מכך:</u> ה-ORF2 מזהה ספציפית את אזור ה-polyA, ובגלל המוטציה הוא לא יכול להיקשר לטנרספוזון שהוא **טרנספוזון RNA מסוג LINE**.

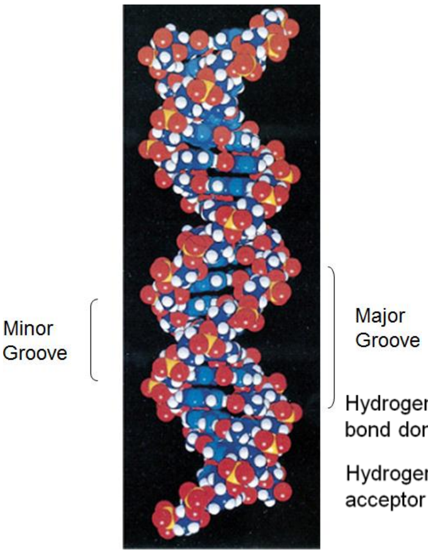
©ענת עציון

הכרה מולקולארית של DNA-חלבון

לפקטורי שעתוק שונים יש אתרי קישור שונים. לחלבון אחד יכולים להיות כמה אתרי קישור שונים.

איך החלבונים מזהים באופן ספציפי את אתר המטרה שלהם?

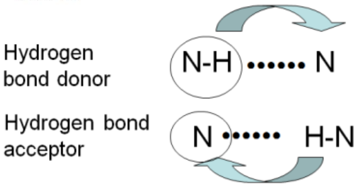
הכרה דרך קשרי מימן ב-DNA grooves:



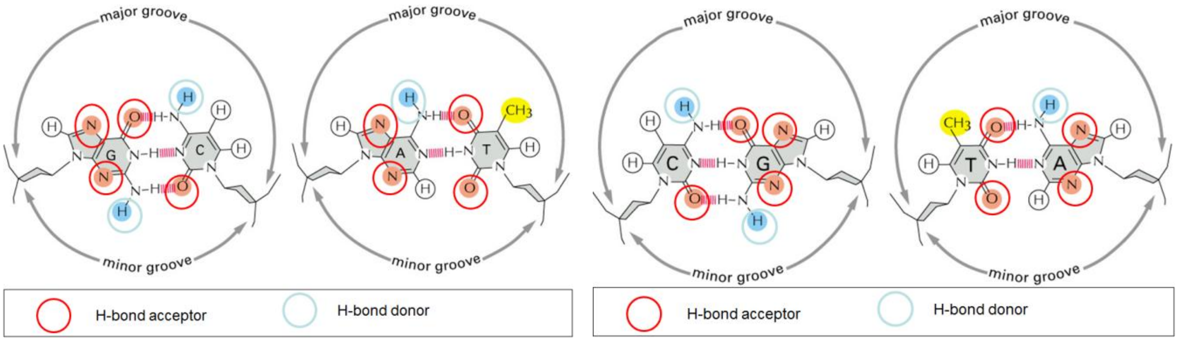
בהינתן שהחלבון הגיע אל אתר מסוים, איך הוא מזהה שהוא הגיע אל אתר המטרה שלו?

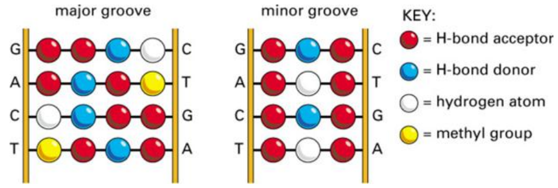
בסיסי ה-DNA מצויים בחלק הפנימי של ההליקס. תחילה הניחו שצריכה להיות פתיחה של הסליל לצורך זיהוי אתר הקישור. אך התברר שאין פתיחה כזו והזיהוי וההכרה נעשים דרך ה-major והminor groove-.

הקישור נעשה ע"י אינטראקציות אלקטרוסטטיות- קשר מימן, קשר לא חזק מידי ולא חלש מידי (בעל אנרגיית-ביניים). בנוסף, לקשר מימן יש כיווניות, יש Donor ו-Acceptor.



הדגם של קשרי מימן ב-major ובminor -groove הוא שונה בין הבסיסים השונים והספציפיות הגבוהה ביותר מתקבלת ב-major groove (כי שם יש יותר קבוצות פונקציונאליות.





ב-major groove לכל זיווג בסיסים יש תבנית ייחודית בעוד שב-minor groove יש רק שתי תבניות שונות.

<u>דוגמא:</u> חומצה אמינית שיכולה ליצור שני קשרי Donor תוכל להיקשר רק למקום שבו יש שני Acceptor.

האינטראקציות הנפוצות ביותר בין חלבונים ל-DNA הן: Arginine-G ו-Aspargine-A.

<u>הערה:</u> קשר מימן מפוצל חזק יותר ותורם לאפיניות.

<u>Direct recognition/readout:</u> זיהוי אתר הקישור ב-DNA ע"י קשרים כימיים.

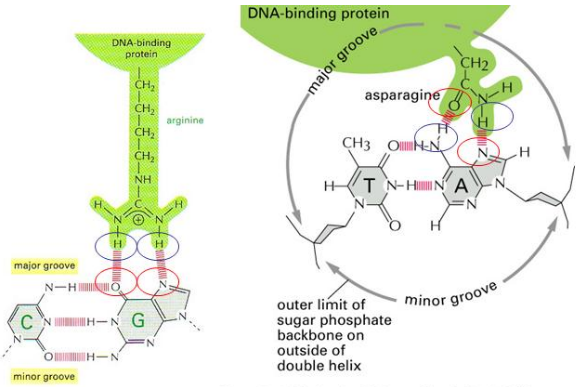
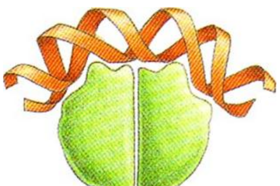


Figure 7–12. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

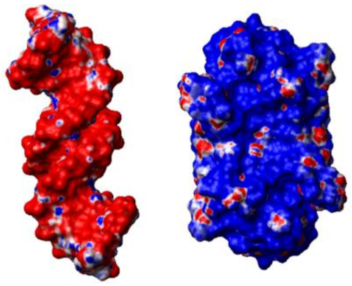
Arginine- G   Aspargine-A

©ענת עציון



הכרה דרך המבנה:

קשרי המימן לא מספיקים לקבלת הספציפיות בהכרה. מלבדם יש הכרה גם ברמה המבנית בין ה-DNA לחלבון. זה נותן גם ספציפיות וגם אפיניות קישור מאוד טובה. ההכרה היא לא ברמה שאנו מכירים בין אנזים לסובסטראט. פני השטח של החלבון מתאימים לפני השטח של הסליל הכפול באתר ההכרה. למשל: המבנה של ה-α-helix מאפשר לו התאמה ל-major groove ב-DNA. אחוז גדול של חלבונים קושרי DNA מכיל α-helix שדרכו נעשה הקישור.



DNA is negatively charged (red) due to the charge of the phosphate group of the backbone.

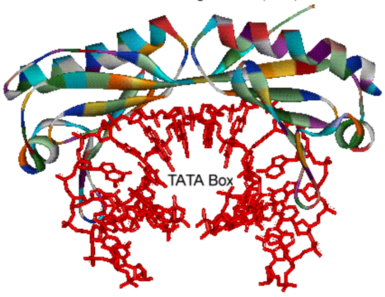
DNA-binding proteins are usually positively charged (blue)

התאמה אלקטרוסטאטית:

ה-DNA טעון שלילית (מסומן באדום) והחלבון הנקשר אליו הוא בעל מטען חיובי כללי וזה מביא את החלבונים אל ה-DNA. זהו הצעד הראשון שמביא את החלבונים המתאימים לקרבת ה-DNA. בדרך-כלל בחלבון קושר DNA, חלק משטח הפנים שלו טעון חיובית ומשטח זה הוא אשר יפנה אל ה-DNA.

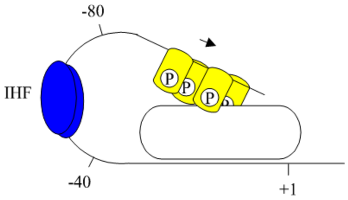
התאמה ע"י כיפוף ה-DNA:

Indirect readout: הכרת חלבון את ה-DNA ע"י מבנה מכופף או רצף בעל נטייה להתכופף למבנה הסופי, ולא רק ע"י קשרי מימן ישירים.



דוגמא: ה-TBP שנקשר ל-TATA box, נקשר דרך β–sheet ל- minor groove וגורם לו להיות פתוח לחלוטין. במקרה זה יש: "induced feet"- ה-TBP גורם בעקבות הקישור לשינוי במבנה ה-DNA. כיום יודעים כי לרצף ה-TATA box יש נטייה מבחינה אנרגטית להתכופף ולכן ה-TBP מנסה לכופף אתרים ב-DNA ונקשר לרצף אותו הוא מצליח לכופף.

דוגמא: בקישור ה-CAP ישנו קישור ישיר וגם קישור לא ישיר ע"י כיפוף של זוג הבסיסים G-C.



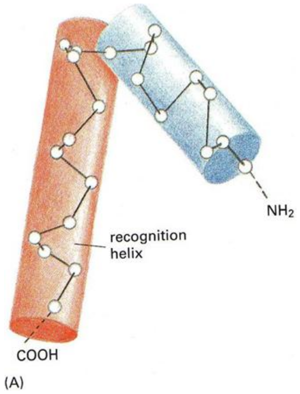
דוגמא: IHF נקשר ל-DNA וגורם לכיפוף ותפקידו הוא הבאת אזורים רחוקים יותר אל אתר תחילת השעתוק, אליהם נקשרים פקטורים שונים. זה מאפשר למשל של הבאה של פקטורי שעתוק הנקשרים באזורים מרוחקים ב-upstream אל אתר תחילת השעתוק לאינטראקציה עם הפולימראז.

הערה חשובה: הכרה ישירה ולא ישירה הן ספציפיות שתיהן, ואין לבלבל בין המושג הזה לבין ספציפיות וחוסר ספציפיות.

משפחות חלבונים עם עקרונות קישור מיוחדים:

helix-turn-helix (HTH):

HTH הוא דומיין, יחידת קיפול עצמאית, אשר מופיע בחלבונים שונים. הרצפים המקודדים לדומיין הם שונים אך יש להם חומצות אמינו מאוד שמורות אשר מאפשרות את המבנה הזה. הזווית בין הליקסים היא שמורה לחלוטין. זוהי משפחה שמופיעה רק בפרוקריוטים, רק הדומיין משותף, החלבונים עצמם הם שונים. הם נקשרים ל-DNA כדימר. חלבונים שונים מהמשפחה יוצרים דימריזציה באופן שונה, אבל זהו תמיד הומו-דימר. המרחק האנכי של הדימר הוא 3.4nm וזה אכן מתאים לקישור לשני major grooves ב-DNA.

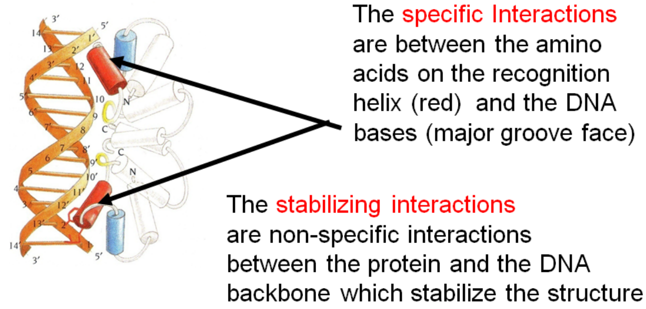


©ענת עציון

רצף הבקרה ב-DNA מאופיין ע"י משהו שדומה לפאלינדרומים, כל חצי של הפאלינדרום (ב-DNA) נקשר לאחד מחלבוני הדימר. ה-core של אתר הקישור הוא בדרך-כלל זהה אבל זה לא מחייב כי אותו חלבון יכול להיקשר לרצפים מעט שונים ולכן אין הכרח לסימטריה מלאה.

<u>ישנים שני סוגים של קישורים בין ה-DNA לחלבון:</u>

1. <u>אינטראקציות ספציפיות:</u> חשובות להכרה ספציפית, נעשות ע"י "הליקס ההכרה".
2. <u>אינטראקציות מייצבות:</u> חשובות לייצוב המבנה ונעשות משני הצדדים של ה- core של אתר הקישור (אלה אינטראקציות לא ספציפיות אל השלד של סליל ה-DNA).

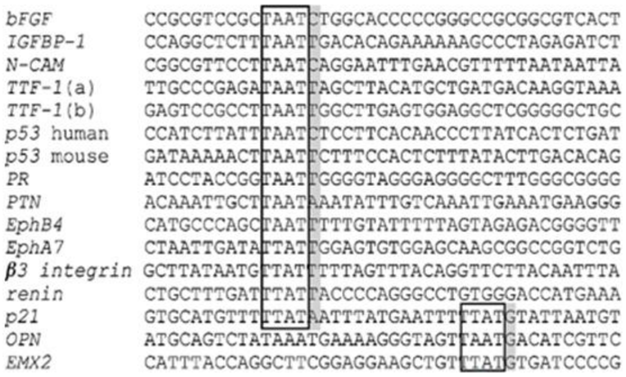


<u>Homodomain- האורתולוג באאוקריוטים:</u>

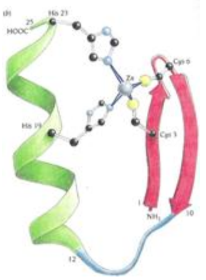
הוא דומה ל-HTH, גם בו יש הליקס בעל רצף הכרה. אך הוא נקשר כמונומר או כהטרו-דימר.

<u>דוגמא:</u> חלבוני ה-hox, ה-core שלהם הוא: TAAT.

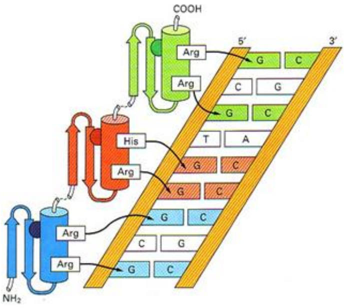
גנים ב-DNA אליהם נקשרים חלבוני hox:



<u>Zinc fingers:</u>



משפחה מאוד נפוצה של חלבונים קושרי DNA. המשפחה קיימת רק באאוקריוטים. המאפיין את המשפחה: α-helix-loop-β-sheet אשר קשורים דרך אטום אבץ, והוא זה שמחזיק את המבנה בצורה מאוד שמורה. ישנן כמה "אצבעות", כלומר: כמה דומיינים אשר מלפפים בזה אחר זה את ה-DNA. הקישור הספציפי ל-DNA נעשה דרך 2-3 חומצות אמינו בהליקס של הדומיין. זהו קישור מאוד קטן ולכן כמעט תמיד רואים בטבע קישור דרך כמה דומיינים כאלה ביחד. לחלבונים שונים יש מספר דומיינים שונה. ההליקס של כל "אצבע אבץ" מתקשר ישירות ל-major groove והחלבון עוטף את ה-DNA.



<u>העדפות קשירה של חומצות אמינו:</u>

חומצות אמינו לא נקשרות לרצף יחיד, אך יש להן העדפות. גם חלבון מסויים יכול להיקשר למספר אתרי קישור שונים ב-DNA.

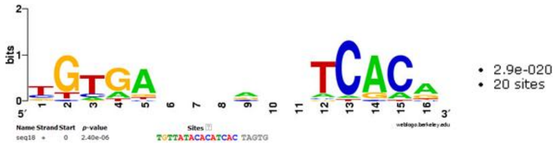
	A	T	C	G
Arg		CAP		GR Trp zif CAP
Asn	en			lambda
Gln	lambda 434	434		434
Glu			CAP	
His				zif
Lys				GR lambda MetJ
Ser				lambda
Thr	MetJ			

	mouse dhfr	a	GGG GCG GGG C
	mouse dhfr	b	GGG GCG GAG C
	HIV-LTR	a	GAGGCG TGG C
	HIV-LTR	b	GGG GAG TGG C
Sp1	*HIV-LTR*	c	TGG GCG GGA C
	human MtII-A		GGG GCG GGG C
	SV40	a	GGG GCG GAG A
	SV40	b	GGG GCG GGA C
	SV40	c	GGG GCG GGA T
	SV40	d	TGG GCG GAG T
	SV40	e	TGG GCG GAA C
	Consensus Site		**G/T-G-G-G-C-G/T-R-R-Y**

©ענת עציון

שאלה מהתרגול:

חוקרים מקבוצה א' חשדו כי החלבון הנקרא CAP (cAMP receptor protein) מבקר את ביטויים של מספר גנים בחיידק. זהו חלבון שקשירתו ל-cAMP גורמת לו לשינוי קונפורמציה ואז הוא יכול להיקשר ל-DNA. הם משערים שככל הנראה הבקרה מתבצעת ע"י קישורו של ה-CAP (כשהוא מצוי בקומפלקס עם ה-cAMP) לרצפים מסויימים הנמצאים ב-upstream לפרומוטור של הגנים. תחילה, הם מעוניינים לקבוע האם קיים רצף קונצנזוס אותו מזהה ה-CAP בגנים אלה. לשם כך עליהם לדעת מהם הרצפים של הגנים ש-CAP מבקר, ומהם הרצפים החשודים כרצפי הקישור.

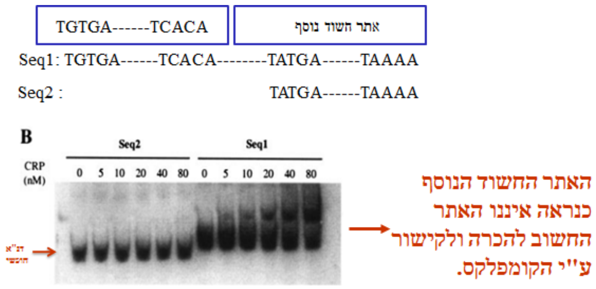


<u>בדיקה:</u> ע"י התוכנה MEME המוצאת מוטיבים ברצפים המוכנסים כקלט.

<u>מסקנה:</u> יש רצף קונצנזוס: TGTGA----TCACA. ככל הנראה החלבון נקשר כדימר, HTH לרצפים פאלינדרומים.

במהלך עבודתם, פורסם מאמר חדש (של קבוצה ב') המפרט רצף נוסף החשוד כמוטיב הקישור של ה-CAP (רצף שונה מזה שקבוצה א' מצאה!).

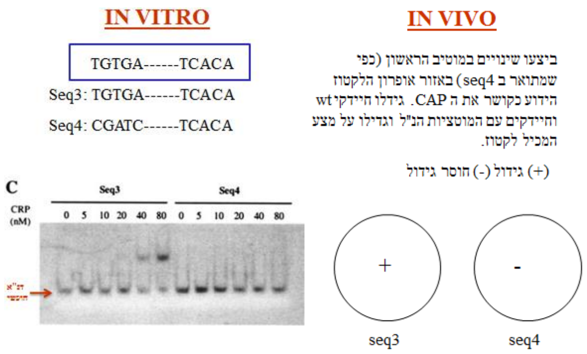
<u>ניסוי שיבדוק מיהו הרצף אליו נקשר ה-CAP:</u>



ניסוי קשירה פעם אחת עם שני האתרים ופעם אחת רק עם האתר של קבוצה ב'.

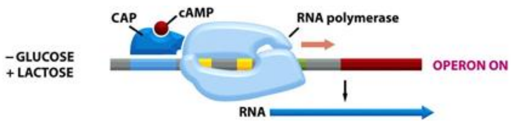
<u>מסקנה:</u> האתר שמצאה קבוצה ב' איננו אתר הקישור העיקרי (רוב ה-DNA לא נקשר כאשר רק הוא היה מצוי).

קבוצה א' המשיכה לבדוק איזה מבין שני המוטיבים, הראשון או השני, חשוב יותר לקישור. לשם כך הם ביצעו שני ניסויים:



<u>In Vitro</u>: Seq3- שני המוטיבים, seq4-שינוי המוטיב הראשון. עם seq4 אין קישור בכלל, ולכן המוטיב הראשון יותר חשוב לקישור.

<u>In Vivo</u>: גידלו חיידקים על מצע המכיל לקטוז עם השינויים המתוארים באופרון הלקטוז. ב-seq3 נוצרה קשירה של ה-CAP וביטוי של אופרון הלקטוז ולכן התאים יכלו לחיות. ב-seq4 ה-CAP לא נקשר לאופרון הלקטוז ולכן לא קרתה אקטיבציה של האופרון, כלומר: ישנה הפרעה ברמת הבקרה.



<u>תזכורת:</u> ה-CAP נקשר לפרומוטור כשיש לקטוז במצע ואין גלוקוז כי אז יש רמות גבוהות של cAMP שגורם ל-CAP להיקשר.

©ענת עציון

בקרת השעתוק בפרוקריוטים

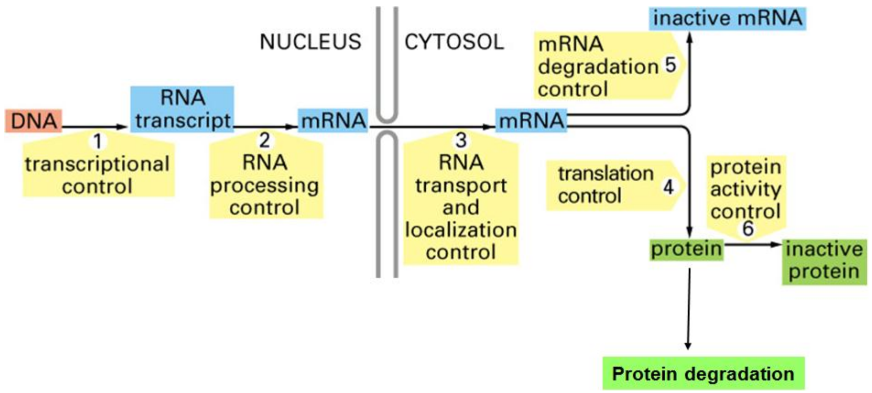
הקדמה:

כל אחד מהתאים שלנו התחיל מתא אחד וכמעט כולם מכילים את כל המטען הגנטי. הביטוי הגנטי צריך להיות מאוד מבוקר. מתמונת קריוטיפ ניתן לראות שכל תא מכיל את כל המידע הגנטי. ע"י שיבוט ניתן להוכיח שכל המידע הגנטי נשמר: מעבירים מידע מתא שעבר התמיינות ורואים שיכול להתפתח ממנו יצור שלם.

תאי צמחים יודעים לעשות רגנרציה (התפתחות מייחורים), בעלי-חיים מפותחים יותר איבדו את התכונה הזו. רוב התאים בגוף שומרים בתוכם את הפוטנציאל לבטא את כל הגנום מחדש.

<u>הערה:</u> בקורס הזה בגלל נוחות טכנית מסתכלים על רמת ה-mRNA כדי לבדוק את רמת הביטוי וזה לא לגמרי מדוייק כי יש RNA שלא מתבטא כחלבון.

<u>ביטוי הגנים יכול להיות מבוקר בשלבים שונים בין ה-DNA לחלבון פעיל:</u>



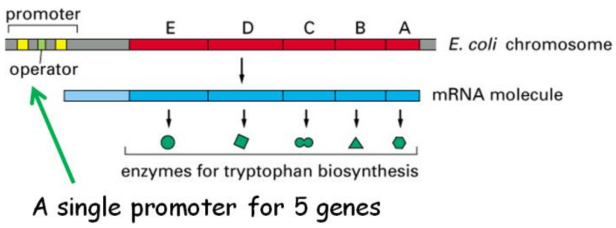
ביטוי הגנים מבוקר בתהליך מורכב. אין בתהליך חיסכון באנרגיה אלא דווקא דגש על דיוק בתהליך. הרבה פעמים כדאי לשים את הבקרה בהתחלה: אם הגן לא משועתק, לא ייווצר ממנו חלבון. אבל לפעמים כדאי לשים את הבקרה בסוף כדי לאפשר לתא תגובה מהירה לשינויים פיזיולוגיים. ישנה גם בקרה ע"י: Alternative Splicing- יצירה מיחידת מידע אחת ב-DNA הרבה מאוד mRNAs שונים.

כמעט כל חלבון מבוקר בכל אחד מהתהליכים. בקרה על השעתוק היא חשובה מאוד, גם בתאים אאוקריוטים, זה שלב שמאפשר "להדליק" או "לכבות" ביטוי גנטי. בהתפתחות של בע"ח רב-תאי בקרת השעתוק היא חשובה מאוד.

<u>הערה:</u> הרבה מן החלבונים הנקשרים ל-DNA הם בעלי דומיין Helix-turn-helix.

פולי-ציסטרון בפרוקריוטים:

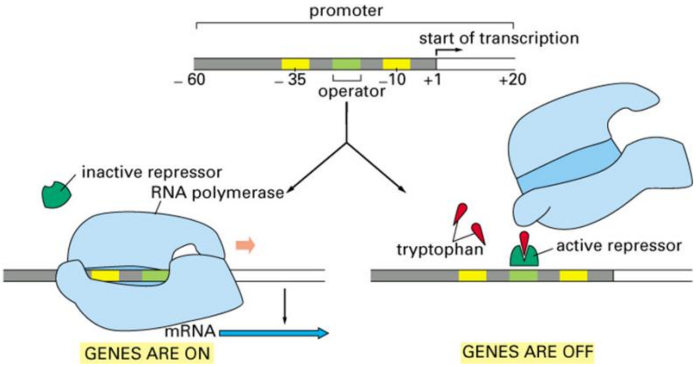
בפרוקריוטים יש שעתוק של כמה גנים בו זמנית: **multi-cistron**. פעמים רבות יש היגיון בבקרה המשותפת- גנים המשתתפים באותו התהליך. הפרומוטור בנוי מרצפים שהם שמורים. יש שם רצף הנקרא: **operator** השייך לבקרה על השעתוק וכמעט תמיד ייקשר אליו חלבון המבקר את השעתוק. באאוקריוטים אין יחידת שעתוק פולי-ציסטרונית.



©ענת עציון

הרפרסור של טריפטופאן:

כאשר אין מספיק Trp, הרפרסור עובר שינוי קונפורמציה ולא נקשר ל-DNA וכאשר יש מספיק Trp, הרפרסור נשאר קשור אליו ומונע התחלת שעתוק ע"י RNA polymerase. הוא נקשר חזק יותר מהאנזים.



בקרה שלילית- בקרה ע"י רפרסור (דכאן):

1. קשירת הליגנד אליו גורמת להסרתו מהאופרטור.
2. קשירת הליגנד אליו נחוצה לקשירתו אל האופרטור.

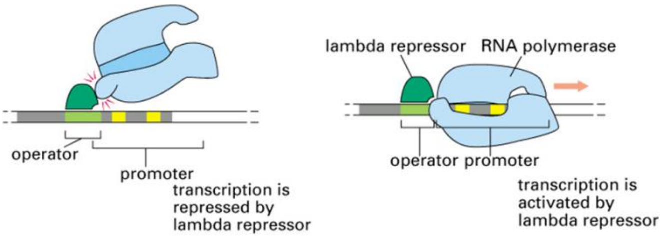
הערה: הבקרה הזו יותר מאפיינת מערכות בקרה בפרוקריוטים.

בקרה חיובית- בקרה ע"י אקטיבטור (משרן):

1. קשירת הליגנד אליו גורמת להסרתו מהאופרטור.
2. קשירת הליגנד אליו נחוצה לקשירתו אל האופרטור.

ה-lambda repressor:

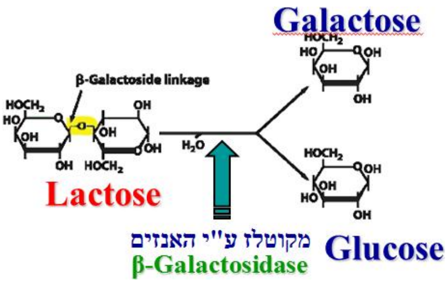
הוא יכול להיקשר גם כרפרסור וגם כאקטיבטור. זהו בקטריופאג' המדכא שעתוק חלק מהגנים של התא המארח ומאקטב גנים הנחוצים לו לצורך שכפול הגנום שלו.

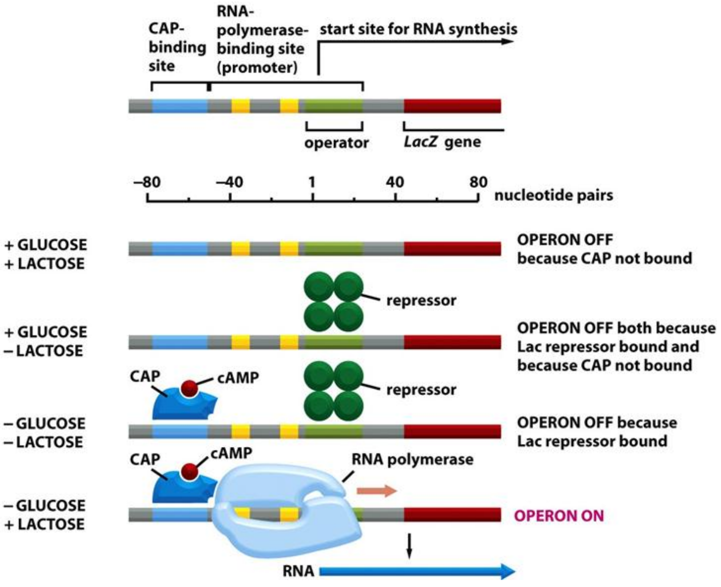


אופרון הלקטוז:

האופרון החיידקי הנחקר ביותר. אופרון הלקטוז מורכב מ-3 גנים. האנזים המרכזי במסלול הוא: **β-galactosidase**, שמפרק לקטוז לגלוקוז וגלקטוז.

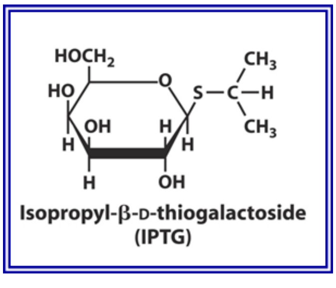
באופרון זה יש גם רפרסור וגם אקטיבטור במקביל:





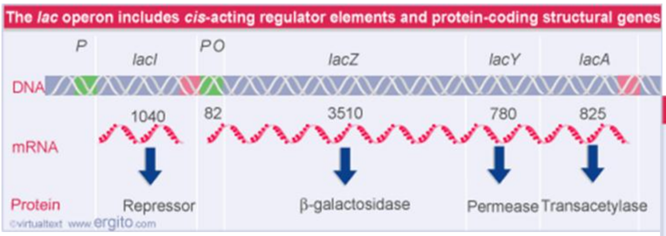
לקטוז גורם לאינדוקציה (הגברת הביטוי) החזקה ביותר של האופרון.

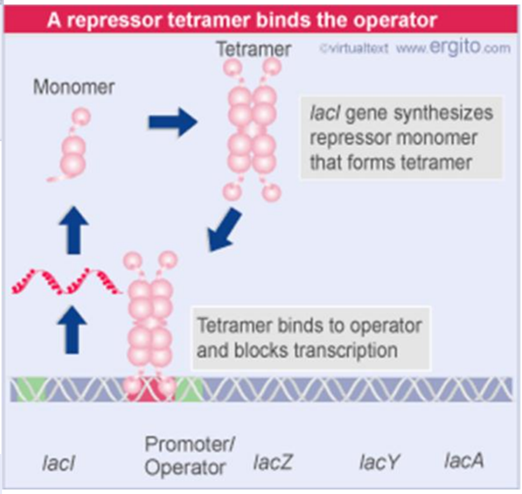
אנלוג שימושי נוסף: IPTG- גורם לאינדוקציה חזקה יותר מהלקטוז, אך איננו מפורק ע"י האנזים (שפעול תמידי).



©ענת עציון

הגן lacI מקודד לרפרסור, מונומר היוצר טטראמר הנקשר לאופרטור.

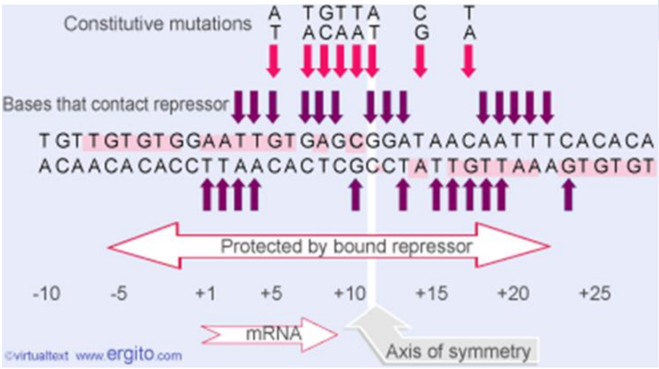




כאשר יש לקטוז, הוא נקשר לטטראמר, גורם לו לשינוי קונפורמציה ואז הרפרסור מתנתק ויש שעתוק.

<u>האופרטור:</u> לאופרטור יש סימטריה.

כל מוטציה שעשו ברצף ההכרה של הרפרסור הביאה לביטוי קונסטיטוטיבי גם אם יש גלוקוז במצע כי המוטציות מונעות מהרפרסור להיקשר.



<u>שני מודלים לניתוק הרפרסור:</u>

1. הליגנד נקשר כשהרפרסור קשור ל-DNA וגורם לשינוי קונפורמציה.
2. הליגנד נקשר כשהרפרסור במצב מסיס ומשפיע על השו"מ של רפרסור קשור וחופשי.

<u>מה שקורה בפועל:</u> הליגנד נקשר לרפרסור בזמן שהוא קשור ל-DNA.

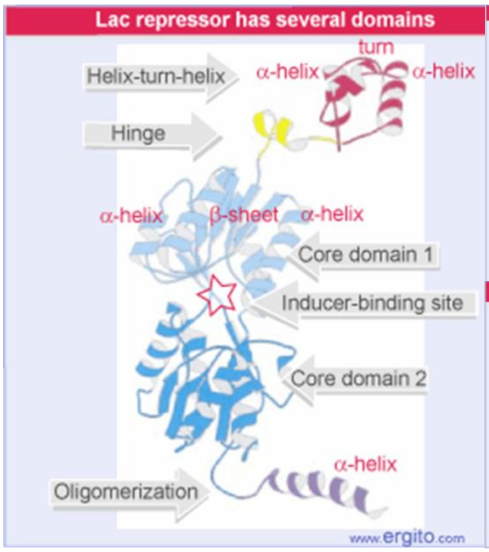
<u>הרפרסור:</u>

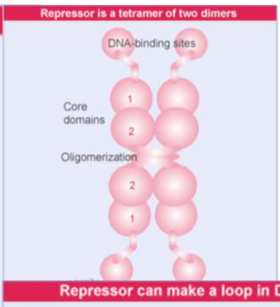
ל-lacI רפרסור יש כמה דומיינים,

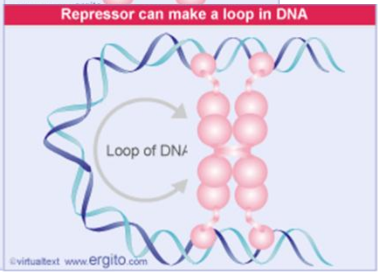
Helix-turn-helix- דרכו הוא נקשר ל-DNA.

ישנו "כיס" עבור הלקטוז.

4 חלבונים כאלה נקשרים ביחד ליצירת טטראמר.







הרפרסור נקשר לשני אתרים שונים ב-DNA וכך הוא גורם לכיפוף ה-DNA.

כאשר נקשר הליגנד (ה-inducer), נגרם שינוי קונפורמציה והראשים של הרפרסור כבר לא מתאימים לקשירה ל-grooves של ה-DNA.

בכל תא חיידק יש כ-10 מולקולות של טטראמר רפרסור. זהו חלבון עם אפיניות ל-DNA ואפיניות גבוהה במיוחד לרצף הפאלינדרומי הספציפי. כל מולקולות הרפרסור קשורות ל-DNA, אבל באפיניות נמוכה יותר לאזורים אחרים שאינם הפאלינדרום. הם נעים על ה-DNA בקפיצות והם לא מסתובבים חופשיים בתא.

©ענת עציון

<u>קבוע ש"מ של אינטראקציה לא ספציפית הוא:</u> $K_A = 2 X 10^6 M^{-1}$

<u>ריכוז ה-DNA בתא הוא:</u> $[DNA] = 7 X 10^{-3} M$ (עצום!).

⇐ $Free/Bound = 10^{-4}$ (הש"מ בין קשירה להתנתקות מה-DNA באזורים שאינם הפאלינדרום).

האפיניות של הרפרסור לרצף הפלינדרום:

2×10^{13} והאפיניות לרצף אחר: 2×10^{6}.

ולכן הספציפיות (חלוקת שניהם): 10^{7}.

96% מהרפרסור קשור לאופרטור.

קשירת הליגנד משנה פי 1000 את האפיניות ואז 10 מולקולות הרפרסור עוברות להיקשר ל-DNA אחר שכעת האפיניות אליו לא מספיק קטנה.

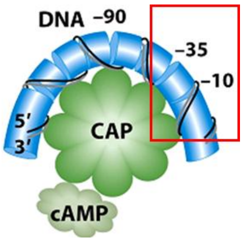
ה-RNA polymerase מוחזק ע"י הרפרסור וכשהוא מסולק האנזים יכול מייד לפעול.

Repressor specifically binds operator DNA

DNA	Repressor	Repressor + inducer
Operator	$2 x 10^{13}$	$2 x 10^{10}$
Other DNA	$2 x 10^{6}$	$2 x 10^{6}$
Specificity	10^{7}	10^{4}
Operators bound	96%	3%
Operon is:	repressed	induced

©virtualtext www.ergito.com

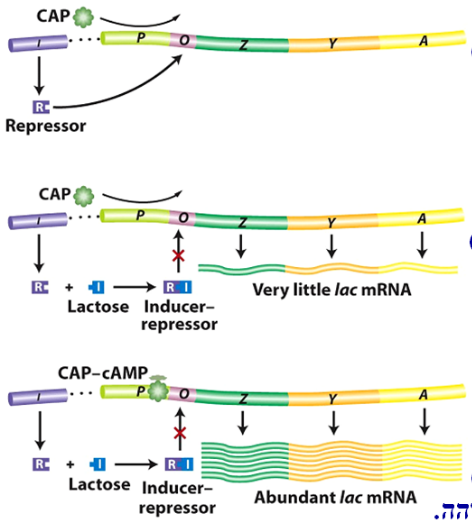
<u>האקטיבטור:</u>



ה-CAP נקשר לפרומוטור כשיש לקטוז במצע ואין גלוקוז כי אז יש רמות גבוהות של cAMP שגורם ל-CAP להיקשר. החלבון CAP נקשר לזוג רצפי מטרה וגורם לכיפוף ב-DNA שחושף את אתרי הקישור ל-RNA polymerase. בנוסף על כך הוא גם יוצר מגע ישיר עם האנזים.

<u>תמונה כללית של הבקרה באופרון הלקטוז:</u>

<u>רמה יחסית של האנזים:</u>



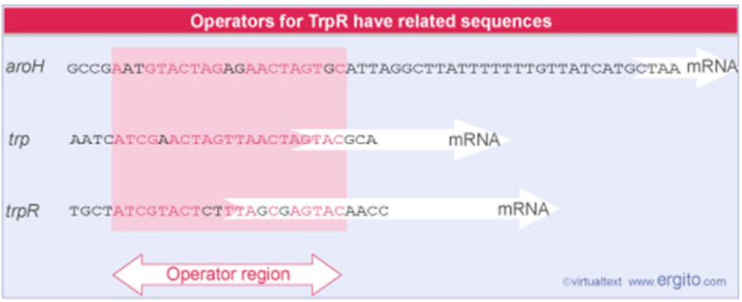
1 — יש גלוקוז (cAMP נמוך) אין לקטוז; אין ביטוי.

50 — יש גלוקוז (cAMP נמוך) יש לקטוז; רמת ביטוי נמוכה.

2500 — אין גלוקוז (cAMP גבוה) יש לקטוז; רמת ביטוי גבוהה.

<u>רפרסור יכול לבקר גנים שונים:</u>

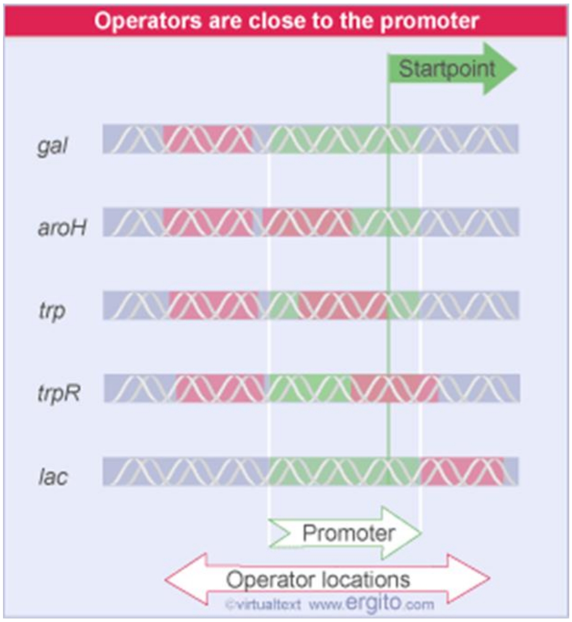
דוגמא- trp repressor מבקר קבוצה של 3 גנים בלתי קשורים.



©ענת עציון

<u>מיקום האופרטור:</u>

רצפי אופרטור בדרך-כלל ממוקמים קרוב לפרומוטור. ויכולים להיות ממוקמים גם לפניו וגם אחריו (כמו באופרון הלקטוז).



מערכת מתוחכמת כזו כנראה הקנתה לחיידק יתרון ולכן מערכת זו שרדה באבולוציה.

<u>שאלה ממבחן:</u>

האנזימים השונים המשמשים לביוסינתזה של החומצה האמינית ארגינין ממוקמים במספר אתרים לאורך הגנום המעגלי של *E. coli*. ביטוי גנים אלו מבוקר על ידי חלבון ה-argR. פעילותו של argR מבוקרת על ידי ארגינין כך שבעודף ארגינין פוחתת כמות האנזימים. כאשר הוא נקשר לארגינין, argR משנה את הקונפורמציה שלו וכך גם את האפיניות שלו לרצפים מבקרים הנמצאים בפרומוטורים של הגנים לאנזימים המשתתפים בביוסינתזה של ארגינין.

א. אם argR הינו דכאן (Repressor) הרי קשירת ארגינין תעלה את האפיניות שלו לרצפים הספציפים ב- DNA.

ב. אם argR הינו דכאן הרי קשירת ארגינין תעלה את האפיניות שלו ל- RNA פולימראז.

ג. אם argR הינו משרן (gene activator) הרי קשירת ארגינין תעלה את האפיניות שלו לרצפים הרגולטורים בפרומוטר.

ד. אם argR הינו משרן (gene activator) הרי קשירת ארגינין לא תשנה את האפיניות שלו לרצפים הרגולטורים בפרומוטר .

©ענת ציון

בקרת השעתוק באאוקריוטים

אנזימי הפולימראז:

בתא אאוקריוטי ישנם לפחות שלושה RNA polymerase:

RNA polymerase I: rRNA.

RNA polymerase II: mRNA, snRNA.

RNA polymerase III: tRNA ויחידות rRNA.

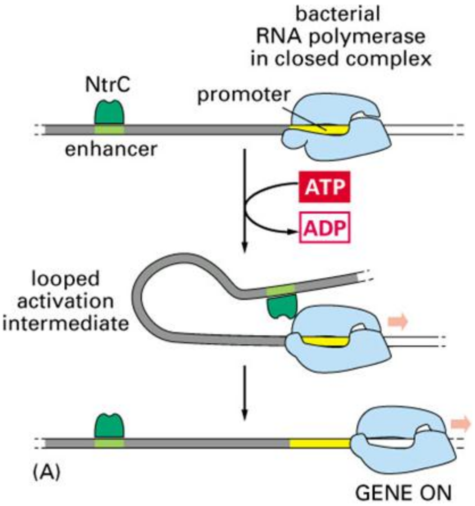
• RNA polymerase I	5.8S, 18S and 28S rRNA genes
• RNA polymerase II	all mRNAs, snoRNAs snRNAs
• RNA polymerase III	tRNAs, 5S rRNA, snRNAs and other small RNAs

פקטורי השעתוק:

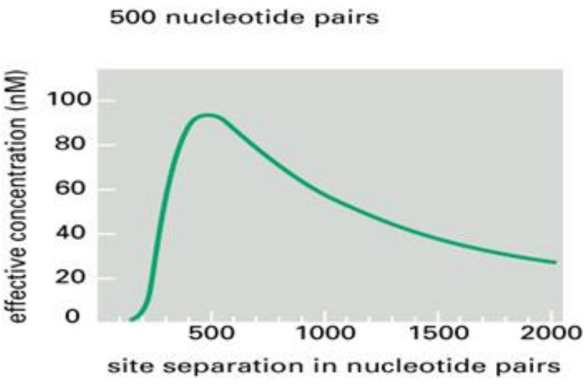
הפרומוטור האאוקריוטי מאופיין בסדרה של "פקטורים כלליים" שכל אחד מהם מורכב מדי הרבה חלבונים- TFIID. הפקטורים הללו ביחד עם האנזים נקשרים ל-"core promoter". הבקרה תהיה ב"פרומוטור הרחב" שהוא שונה מגן לגן.

הבקרה יכולה להיות גם בקשירה במקומות מאוד מאוד רחוקים. במקרה זה האקטיבטור לא נקשר לפרומוטור הבסיסי אלא ל-mediator והוא זה שנקשר לפרמוטור הבסיסי.

דוגמא- NtrC: גן המופעל ע"י looping.

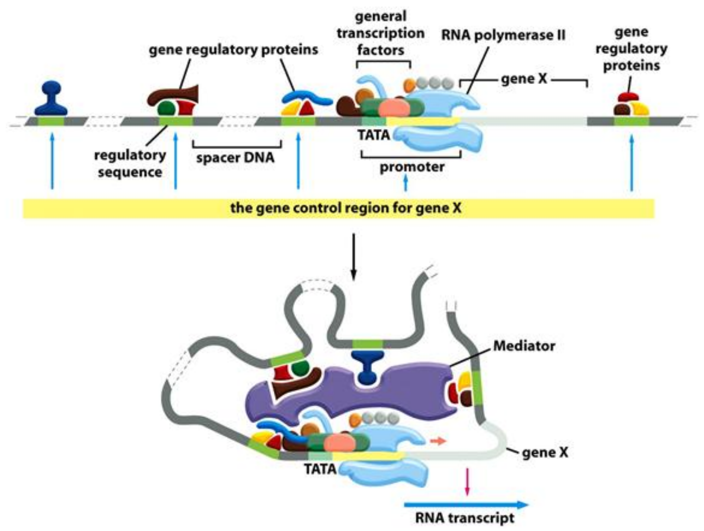


Enahncer: אתר ב-DNA המאקטב שעתוק (אתר קישור לאקטיבטור).



אחד הדברים שמשפיעים על חוזק הבקרה הוא מרחק אתר הקשירה של הפקטור. כשמגדילים את המרחק עד 500 יש הגדלת האפקט: ב-500 יש מרחק מספיק לקיפול ה-DNA כדי לבצע עיכוב/אקטוב. כשמתרחקים מהמרחק האופטימאלי האפקט יורד ויש פחות השפעה.

The gene control region of a typical eukaryotic gene



חלבוני בקרה:

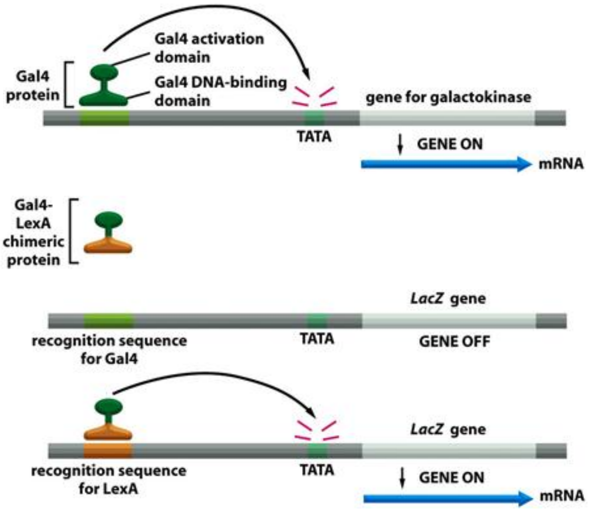
באדם, מתוך 25,000 גנים, 8% (~2000) קשורים לחלבונים המבקרים שעתוק גנים. אם נוסיף לכך את סוגי הבקרה הנוספים נקבל קרוב לחצי מן הרצפים. אבל כמות התוצר החלבוני שלהם היא רק 0.01% בתא ברגע נתון, כי מספיקות מולקולות ספורות של פקטורי בקרה כדי לאקטב/לעכב גן.

©ענת עציון

אזור הבקרה משתרע על-פני אלפי בסיסים לפני, אחרי ובתוך האזור המקודד. זה מסבך את ההגדרה של המושג: "גן". לבסוף החליטו ש:

גן: האזור ב-DNA שמשועתק ל-RNA. שאר הרצפים נקראים: **רצפי בקרה**.

חלבון Gal4:



חלבון המורכב משני דומיינים:

DNA binding domain: בעל אפיניות גדולה לרצף ב-DNA.

Activation domain: נקשר ל-RNA polymerase ומאקטב אותו.

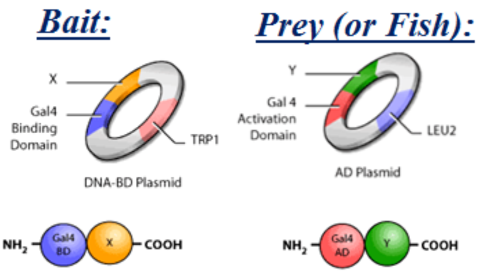
כל אחד מהדומיינים בנפרד לא יגרום לאקטיבציה של השעתוק.

אם מחברים את ה-activation domain לדומיין קושר DNA מסוג אחר, אבל דואגים לרצף ה-DNA המתאים לו במיקום זהה, תהיה הפעלה של השעתוק.

מספיקה סמיכות מרחבית בין הדומיינים, הם לא חייבים להימצא על אותו חלבון.

Two Hybrid assay for interacting protein:

שיטה לאנליזת אינטראקציות חלבון-חלבון



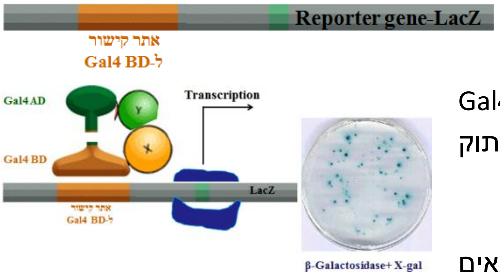
אם יוצרים כל דומיין מאוחה לחלבון אחר ומאפשרים קרבה מספקת ביניהם, אז זה מספיק לפעולת שעתוק, וע"י שעתוק של גן מדווח ניתן לבחון את האינטראקציה בין החלבונים המאוחים.

השיטה: מאחים את ה-binding domain לגן X.

מאחים את ה-activation domain לגן Y.

אם חלבון X באינטראקציה עם Y- יהיה שעתוק.

הפלסמידים עוברים טרנספורמציה אל תוך תאי שמרים. שמרים אלה מהונדסים גנטית כך שהם מכילים בגנום שלהם אתר קישור ל- Gal4 Binding domain. אתר קישור זה מאוחה לגן מדווח.



אינטראקציה בין חלבון X לחלבון Y תביא לקרבה בין Gal4 AD ל-Gal4 BD, לגיוס פקטורי השעתוק ופולימראז ולשעתוק הגן LacZ המקודד ל-β-galactosidase.

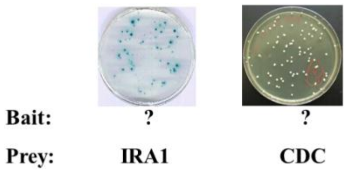
לפלסמידים מכניסים גם סמן סלקציה המאפשר לתאים לגדול על מצע דל (חסר Trp ו-Leu) רק אם שני הפלסמידים נכנסו. הגן המדווח צובע בצבע. ולכן נראה צבע אם יהיה שעתוק.

שאלה מהתרגול:

אתה חוקר את מנגנון חלוקת תאים הומניים. ידוע לך כי במסלול זה קיים חלבון הנקרא: RAS1 בעל תפקיד חשוב בפרוליפרציה של תאים. מניסויי IP שערכת, גילית כי החלבון RAS1 עובר אינטראקציה עם שני חלבונים נוספים: CDC ו-IRA1. ברצונך לאמת אינטראקציות כאלה בשיטה מולקולארית נוספת- Yeast two hybrid.

©ענת עציון

<u>הקונסטרקטים שעליך לבנות:</u> Bait שיכיל את החלבון RAS1, את Gal4 BD וסמן סלקציה, לדוגמא: URA3. קונסטרקטי ה-prey (שניים) יכילו את CDC או את IRA1, את Gal4 AD וסמן סלקציה אחר, לדוגמא: LEU2 (סמן הסלקציה חייב להיות שונה מזה של ה-Bait).

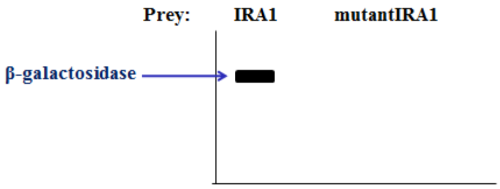


אחרי טרנספורמציית הפלסמידים לשמרים מהונדסים גנטית (המתאימים למערכת ה-two hybrid ומכילים את הגן המדווח LacZ), גידלת את השמרים על צלחות המכילות X-gal.

<u>אפשרות-א:</u> CDC נקשר ל-IRA1 ולא ל-RAS1 ישירות.

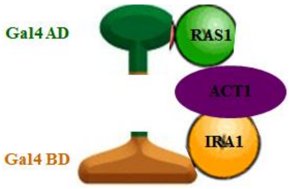
<u>אפשרות-ב:</u> החלבונים צריכים להגיע לגרעין, איפה שיש שעתוק, וייתכן ש-CDC פשוט לא מגיע לגרעין, שכן לא כל החלבונים מסוגלים להיכנס לגרעין התא.

רצית להמשיך ולחקור את החלבון IRA1 ותפקידו במסלול. גילית כי לחלבון זה יש domain הידוע כקושר ספציפית ובלעדית את החלבון ACT1. החלטת לבדוק את תפקיד הדומיין הזה במסלול חלוקת התאים. לצורך כך בנית קונסטרקט prey חדש, המכיל מוטציה בדומיין, ועשית לו טרנספורמציה לשמרים (bait: RAS1). הפעם נבדק ביטוי הגן β-galactosidase באנליזת western-blot תוך שימוש בנוגדן ספציפי לחלבון זה.



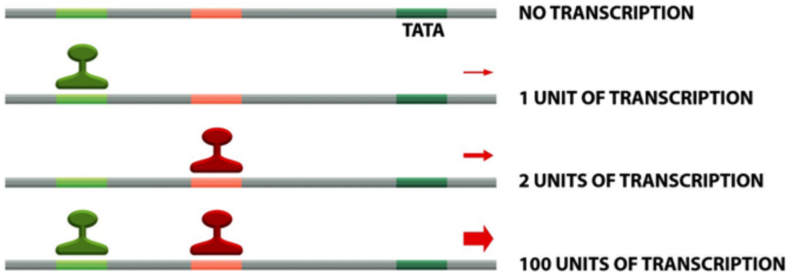
<u>ניתוח:</u> מניסוי זה ניתן לראות כי אין ביטוי של החלבון כאשר פוגעים בדומיין המדובר. כלומר: במוטנט אין אינטראקציה בין RAS1 ל-IRA1. זה מעיד שקורה אחד מהשניים:

1. דומיין זה חשוב לאינטראקציה הישירה בין RAS1 ל-IRA1.
2. האינטראקציה בין RAS1 ו-IRA1 איננה ישירה והיא מתווכת ע"י ACT1. בזן שאיננו מוטנטי האינטראקציה יכולה להתאפשר במידה ו-ACT1 השמרי מסוגל להיקשר לשני החלבונים בגרעין התא.



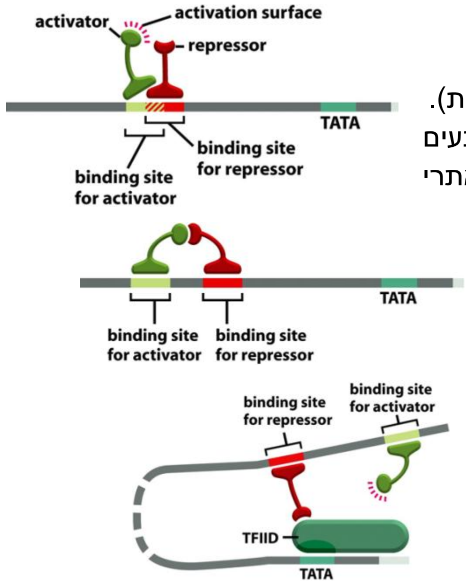
:Transcriptional Synergy

כמעט כל גן אאוקריוטי מבוקר ע"י אתר בקרה אחד או יותר, ואין אדטיביות בין אתרי הבקרה (כלומר: אין יחס ישר בין כמות התוצר של שני פקטורים לפעולת כל אחד מהם בנפרד).



<u>מנגנוני עיכוב:</u>

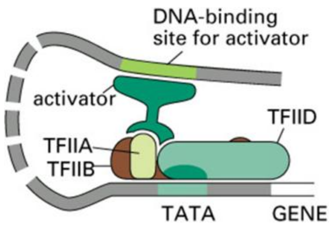
רוב הבקרה באאוקריוטים היא ע"י אקטיבטורים (בקרה חיובית).



- הרבה מאוד רפרסורים יפעלו ע"י כך שהם מונעים מהאקטיבטורים לעבוד, למשל כאשר ישנה חפיפה באתרי הקשירה שלהם ולרפרסור יש אפיניות גדולה יותר.
- הרפרסור תופס את האקטיבטור ולא מאפשר לו להיקשר לקומפלקס לאקטוב השעתוק.
- עיכוב ע"י קשירה ישירה לקומפלקס פקטורי השעתוק.

©ענת עציון

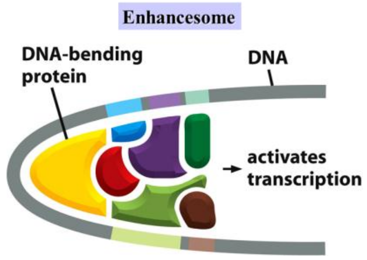
כאשר האקטיבטור נקשר הוא משרה יצירת קומפלקס החלבונים שגורם להפעלת השעתוק.



קואקטיבטורים וקורפרסורים:

לא נקשרים ישירות ל-DNA, הם מתווכים בין פקטורים הקשורים ל-DNA או לקומפלקס הבסיסי של השעתוק.

Enhanesome: קומפלקס חלבונים לאקטיבצייה של שעתוק.



שאלות ממבחן:

RNA polymerase I (RNA פולימראז I) בתאים אאוקריוטים

א. משמש לתעתוק גנים המכילים אינטרונים.
ב. משמש לתעתוק RNA ריבוסומלי. (מסומן)
ג. משמש לתעתוק tRNA.
ד. משמש לתעתוק RNA העובר שחבור אלטרנטיבי.
ה. משמש לתעתוק RNA העובר עריכה Editing.

כאשר מבטאים גן מחיידק בתאים אנימלים:

1. חייבים להצמיד לו פרומוטור חיידקי בנוסף לאינטרון סינטטי.
2. חייבים להצמיד לו פרומוטור אאוקריוטי ואלמנטים נוספים לביטוי אאוקריוטי. (מסומן)
3. חייבים לדאוג למבנה גבעול-ולולאה בקצה ה-3' של הגן.
4. חייבים לדאוג שיהיה אינטרון מקבוצה II (Group II) במרכז הגן.
5. חייבים לשנות את קודון החומצה האמינית הראשונה בהתחלת התרגום לכזה שהוא אאוקריוטי.

<u>הערה:</u> בתאים אנימאליים, הביטוי הרבה יותר טוב כאשר הגן שמוכנס בהנדסה גנטית מכיל אינטרון.

חוקר הכניס בהנדסה גנטית את הגן לאנזים β- גלאקטוזידאז לתאי חיידק תחת בקרה של פרומוטור חיידקי חזק וכך שהוא בכיוון הפוך לגן הטבעי. כלומר, יתועתק ה-RNA מהגדיל המשלים אשר יצור סליל כפול עם ה-RNA המקורי של אותו גן.

א. בתאי החיידק ייווצר יותר אנזים מפני ש-RNA כזה יעיל מאוד בתרגום.
ב. בתאי החיידק לא יתועתק RNA ל-β- גלאוקטוזידאז.
ג. בתאי החיידק ייווצר רק ה- antisense RNA ל- β-גלאקטוזידאז.
ד. בתאי החיידק יוסר מקטע ה-RNA של הגן המקורי על ידי רקומבינציה הומולוגית.
ה. אף תשובה מ-א' עד ד' אינה נכונה. (מסומן)

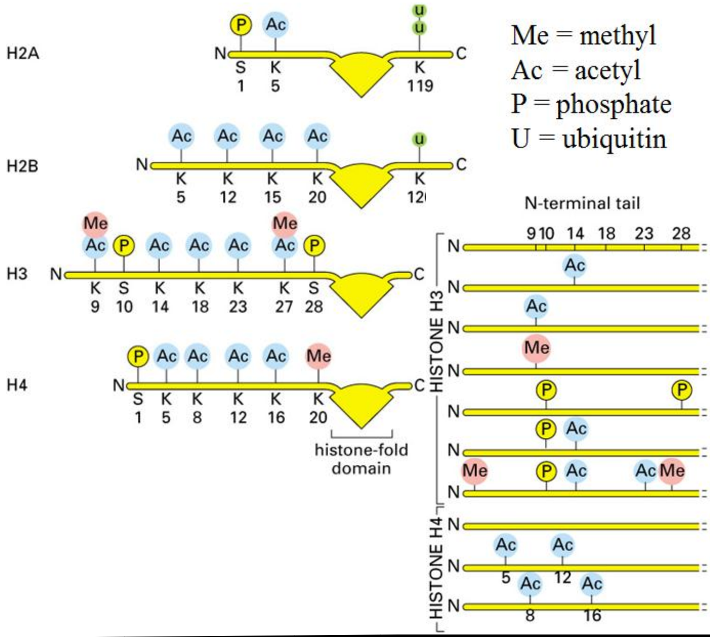
dsRNA- מבנה מאוד יציב עד כדי כך שהריבוזום לא יכול לפרק אותו.

Chromatin remodeling:

בנוסף לפקטורים החלבוניים, גם לכרומטין יש תפקיד בבקרה על ביטוי הגנים.

מודיפיקציות קוולנטיות בהיסטונים:

ההיסטונים, החלבונים שאורזים את ה-DNA, עוברים הרבה מאוד מודיפיקציות שלאחר תרגום: מתילציה, אצטילציה, זרחון וקשירת יוביקוויטין (אשר לא משמש כאן כסמן לדגרדציה).

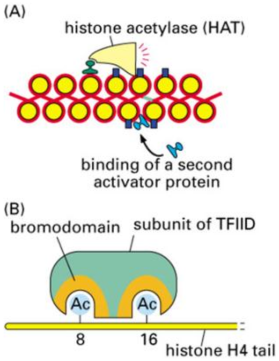


modification state	"meaning"
unmodified	gene silencing?
acetylated	gene expression
acetylated	histone deposition
methylated	gene silencing/ heterochromatin
phosphorylated	mitosis/meiosis
phosphorylated/ acetylated	gene expression
higher-order combinations	?
unmodified	gene silencing?
acetylated	histone deposition
acetylated	gene expression

לכל מודיפיקציה כזו יש משמעות בביטוי הגנים.

זו בקרה דרך אנזימים שעושים מודיפיקציות להיסטונים.

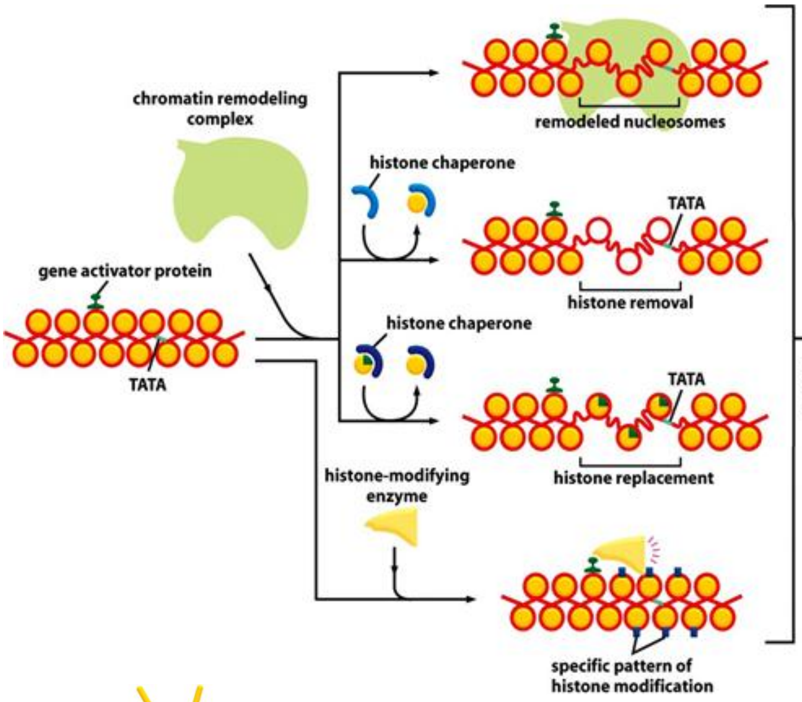
©ענת עציון



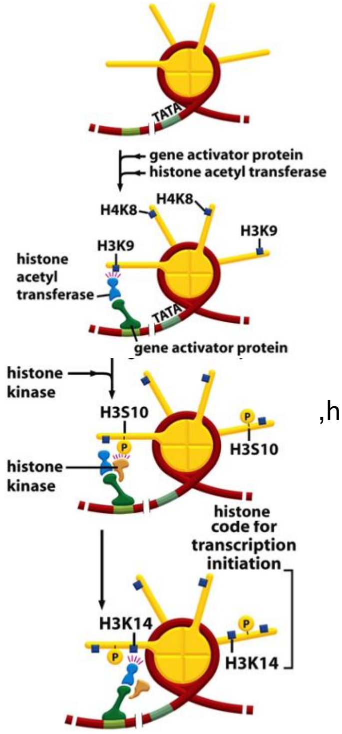
<u>דוגמא:</u> בדרך-כלל ה-DNA דחוס מאוד מה שלא מאפשר הגעת פקטורי שעתוק. כדי להביא גנים לביטוי יש לפתוח את המבנה ההיסטוני הדחוס מאוד. האנזים HAT מוסיף להיסטון שיירי אצטיל וזה גורם לפתיחה של ההיסטונים. ל-TFIID יש יכולת לקשור שתי קבוצות אצטיל על ההיסטון H4.

<u>Nucleosome remodeling:</u>.

<u>Chromatin remodeling complex:</u> קומפלקס גדול המכיל הרבה חלבונים שעושים את המודיפיקציות (הרחבה בהמשך).



- פקטור השעתוק נקשר ומביא איתו את קומפלקס ה-remodeling שגורם ל-DNA להיפתח (בכל-מיני דרכים), ואז נחשף רצף ה-TATA וה-TFIID יכול להיקשר.
- יש חלבונים נוספים: histone chaperons אשר מאפשרים להיסטונים להיקשר אחרת ל-DNA, במבנה יותר פתוח. למשל: שינויים בהיסטונים שלא ייקשרו יותר ל-DNA.
- אנזים שעושה מודיפיקציות להיסטונים בתבנית מסויימת, וזה גורם לכרומטין להיפתח.



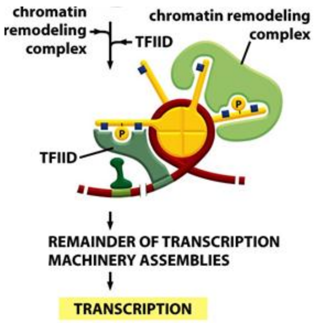
<u>דוגמא- הגן לאינטרפרון:</u>

חלבון שנוצר כאשר בתא אנימאלי מופיע dsRNA (מע' התגוננות מפני וירוסים).

<u>תהליך הפעלת הגן:</u>

1. נקשר אקטיבטור לרצף ב-upstream.
2. לאקטיבטור נקשר אנזים histone acetyl transferse שעושה אציטלציה של ההיסטון-3 בליזין-9, של היסטון 4 בליזין-8, עבור שני ההיסטונים מכל סוג.
3. הקומפלקס של האנזים ביחד עם הפקטור מושך אליו אנזים histone kinase, הוא מזרחן את סרין 10 בהיסטון-3.
4. אצטילציה נוספת בהיסטון 3- של ליזין 14.

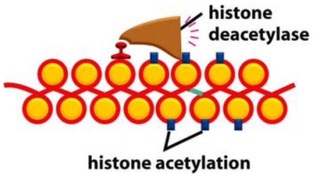
©ענת עציון



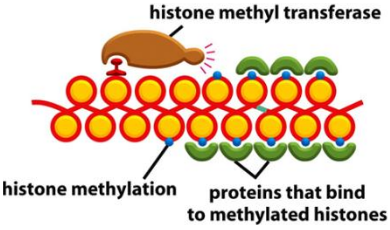
5. דגם האצטילציה הזה ביחד עם שתי קבוצות הפוספט מהווה אתר קשירה ל-chromatin remodeling complex, הוא נקשר להיסטונים וגורם להם להיפתח מבחינה מרחבית שתאפשר קשירה של TFIID ל-TATA box.

עיכוב ה-remodeling:

- גיוס ה-chromatin remodeling complex למקום אחר מה שיביא את ה-DNA לחזרה למצב דחוס שלא מאפשר היקשרות TFIID ל-TATA box.

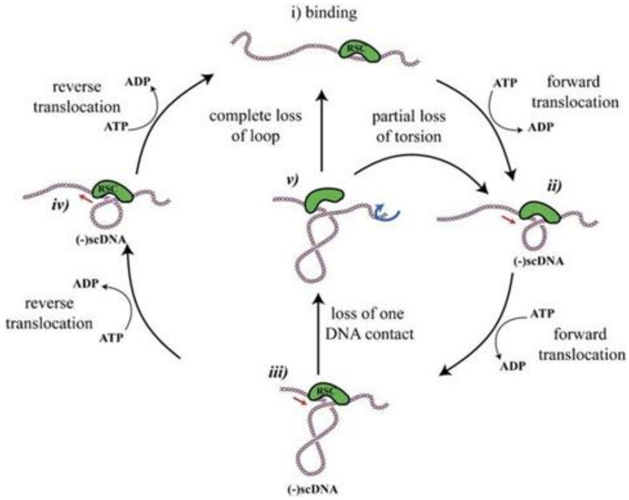


- אנזים histone deacetylase שמסיר אצטילציות מהיסטונים.



- אנזים שממתל היסטונים שעברו אצטילציה וגורם להם להישאר במבנה שלא מאפשר פתיחה של ההיסטונים.

Chromatin Structure Remodeling (RCS) Complex:

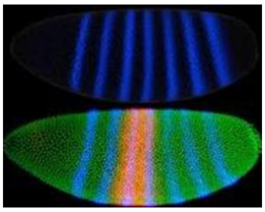


קומפלקס הבנוי מ-17 יחידות חלבוניות, בעל יכולת לשנות את מבנה הכרומטין. יש בו פעילות ATPase (משתמש ב-ATP) ויש לו היכולת לפתוח את הלופים של ה-DNA.

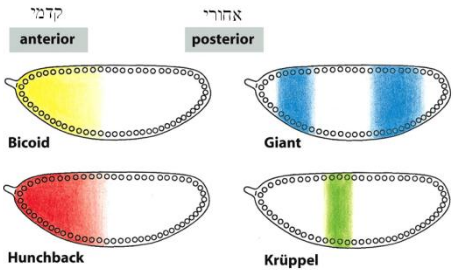
כאשר מוטציות פוגעות באחד האנזימים שאחראים על המודיפיקציות, קורים סוגים שונים של מחלות גנטיות כתוצאה מביטוי לא נכון של גנים במוח.

דוגמא: מצאו שאצל אנשים המכורים לאלכוהול יש chromatin remodeling לא תקין.

בקרת הביטוי בעובר הדרוזופילה:



לאחר שהביצית מופרית נוצר תא ענקי עם אלפי גרעינים לאורך הדפנות וציטופלסמה אחת המשותפת לכולם. ההחלטה הכי חשובה בשלב זה היא: מה יהיה החלק הקדמי ומה יהיה החלק האחורי? זה נקבע ע"י ביטוי גנטי באלפי גרעיני התאים המצויים שם. נוצרות 7 רצועות שבשלבים יותר מאוחרים קובעות את תהליך ההתפתחות. הרצועות נגרמות ע"י ביטוי של גן מסויים: הגן Eve, שגורם לו להופיע ב-7 רצועות. הגנים בתחילת תהליך ההתפתחות (השמות ניתנו לפי הזבוב שנוצר כשבגן יש מוטציה) אלה גנים שפגיעה בהם פוגעת מהותית בהתפתחות. הביטוי של הגנים האלה נעשה במיקומים מאוד מדוייקים בביצית.



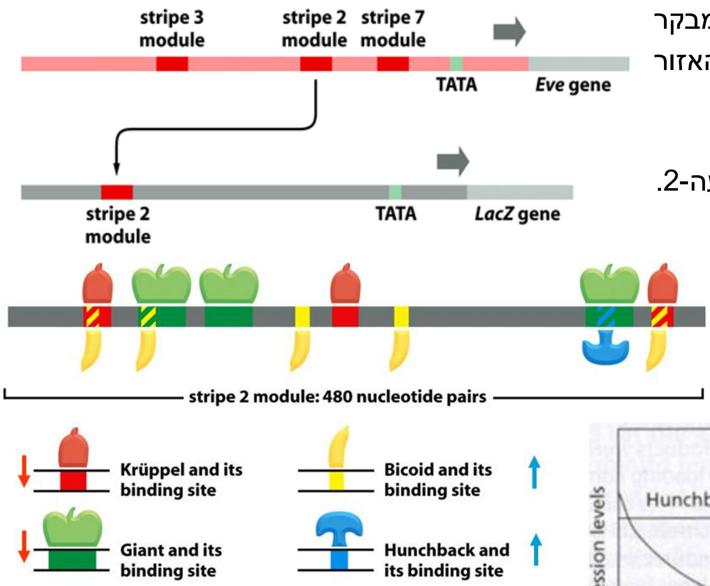
©ענת עציון

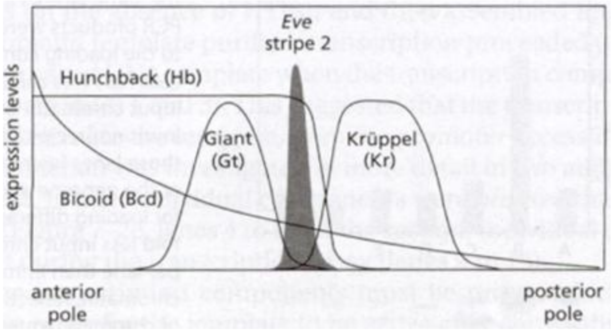
<u>האם בקרת השעתוק היא שקובעת את הביטוי המדוייק?</u>

<u>**ניסוי:**</u> בפרומוטור של Eve יש אזור שמבקר את רצועה-2 של הגן Eve. שמו את האזור הזה ב-upstream של גן מדווח LacZ.

<u>תוצאה:</u> רצועה אחת בדיוק באזור רצועה-2.

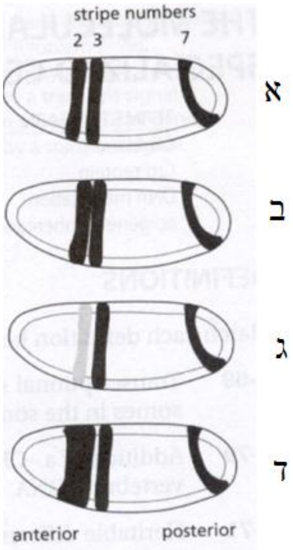
<u>מסקנה:</u> המקטע בפרומוטור נחוץ לצורך ביטוי מדוייק של רצועה-2, ואלמנט זה מכיל אתרי קשירה ל-2 אקטיבטורים ו-2 רפרסורים.





ארבעת החלבונים מתבטאים שונה באזורים שונים של הביצית. באזור רצועה 2, שני הרפרסורים מתבטאים ברמה נמוכה, אקטיבטור אחד ברמה גבוהה ושני ברמה בינונית. שינוי בביטוי של הרפרסורים יזיז את הרצועה.

שאלה מהתרגול:



בכדי לבדוק אם אלו אכן התנאים לביטוי Eve בפס השני, חיברתם את אתר הבקרה לגן מדווח: β-galactosidase. בנוסף, ביצעתם בעזרת הנדסה גנטית מספר שינויים שכללו החסרה של אתרי קשירת אקטיבטורים ורפרסורים.

בקרה (א)

<u>שינוי-1:</u> החסרת כל אתרי הקישור של Kruppel (ב).

<u>שינוי-2:</u> החסרת כל אתרי הקישור של Giant (ד).

<u>שינוי-3:</u> החסרת שני אתרי הקישור הימניים של Biocid (ג).

באותו-זמן שאתם ביצעתם את הניסויים שלכם, התפרסם מאמר של קבוצה אחרת. שיטת העבודה שלהם הייתה זהה לשלכם אך חלק מהתוצאות הפתיעו אותכם.

<u>התוצאה המפתיעה:</u> התוצאה המראה ירידה בביטוי הפס השני, למרות שהמוטציות בוצעו באתרים של Kr. זה בגלל שהם עשו מוטציות נקודתיות שפגעו באתרי הקשירה של Bcd החופפים להם.

הכנסת מקטע בעל מוטציות נקודתיות באתרים של Kr
(מסומנים בכוכבית אדומה) לעובר תקין

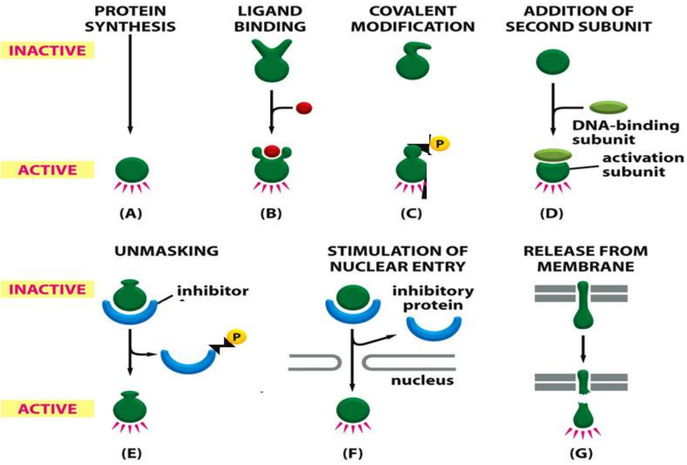
©ענת עציון

הבקרה בפרומוטור:

ישנם אקטיבטורים ורפרסורים, חזקים או חלשים. זוהי קומבינטוריקה שלמה של המערכת. ישנם כאלה המתארגנים ביחד כקומפלקס, וישנם כאלה שנמצאים ומשפיעים רק בקומבינציות מסויימות.

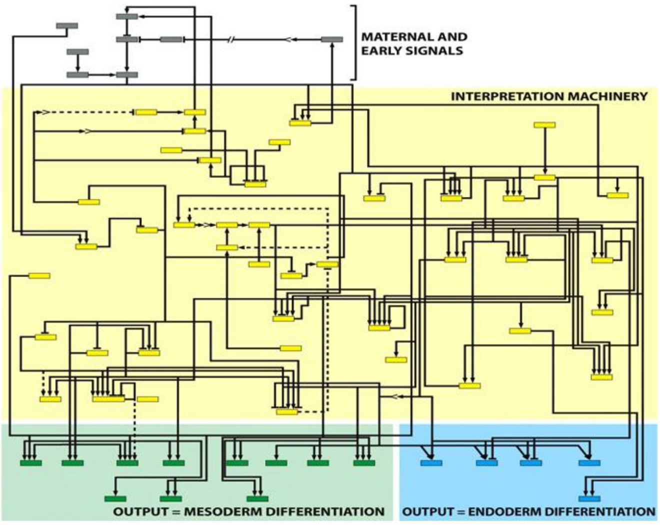
הבקרה יכולה לעבוד דרך סדרה שלמה של מערכת.

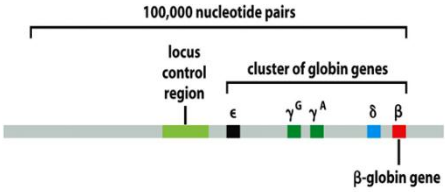
יש גם בקרה ע"י מידור מהגרעין, למשל: חלבון ממברנאלי שיש לחתוך אותו מהממברנה כדי שייכנס לגרעין.



The gene circuit:

ביטוי הגנים של תהליך התפתחות ה-sea urchin. כל חץ הוא אקטיבטור, וכל קו הוא רפרסור. כל ריבוע צהוב הוא גן, שיכול גם הוא להיות אקטיבטור/ רפרסור.

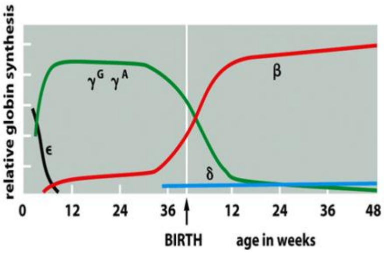


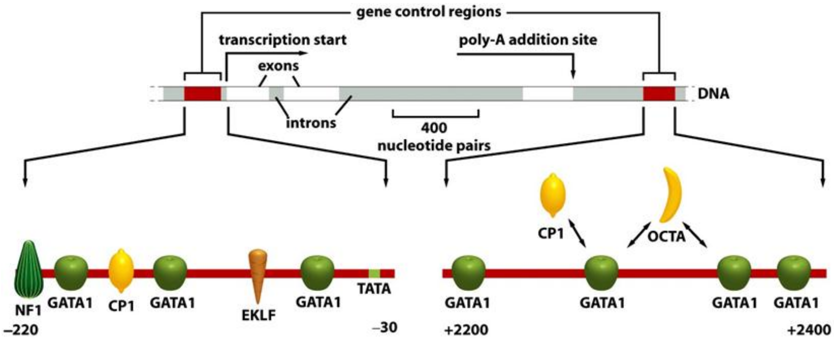


דוגמא-הגנים להמוגלובין:

ביונקים שגדלים בשלייה, עד ללידה ואחרי הלידה העובר משנה לגמרי את הסביבה שלו: תחילה החמצן מומס בנוזל השלייה ואח"כ הוא מצוי באוויר, ובהתאם לכך יש לשנות את החלבון והאפיניות שלו לחמצן.

זה נעשה ע"י משפחת גנים המקודדים בקלסתר. הם נמצאים באזור מסויים בגנום ויש אזור המבקר את הביטוי שלהם. יש 5 גלובינים שונים: בעובר מתבטא γ וקצת ε ומייד בלידה הביטוי של γ יורד ועולה הביטוי של β.

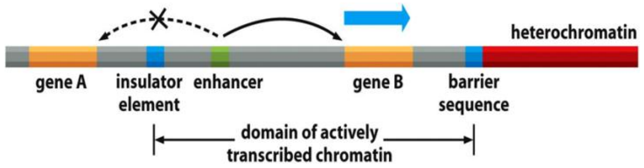




הבקרה על הביטוי הזה נעשית ברמת השעתוק ב-upstream ובמחקר שנעשה לאחרונה מצאו שיש בקרה גם באזור ה-downstream.

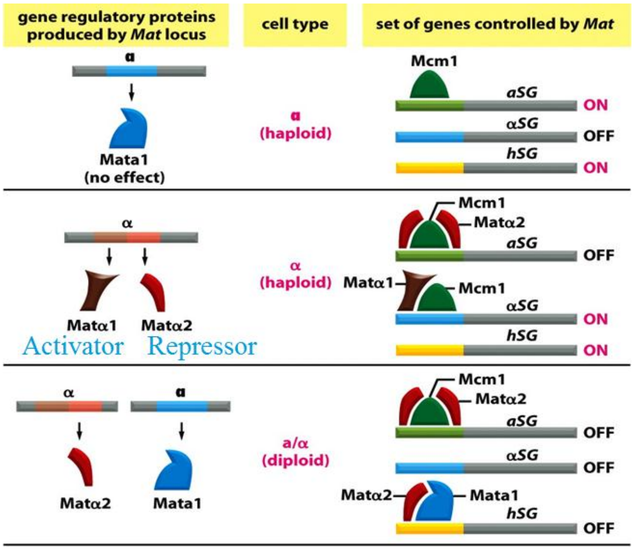
©ענת עציון

מבודדים – Insulators:



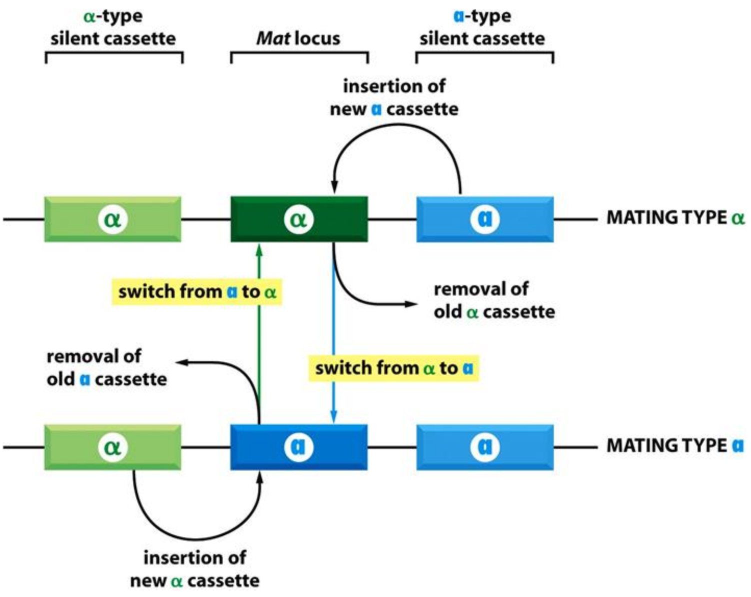
רצף של DNA שמהווה אתר קשירה לחלבון, וע"י כך הוא מבודד את פעולת האקטיבטור או הרפרסור ומגביל אותו שלא ישפיע באזור מסויים- האזור שבו האינסולטור נמצא.

דוגמא- השפעת זן השמר על תהליך ההנצה:



בשמרים ישנם שני סוגים: A ו-α שהם הפלואידים והם מסוגלים ליצור שמר דיפלואידי (יתרון אבולוציוני: מאפשר מיוזה במצבי stress). הם גם מסוגלים להפוך מסוג אחד לשני, כדי לאפשר את יצירת הדיפלואיד בכל אוכלוסייה, שאף אחד מהזנים לא "ייכחד". הקביעה האם השמר יהיה A או α היא בבקרה על השעתוק, ע"י פקטורי השעתוק. ישנם שלושה גנים (מקודדים לרצפטורים שונים), והקומבינציה של הביטוי שלהם קובעת את סוג השמר. הגן a מקודד לחלבון: Mata1, שמפעיל פקטור שעתוק, אבל לא פועל לבד. הגן α מקודד לשני גנים: Matα1- אקטיבטור ו-Matα2-רפרסור. השילוב שלהם עם פקטורים נוספים מפעיל או מדכא את השעתוק של שלושת הגנים.

מודל קסטה להחלפת הזן בשמר:

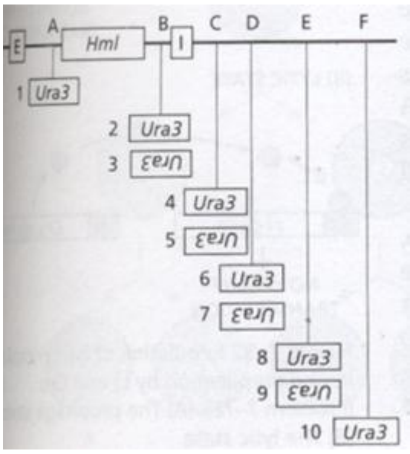


"קסטה": גן וכל אזורי הבקרה שלו.
לפני ואחרי הגן שביטויו מתאים ל-α יש שתי קסטות אחרות: אחת של α ואחת של a. הקסטות שבצדדים לא מתבטאות בגלל שהכרומטין לא נותן להן. היחיד שמתבטא הוא האלמנט שבמרכז.
ישנם תהליכים הדומים לרקומבינציה הומולוגית ובהסתברות מסויימת קורה שהקסטה שנמצאת בצד מחליפה את זו שנמצאת במרכז. אם הקסטה של a החליפה את α, יש החלפה של זן השמר.
ובאוכלוסיית שמרים שמתרבה, בהסתברות מסויימת קסטה מסוג אחד תתחלף בזן מסוג אחר.
וכך תמיד ישנו מספר מסויים של שמרים שמוכנים להפוך לדיפלואידים.

שאלה מהתרגול:

בנוסף לאתר Mat המכיל גנים הקובעים את סוג הזוויג של תא הפלואידי, בשמרי אפייה ישנם אתרים נוספים המכילים את אותם הגנים. אתרים אלו הנקראים: Hml ו-Hmr מושתקים ועל-כן אין ביטוי של הגנים הקובעים את הזוויג למרות נוכחות סיגנלים מתאימים. התברר לכם כי משני צידיו של כל אתר ישנם שני אלמנטים (E ,I) אשר קושרים מספר חלבונים ועל-כן חשודים על ידכם כאחראים להשתקה.

©ענת עציון



בכדי לבדוק את תפקידם של אלמנטים אלו החלטתם להכניס את הגן Ura3 לאזורים שונים באזור אתר Hml ולבדוק את הביטוי שלו.

<u>השמרים גודלו על מספר מצעים:</u>

1. מצע מלא (ביקורת לכך שהשמרים גדלים בצורה תקינה).
2. מצע חסר uracil (מה שיגדל- היה בו שעתוק של Ura3).
3. מצע המכיל בנוסף FOA- חומר אשר בנוכחות uracil הופך לרעל לשמר (ביקורת פנימית לכך שה-uracil הוא אכן זה שמתבטא וגורם למוות של השמרים בהם הוא מתבטא).

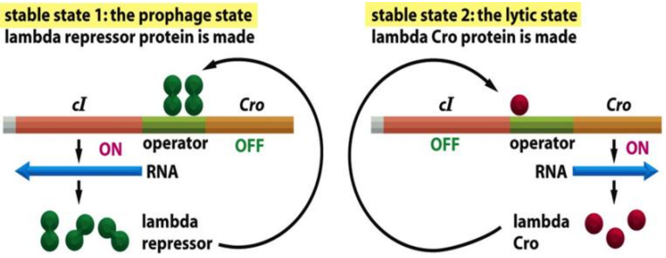
<u>תוצאות:</u> יש ביטוי של Ura3 מחוץ לאזור שבין E ו-I. באזורים: 1,2,3 לא רואים שעתוק של Ura3. מסקנה: האלמנטים E ו-I משתיקים את האזור שביניהם באופן לא ספציפי לגן מסויים.

The phage λ life cycle- התפתחות וירוסים בתאים:

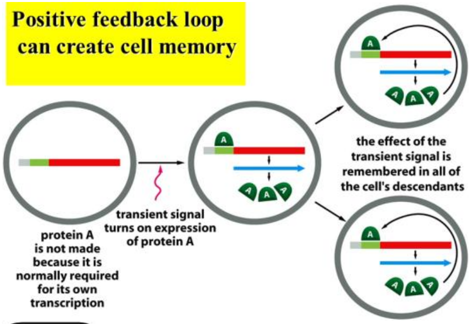
לאחר שהבקטריופאג' מדביק את תא החיידק, ישנן שתי אפשרויות לתהליכים שבהם הוא ימשיך:

1. <u>המסלול הפרופאג':</u> הגנום של הבקטריופאג' נכנס לתוך גנום החיידק, החיידק ממשיך לחיות והגנים שבונים את הבקטריופאג' מושתקים, רק ה-DNA שלו נמצא בפנים.
2. <u>המסלול הליתי:</u> הגנום של הבקטריופאג' לא נכנס לגנום החיידק, הוא מבטא את החלבונים שבונים את הקופסית ויוצר מאות בקטריופאג'ים ואח"כ מפוצץ את החיידק ויוצא לתקוף חיידקים נוספים.

הבקרה על חלבוני הוירוס בנויה על אקטיבטורים ורפרסורים.



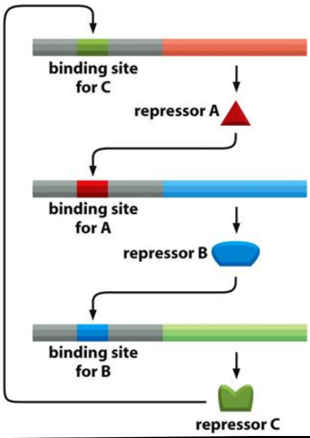
<u>**ה-λ repressor:**</u> חלבון שנקשר חזק מאוד לפרומוטור של חלבוני הבקטריופאג' ובכך הוא לא מאפשר יצירת חלבון (מצב של "נשא" של הוירוס). אבל במסלול הליתי נוצר החלבון Cro שנקשר לאופרטור ולא מאפשר ביטוי של ה-λ repressor ואז חלבוני הבקטריופאג' יכולים להתבטא.



The positive feedback loop:

התוצר של גן מסויים מהווה אקטיבטור של אותו הגן. מהרגע שהגן מתבטא אפילו במעט, הגן הזה תמיד יתבטא. כל תא שיתחלק ממנו תמיד ימשיך לבטא את הגן.

Gene clock:



כל היצורים החיים בנויים על מחזוריות של בד"כ 24 שעות (תלוייה באור יום). הרבה מאוד גנים ביצורים החיים מבוטאים בצורה של מחזור יומי.

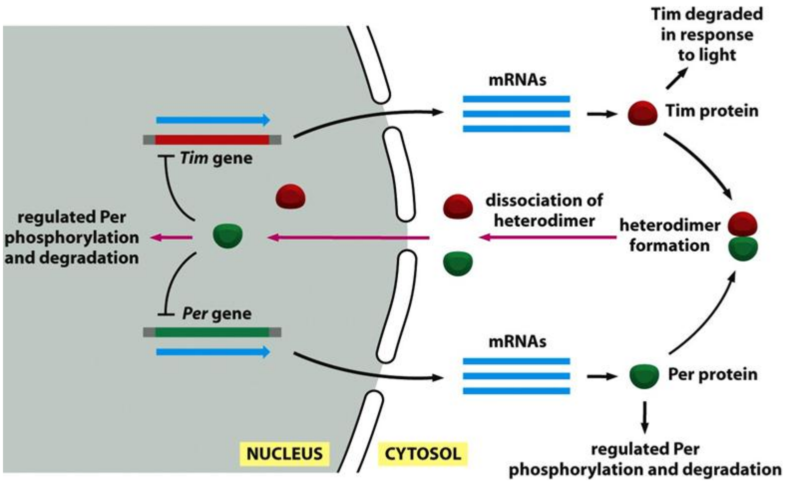
ניתן ליצור זאת ע"י המערכת הסכמטית הבאה: תוצר הגן הראשון מעכב את תוצר הגן השני שמעכב את תוצר הגן השלישי שמעכב את הראשון. כדי שהמערכת הזו תעצור את עצמה היא צריכה קודם להתבטא קצת. הזמן שלוקח לגן להתבטא כדי להתחיל לפעול ולעכב יוצר מחזוריות מסויימת.

<u>הערה:</u> תופעת הג'ט-לג בחזרה מחו"ל קשורה לזה.

©ענת עציון

:The circadian clock in Drosophila

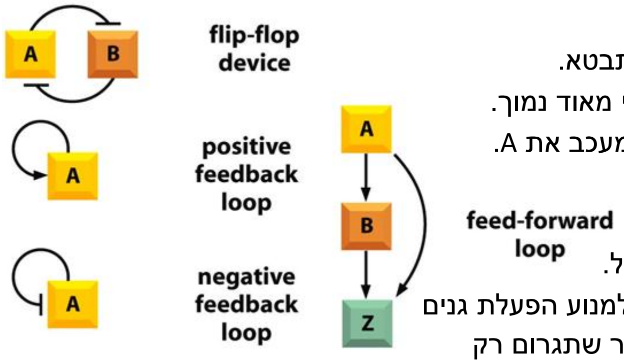
מערכת בדרוזופילה הרגישה לאור השמש.



<u>שני גנים:</u> Tim ו-Per אשר יוצרים את ה-mRNA שלהם שמתורגם בציטופלסמה. החלבונים של שני הגנים האלה יוצרים קומפלקס שאח"כ מתפרק והחלבונים נכנסים לגרעין לבקר את הביטוי של הגנים שלהם.
<u>אפקט האור:</u> עושה דגרדציה של החלבון Tim (ע"י מערכת פרוטיאוליטית שמופעלת ע"י אור), ויכול לגרום לבקרה על החלבון השני ע"י פוספורילציה. על המערכת הזו מתלבשים כל-הזמן סיגנלים חיצוניים המווסתים את כמות החלבונים הללו.

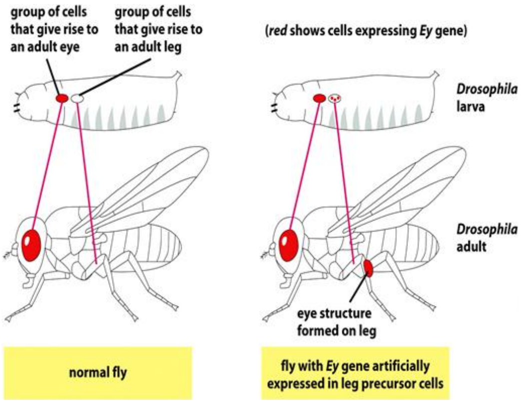
<u>למה היה חשוב לטבע לפתח מחזוריות התלוייה באור?</u>
כנראה שהיה יתרון אבולוציוני למי שהיה בו המנגנון הזה של מחזוריות, המווסתת ע"י גורם חיצוני- אור. יש פיגמנטים מסויימים בתאי צמחים וגם בתאים שלנו שמווסתים את המערכת הזו .

מוטיבים ברשתות שעתוק גנים:

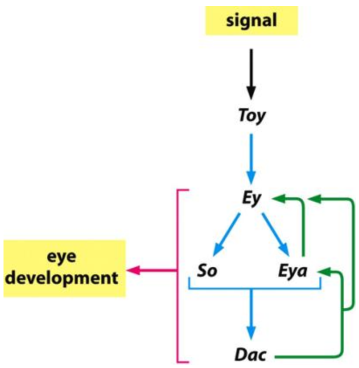


<u>Positive feedback:</u> הגן ימשיך תמיד להתבטא.
<u>Negative feedback:</u> כאשר צריכים ביטוי מאוד נמוך.
<u>Flip-flop device:</u> גן A מעכב את B וגן B מעכב את A.
מערכת פשוטה שתיתן מחזוריות.
<u>Feed-forward-loop:</u> A מפעיל את B, B מפעיל את Z אבל Z זקוק גם ל-A כדי לפעול.
זו מערכת שנועדה למנוע "רעש", כלומר: למנוע הפעלת גנים כשיש סיגנל חלש (הפעלה של A לזמן קצר שתגרום רק לייצור מועט של B). אם A מתבטא מספיק זמן אז A ו-B יפעלו בו-זמנית ויפעילו את Z.

התפתחות העין בזבוב:



העין בזבוב מחולקת לאזורים רבים. ניסוי הראה שאם לוקחים את האזור בלרווה שממנו תתפתח הרגל וגורמים באזור לביטוי החלבון: **Ey**, אשר שולט על התפתחות העין (למשל ע"י פרומוטור חזק). השינוי הזה מספיק כדי לגרום לכך שעל רגל הזבוב יתפתח איבר שלם- עין.



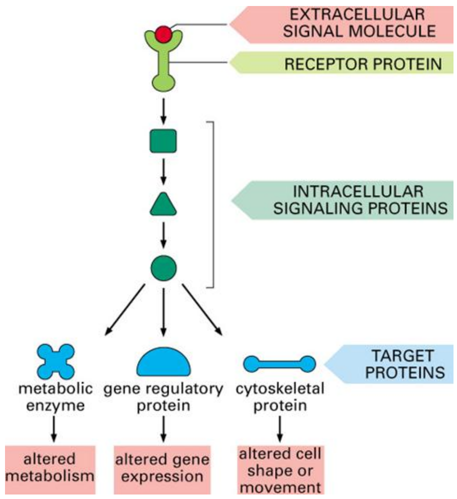
<u>המנגנון:</u>
יש סיגנל מסוים שנובע מההתפתחות בעובר, הוא מפעיל גן Toy שמפעיל את הגן Ey והוא מפעיל שני גנים אחרים שמפעילים עוד גן שלישי, ו-4 הגנים הללו הם כולם אקטיבטורים של הגנים שבונים את העין של הזבוב.

©ענת עציון

שפעול רצפטורים ע"י הורמונים:

ישנם רצפטורים בגרעין התא שגורמים להפעלת שעתוק. ההורמון נקשר לרצפטור אשר מעביר שרשרת של סיגנלים (שינויים בחלבונים שונים כמו- פוספורילציה, אצטילציה, פרוטיאוליזה וכו'). בסופו של דבר הסיגנלים מגיעים אל <u>חלבוני המטרה</u> אשר משנים את תפקוד התא. אחד מהם משנה את המבנה וצורת התא, אחד משנה את הביטוי הגנטי ואחד משנה את הפעילות האנזימטית.

הסיגנל החיצוני יכול להיות חומר שיוצר במקום אחר בגוף או משהו שנשמנו/אכלנו/הזרקנו וכו'.

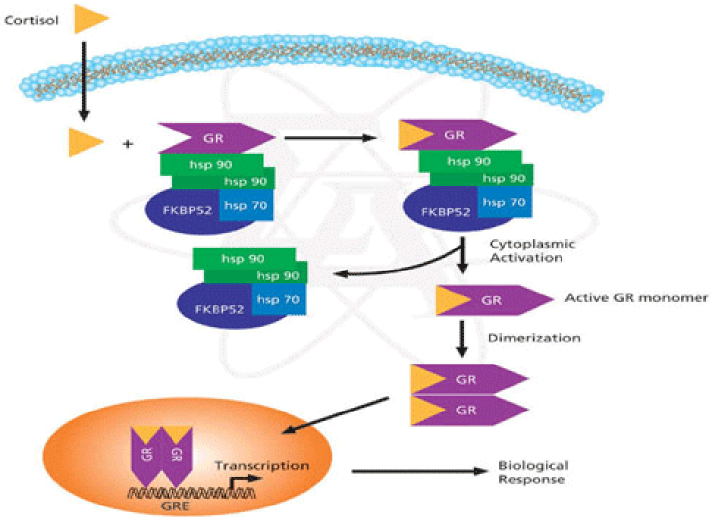


הורמונים סטרואידים:

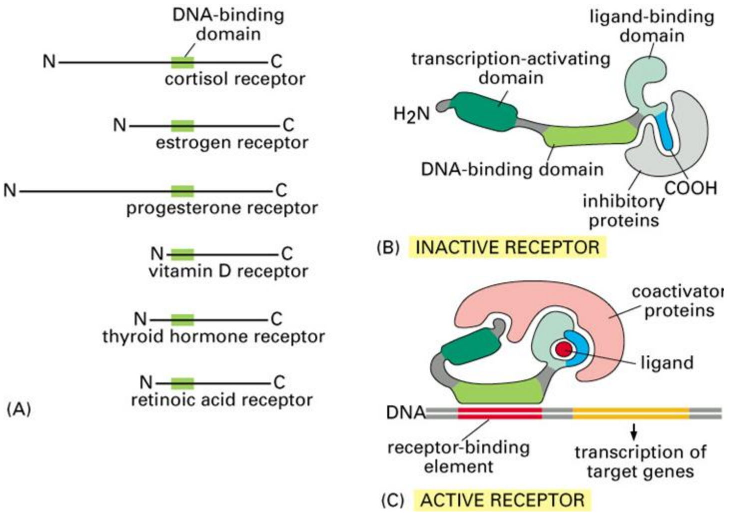
המשפחה הכי מוכרת של הורמונים.
המבנה שלהם די דומה.
<u>קורטיזול:</u> הורמון שנקשר ל-
Glucocorticoid receptor (GR) חלבון מסיס בתא, שמצוי בקומפלקס עם חלבונים אחרים. הקורטיזול הוא מסיס בתא, עובר את הממברנה בקלות ואז הוא נקשר ל-GR. ה-GR מתפרק מהקומפלקס (שבנוי בעיקר מצ'פרונים).

אקטיבציית הרצפטור בציטופלסמה:

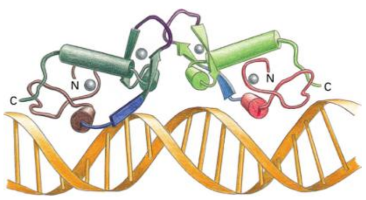
לאחר-מכן ה-GR יוצר דימר שנכנס לגרעין התא (כדימר הוא מוכר ע"י המערכת שמכניסה חלבונים לגרעין) ושם הוא מפעיל את ביטוי הגנים שבפרומוטור שלהם יש: Glucocorticoide Responsing Element (GRE).



הרצפטורים הללו הם superfamily, עיקרון פעולתם דומה, ולכולם יש DNA-binding domain שנקשר ל-receptor binding element בפרומוטור של גנים מסויימים.
כאשר נקשר הליגנד יש שינוי קונפורמציה, המעכב עוזב אותו ונקשר coactivator שמקפל את החלבון (הרצפטור) כך שה- DNA binding domain יהיה חשוף ויוכל להיקשר ל-DNA. וה- activation domain ביחד עם הקואקטיבטור נקשרים ל-mediator-קומפלקס ומפעילים את השעתוק.



<u>הערה:</u> גם הרצפטורים האלה הם Helix-turn-helix.

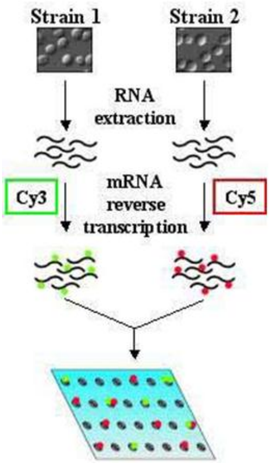


©ענת עציון

אנליזת ה-Microarray

אנליזה שנעשית ברמת ה-RNA והיא מתבססת על היברידיזציה. ע"י האנליזה ניתן להשוות את הגנים המתבטאים בסוג תא אחד לעומת סוג תא שני, ובעזרת שיטות ביואינפורמטיות ניתן לאפיין את קבוצות הגנים המתבטאות בכל סוג תא.

אנליזת ה-microarray:



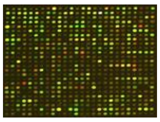
1. בוחרים את שני סוגי התאים ביניהם רוצים להשוות.
2. מפיקים mRNA משני סוגי התאים.
3. מייצרים ממנו cDNA ע"י רוורטרנסקריפטאז, וצובעים אותו בצבעים פלוריסנטיים (ה-cDNA מיוצר ע"י פריימר שמתאים לזנב ה-polyA).
4. עושים היברידיזצייה של ה-cDNA עם צ'יפ ובו הרבה באריות, כל אחת מכילה מספר עותקים רב של גן מסויים (שקשורים קוולנטית לצ'יפ).
5. מבצעים שטיפות למיסוך אינטראקציות לא ספציפיות.
6. סורקים את הצ'יפ באמצעות הארתו בלייזר.
7. אנליזה לתוצאות.

<u>הערה:</u> כשרוצים להשוות בין RNA משני סוגי תאים אז מוסיפים לכל תא נוקליאוטידים המסומנים בצבע שונה. את ה-cDNA משני התאים שמים על אותו צ'יפ ומאפשרים זמן לאינקובציה. ואז קוראים בנפרד צבע ירוק וצבע אדום. המחשב זוכר את שתי הקריאות ואז בסוף הוא מציג איחוד שלהן.

<u>שאלה מהתרגול:</u>

אתה חוקר את עובר הדרוזופילה ושלבי התפתחותו. ברצונך לבצע אנליזה גנומית ולאפיין את הגנים המשפיעים על התפתחות הכנף ולהשוותם לגנים המשפיעים על התפתחות הרגליים.

<u>הניסוי שיש לבצע:</u> הפקת mRNA מתאי כנף ו-mRNA מתאי רגל ← הפיכת ה-mRNA ל-cDNA ע"י רוורטרנסקריפטאז ← צביעת ה-cDNA: תאי כנף- ירוק (Cy3), תאי רגל-אדום (Cy5) ← היברידיזצייה ל-slide (צ'יפ) המכיל מקטעי גנום דרוזופילה ← סריקה באמצעות לייזר + אנליזה.



קיבלת את תוצאות ה-microarray שמתקבלות כתמונה צבעונית. מהי המשמעות של כל נקודה ב-array? מהי משמעות צבעה של נקודה זו?

<u>תשובה:</u> כל נקודה מייצגת גן שונה, כאשר צבעה של הנקודה יעיד על סוג התא בו גן זה הופיע ברמות גבוהות יותר (על-פי הסימון הפלוריסנטי): נקודה ירוקה- גן שרמות ביטויו היו גבוהות יותר בתאי הכנף ביחס לתאי הרגל (ולהפך לגבי הצבע האדום). ההבדל ברמת הביטוי מתבטא בעוצמה של הצבע בבארית בצ'יפ.

ניתן לחשב את רמת הביטוי של כל גן ע"פ היחס: $\log_2\frac{Cy5}{Cy3}$ יחס זה ניתן לכל גן ב-array.

<u>הערה:</u> בנוסף לרמת הביטוי, עוצמת הצבע מושפעת מ: תנאי ההיברידיזציה וכמות ה-cDNA.

$$\log_2\frac{Cy5}{Cy3}\ [Foot1]=(3.022)$$

$$\log_2\frac{Cy5}{Cy3}\ [Wing3]=(-2.28)$$

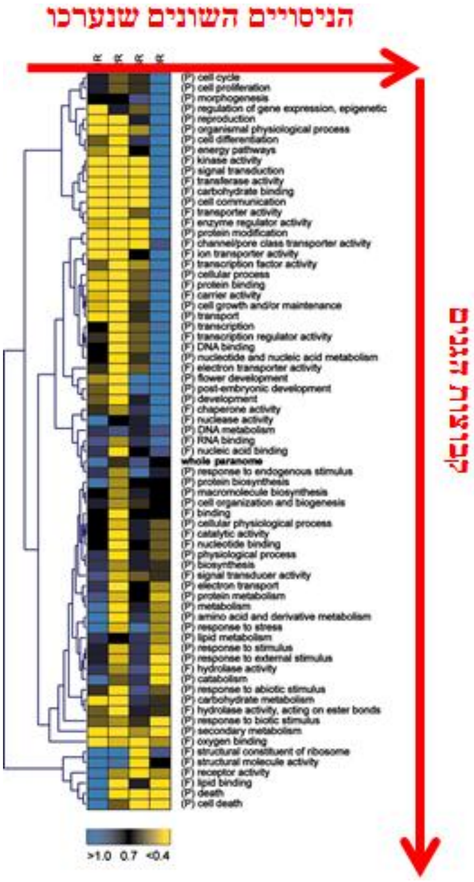
בחנת ערך זה עבור הגנים: Wing3 ו-Foot1. הערכים שהתקבלו:

<u>משמעות הערכים:</u> אם ערך הlog קטן מ-0, ערך Cy3 גדול מערך Cy5 ← הגן מתבטא יותר בתאי כנף ביחס לתאי רגל. אם ערך ה-log גדול מ-0, ערך Cy3 קטן מערך Cy5 ← הגן מתבטא יותר בתאי רגל ביחס לתאי כנף. אם ערך ה-log שווה כמעט ל-0 ← רמות הביטוי דומות.

©ענת עציון

<u>הערות:</u>

- נהוג לשים את התוצאות בגרף ולהעביר קו מגמה, הגנים שלא נמצאים על הקו הם גנים שהשתנו- עלו או ירדו.
- לא תמיד שמים מכל הגנים בדיוק את אותה הכמות של cDNA וצריך לנרמל את התוצאות בהתאם.
  - ניתן לבדוק את הגנים שהם: **housekeeping** שאמורים לבוא לידי ביטוי באותה רמה בשני התאים.
  - מוסיפים mRNA ממקור חיצוני (לא מהתאים הנבדקים) ואז משווים לרמת הקרינה שלו (שאמורה להיות זהה בשני התאים) ואם אין שוויון, מנרמלים את הערכים בהתאם.



לפי ערכי ה-log ניתן לקבל את דגם הביטוי של הגנים בתא מסוג 1 ביחס לתא מסוג 2 בניסויים שונים.

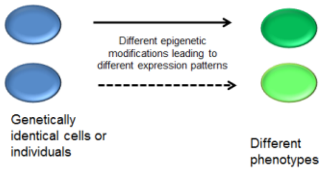
לתוצאות אלו ניתן לערוך אנליזה ביואינפורמטית, על-מנת למצוא גנים בעלי דגם ביטוי גנטי דומה, מה שיכול להעיד על תכונות משותפות של הגנים

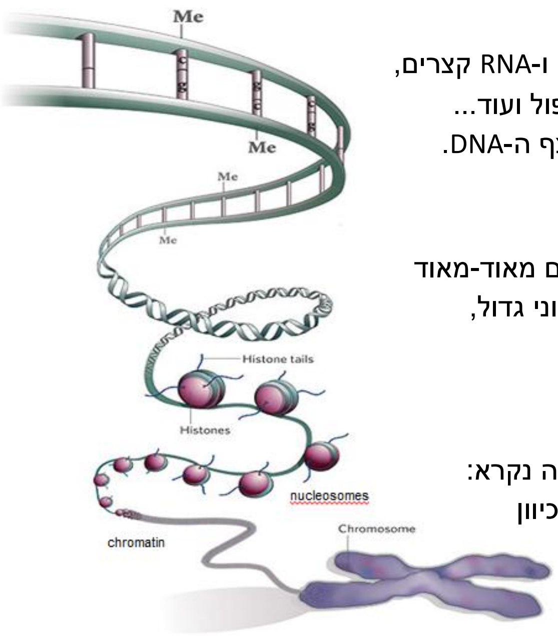
<u>משמעות המקרא:</u> רמת ביטוי הגנים השונים ביחס לממוצע של מספר הניסויים, איזה גן התבטא יותר בין איברים/ניסויים שונים.

<u>**Clustering:**</u> לוקחים גנום ממספר איברים שונים (ממספר microarray) ומסדרים אותם כך שכל שורה מייצגת גן אחר, וכל עמודה מייצגת microarray אחר. ישנם שני צבעים בגלל שלוקחים ממוצע על-פני כל הניסויים וצובעים לכל ניסוי צבע המסמן **כמה הגן התבטא ביחס לממוצע** (גבוה או נמוך מהממוצע).

©ענת עציון

החתמה גנומית (Imprinting)





אפיגנטיקה: גורמים המשפיעים על הביטוי הגנטי למרות שהם לא כתובים ברצף הגנום. יש שינויים בביטוי הגנטי שמתרחשים יותר מהר מאשר מתרחשת הסלקציה עקב מוטציות, והם מחזיקים מעמד אפילו כמה דורות. באפיגנטיקה אין כלל שינוי של ה-DNA אלא רק עיצוב ביטוים של גנים מסויימים.

דוגמאות: chromatin remodeling, מתילציה של DNA ו-RNA קצרים, מודיפיקציות להיסטונים, מיקום הנוקליאוזום, זמן השכפול ועוד...

המשמעות: "מעל הגנטיקה", מידע המקודד מעבר לרצף ה-DNA.

הבדלים אפיגנטיים בתאומים זהים:

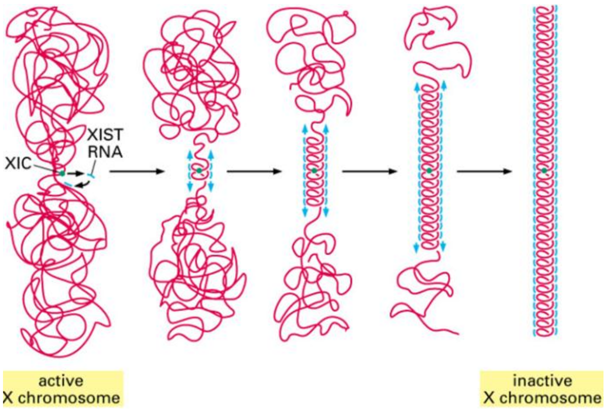
מחקרים הראו שתאומים זהים שנוצרו מאותה ביצית הם מאוד-מאוד דומים אבל בכל-זאת יש ביניהם שוני, לפעמים אפילו שוני גדול, למרות רצף ה-DNA הזהה של שניהם.

הטבעה גנטית- פרד:

פרד הוא זיווג של אתון וסוס או חמור וסוסה. בעברית זה נקרא: פרד אבל בשפות אחרות אלה שני בע"ח שונים. זאת מכיוון שהתברר שיש השפעה למאיזה זן הגיע האב ומאיזה זן הגיעה האם, בניגוד לגנטיקה הקלאסית.

אינקטיבציה של כרומוזום-X:

אצל אישה יש אריזה של כרומוזום X אחד בצורה חזקה כדי שלא יתבטא. זה לא קורה בביצית אלא בעובר שכבר מכיל כמה עשרות תאים, ולכן בבע"ח שנוצר יש פסיפס בין תאים המבטאים כרומוזום X אחד, לתאים המבטאים את הכרומוזום X השני.

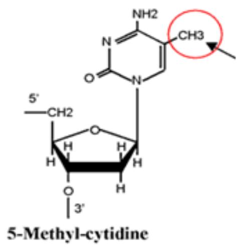


המנגנון: ליד הצנטרומר ישנו גן שהתוצר שלו הוא XIST RNA, הגן הזה מתבטא באחד הכרומוזומים, או זה שהגיע מהאמא או בזה שהגיע מהאבא, מתבטא בכמות גדולה, וה-RNA במנגנון שעד היום לא מובן לחלוטין, מתחיל לעטוף את ה-DNA של הכרומוזום. בסופו של דבר ה-DNA ארוז בצורה כזו שלא מאפשרת לו להתבטא.

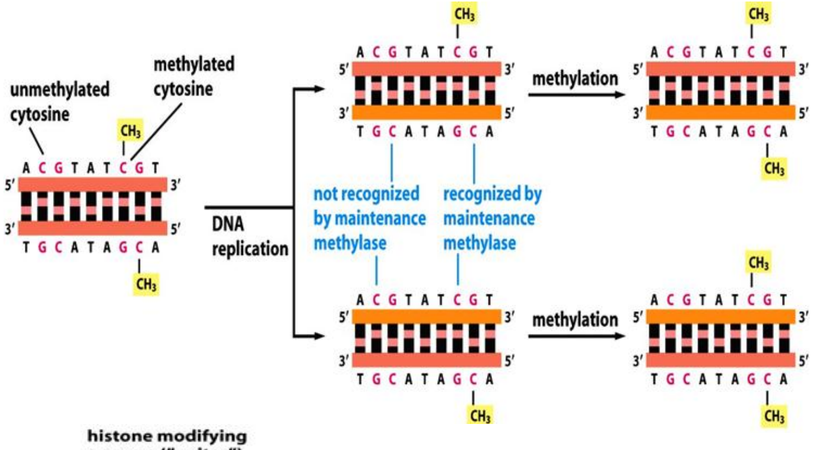
אם ישנם אללים שונים בין שני כרומוזומי X, יהיה שינוי בין תאים מסויימים. לפעמים יש אינטרסים שונים, למשל: האמא רוצה לחיות, ולכן לא רוצה שהעובר יהיה גדול מידי, והאבא רוצה שהעובר יהיה גדול יותר כי הוא רק רוצה להעביר את הגנים שלו הלאה. גם בגנטיקה יש תחרות ומאבק על הגנים, והגנים של מי יעברו הלאה.

©ענת עציון

מתילציה של DNA:

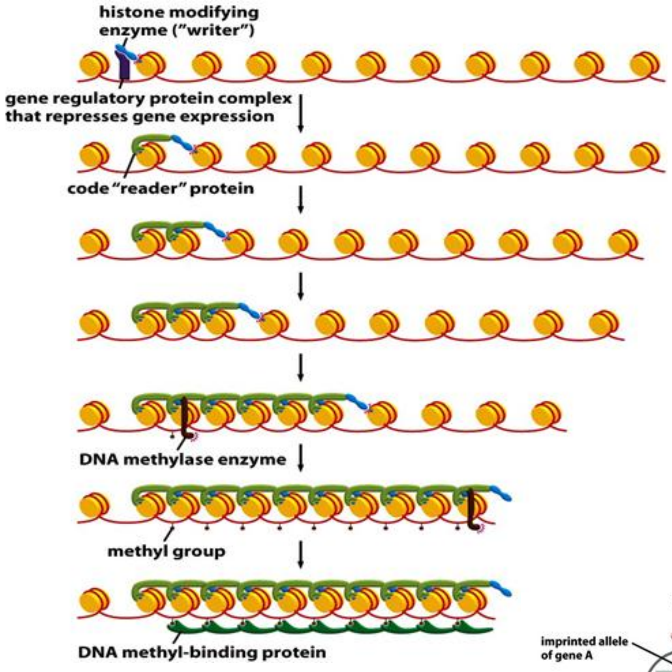


קבוצת מתיל זו אחת הקבוצות הכי קטנות מבחינה כימית, והיא משנה מהותית את ביטוי הגנים. המתילציה קורית על ציטוזין (C). את קבוצת המתיל מוסיף האנזים מתילאז (ישנם כמה כאלה) לציטוזינים מסויימים. למתילאז העיקרי: maintenance methylase, יש תכונה שכאשר ה-DNA משוכפל, נוצר מצב שבו גדיל אחד מכיל מתיל (הגדיל המקורי) והגדיל השני לא (הגדיל החדש), וכאשר האנזים רואה DNA שהוא hemi- methylated הוא ממתל גם את הגדיל השני. זה מאפשר שימור של דגם המתילציה בין חלוקות תאים.



מתילציה קורית כמעט תמיד על הרצף CG.

ישנו אנזים דה-מתילאז שמוריד קבוצות מתיל.



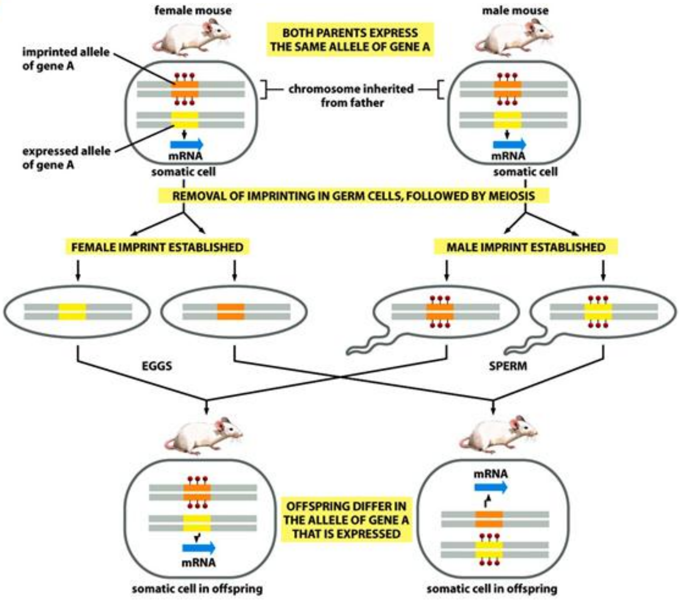
כמעט תמיד DNA ממותל הוא אזור סגור לשעתוק- "גן סגור". אפילו אם יש אקטיבטור באזור, אם אזור הפרומוטור הוא ממותל, הוא לא יעבור שעתוק. המתילציה עצמה היא נחבאת ב-DNA, היא לא "מספיקה" כדי לעכב את השעתוק.

תחילה נעשית מודיפיקציה להיסטונים. ההיסטונים מביאים את האנזים הממתל את ה-DNA. חלבונים שמזהים DNA ממותל נקשרים לאזור הזה ואז הוא נהיה "נעול". זה קורה כאשר ה-DNA ממותל באזור הפרומוטור.

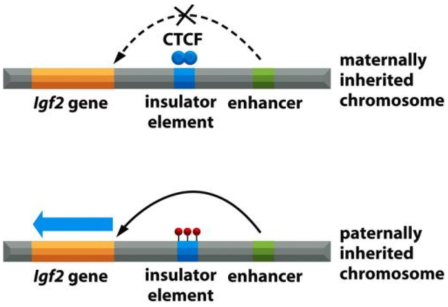
Genomic imprinting:

תהליך שבו האב והאם קובעים במהלך המיוזה, ולאחר-מכן בהפרייה, איזה מן האללים יהיה ממותל ואיזה מהם יתבטא.

בתהליך המיוזה נעשית הסרה של מתילציה שהייתה קיימת אצל ההורים ובתאי המין של הנקבה אין DNA ממותל, ולעומת-זאת בתאי המין של הזכר נעשית מתילציה של כל האללים. ואז נוצרים צאצאים וניתן לראות הבדל ביניהם כתלות באיזה אלל הגיע מאיזה הורה. ובדרך-כלל מי שממותל לא מתבטא.



©ענת עציון

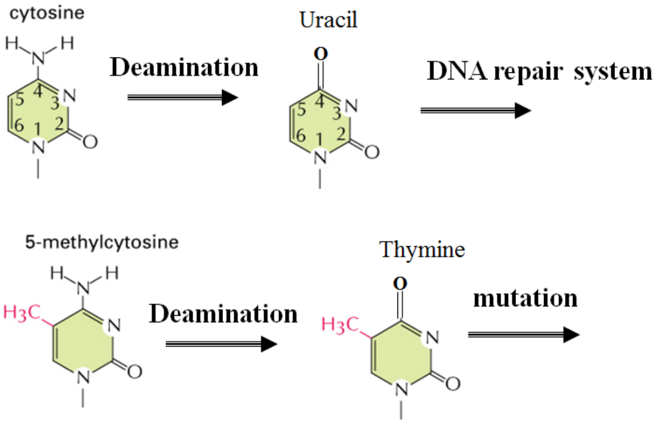


דוגמא נוספת ל-genomic imprinting:

הגן Igf2, מקודד לגורם גדילה שקובע את גודלו של העובר. בין ה-enhancer אל הגן יש insulator אשר אליו נקשר חלבון: CTCF. הוא לא יכול להיקשר אם הרצף של ה-Insulator ממותל, ואז הגן מתבטא יותר והעובר יותר גדול.

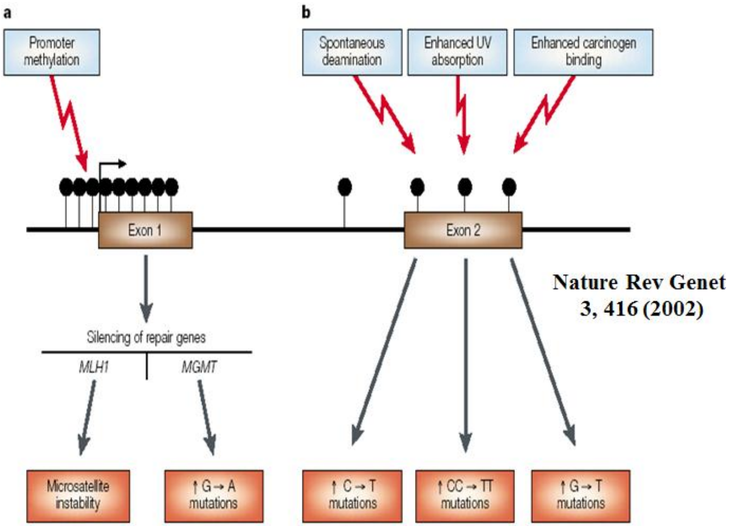
CG islands:

כאשר מסתכלים על הגנום מגלים שרוב ה-CG מרוכזים ב"איים" והם נמצאים באזורי הפרומוטורים. מדוע? האם כתוצאה מתהליך אבולוציוני שבו הם נוצרו רק באזורי הפרומוטורים או שלהפך- אלה שלא היו באזור הפרומוטור נעלמו במהלך האבולוציה. הרבה מה-CG שהיו בגנום נעלמו, ומקומות שבהם מוטציה תהיה יותר הרסנית נשארו שמורים- אזורי הפרומוטורים.



כאשר ציטוזין רגיל עובר מוטציה של דה-אמינציה, הוא הופך ל-U. DNA שיש בו U מתוקן ע"י מערכת תיקון- ומסולק. אבל כאשר מתיל-ציטוזין עובר דה-אמינציה הוא הופך ל-T. זה "מרמה" את מערכת התיקון, ואז נוצרת מוטציה והרצף משתנה. ולכן CG שה-C בהם היה ממותל, הפכו ל-T. ברוב המקומות בגנום מוטציות כאלה לא מפריעות (זו חלק מהאבולוציה), זה הפריע בעיקר בפרומוטורים וגרם לגן שלם לא להתבטא ולכך שהאורגניזם לא שרד. ולכן ה-CG מרוכזים בעיקר בפרומוטורים של הגנים, אותם אי-אפשר היה לסלק. ולכן זיהוי CG island זו אינדיקציה טובה לכך שיש שם פרומוטור. ישנם 18,000 אזורי CpG islands בגנום, והם נמצאים ב60% מהפרומוטורים. בדרך-כלל בפרומוטור הם לא ממותלים ובשאר הגנום הם כן ממותלים.

יש גנים שחייבים להתבטא בשביל שנהיה בריאים, ואם חוסמים את הביטוי שלהם יכולים לסבול מדברים לא נעימים, כמו סרטן. למשל: p53 שהוא tumor suppressor. אם ה-CG island של גן כזה עובר מתילציה, התא יהפוך לסרטני. מצד שני, חלק גדול מהגנום שלנו מורכב משרידים שונים של וירוסים ולמזלנו רובם ממותלים ולכן לא "משתוללים" בגנום. אם כתוצאה מהזדקנות/עישון מוסרת המתילציה מאזורים אלה, הם מתחילים "להשתולל"- יכולים לפגוע ב-tumor suppressors ולשים פרומוטורים חזקים לפני גנים שמעודדים גדילה וחלוקת תאים. המתילציה דרושה לשמירה על ה"שקט" של הגנום.



Nature Rev Genet 3, 416 (2002)

ציטוזין ממותל הוא רגיש יותר, הוא בולע באורך גל שיותר קרוב לאור השמש מאשר ציטוזין רגיל. כלומר: הקרינה נבלעת ביעילות גדולה יותר ואז היא הופכת CC לדימרים של TT, וזה יכול לגרום לסרטן העור.
ציטוזין ממותל גם מושפע יותר מרעלים שבזפת או בסיגריות המביאים למוטציה מ-C ל-T.

©ענת עציון

השפעת אפיגנטיקה במשך שני דורות:

מחקר שנעשה בצפון סקנדינביה, אזור צפוני שקשה לחיות בו וחודשים רבים בשנה מאוד קר שם אבל היה בו רישום מדוקדק על מצבם הרפואי של אנשים באוכלוסיה מאוד-מאוד מנותקת ומבודדת. ונעשה מעקב מדוייק אחרי 6000 האנשים שחיים באזור הזה.

בערך בשנת 1850 האזור היה מאוד מנותק, והיו תופעות אקלים שפגעו בתפוחי-האדמה, וזה גרם לתושבים לסבול מרעב. במחקר מצאו שבתקופות בהן היה יותר מזון, הילדים היו יותר שמנים, ועל-פני 3 דורות, הנכדים של הילדים שסבלו חרפת רעב, חיים בממוצע יותר שנים מאשר אלה שהסבים שלהם היו שמנים. עדיין לא יודעים אם זה קשור למתילציה.

השפעת מזון על פנוטיפ שונה:

בדבורים, הלרווה שהוחלט שתהיה המלכה מקבלת מזון מיוחד "מזון מלכות" שגורם לשינוי גנטי. המלכה היא גדולה יותר, היא בקושי זזה, היא לא רואה אור יום ותפקידה הוא רק להעמיד צאצאים. לעומת-זאת הפועלות מזמזמות, יוצאות החוצה, המוח שלהן הרבה יותר פעיל מאשר המלכה. ברור שזוהי אפיגנטיקה, אבל במחקר בדקו האם מדובר במתילציה ברמה גנומית.

במחקר בודדו הרבה מוחות של דבורים, פועלות, מלכות וזכרים. והסתכלו על רמת המתילציה.

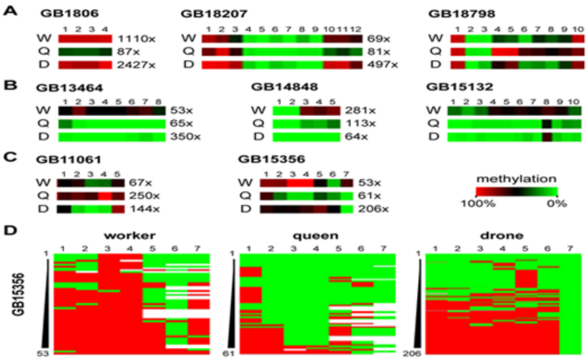
ירוק= 0% מתילציה.

אדום=100% מתילציה.

יש הבדלים גדולים בדגם המתילציה.

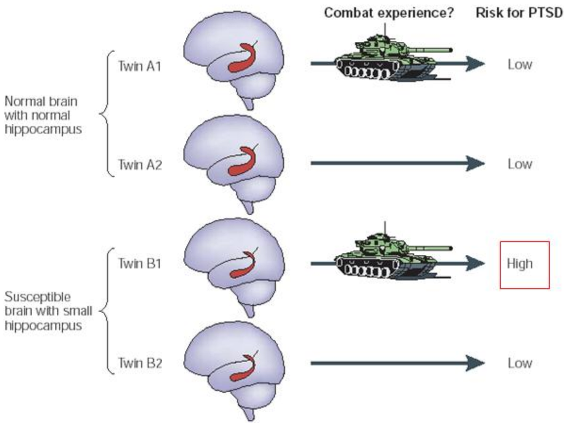
האם זה מה שמושפע ע"י מזון המלכות?

זה כרגע נמצא במחקר...



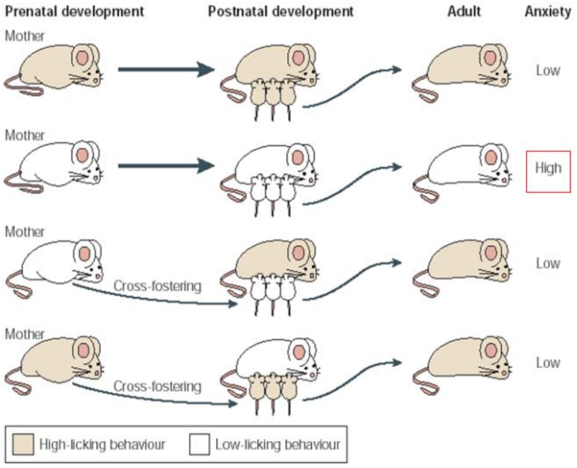
הקשר בין חרדה ואפיגנטיקה:

נעשו מחקרים על תאומים זהים (שיש להם אותו גנום) שהופרדו בילדות. במחקר שנעשה בעקבות מלחמת ויאטנם הראו שיש קורלציה בין עמידות להלם קרב (סוג של חרדה) לבין גודל בלוטת ההיפוקמפוס. כאשר תאומים זהים, שאחד מהם נחשף לאירוע טראומתי, ויש להם בלוטה גדולה יחסית- שניהם לא סבלו אחר-מכך מהלם קרב. לעומת-זאת, בתאומים שאחד מהם חווה מצב של הלם קרב והבלוטה שלהם קטנה יחסית, אז נוצרה אצלו רגישות גדולה יותר לטראומה.



תופעת licking & grooming:

תופעה של יונקים ומכרסמים שכאשר נולדים הצאצאים, האמא אוספת אותם אליה ומלקקת אותם, ויש אמהות שפחות עושות את זה. נעשה ניסוי על עכברים- יש עכברות (חום) שהצאצאים שלהן עמידים יותר לחרדה, ויש כאלה שפחות עמידים לחרדה. אם לוקחים צאצאים שרגישים לחרדה (לבנים) אל אמא שמלקקת יותר הם נעשים עמידים לחרדה. לעומת-זאת, אם לוקחים צאצאים עמידים לחרדה אל אמא שלא מלקקת מספיק, הם נשארים עמידים. זו תכונה אפיגנטית נרכשה שעוברת לפחות 2 דורות קדימה.

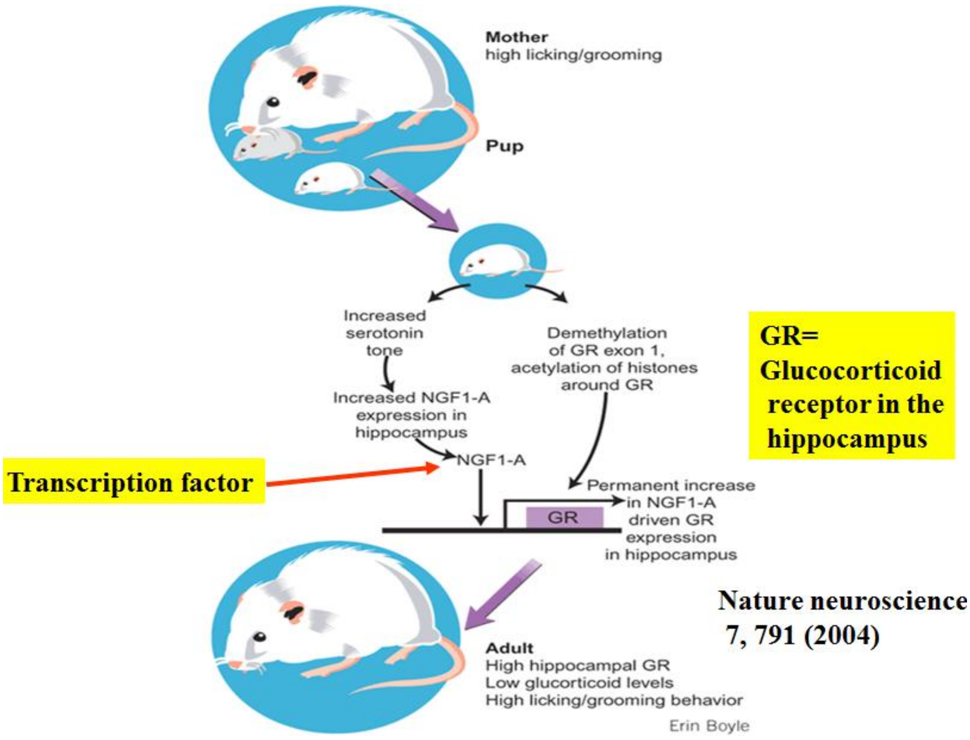


©ענת עציון

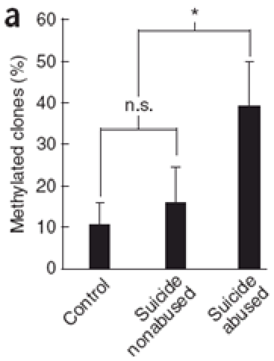
<u>הערה:</u> אם נשליך בין הלם קרב של אנשים לחרדה של עכברים, אז עכברים שעמידים לחרדה, ההיפקמפוס שלהם גדול יותר.

<u>התנהגות ה-licking גורמת לשני תהליכים עיקריים:</u>

1. דה-מתילציה של הגלוקוקורטיקואיד-רצפטור, וזה גורם לביטוי יתר שלו.
2. יצירת הורמון סרוטונין, שהוא אקטיבטור שמגביר את הביטוי של בלוטת הגלוקוקורטיקואיד במוח.



<u>מחקר שנעשה באנשים:</u> בדקו 25 אנשים שהתאבדו, ובילדותם עברו טראומה רצינית (כמו אמא שלא עושה licking & grooming) לעומת קבוצת ביקורת של 25 אנשים שהתאבדו מבלי שעברו טראומה בילדות. הם בדקו כמה mRNA התבטא מאותו חלבון של הגלוקוקורטיקואיד, ומצאו שבאופן מובהק בקבוצה שעברה טראומה הביטוי של ה-mRNA היה יותר נמוך. כלומר: זהו לא אפקט ההתאבדות אלא כתוצאה מהטראומה שהם עברו בילדות. הם בדקו גם הבדלים במתילציה של אקסון מסויים, וראו הבדלים מובהקים.



<u>שאלות ממבחן:</u>

שכיחות רצפי C_pG בגנים גבוהה מהמצופה לפי חישובים סטטיסטיים לעומת כלל הגנום כי:

א. רצפי C_pG בכלל הגנום עוד לא הספיקו להתפשט בגנים בדרך של שחלוף אלטרנטיבי.

ב. במהלך האבולוציה מוטציות "מחקו" את רצפי ה-C_pG באיזורי הגנים.

ג. רצפי C_pG הם אלו העוברים מתילציות.

ד. אף תשובה מ-א' עד ג' אינה נכונה.

א. לא נכונה.

ב. לא נכונה כי זה בדיוק להפך- הרצפים נשארו רק באזורי הגנים.

ג. נכונה אבל לא רלוונטי לשאלה.

בקרת שעתוק על ידי הרצפטורים הגלוקוקורטיקואידים:

<u>א.</u> קישור ההורמון לרצפטור מאפשר את כניסתו לגרעין התא.

ב. הרצפטור משפעל שעתוק על ידי שינוי פעולתו של RNA Pol II , אך אינו משפיע על מבנה הכרומטין.

ג. הגלוקוקורטיקואידים הודרים לתא על ידי רצפטורים ממברנליים הנמצאים בממברנות התא המגיב להורמונים.

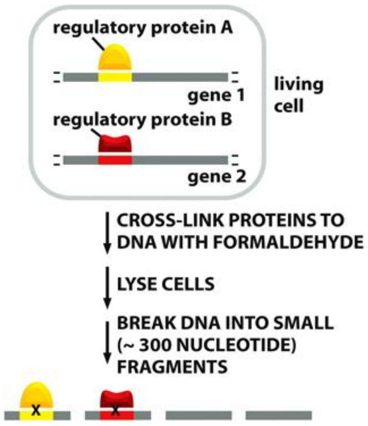
ד. לרצפטור שתי אצבעות אבץ (Zinc finger), אחת לקישור DNA ואחת לקישור RNA.

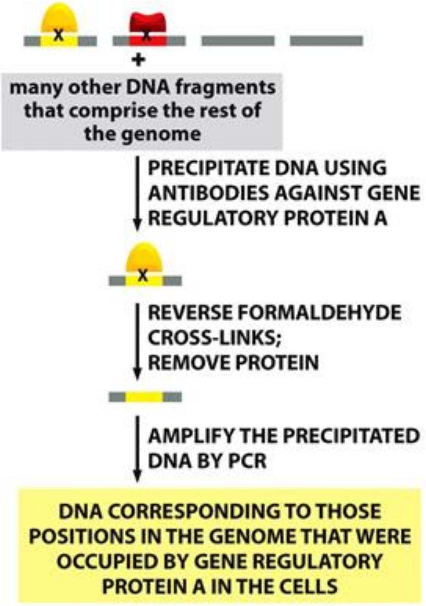
©ענת עציון

ChIP on Chip

ChIP: Chromatin Immunoprecipitation.

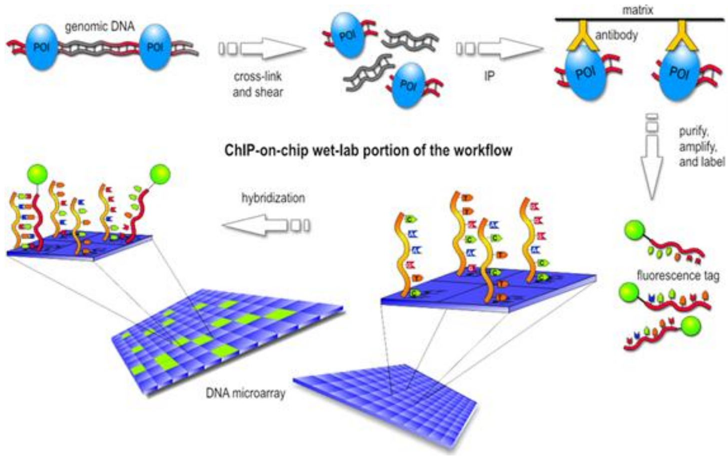
השיטה משמשת למציאת אתרי קשירה על חלבון מסויים.
לפעמים ניתן לזהות את אתר הקשירה ברגע נתון (למשל, רק בטמפרטורה מסויימת). התנאים בהם עושים את ה-freeze ישפיעו על סוגי החלבונים הנקשרים.
קושרים את החלבונים לתאים, מפוצצים את התאים ושוברים את ה-DNA לפרגמנטים קצרים.





לחלק מהפרגמנטים יהיו קשורים חלבונים ולחלק לא.
משתמשים בנוגדן לחלבון ספציפי (בתמונה- הצהוב).
מפרידים את החלבון מה-DNA ונשארים עם הרצף אליו הוא נקשר.
עושים הגברה של הרצף עם PCR.

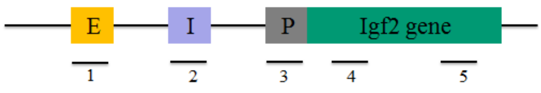
<u>ביקורת לניסוי:</u> בודקים מה קורה ללא הנוגדן (בלאנק), אם משהו שקע ללא הנוגדן, יש להתעלם ממנו בניסוי (רעש רקע).



איפה שנראה סיגנל על הצ'יפ: האזורים של אתרי הקשירה של החלבון.
הצ'יפ מכיל רצפים בעלי רצף ידוע והיברידיזציה לרצפים מה-PCR תהיה אינדיקציה לאתרי הקשירה.
<u>הערה:</u> בדרך זו אפשר למפות אתרי קשירה של רפרסורים, אקטיבטורים, אזורי פרומוטורים, אינסולטורים וכו' בגנים השונים.

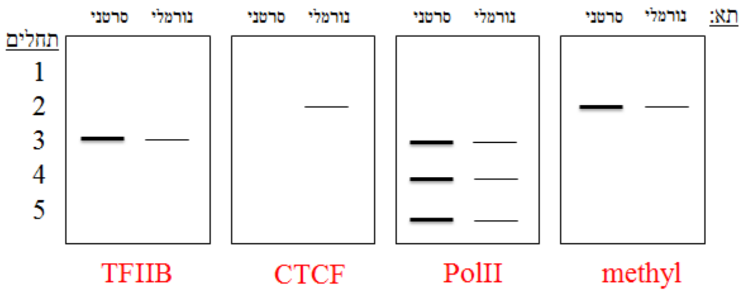
<u>שאלה מהתרגול:</u>

התחלתם לעבוד במעבדה בה חוקרים את מנגנוני ההפעלה וההשתקה של פקטור הגדילה Igf2 (Insulin-like growth factor 2). כידוע, האלל המגיע מהאבא פעיל וממנו משועתק פקטור הגדילה.
האלל המגיע מהאמא מושתק בעקבות הסרת המתילציה באזור האינסולטור וקישור של CTCF.
כשלב ראשוני בפרוייקט אתם מעוניינים לבדוק את מידת המתילציה של הגן בתאים נורמלים ובתאי סרטן המעי ולבדוק האם אכן יש קשר בין ביטוי מוגבר של Igf2 לסרטן. החלטתם לבדוק זאת בשיטת ה-ChIP, לשם כך השתמשתם בנוגדנים כנגד: קבוצת המתיל, CTCF, RNA pol II, ו-TFIIB והגברתם את המקטעים הממוספרים באיור.
<u>הערה:</u> נוגדן ל-CTCF זו ביקורת הפוכה לנוגדן למתיל, כי CTCF נקשר רק ללא מתילציה.



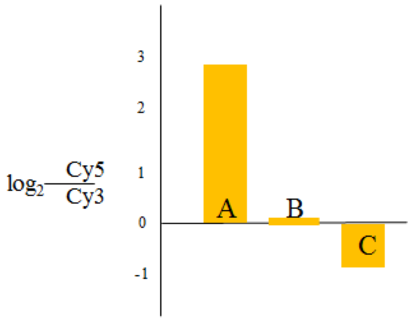
E- enhancer; I- insulator; P- promoter

©ענת עציון



תוצאות הניסוי:

- לאזור הפרומוטור נקשרים: פקטור שעתוק ו-RNA pol II, הפקטור הוא TFIIB, כי את האנזים נצפה לראות גם באזורים 4 ו-5. בתא סרטני יש ביטוי מוגבר של TFIIB.
- CTCF נקשר כאשר אין מתילציה, באלל מהאמא אין מתילציה ולכן הוא נקשר.
- מתילציה- בתאים נורמלים האלל האבהי ממותל ובתא הסרטני שני האללים ממותלים.



בשלב השני עניין אותכם לחקור את מידת המתילציה בתאים נורמליים ובתאי סרטן גם בגנים נוספים. לשם כך השתמשתם בשיטת ChIP on Chip עם נוגדן כנגד קבוצת המתיל. לאחר סימון הדוגמא הנורמלית בירוק (cy3) והדוגמא הסרטנית באדום (cy5) הן הועלו על CpG microarray- רצפים מוכרים של CpG islands שהם אזורי הפרומוטורים של הגנים.

A- ממותל בעיקר ב-cy5 ולכן לא פעיל בתאים סרטניים. סביר להניח שזהו tumor suppressor.

B- אין הבדל, רמת המתילציה לא השתנה בתאים סרטניים.

C- ממותל יותר ב-cy3, הגן הזה מוגבר בתאים סרטניים וכנראה שהוא מעודד גדילת תאים.

©ענת עציון

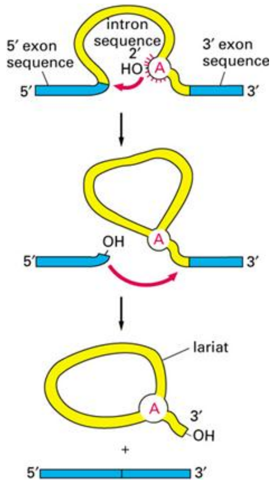
Alternative Splicing

הגנים האאוקריוטים בנויים מאלמנטים שנשארים בתעתיק הסופי- האקסונים, והם "מופרעים" ע"י האינטרונים שאינם נשארים. האינטרון גדול יותר מפי-10 בממוצע מהאקסון.
מדוע ישנו תהליך שהוא גם יקר אנרגטית, וגם דורש דיוק שכל פגיעה בו תפגע בתהליך הסופי?
<u>תשובה:</u> זה מאפשר מגוון של תוצרים. האינטרונים הם האזורים הלא שמורים, הם מאפשרים "משחק" מבלי לסכן את היצור החי. ההסבר העיקרי: הם מאפשרים לקבל מספר קומבינציות של אקסונים מתוך תעתיק אחד, שיחוברו באותו סדר שבו הם מופיעים ב-pre-mRNA.
<u>הגן DSCAM:</u> גן מפורסם מאוד בדרוזופילה. לגן יש 115 אקסונים שמתוכם 95 הם אקסונים אלטרנטיביים. תיאורטית ניתן לקבל 38,000 תעתיקים (פי 2.5 ממספר הגנים בדרוזופילה).

מספר הגנים בגנום שמסוגלים לעבור את התהליך הולך ועולה ככל שהיצור יותר מפותח. אבל אין **קורלציה פשוטה** בין מורכבות היצור ל-% הגנים שעוברים את התהליך.

	alternative genes
Human :	- 70-95%
Worm:	~20%
Baker's Yeast:	~0(2 genes)

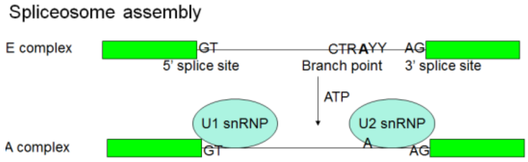
תהליך ה-Alternative splicing:



בתהליך ה-splicing האינטרון הוא במרכז התהליך.
ישנו A שמור ב-branch point שמתקיף את הקצה ה-5' ונוצרת לולאה שנקראת: Lariat, ולאחר חיתוך נוסף הלולאה שהיא האינטרון יוצאת, ושני האקסונים מתחברים ביניהם.

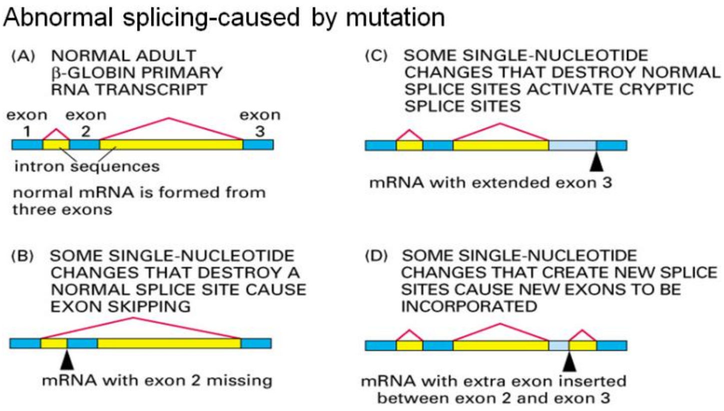
<u>אלמנטים קריטיים לתהליך:</u>

- <u>5' splice site:</u> רצף שמור (בכל יצור השמירות שלו קצת שונה), באדם ובקופים הוא שמור כ: GU. זהו רצף בתוך האינטרון.
- <u>3' splice site:</u> באדם ובקופים הוא שמור כ: AG.
- <u>Branch point:</u> A במרחק מסויים מהקצה ה-3'. אמנם סביבו יש רצף שמור אבל גם אם ישנה מוטציה שפגעה ב-A המקורי, ניתן לבצע את התהליך עם A אחר במרחק קצר ממנו.



זהו ה-E complex. זה צריך להיות מזוהה ע"י U1, U2 snRNPs, וההכרות הראשונית עם קצות האינטרון תקבע אם יהיה splicing או לא. ההכרות הזאת היא חזקה ויש מערכות בהן זה מספיק כדי לקבל splicing.

<u>מה קורה במצב שאינו תקין:</u>



C: מוטציה ב-3' splice site ואז המערכת תזהה אתר אחר upstream לאתר המקורי- בתוך האינטרון, ולכן רק חלק מהאינטרון יצא החוצה.

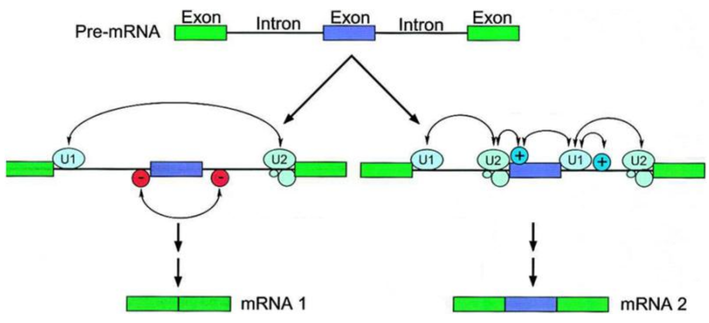
B: מוטציה ב-3' splice site שגרמה למנגנון ה-splicing לדלג עד לאתר ה-3' splice site הבא ולהוריד את כל המקטע כאינטרון, מה שגורם לאובדן אקסון.

D: נוצר splice site 5' חזק באמצע האינטרון כתוצאה ממוטציה, וזה גרם לזיהוי 3' splice site משמאל לו בתוך האינטרון. והאינטרון נחתך לשניים ונוצר אקסון חדש.

©ענת עציון

סוגים שונים של Alternative splicing:

Cassette exon



Cassette exon: האקסון האמצעי לפעמים נכנס לתעתיק הסופי ולפעמים לא והשניים שבצדדים תמיד ייכנסו (קונסטיטוטיביים).

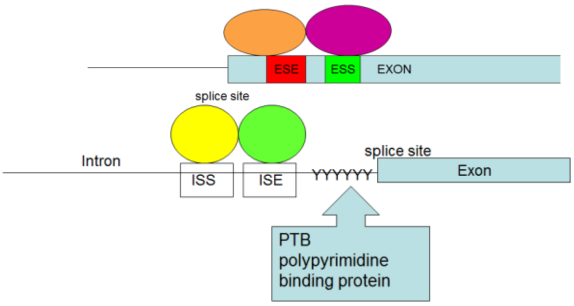
זה נעשה ע"י בקרה של חלבונים החוסמים את אתרי ה-splicing האמצעיים ואז המערכת לא תזהה את אתרי ה-splicing ותחתוך את שני האינטרונים ביחד עם האקסון.

Splicing factors:

חלבוני SR: עשירים בסרין וארגינין, בדרך-כלל מהווים בקרה חיובית.

חלבוני hnRNP: יש לחלבונים אלה גם תפקידים אחרים שלא קשורים ל-splicing, בדרך כלל מהווים בקרה שלילית.

אופן פעולת פקטור הבקרה אינו תלוי רק בחלבון עצמו אלא גם באלמנט אליו הוא נקשר.



ESE (Exon Splicing Enhancer): בקרה חיובית על האקסון.

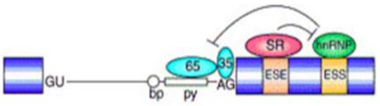
ESS (Exon Splicing Silencer): בקרה שלילית על האקסון.

ISE (Intron Splicing Enhancer): בקרה חיובית על האינטרון.

ISS (Intron Splicing Silencer): בקרה שלילית על האינטרון.

הערה: תהליך שחבור אלטרנטיבי מבוקר ברמת הרקמה.

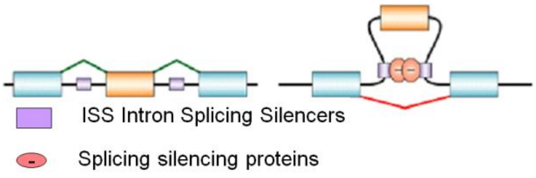
בקרה חיובית:



- הפקטור נקשר ל-ESE, והקישור מושך בצורה פיזית את ה-U1 וה-U2.
- SR נקשר ל-ESE ובכך מעכב קשירת hnRNP, מסתיר פיזית את אתר הקישור של המעכב.

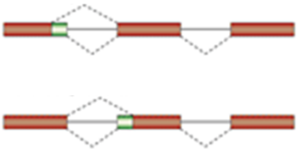
בקרה שלילית:

- הפקטור נקשר ל-ISE ומפריע פיזית לקשירת חלבוני מערכת ה-splicing.
- הסתרה של האקסון ממערכת ה-splicing ע"י יצירה של לולאות בתעתיק. ישנם אלמנטים של ISS שהם די מרוחקים מקצוות האקסון, אלמנטים אלה קושרים חלבוני בקרה שליליים שעוברים אינטראקציה ביניהם וזה יוצר את הלולאה שבתוכה האקסון. ואז האקסון יוצא מהתעתיק ביחד עם שני האינטרונים.



הערה: יצירת הלולאה תלוייה בריכוז החלבונים הללו בתא.

ישנה תחרות של אפיניות בין סוגי הפקטורים שמשפיעה האם האקסון ייכנס לתעתיק או לא.

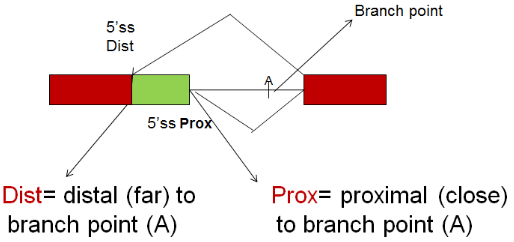


Alternative 5' splice site

Alternative 3' splice site

Alternative 3'/5' splice site: יש בחירה בין שני אתרים, אחד מהם בתוך האקסון הקודם או האינטרון.

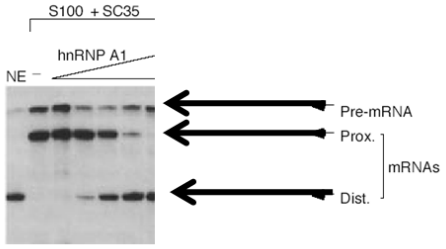
©ענת עציון



<u>האתר הפרוקסימלי:</u> קרוב יותר ל-branch point.

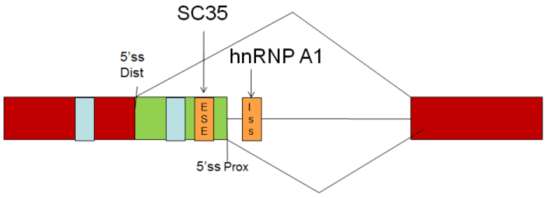
<u>האתר הדיסטאלי:</u> רחוק יותר מה-branch point.

<u>בדיקת התהליך:</u>



הכניסו SC35 שהוא SR protein, והתחילו להוסיף hnRNP A1 בריכוזים עולים.

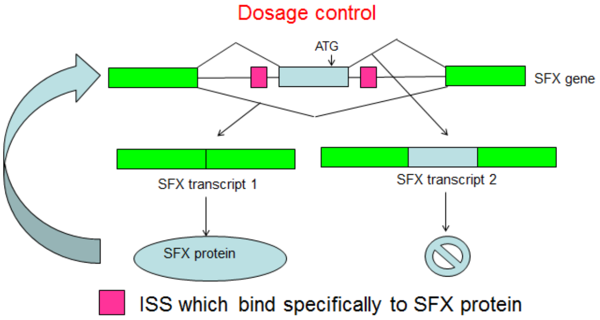
<u>תוצאה:</u> ככל שיש יותר מהמעכב, יש יותר חיתוכים ב-5' הדיסטאלי.



<u>פתרון אפשרי:</u> ישנו ESE שמזהה באופן ספציפי את SC35 והוא נקשר אליו ומביא איתו את חלבוני מערכת ה-splicing. וישנו אתר ISS אליו נקשר A1 hnRNP שגורם לדחייה פיזית של ה-SC35 מלהיקשר לאתר ה-ESE.

<u>תוצר חלבוני:</u>

- פעמים רבות הכנסה של אקסון או הוצאה של אקסון תגרום להכנסה או הוצאה של דומיין מהתוצר החלבוני, והחלבונים יכולים להיות אנטגוניסטים, והם בדרך-כלל מעורבים באותו תהליך ביולוגי.
- במקרה אחר, הכנסת חומצה אמינית אחת יכולה לגרום להבדל בין שני חלבונים מבחינת אפיניות הקשירה שלהם.
- ייתכן מצב שבו כתוצאה מכניסת אקסון, נכנס stop codon, וזה יביא לתעתיק קצר הרבה יותר. ובדרך-כלל החלבון לא ייווצר בכלל (יילך לדגרדציה) או ייווצר באופן לא תקין ולא פעיל.



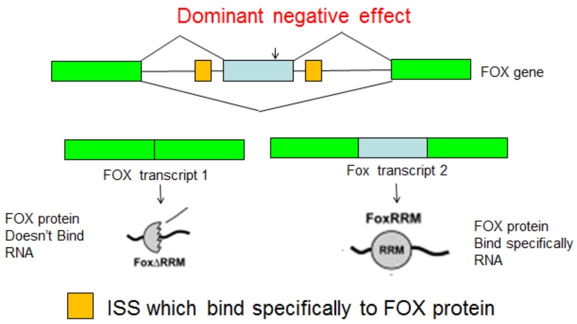
<u>**אוטורגולציה:**</u> פקטור שחבור שמבקר את הגן של עצמו. התופעה קיימת גם בפקטורי שעתוק אבל בעיקר בפקטורי שחבור.

<u>**דוגמא:**</u> חלבון SFX יוצר בקרה חיובית לגן של עצמו, ומוריד את הרמה של אפשרות ה-splicing השנייה שמביאה לתעתיק לא פונקציונאלי.

<u>הערה:</u> אוטורגולציה יוצרת קיצוניות והבדלים גדולים יותר בין רקמות שונות.

לפעמים אוטורגולציה גם מקטינה בצורה מבוקרת את רמת החלבון הפעיל.

<u>:Dominant negative effect</u>



<u>**דוגמא:**</u> FOX, הוא פקטור שחבור מאוד ספציפי לרקמות מסויימות (בעיקר לשריר ולמוח). ניתן לקבל מ-splicing שונה שני חלבונים פונקציונאליים בעלי פונקציה אנטגוניסטית:

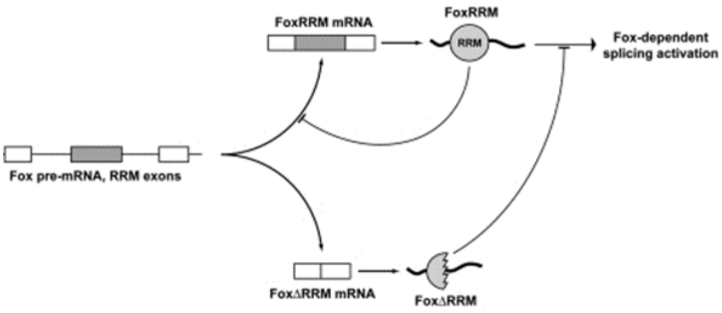
1. FOX שנקשר ספציפית, מכיל בתוכו מוטיב RNA Recognition Motif (RRM).
2. FOX שלא יכול לקשור RNA כי הוא לא מכיל את המוטיב.

©ענת עציון

FOXRMM מעכב את תהליך ה-splicing שמביא ליצירתו, ולכן נוצר יותר מהסוג השני.

FOXΔRMM מעכב את פעילות החלבון כקושר RNA ע"י קשירה אל החלבון הפעיל ומעכב את קשירתו ל-RNA.

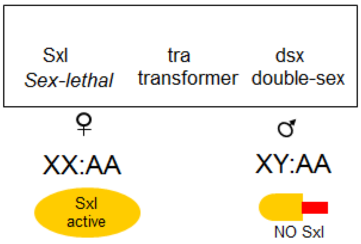
⇐ שתי הבקרות פועלות במטרה להוריד את רמת החלבון הפעיל, מדוע יש בקרה חזקה על הירידה בפעילות? לא יודעים עדיין...



קביעת המין בדרוזופילה:

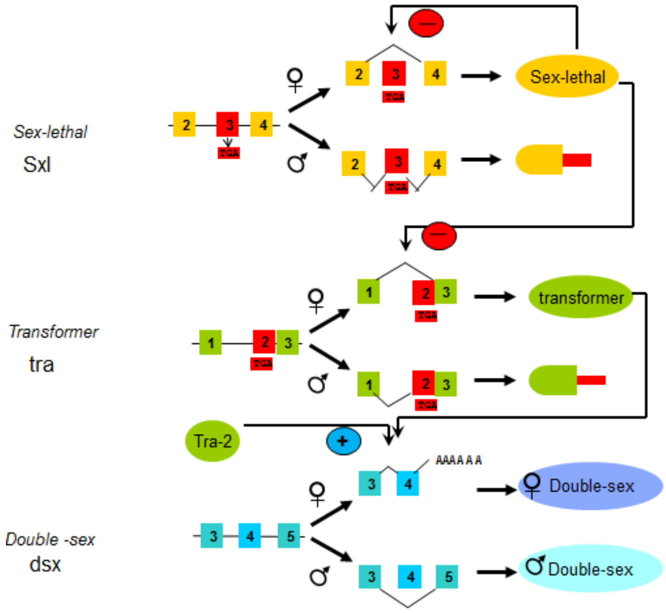
המין בדרוזופילה נקבע ע"י 3 פקטורים שחבור שמבקרים את עצמם באוטורגולציה וגם מבקרים אחד את השני.

המין נקבע לפי היחס בין כרומוזומי X לכרומוזומים האוטוזומליים.



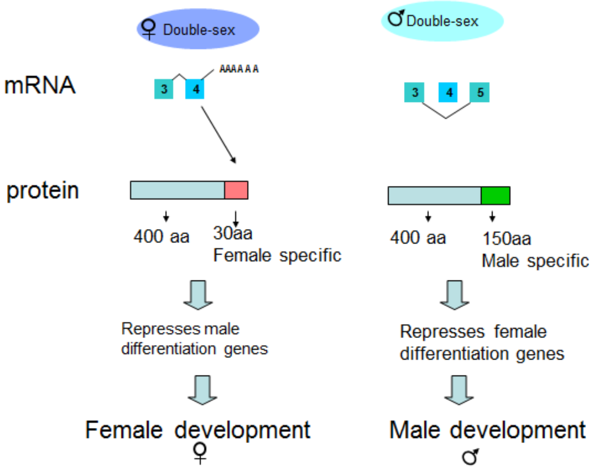
התהליך:

1. Sxl נקשר ל-splicing enhancer המצויים סביב אקסון-3 שמכיל stop codon. בנקבה יש רמה מסויימת של Sxl והוא משתיק שחבור וגורם לאקסון 3 לא להיכנס לתעתיק וכך נוצר חלבון Sxl פעיל. בזכר אין Sxl ולכן התעתיק מכיל את אקסון 3 ונוצר חלבון Sxl לא פעיל.
2. Sxl בנוסף לבקרה העצמית מבקר גם את tra. הוא משתיק את אתר השחבור ב-tra ואז מתקבל tra פעיל שלא מכיל את אקסון 2. בזכר אין tra פעיל.
3. בנקבה tra וחלבון נוסף: tra2 עושים ביחד בקרה חיובית על splicing של החלבון dsx שגורמת לאקסון 4 להיכנס לתעתיק. בזכר נוצר חלבון ללא אקסון 4. שני התוצרים הללו הם פעילים.



באקסון-4 יש סיגנל חזק לפוליאדנילציה ולכן התעתיק מסתיים באקסון-4 באתר הפוליאדנילציה, שהוא קצר יותר. בזכר לא קיים אקסון 4 ולכן ישנם רק אזורים 3 ו-5.

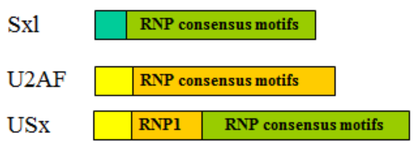
הגן בנקבה מדכא גנים לדיפרנציאציה של זכר והחלבון בזכר להפך.

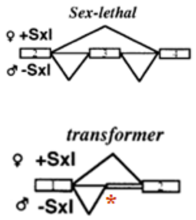


©ענת עציון

<u>שאלה מהתרגול:</u>

אתם מעוניינים לחקור את מנגנוני השחבור בהתפתחות המין של זבוב הדרוזופילה. מאמר שהתפרסם הציג תוצאות של ניסויי שחבור אלטרנטיבי במערכת in vitro על ה-pre-mRNA של הגן tra. מאמר זה הראה כי כאשר האזורים הקושרים RNA בחלבון Sxl אוחו עם החצי ה N-טרמינאלי של החלבון U2AF, החלבון הכימרי שמר על יכולתו לקשור RNA אך במקום לעכב, איקטב את אתר השחבור החליפי המסומן בכוכבית באיור, מה שהביא לכניסת אקסון וקבלת tra לא פעיל כמו בזכר.

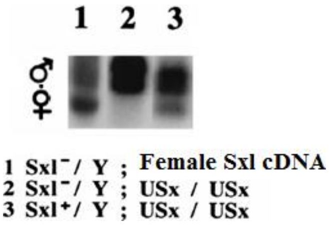




<u>**מסקנה:**</u> האזור ה-N-טרמינאלי של החלבון U2AF הוא החלק המוכר ע"י מערכת ה-splicing ו-Sxl הינו אנטגוניסט של U2AF. כלומר, Sxl משתיק את הפעילות של U2AF ובכך מבקר את השחבור האלטרנטיבי של הגן tra.

בכדי לבדוק אם אותו המנגנון מתרחש גם in vivo ואם מנגנון דומה מבקר גם את השחבור האלטרנטיבי של הגן Sxl, יצרתם זבובים טרנסגנים אשר עברו טרנספורמציה עם הגן הכימרי USx המבוטא תחת פרומוטור רגיש לחום- כאשר נחמם תקרה אקטיבציה של הגן USx ואז נקבל פנוטיפ זכרי (כי נוצר splicing ב-tra כמו בזכר).

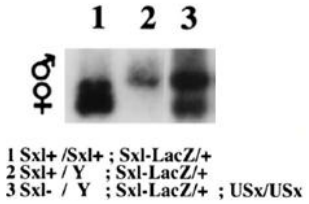
כדאי להשתמש בזכרים כי במערכת שלהם אין חלבון Sxl פעיל ורוצים לחקור את השינויים ב-splicing שלו. רוצים לבדוק אם אותה התופעה קורית גם in-vivo.



ראשית בדקתם את ההשפעה של USx על השחבור של ה: tra pre-mRNA.

<u>**מהלך הניסוי:**</u> הזבובים הטרנסגנים אוחסנו ב-37 מעלות למשך 90 דקות בכדי לאפשר ביטוי של הגן המוחדר. לאחר מכן כלל ה-RNA הופק והיחס בין תוצרי השחבור האלטרנטיבי כומת ע"י RT-PCR.

1. הכנסת Sxl cDNA כדי ש-tra יעבור חיתוך שבו יש השתקה של אתר ה-splicing, כמו אצל נקבה- קבלת tra פעיל (ביקורת).
2. USx בזכרים הפגועים בגן Sxl אינו מצליח לאקטב חיתוך נקבי של הגן tra.
3. כאשר בזכרים קיים Sxl תקין, הוא פועל לחיתוך ה-Sxl עצמו ונוצר חלבון Sxl פעיל שגורם ל-splicing נקבי של ה-tra, זה יכול לקרות אם ה-USx יכול לאקטב חיתוך נקבי של Sxl ובכך לייצר חלבוני Sxl פעילים.



כעת עברתם לבדוק את ההשפעה של USx על השחבור של ה--Sxl pre-mRNA. במקרה זה השתמשתם בזכרים טרנסגנים הפגועים בגן Sxl המבטאים בנוסף את הגן המדווח Sxl-LacZ. גן זה מכיל את כל הרצפים הרגולטורים לצורך חיתוך אך אינו מקודד לחלבון Sxl פונקציונאלי (כלומר: ל-Sxl שיוכל להפעיל את עצמו ולשנות לעצמו את ה-splicing כך שהחיתוך שלו יהיה רק כפי ש-USx חותך אותו).

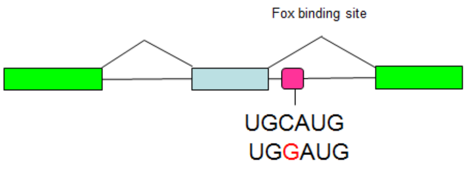
1. הפנוטיפ לא השתנה, החום לא השפיע והחדרת USx לא השפיעה- התקבל Sxl נקבי.
2. לא היה חיתוך בצורה נקבית, זוהי בקרה לאיך נראה החיתוך הזכרי.
3. רואים ש-USx חותך ה-Sxl pre-mRNA באופן דומה לחיתוך הנקבי, וזאת בניגוד למה שראינו לגבי החיתוך של הגן tra.

<u>**הסבר אפשרי למנגנון:**</u> USx לא מהווה Sxl פעיל כי הוא לא גורם להשתקת אתר החיתוך ב-tra (כנראה שישנה חשיבות לאזור ה-N-טרמינאלי של Sxl בבקרה). אבל הוא יוצר Sxl פעיל, כלומר: מביא ל-splicing שיוצר Sxl פעיל שמסוגל לחתוך נכון את tra.

©ענת עציון

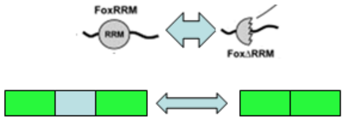
פגיעה בתהליך ה-Splicing:

- מוטציות ב-splice sites.
- מוטציות ב-junction, באזור התפר בין האקסון לאינטרון, פוגעות ב-ESE,ESS,ISE,ISS.



דוגמא: אתר שכתלות במיקום שלו הוא יכול להיות גם silencer וגם enhancer: כשהאתר מצוי downstream לאקסון האלטרנטיבי הוא יגרום לאקטיבציה של השחבור אבל אם תהיה מוטציה וה-C יתחלף ל-G, אתר הבקרה כבר לא יזהה באופן ספציפי את ה-FOX ואז אין שחבור.

- כשהמוטציה קורית באזור הבקרה הפגיעה תהיה בגן הזה, בתוצר שלו, או ביחסים בין התוצרים האלטרנטיביים שלו. לעומת-זאת ניתן לקבל מצב חמור יותר כאשר המוטציה היא לא על הגן עצמו, אלא היא בחלבון שהוא פקטור שחבור, ואז נפגעים כל הגנים המבוקרים על-ידו.
- מוטציות שגורמות לשינוי רמת הפקטור שחבור בתא, ברקמה מסויימת. וזה גורר מלבד שינוי ש"מ של החלבון הספציפי הזה, סדרה של הפרות ש"מ בתעתיקים אחרים המבוקרים על-ידו.



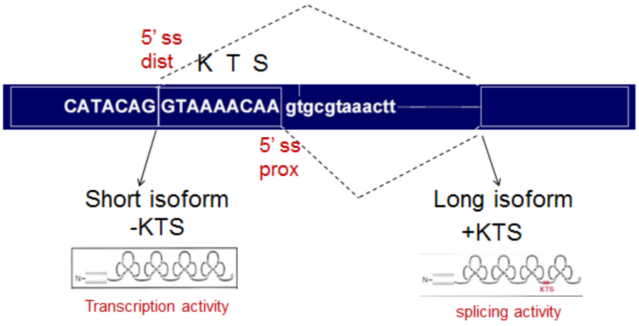
Wilms' Tumor:

מחלה קשה הנגרמת ממוטציה נקודתית ב-splice site של הגן WT1. גן זה עובר שחבור חליפי שיוצר שני סוגי חלבונים-אחד מכיל חלק נוסף של חומצות האמינו: KTS.

-KTS: פקטור שעתוק

+KTS: פקטור שחבור.

באנשים בריאים היחס ביניהם 2:1.



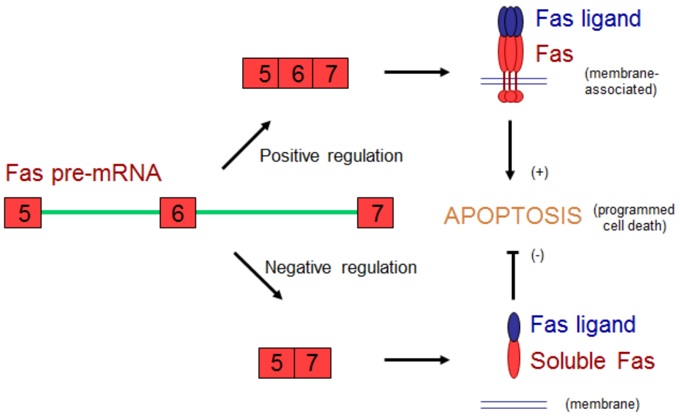
באנשים החולים במחלה יש מוטציה אחת קטנה שגורמת לאיבוד ה-5' ss prox ואז יכול להיווצר רק התוצר: -KTS. ואז התא מאבד את בקרת השחבור.

איבוד היחס בין תוצרי Fas כגורם לסרטן:

הגן Fas יש לו תפקיד מאוד חשוב בבקרה על אפופטוזיס. זהו גן שעובר שחבור חליפי (Cassette exon באקסון 6). ישנם מספר פקטורי שחבור המבקרים אותו ומביאים לקבלת שני תוצרים אלטרנטיביים:

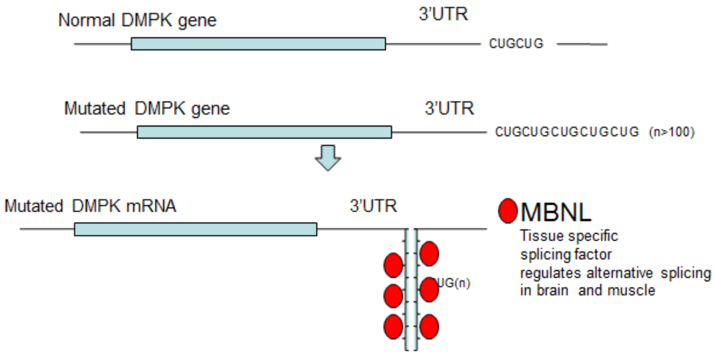
1. אקסונים 5,6,7: חלבון ממברנאלי.
2. אקסונים 5,7: חלבון מסיס.

Fas המסיס מדכא אפופטוזיס וה-Fas הממברנאלי מאקטב אותו. כשמאבדים את הבקרה על היחס ביניהם משתבשת הבקרה על האפופטוזיס ויש הגברה של התהליך הסרטני.



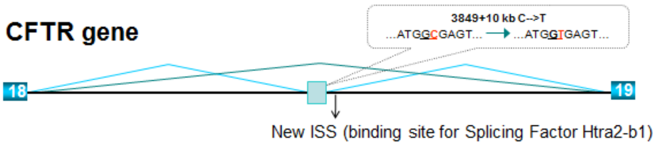
©ענת עציון

:Myotonic dystrophy



מחלה של ניוון שרירים. מחקר המחלה במשך שנים רבות לא הוביל לתוצאות כי לא נמצא בחולים אף גן פגום. לבסוף מצאו שיש גן: DMPK שבחולים אמנם אין בו מוטציה נקודתית אבל יש באזור ה-3' UTR רצף ארוך מאוד של עותקים חוזרים של: CUG. הסתבר שהרצף הארוך גורם לקיפול הרצף על עצמו וזה מושך פקטור שעתוק בשם: MBNL, שאתר ההכרה הרגילי שלו גם מכיל CUG, אבל הוא אתר בקרה ל-splicing במקום אחר לגמרי. פקטור זה "נתקע" על ה-mRNA של החלבון ולא מגיע לאיפה שהוא אמור להגיע, ואז ישנה פגיעה באתרי splicing של עשרות גנים המבוקרים ע"י MBNL.

:Cystic Fibrosis



זו מחלה שנגרמת (בין השאר) ממוטציות בגן- CFTR. רוב המוטציות הידועות לא קשורות ל-splicing. אבל נמצאה קבוצה של חולים שבהם לא הופיעו המוטציות המוכרות. ואז מצאו בתוך האינטרון, בין אקסון 18 לאקסון 19, מוטציה גרמה ל-GC להפוך ל-GT וזה גרם להיווצרות splice site חדש ונוצר אקסון חדש בין אקסונים 18 ו-19. באקסון החדש היה stop codon ואז לא נוצר תעתיק תקין מהגן. והאנשים בעלי המוטציה, לא היה להם חלבון CFTR בכלל.

__פיתרון אפשרי:__ כשחקרו את האזור שבו נכנס האקסון גילו משהו דומה לאתר קישור לחלבון htra שיכול לשמש כ-silencer של ה-splicing, מה שימנע את כניסת האקסון ובעצם יטפל במחלה. htra אינו חלבון נפוץ ולכן חשבו שתוספת שלו לא תפגע יותר מידי במאזן הפנימי של הגוף. בתאי ניסוי הצליחו לשפר את היחס בין התעתיק התקין ללא תקין.

:שאלות ממבחן

חלבון ה-fox הוא חלבון בקרה של splicing המתבטא באופן ספציפי בתאי המוח. החלבון מבקר באופן חיובי את אקסון מספר 2 של הגן crox המכיל 3 אקסונים (1,2,3). בתנאים רגילים אקסון 2 אינו מתבטא בתאי מוח מעכבר.

חוקרת עשתה מחקר שבו היא ביטאה את החלבון fox באופן קונסטיטוטיבי. מה התוצר הצפוי?

א. היחס בין מספר תעתיקי ה-RNA המכילים את אקסונים 1,2,3 לבין התעתיקים המכילים רק את אקסונים 1,2 יהיה גדול מ-1.

ב. היחס בין מספר התעתיקים המכילים את אקסונים 1,2,3 לבין התעתיקים המכילים רק את אקסונים 1,3 יהיה קטן מ-1.

ג. היחס בין מספר התעתיקים המכילים רק את אקסונים 1,2 לבין התעתיקים המכילים את אקסונים 1,2,3 יהיה גדול מ-1.

ד. היחס בין מספר התעתיקים המכילים את אקסונים 1,3 לבין התעתיקים המכילים את אקסונים 1,2,3 יהיה קטן מ-1.

חוקר מצא רצף באורך 200 בסיסים בכרומוזום 2 באדם החשוד במעורבות במחלה. בבדיקה נוספת הוא מצא כי בכל מסגרות הקריאה האפשריות יש קודון הפסקה Stop codon. בנוסף, נמצא שהרצף שמור לגמרי בין אדם לעכבר. החוקר חושד שמדובר באקסון שעובר שחבור חילופי "alternative splicing".

אלו מהממצאים הבאים יתמכו בהשערתו?

א. אין ממצא שיכול לתמוך בהשערה זו מכיוון שנוכחות קודון הפסקה מצביעה כי אין מדובר באקסון.

ב. אנליזת microarray הראתה כי האקסון מתבטא בכל הרקמות.

ג. אנליזת microarray הראתה כי הגן מתבטא רק ברקמות המוח והשריר.

ד. אנליזה גנומית הראתה כי באינטרון משני צידי הרצף ישנם אתרי קישור לחלבונים שגם הם שמורים בין אדם לעכבר.

©ענת עציון

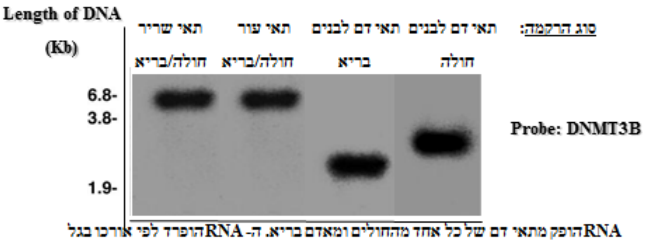
שאלה מהתרגול:

למעבדה אונקולוגית הגיע חולה לוקמיה מיאלואידית. במעבדה העלו החוקרים את ההשערה כי מחלתו קשורה לגן DNA methyl transferase 3B. גן זה מקודד לאנזים המסייע במתילציית DNA. ידוע כי גן זה מתבטא בצורה שונה בתאי דם לבנים ביחס לשאר הרקמות. כמו-כן, מחקרים שונים הראו כי מוטציות בגן זה קשורות, בין היתר, להתמרות סרטניות. החוקרים רצו תחילה לחקור גן זה.

בשלב הראשון- החוקרים הפיקו RNA מתאי החולה (תאי דם לבנים מאדם בריא, תאי דם לבנים מהאדם החולה, תאי עור ותאי שריר הן מאדם חולה והן מאדם בריא) וביצעו אנליזת northern blot עם גלאי ספציפי לגן.

תוצאות האנליזה:

באדם בריא וחולה אין שינוי ב-mRNA בתאי עור ותאי שריר ואילו בתאי דם לבנים ה-mRNA בבריא קצר יותר- נעשה חיתוך אחר של ה-pre-mRNA, כי מנגנון ה-splicing alternative נפגע בתאי החולה.



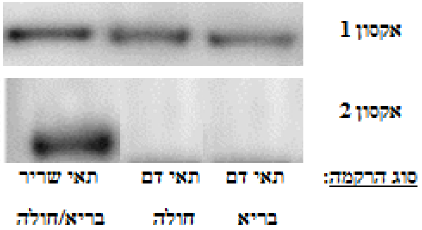
RNA הופק מתאי דם של כל אחד מהחולים ומאדם בריא. ה-RNA הופרד לפי אורכו בגל אגרוז, הועבר לממברנה ועבר היברידיזציה עם מקטע של cDNA ל DNMT3B המסומן פלואורוסנטית.

החוקרים מעוניינים להבין את המנגנון המתרחש בתאי הדם הלבנים באדם הבריא ובאדם החולה. לצורך כך ברצונם לרצף את התעתיק ולבדוק האם אכן מדובר במוטציות בהן הם חושדים. עליהם להגביר את הגן הרלוונטי ע"י PCR, תוך שימוש בפריימרים אשר יתאימו לכלל אזורי ה-splicing בגן. האזורים המרוצפים חייבים לכלול את ה-splice sites ואת ה-branch point.

החוקרים החליטו להריץ בג'ל את תוצרי ה-PCR שערכו, עבור אקסון 1 ו-2 בלבד.

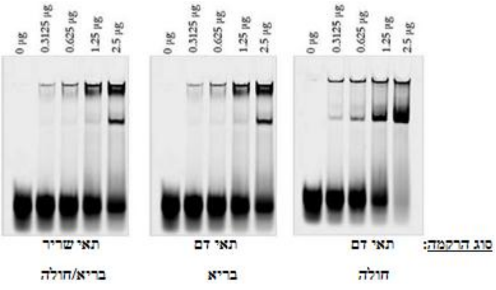
<u>התוצאות שהם קבלו:</u>

<u>מסקנה:</u> הגן עובר alternative splicing. בתאי דם לבנים ברקמה הבריאה מנגנון גורם לכך שאקסון 2 לא יופיע בתעתיק (exon skipping).



החוקרים רצו להמשיך ולבדוק את החולה. לצורך כך הם ביצעו ניסוי EMSA ל-RNA של הגן. החוקרים השתמשו בחלבון hnRNP ידוע בריכוזים עולים. להלן התוצאות אותן קבלו:

ניתן לראות כי אפיניות הקישור של חלבון ה-hnRNP ל-RNA של הגן עלתה אצל החולה.



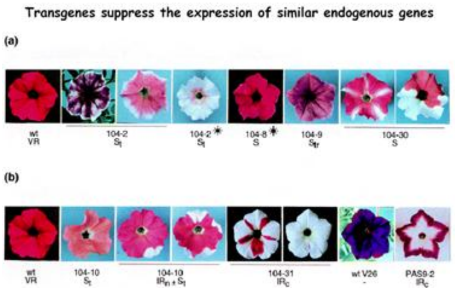
ככל הנראה התרחשה מוטציה בגן שגרמה לחיזוק האפיניות של החלבון. כתוצאה מקישורו ייתכן והושתק אתר splicing אחד, מה שגרם לאקטיביציה של אתר splicing "חלש" יותר באזור אחר, ולקבלת תעתיק ארוך יותר.

©ענת עציון

The small RNA world

התברר שבתאים שלנו יש המון המון RNA רים שלא מקודדים לחלבונים. העולם הזה התגלה לפני כ-10 שנים (בשנת 2002), והוכתר כתגלית הגדולה של אותה שנה ע"י מגזין Science. זוהי בקרת הביטוי של ה-RNA ע"י RNA קצרים.

המנגנון שהתגלה בצמחים: ניסו לעשות פרחים בצבעים שונים ע"י הנדסה גנטית. החוקר שם פרומוטור חזק מאוד כדי לקבל צבע סגול שהיה קשה לקבל בפרחי פטוניה, ואכן הוא קיבל פרחים בעלי צבע סגול חזק אבל להפתעתו הוא קיבל גם פרחים לבנים לחלוטין. לבן אומר שהגן לא התבטא.



החוקר חיפש מה עצר את התבטאות הגן. הוא מצא שהחלבון בכלל לא נוצר בגלל שה-RNA לא מצטבר אבל הוא כן משועתק, ונשלח מייד לדגרדציה. כלומר: עקב הכנסת הפרומוטור החזק הופעל מנגנון בתא שזיהה שנוצר יותר מידי mRNA, והוא שלח אותו לדגרדציה.

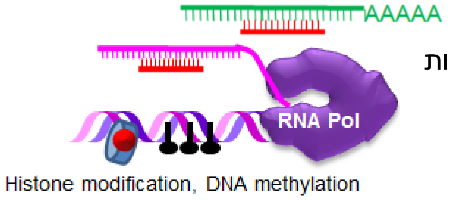
Co-supression: המנגנון שמסלק את ה-mRNA כאשר נוצר ממנו יותר מידי. זה הביא לפיתוח כלי לשיתוק מלא של גנים בצמחים- מביאים אותו לביטוי יתר כדי שהמנגנון הזה ייכנס לפעולה. זה יותר פשוט מאשר לעשות שינויים בגנום.

Antisense RNA: פרומוטור חזק והגן בכיוון הפוך מביא ליצירת הגדיל המשלים שמתחבר ל-RNA המקורי ובכך גורם לשיתוקו, ds-RNA עובר פירוק מהיר ע"י המנגנון.

מדוע נוצר המנגנון? המנגנון הינו כנראה מנגנון הגנה קדום מפני וירוסים המגיעים כ-RNA. זהו מנגנון בסיסי מאוד שקיים בכל האאוקריוטים והפרוקריוטים, גם בכאלה שאין להם מערכת חיסונית מפותחת כמו לאדם.

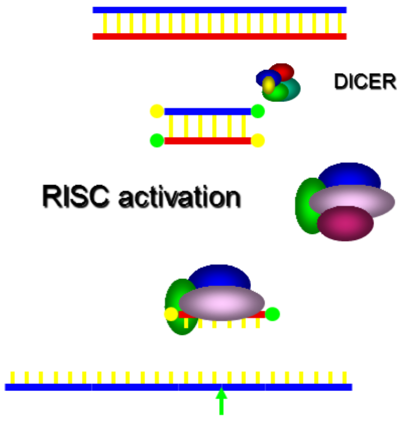
Small RNAs:

יכולים להיות עד אורך של 21-24 נוקליאוטידים. הם לא יכולים להיות ארוכים יותר כי אז התא יזהה אותם ויפעיל את מנגנון האינטרפרון נגדם. ולכן האורך הזה הוא חשוב מאוד. מצד שני הם לא יכולים להיות קצרים מ-20 נוקליאוטידים כי זה יקשה על הספציפיות של המולקולות (התאמה חד-ערכית).



ה-Small RNAs יכולים גם להביא לפירוק RNAs:
וגם לעכב את השעתוק, למשל ע"י מודיפיקציות אפיגנטיות לכרומטין.

מנגנון לפירוק RNAs:



Initiation step: כאשר נוצר ds-RNA בתא, הוא נחתך ע"י חלבון- Dicer (ע"י ATP) למקטעים של 21 נוקליאוטידים עם קצוות דביקים ומזורחנים. ישנו גם חלבון שמסוגל לבצע הגברה של ה-siRNA (המקטעים הקצרים).

Effector step: קומפלקס חלבוני RISC קושר לתוכו את ה-ds-RNA הקצר, "בוחר" מתוך שני הגדילים את הגדיל ה-antisense ל-RNA המטרה. הגדיל שנבחר יעבור היברידיזצייה ל-RNA המטרה והגדיל השני מפורק.

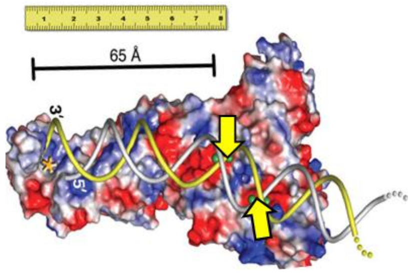
ואז הקומפלקס RISC-siRNA נקשר ל-mRNA המטרה, ופעילות אנדונוקליאז של ה-RISC גורמת לביקוע mRNA המטרה, וזה גורר פירוק של כל ה-mRNA.

איך RISC בוחר את הגדיל הנכון? עדיין לא לגמרי מבינים, אבל זה קשור לקצוות הדביקים, הוא בוחר לפרק את הגדיל שהקצה שלו הוא פחות יציב.

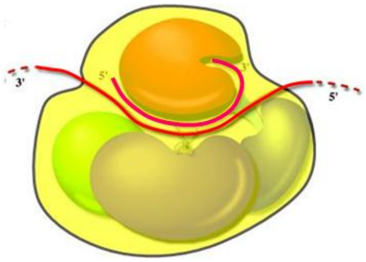
Argonaute: חלק מחלבוני ה-RISC שקושרים את ה-siRNA.

©ענת עציון

<u>Dicer:</u> חלבון שיש בו תעלה ל-ds-RNA והמבנה שלו מאפשר לו לחתוך בדיוק באורך הרצוי.



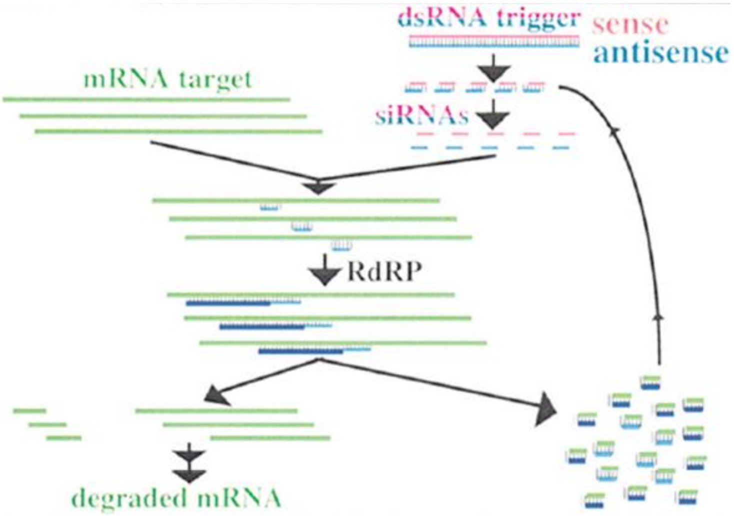
<u>Argonaout:</u> הקומפלקס החלבוני, חלבון אחד בו קושר את ה-siRNA וישנה תעלה שקושרת את mRNA המטרה. וכאשר הכל נקשר כמו שצריך, ישנו קטע שמבצע את החיתוך.



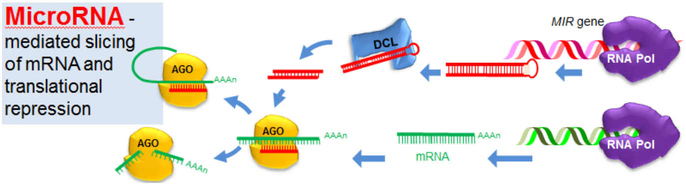
בכמה יצורים (צמחים ונמטודות) ישנו מנגנון שלוקח את ה-siRNA ומגביר אותם לאחר החיתוך. איך ניתן לשעתק RNA מ-RNA? ישנו אנזים- RNA Dependent RNA Polymerase (RdRP) שמשמש ב-ds-RNA כפריימר.

ה-ds-RNA שהוגברו יכולים לעבור סיסטמית מתא לתא וע"י כך זה עובר לכל היצור ויוצר הגנה של כל התאים בסביבה כנגד אותו RNA.

לעומת-זאת ביונקים האנזים לא קיים והתגובה מוגבלת לתאים שבהם נוצר ה-siRNA.



<u>microRNA:</u> לא תמיד ה- RISC טעון ב-siRNA, אלא ישנם גנים שיוצרים RNA שהרצף שלהם מתאים ל-RNA אחרים. אלה גנים המקודדים בגרעין ע"י פלימראז II, עוברים capping ו-adenylation באופן רגיל אבל הם יוצרים מבנה stem & loop, והוא מזוהה ע"י DICER, שקוצץ אותו לגודל המתאים.



כלומר: מעורבים בתהליך שני גנים- אחד מקודד ל-mRNA המטרה ואחד שמקודד ל-mirRNA.

לעומתם: siRNA נוצרו מאותו גן של mRNA המטרה.

סביר להניח שמנגנון ה-siRNA נוצר קודם, ומנגנון ה-mirRNA נוצר בשלב מאוחר יותר על גביו. זה מאפשר שהבקרה על הגנים של ה-mirRNA למעשה מבקרים את ה-mRNA מטרה. הטבע ניצל כל דרך אפשרית כדי להכניס רמות נוספות של בקרה על ביטוי הגנים.

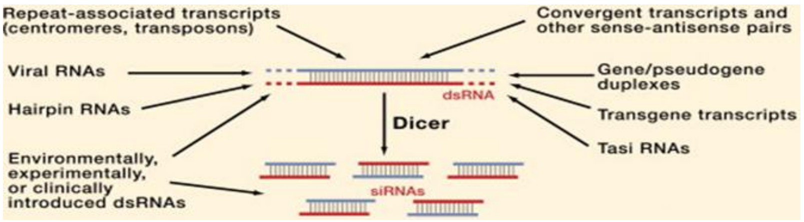
<u>siRNA:</u> מגנים על התא מפני וירוסים. וירוס שנכנס יכול להפעיל את המערכת הזו וזה יגרום לפירוקו. siRNA גם משתיקים תעתיקי RNA שנוצרו בכמות גדולה מידי. זה יכול לקרות כתוצאה מבקרות שנפגעו, ומחלקיקים קופצים בגנום שפתאום "מתעוררים". יש להם גם תפקידים בהשתקה אפיגנטית של ביטוי גנים (למשל ע"י מתילציה).

<u>הערה:</u> RISC משפיע על מספר תהליכים: דגרדציה של RNA, דגרדציה של DNA, תרגום, הטרוכרומטין ושעתוק.

©ענת עציון

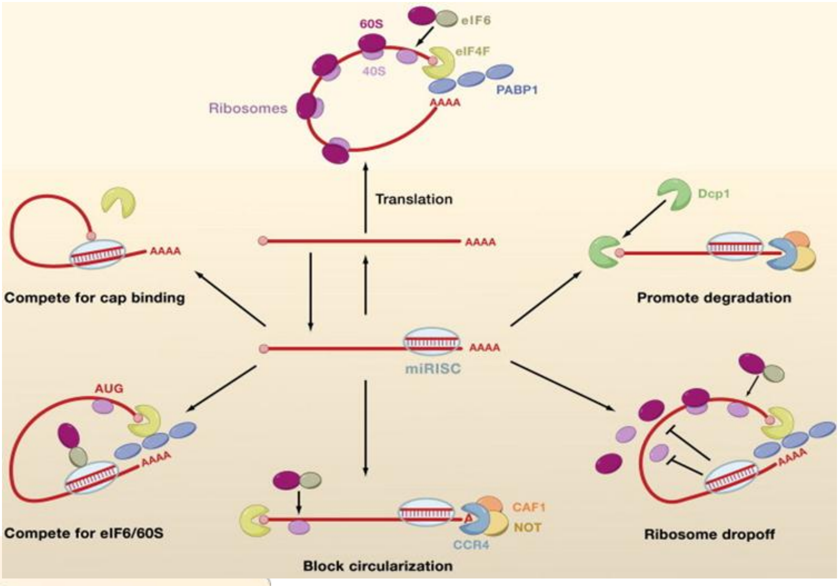
שימושים מעבדתיים ב-RNAi:

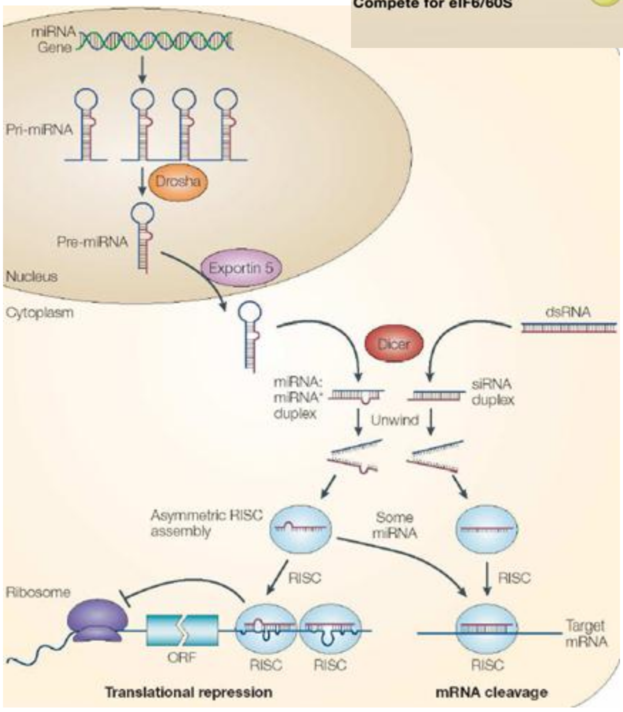
מאפשר בקלות לשתק את הביטוי (Knock down, בניגוד ל- Knock-out שמשמעותו הוצאת הגן) של גן בצורה ספציפית לחלוטין, אין צורך בהנדסה גנטית מסובכת לצורך הסרת הגן, ואין צורך בחומרים לעיכוב שעתוק שהם אינם ספציפיים.



RNAi – עיכוב התרגום:

במהלך התרגום ה-mRNA מסתדר בצורה עגולה כאשר זנב הפולי-A קשור לקומפלקס ה-capping. ואז הריבוזומים עולים ומתרגמים יותר ביעילות. ואז ישנם כמה מנגנונים בהם miRNA+RISC נקשרים, כמעט תמיד ב 3' UTR, והקשירה הזו מונעת את ה-circled mRNA. ישנן עדויות לכך שהקשירה הזו מעכבת את תנועת הריבוזומים. וגם ישנן עדויות לכך שהקשירה מביאה לדגרדציה.





ה-miRNA הוא לא תמיד הומולוגי ל-mRNA המטרה ב-100%. וכדי ש-RISC יחתוך דרושה הומולוגיה מלאה. כאשר אין הומולוגיה מלאה (כפי שקורה ברוב ה-miRNA) אז לחלקים שבהם אין הומולוגיה מלאה, לא עובד מנגנון הדגרדציה אבל עובדים המנגנונים האחרים של: עיכוב תרגום, עיכוב שעתוק, ו-chromatin remodeling.

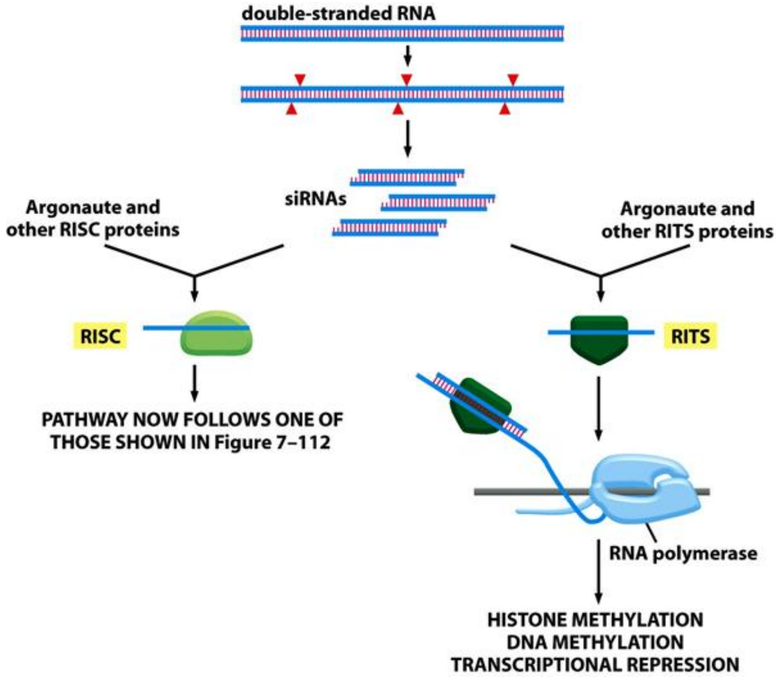
Pri-miRNA: התעתיק הראשוני של ה-miRNA המאופיין בכמה לולאות.

Drosha: אנזים שנמצא בתוך הגרעין, וחותך את ה:pri-miRNA ליצירת **pre-miRNA**. ה: pre-miRNA יוצא מגרעין התא במנגנון שבו חלבונים יוצאים עם **Exportin 5**. בציטופלסמה הוא משמש סובסטרט ל-DICER ומשם התהליך ממשיך.

©ענת עציון

RNAi – השפעה על מתילציות:

הם נקשרים ל-RNA שנוצר תוך כדי שעתוק, וכשהוא עדיין קשור ל-DNA, הקומפלקס הזה משפיע על השעתוק ע"י מתילציה או chromatin remodelling.

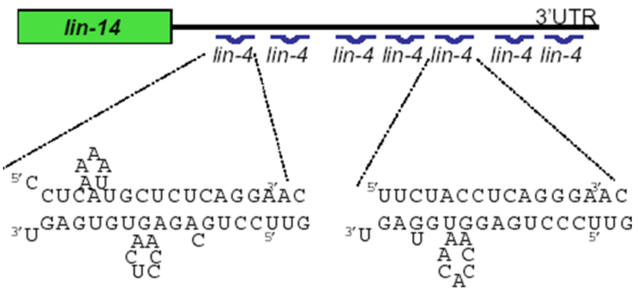


התפקידים הביולוגיים של miRNA:

- בקרת ביטוי גנטי, למשל: בהתפתחות מערכת העצבים ב-C. elegans.
- מניעת מוות תאי, למשל: בדרוזופילה miRNA מסויים מדכא מוות תאי ונחוץ למטבוליזם תקין של שומנים.
- בצמחים ישנם תפקידים רבים בהתפתחות העלה.

<u>**דוגמא:**</u> בגן lin-14, ישנם הרבה מאוד אתרי קשירה ב-mRNA ב: '3 UTR המתאימים ל: lin-4 RNA באורך 21 נוקליאוטידים.

<u>הערה:</u> מספר ה-miRNA עולה ככל שעולה מורכבות היצור.



RNAi ככלי ניסויי:

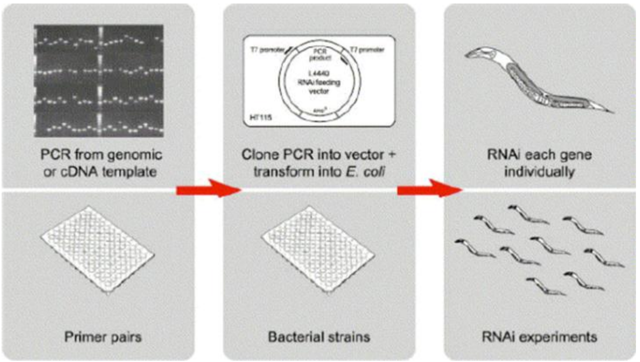
1. להחדיר (Transfection) את ה-ds-RNA ישירות לתאים
2. להכניס לתאים פלסמיד שממנו נוצר RNA במבנה stem & loop שיהווה סובסטראט ל-DICER.

<u>סיבות לכך שלא בכל התאים נעלם הביטוי:</u>

- מדובר בהפסקת ביטוי שהיא אינה מוחלטת, עדיין יש ביטוי.
- כשעובדים עם אוכלוסיית תאים, לא כולם בהכרח מודבקים באותה המידה.

סריקה גנטית:

כאשר רוצים לבדוק מי אחראי על פנוטיפ מסויים. רוצים לבדוק קבוצה גדולה של גנים ולשתק אותם אחד-אחד. אז מוצאים לכל גן siRNA מתאימים (ניתן לקנות ספרייה כזו). ואז לוקחים אוכלוסיית תאים ומדביקים אותם בצלחות שונות עם siRNA שונים. וע"י תהליך של סריקה מגיעים למצב ש-siRNA מסויים גורם לפנוטיפ שמעניין את החוקר. יודעים איזה גן היה מושתק בפנוטיפ זה.



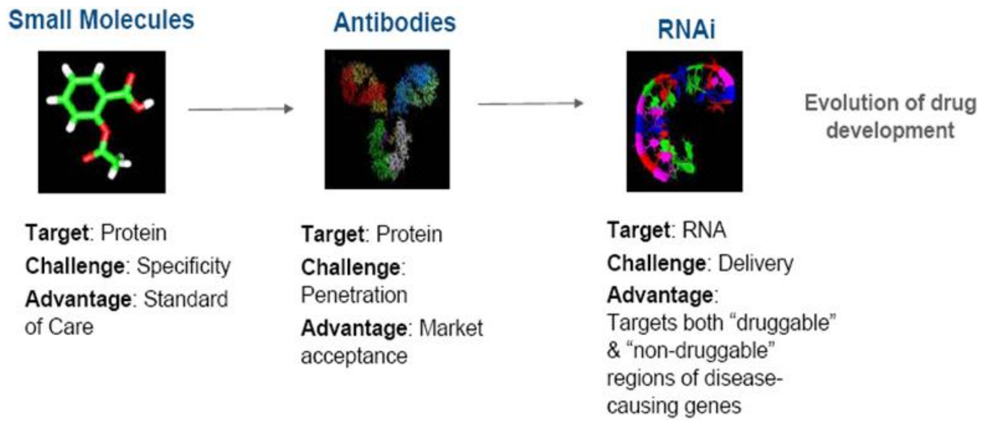
©ענת עציון

אפליקציות של small RNAs:

בחקלאות:

- מאפשר השתקה סלקטיבית של גנים. דוגמא: יצירת בוטנים שלא ייצרו אלרגיה אצל בני-אדם.
- ביטוי dsRNA שהוא זהה לגורמים מזיקים הופך את הצמחים לעמידים בפניהם.
- השתקת גנים יכולה להסיר תרכובות רעילות מזרעי כותנה כדי שהיא תוכל לשמש למאכל.

ברפואה:

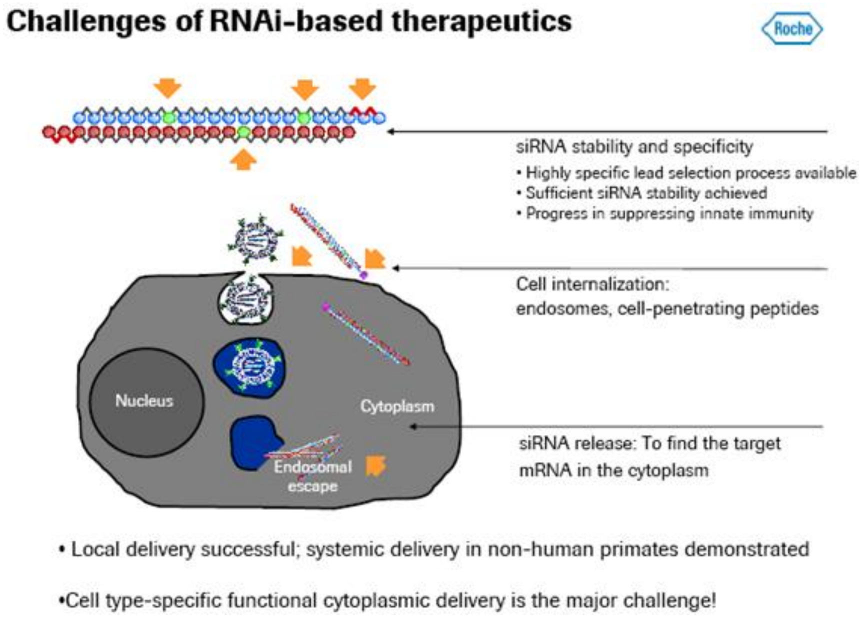


- כיום הרפואה עובדת על החדרת מולקולות כימיות שאמורות לעבוד בצורה שהיא לא תמיד מספיק בטוחה ולא תמיד מספיק ספציפית.
- בשלב מאוחר יותר התחילה רפואה שמבוססת על נוגדנים. הם יותר ספציפיים אבל הם מעוררים תגובה אנטיגנית של הגוף שלנו.
- בעתיד נחדיר לחולים: siRNA. זה יאפשר ספציפיות מאוד גבוהה. RNA כזה קצר לא יעורר תגובה חיסונית של הגוף. האתגרים: delivery, stability, safety ו-incomplete knockdown.

  האתגר הגדול ביותר: ה-delivery- איך לגרום להם להיכנס לאיבר המטרה?

  <u>רעיון:</u> שימוש בליפוזומים שידביקו תאים ובתוכם ה-siRNA.

  <u>רעיון:</u> שימוש בוירוסים לצרוך הכנסה לגנום. בעיה: אין שליטה של המקומות בגנום הוא נכנס, וזה יכול להפריע לגנים שהם tumor supressors. או להביא לגנים סרטניים להיכנס תחת פורמוטור חזק שהגיע עם הוירוס.



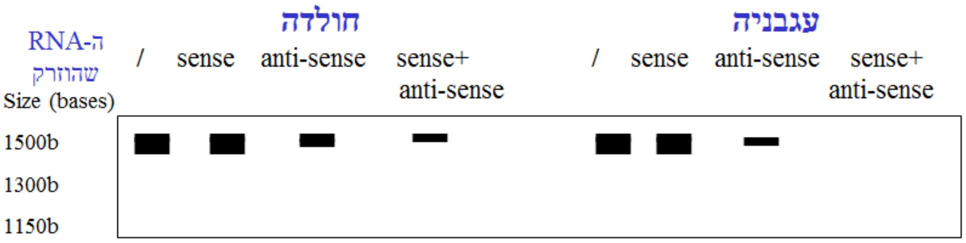
©ענת עציון

שאלה מהתרגול:

במהלך עבודתך במעבדה העוסקת בחקר גידול העגבניה גילית גן חדש, אשר אינך יודע מהו תפקידו (גן S). כניסוי מקדים, החלטת לבצע knock down לגן זה בשיטת RNAi ולבדוק מהו הפנוטיפ הנגרם עקב כך. בשלב הראשון- ריצפת את הגן וגילית כי קיים לו הומולוג בחולדה, בעל דמיון רצפי גבוה מאוד. החלטת להשתמש בחולדה כביקורת.

לצורך ביצוע ה-knock down, הזרקת לצמח אחד מהשלושה בכל פעם: גדיל ה-sense של ה-RNA, גדיל ה-anti-sense של ה-RNA, RNA דו-גדילי הנוצר מהיברידיזציה בין גדילי ה-sense וה--anti-sense. כביקורת- הזרקת את הגדילים גם לחולדה.

כדי לבדוק באיזה מקרה נגרם knock down משמעותי, הפקת את ה-RNA מתאי צמח העגבניה ומתאי החולדה, הרצת בג'ל וביצעת אנליזת northern blot, תוך שימוש בגלאי ספציפי ל-S:



RNA חד-גדילי/ דו-גדילי המתאים לגן S הוזרק לתאי צמח העגבניה, או לתאי חולדה. RNA כללי הופק, לאחר כל טיפול, מהתאים והורץ על גבי ג'ל לצורך אנליזת northern blot. הממברנה הוגבה עם גלאי ספציפי ל-RNA של הגן S

<u>הסבר התוצאות:</u>

- <u>הכנסת גדיל ה-sense:</u> לא תגרום ל-knock down, מאחר ולא תוכל להתרחש היברידיזציה עם RNA המטרה, לכן אין ירידה ברמות ה-RNA.
- <u>הכנסת גדיל הanti-sense:</u> תתרחש היברידיזציה עם RNA המטרה (ישירות) ותהיה ירידה ברמות ה-RNA. מנגנון ה-RNAi יופעל (כי נוצר RNA דו-גדילי), אם כי (ככל הנראה) בצורה פחות אפקטיבית. ה-DICER יכול לזהות את המקטע הדו-גדילי הקצר אבל ייקח לו יותר זמן.
- <u>הכנסת RNA דו-גדילי (sense+anti-sense):</u> יופעל המנגנון אשר ייגרום לגיוס ה-DICER וה-RISC, דבר שיתבטא בירידה משמעותית יותר ברמות ה-RNA.

  <u>הערה:</u> לא ברור אם ה-DICER יפעל על ה-dsRNA המוכנס מראש כי זה למעשה סובסטרט של RISC.
- <u>ההבדל בין הצמח לחולדה:</u> בצמח קיים האנזים RdRP, דבר הגורם להגברת מנגנון ה-RNAi, לכן קיים knock down ברמה גבוהה יותר.

גילית כי כאשר השתקת גן זה, גרמת לפגיעה בהבשלת העגבניה, לכן הסקת כי גן זה קשור למסלול הבשלת הפרי.

ב. בהמשך מחקרך העוסק בהבשלת העגבניה, גילית וירוס הפוגע בתהליך זה. אתה חושד כי הוירוס מצליח לחדור לצמח ע"י כך שהוא משתק את מנגנון ה-RNAi. איזה מהסעיפים הבאים מתאר מנגנון אשר באמצעותו <u>לא יצליח</u> הוירוס לשתק את מנגנון ה- RNAiשל הצמח?

א. בגנום הוירוס מקודד חלבון שהוא מעכב חזק של DICER.

ב. בגנום הוירוס מקודד RNAהנקשר ל- RNA הריבוסומלי (28S) באיזור האתר הפעיל לתרגום חלבונים.

ג. בגנום הוירוס מקודד RNAהמונע את האקטיבציה של RISC.

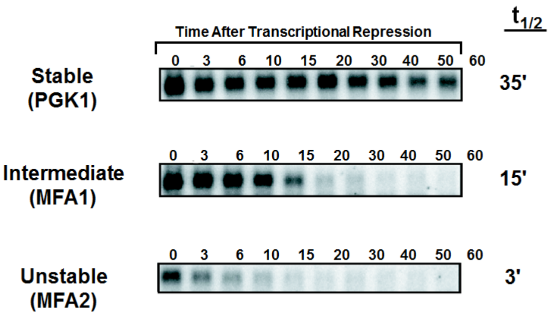
ד. בגנום הוירוס מקודד חלבון המונע מ- RISCלהשתחרר מ- RNAהמטרה לאחר שהוא הותך אותו.

©ענת עציון

מנגנוני בקרת איכות – דגרדציה של RNA

קביעת משך החיים של ה-mRNA:

ישנה משרעת שלמה של משך חיים של mRNA.



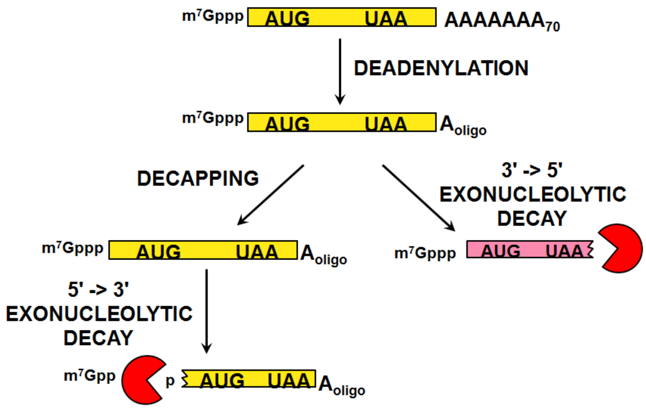
ניסוי: 3 mRNAs שונים נלקחו משמרים הרגישים לטמפרטורה גבוהה- היא מעכבת את השעתוק. בדקו בזמנים שונים את כמות ה-mRNA בתא וכך הסיקו לגבי קצב הפירוק שלו. בתאים שבהם השעתוק לא עוכב, כל-הזמן יש mRNA כי הוא נוצר מחדש.

הערה: מניחים כי החימום לא משנה את קצב הדגרדציה של ה-mRNA.

ישנם mRNAs מאוד קצרי חיים- משמש לבקרה מאוד הדוקה על קצב יצירת החלבונים. תעתיק קצר-חיים הוא תהליך בזבזני באנרגיה- עליה במידת הבקרה מביאה להשקעת אנרגיה גדולה יותר עקב פרוק מהיר של mRNA שהגוף השקיע בסנתוזו.

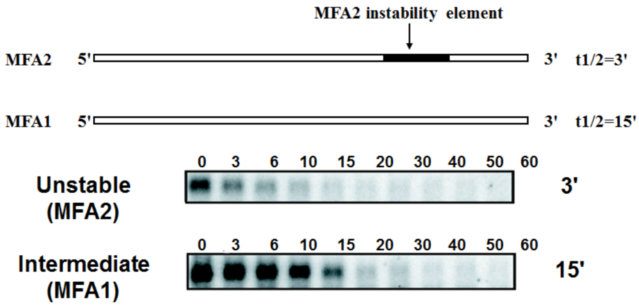
איך מקודד אורך החיים של ה-mRNA? הרבה פעמים המידע מצוי ב-UTRs.

מנגנון פירוק ה-mRNA:



1. קיצור זנב ה-polyA. מזנב שאורכו 70 בשמרים ו-200 בתאי יונקים עוברים לזנב קצר ע"י אנזימים Deadenylases שמפרקים את הזנב.
2. מסלול פירוק-1: decapping- הסרת ה-capping מהקצה ה-5', שמביא לקשירה של אנזים (פקמן אדום) שמעכל את ה-RNA מכיוון 5' לכיוון 3'.

   מסלול פירוק-2: גיוס קומפלקס שבנוי מ12 חלבונים שמעכל מכיוון 3' ל-5'.

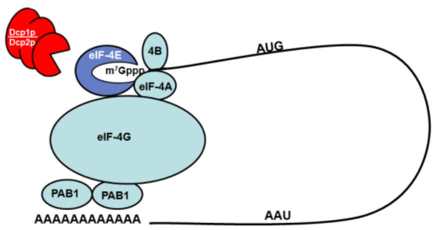


ניסוי:

שני גנים מאוד דומים בשמרים: MFA1, MFA2 שההבדל ביניהם הוא רצף נוקליאוטידים שמסומן כאן למעלה. והרצף הזה מקצר את החיים של MFA2, החסרתו מעלה את זמן מחצית החיים פי-5.

הערה: במקרה זה הרצף המשפיע על משך החיים מצוי באזור המקודד.

השערה: רצף זה נקשר לחלבונים מיוחדים קושרי-RNA אשר מגייסים את מערכת הפירוק.



השפעה נוספת:

כל פגיעה ב-circle שיוצר ה-RNA במהלך תהליך התרגום, תגרום לחשיפת ה-cap 5' לאקסונוקליאז שאורב כל-הזמן להתחיל לפרק אותו, ויתחיל תהליך הפירוק.

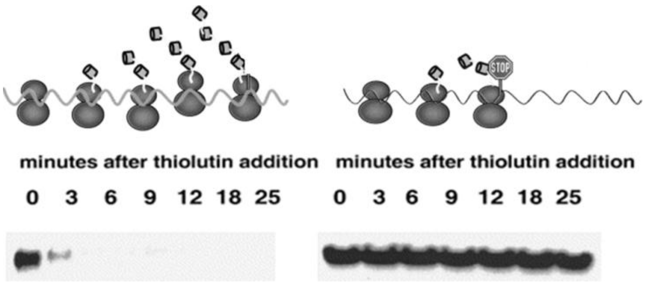
©ענת עציון

מנגנוני בקרת איכות:

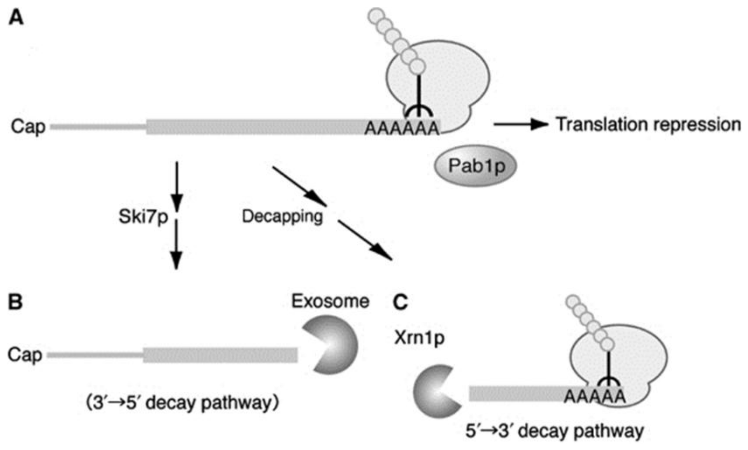
מערכת אשר מזהה פגמים ב-mRNA ובגללם, היא מסלקת אותו מהמערכת.

ניסוי:

לאחר הכנסת חומר מעכב שעתוק לתאי שמרים, ראו של-RNA רגיל שיש לו באיזשהו מקום stop codon, הוא די יציב, זמן מחצית החיים מעל 25 דקות.
אם מורידים את ה-stop codon, ה-mRNA נהיה מאוד לא יציב ועובר פירוק מאוד מהיר. זמן מחצית החיים הפך לפחות מ-3 דקות.



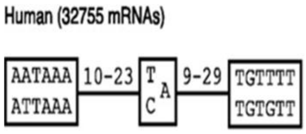
הסבר: יש יתרון למערכת שיודעת לקרוא את הקודונים ולפרק mRNA במקרה כזה כי בסבירות גבוהה זהו mRNA לא טוב. התא צריך יכולת להבדיל בין שני ה-mRNAs האלה. רק הריבוזום מוכר כיודע לקרוא קודונים במסגרת קריאה.



ריבוזום שלא מגיע ל- stop codon ממשיך ומגיע עד לסוף ה-mRNA ונתקע שם כי אין מקום לקישור ה-release factor. ולכן כל הריבוזומים שאחריו נתקעים גם כן. ובנוסף נפתח ה-mRNA circled ונפגע תהליך התרגום.
ואז מגיע פקטור חלבוני: Ski7 שהוא דומה מאוד לtRNA והוא נקשר במצב כזה. הוא נקשר חזק גם לאקסוזום שמעכל את ה-RNA.

הסיבה האבולוציונית ליצירת המנגנון:

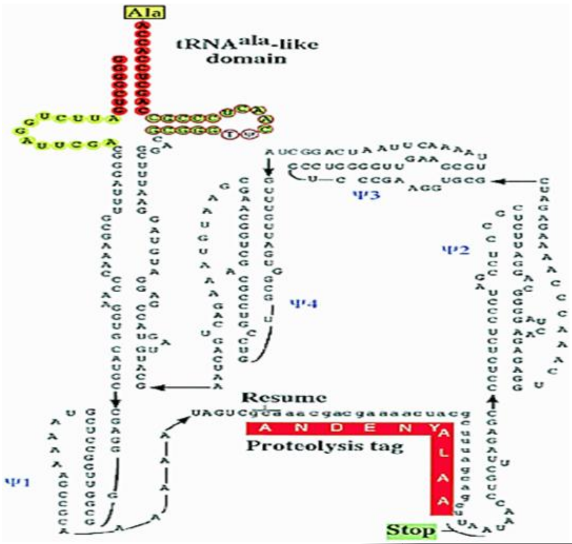
ב-0.7% מה-mRNAs הנוצרים קיימות מוטציות כאלה (שזה % גבוה יחסית).
איך כל-כך הרבה mRNAs נוצרים לא נכון ע"י המערכת?
מצאו שרצף הדומה לרצף הפוליאדנילציה (AU-rich) מופיע בתוך האזור המקודד שלהם ולכן מגיע גם ל-mRNA. מנגנון הפוליאדנילציה עובד כך שכשהוא רואה רצף כזה הוא עושה חיתוך ואז מוסף את זנב הפוליA. בגנים האלה המנגנון טועה ולכן בתעתיקים הנוצרים אין stop codon.



המנגנון בחיידקים:

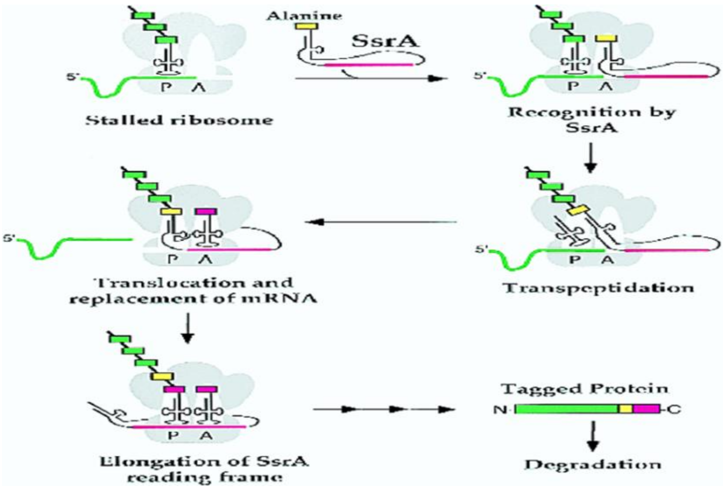
בחיידקים גם התפתח מנגנון כזה, בחיידקים אין פוליאדנילציה בקצה ה-mRNA. מוטציות מכניסות ל-mRNA בחיידקים מצב שבו אין stop codon ואז הריבוזום מגיע לסוף. ושם התגלה tmRNA.

tmRNA/SsrA RNA: מולקולת ה-RNA היחידה שאנחנו מכירים שהיא גם mRNA וגם tRNA. במקום ה- anticodon loop ישנו המשך ויש בו reading frame קצר מאוד



©ענת עציון

עם stop codon בסוף. מתברר שאם מוסיפים את הפפטיד המתורגם ממנו לחלבון, החלבון הזה נשלח לדגרדציה מהירה. הריבוזום נע על-פני ה-mRNA, מגיע לסוף ונתקע, והמצב הזה מתאים ל-tmRNA שנקשר לריבוזום באתר הפעיל, האלאנין נקשר לחלבון, והריבוזום ממשיך לנוע על פני מסגרת הקריאה שבתוכו. בצורה כזו נוצר חלבון שיש לו אלאנין בתוספת לפפטיד שהוא זיף קוד לדגרדציה.



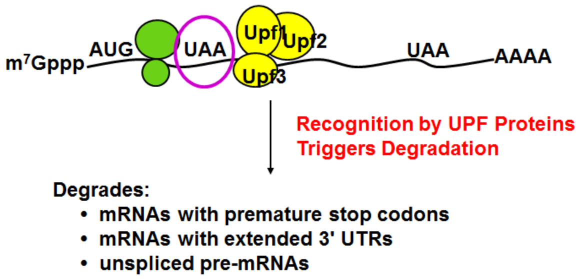
Nonsense-mediated decay (NMD):

כאשר ב-mRNA נוצר stop codon לפני סיום מסגרת הקריאה, הוא עובר דגרדציה מהירה. זה טוב כי החלבון שנוצר חתוך ולכן יש לסלק אותו מהר מהמערכת.

<u>כיצד הריבוזום מזהה שמדובר ב-stop codon מוקדם מידי?</u>

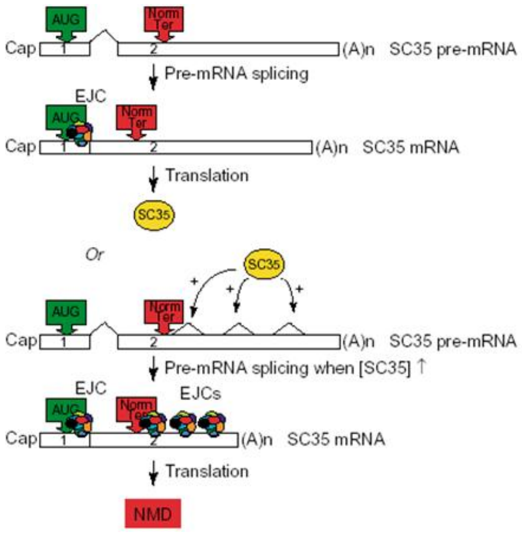
ה-stop codon הלא תקין שמזוהה ע"י המנגנון תמיד מופיע לפני אינטרון (אם אין אינטרון אחריו אז הוא לא מזוהה ע"י המנגנון ולא קורית דגרדציה מהירה) בעוד שב-3' UTR אין בכלל אינטרונים. בנוסף, אם המרחק בין ה-stop codon המוטנטי לאינטרון קטן מ-50 בסיסים אז המנגנון גם לא מזהה אותו. כלומר: ה-mRNA "זוכר" איפה היו האינטרונים (שכבר הוצאו מהתעתיק).

איפה שהיה splicing נשאר קומפלקס חלבוני-Exon Junction Complex-EJC. הריבוזום (בירוק) שנע "מגלח" את הקומפלקסים האלה, ואז ה-mRNA שיוצא מהגרעין הוא יציב. אם ה- stop codon רחוק ביותר מ-50 נוקליאוטידים אז הריבוזום לא מגיע לסלק את הקומפלקס, והוא זה שמסמן את ה-mRNA לדגרדציה.

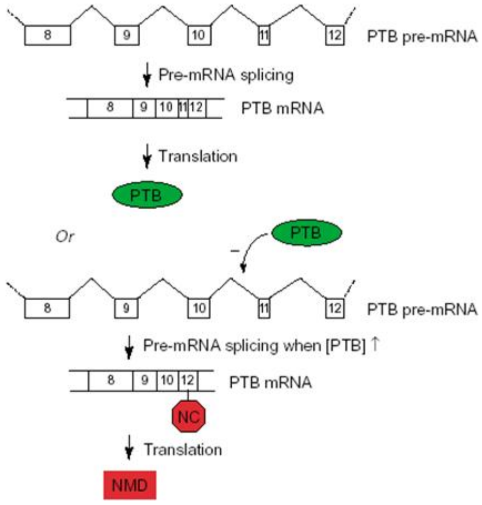


<u>דוגמא-1:</u>

SC35 שהוא פקטור שמבקר את עצמו כך: יש לו אינטרון ובאדום מסומן ה-stop codon המקורי ואחריו 3' UTR מאוד ארוך. ה-mNA שלו עובר splicing, ותוצר הגן הוא פקטור שחבור. הפקטור הזה נקשר ל-3' UTR הארוך ויוצר שם 3 אינטרונים שקודם לא היו שם, והם מופיעים לאחר ה-stop codon המקורי. ואז ה-mRNA מכיל 3 EJC ולכן עובר דגרדציה מהירה, ואז כשכמותו יורדת אז מפסיק ה-splicing של האינטרונים ב-3' UTR והחלבון חוזר לתרגום תקין. זה מנגנון פידבק ששומר על רמה קבועה של חלבון.



©ענת עציון

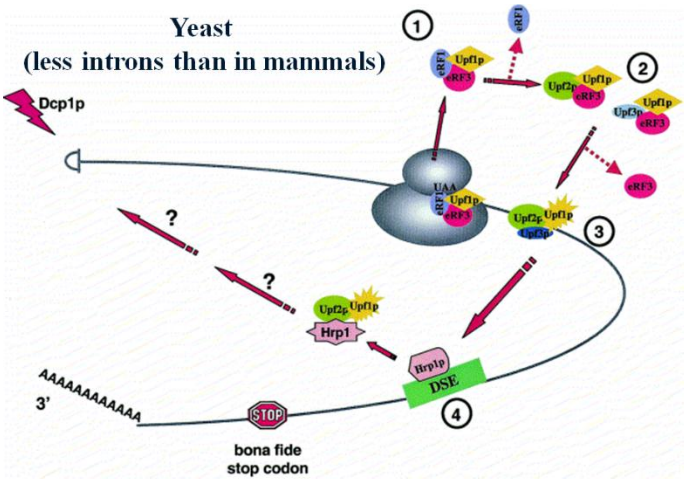


דוגמא-2:

PTB הוא פקטור שחבור שבכמות גדולה מידי הוא נקשר ל-mRNA של עצמו וגורם לדילוג על אקסון 11 (exon skipping) אקסון 10 מתקשר לאקסון 12 ומסגרת הקריאה משתנה, וזה גורם ל-stop codon חדש באמצע אקסון 12 שמצוי לפני אינטרון. וזה גורם ל-NMD, פירוק מהיר של החלבון.

התהליך בשמרים:

בשמרים אין כמעט שחבור ולכן לא ניתן להשתמש באינטרונים וב- EJC כדי לגלות mRNAs פגומים. אבל קיים מנגנון דומה: ישנו רצף שנקרא: DSE- destabilizing element שגורם לפירוק מהיר של ה-mRNA ע"י קישור חלבונים שגורמים אחרי זה לדגרדציה. אם הריבוזום נע ומגיע ל-DSE שנמצא במסגרת הקריאה, הוא "מגלח" את החלבונים הקשורים והתעתיק נשאר יציב.



שאלה ממבחן:

איזו ממולקולות ה-mRNA הבאות תהיה יציבה בתאים אאוקריוטים?

א. מולקולה המכילה cap, polyA וקודון סיום תרגום במסגרת הקריאה של התרגום. קודון הסיום ממוקם במרכזו של האקסון הראשון מקצה ה-5'.

ב. מולקולה המכילה cap, polyA וקודון סיום תרגום שאינו במסגרת הקריאה של התרגום. קודון הסיום ממוקם במרכזו של האקסון הראשון מקצה ה-5'.

ג. מולקולה המכילה cap, polyA וקודון סיום תרגום במסגרת הקריאה של התרגום. קודון הסיום ממוקם לפני האקסון האחרון לכיוון 3' ובמרחק של יותר מ-50 נוקליאוטידים מגבול האינטרון-אקסון.

ד. מולקולה המכילה שלושה אינטרונים אך חסרה cap ו- polyA.

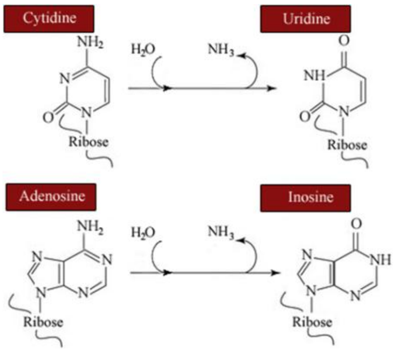
המולקולה תהיה יציבה כי קודון הסיום אינו במסגרת הקריאה ולכן הריבוזום לא מתרגם אותו.

©ענת עציון

בקרות נוספות לאחר שעתוק

עריכת RNA:

לאחר שה-RNA שועתק (או במהלך השעתוק) ולאחר תהליך השחבור, ישנה מערכת שלוקחת נוקליאוטידים מסויימים ומחליפה אותם באחרים. זה התגלה ע"י שוני בין ה-cDNA שרוצף מ-mRNA לבין הרצף ב-DNA. ברוב המקרים מדובר במודיפיקציות אבל לפעמים גם ב-indels. זה היה מאוד מפתיע כי זה לא לגמרי תואם את הדוגמה המרכזית.

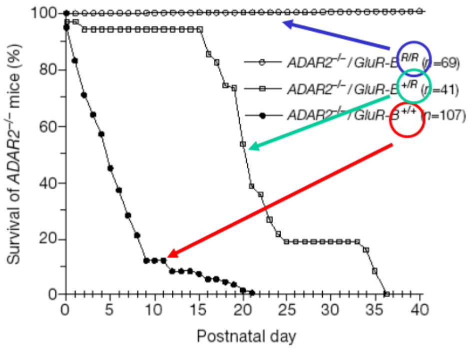


<u>דוגמאות נפוצות:</u>

- **I→A**: נוצר ע"י דהאמינציה של אדנין. קורה בחלבונים ממברנאליים ברקמות של מערכת העצבים, או בתעלות, או ברצפטורים המצומדים ל-G proteins.
- **U→C**: נוצר ע"י דהאמינציה של ציטוזין.
- ישנו RNA editing מיוחד ב-Trypanosomatids שיוצר mRNAs מיטוכונדריאליים ע"י הכנסת מקטעים גדולים של polyU.

<u>**האנזים deaminase:**</u> מוריד את קבוצות האמין מבסיסי A מסויימים, אבל לא מבסיסי A אחרים. האנזים בדרך-כלל נקשר לאזור double-stranded ב-DNA. עדיין לא ידוע היום מה קובע את הספציפיות של האנזימים.

Inosine מוכר ע"י הריבוזום-הוא מתייחס אליו כמו אל G, וזה גורם לשינוי חומצת אמינו בחלבון. זה גם יכול לשנות אתר splicing בקצה ה-3' ולגרום ל-alternative splicing.



<u>**ניסוי:**</u>

לקחו עכברים שיש בהם A שתמיד עובר דהאמינציה ל-I וביצעו מוטציות ב-mRNA שגרמו לכך שלא ניתן יהיה לבצע את ה-editing. זה גרם למוות מוקדם של העכברים. וגם גילו ש-ADAR2 הוא זה שעושה את ה-editing של הרצפטור.

<u>החלבון apo-B:</u>

חלבון חשוב שקושר כולסטרול. ישנו אלל גרוע לחלבון שלא קושר כולסטרול בצורה טובה, אלא שומט אותו ומביא להצטברות כולסטרול על כלי הדם. הפיכת C ל-U מעבירה בין שני המצבים הללו.

<u>ההיגיון האבולוציוני:</u>

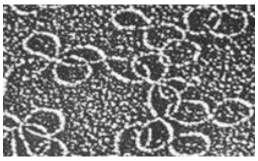
המנגנון מאפשר "לתקן" מוטציות. כאשר משווים רצפים אורתולוגים ביצורים שונים אפשר לראות שה-RNA editing מחזיר לרצף הנוקליאוטידים המקורי.

<u>מסקנה:</u> המנגנון נוצר כדי "להילחם" במוטציות.

<u>Trypanosome:</u>

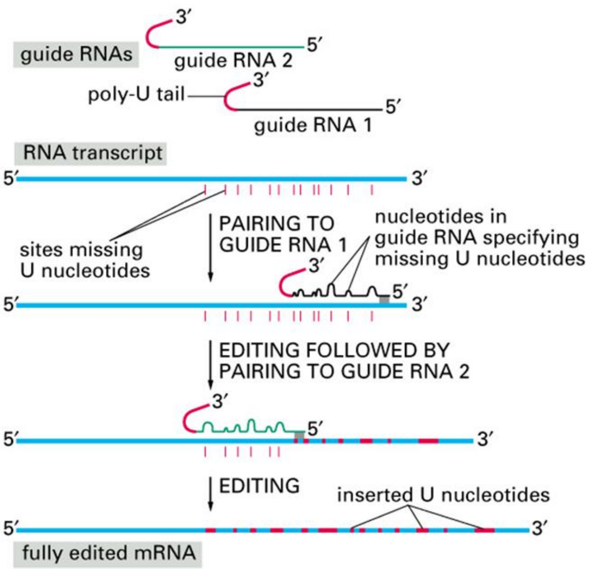
ליצורים אלה יש איבר פנימי כמו מיטוכונדריה, שיוצר את האנרגיה.
בערך 20 גנים אצלם מקודדים ע"י גנום מיטוכונדריאלי.
הם מכילים איברון נוסף בעל DNA והוא מאוד דומה לגנום שיש בכלורופלסטים של צמחים. כנראה שפעם היצורים הללו היו דומים לאצות ירוקות ועם האבולוציה הם איבדו את התכונות של הפוטוסינתזה כשנהפכו לטפילים בדם של חיידקים.

©ענת עציון



במיטוכונדריה יש כרומוזום אחד גדול ויש בו רשת צפופה של מעגלי DNA השזורים אחד בשני. כאשר משווים את רצף ה-RNA לרצף ה-DNA, הרבה מאוד נוקליאוטידים מסוג U לא מופיעים ב-DNA ואילו T/U המופיעים ב-DNA לא מופיעים ב-RNA. נעשית תוספת של U לתוך ה-RNA.
ישנם גנים שמוכנסים בהם יותר U מאשר היו במקור ב-DNA. זהו תהליך מאוד מסובך.

RNA Editing in Trypanosomes

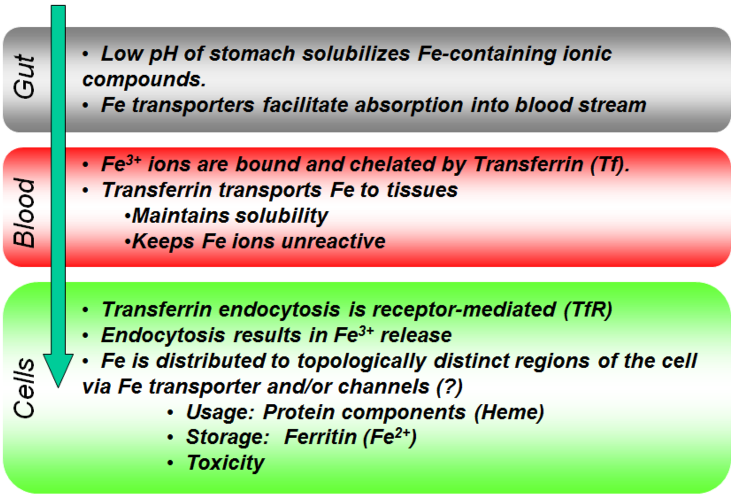


guide RNA: מתאימים לרצף mRNA אבל לא התאמה מלאה. חוסר ההתאמה הזה מקודד לשינויים שיש לבצע (ה-guide RNA מקודדים ע"י הרשת הצפופה של מעגלי ה-DNA).

זו מערכת שבה שני גנים שונים יוצרים שני RNA, ושניהם נחוצים ליצירת ה-mRNA השלם.

מטבוליזם של ברזל:

במהלך האבולוציה עלה ריכוז החמצן באוויר, ולכן זקוקים לכמות ברזל מסויימת ולא מעבר לה. ללא ברזל סובלים מחולשה ואנמיה. ולכן צריך מערכת מאוד טובה שתשמור על האיזון ועל רמת הברזל הרצוייה בדם.



בקיבה ישנו pH נמוך וזה מכניס את הברזל בצורה מסיסה ע"י טרנספורטרים, הוא נקשר ע"י חלבון טרנספרין הקושר יוני ברזל ונושא אותם לתאים אחרים. הוא גם מחזיק את הברזל באופן לא פעיל כדי שלא ייצור רדיקלים.
לאחר אנדוציטוזה משוחרר הברזל בתא ואז משתמשים בו. כאשר נוצר עודף ברזל בתא, חלבון פריטין קושר את הברזל ושומר עליו כדי שלא יוכל ליצור רדיקלים. בעודף רב מאוד של ברזל יש רעילות גדולה וביחד עם חמצן נוצרים רדיקלים.

רמת ברזל נמוכה: סינתזה של יותר רצפטור לברזל והורדת הביטוי של פריטין בתא, שלא ייִמסך את הברזל.
רמת ברזל גבוהה: התאים מורידים מאוד את כמות הרצפטורים כדי שפחות ברזל ייכנס לתא, ומעלים את הביטוי של פריטין כדי למסך יותר ברזל מתוך מה שבכל-זאת נכנס.

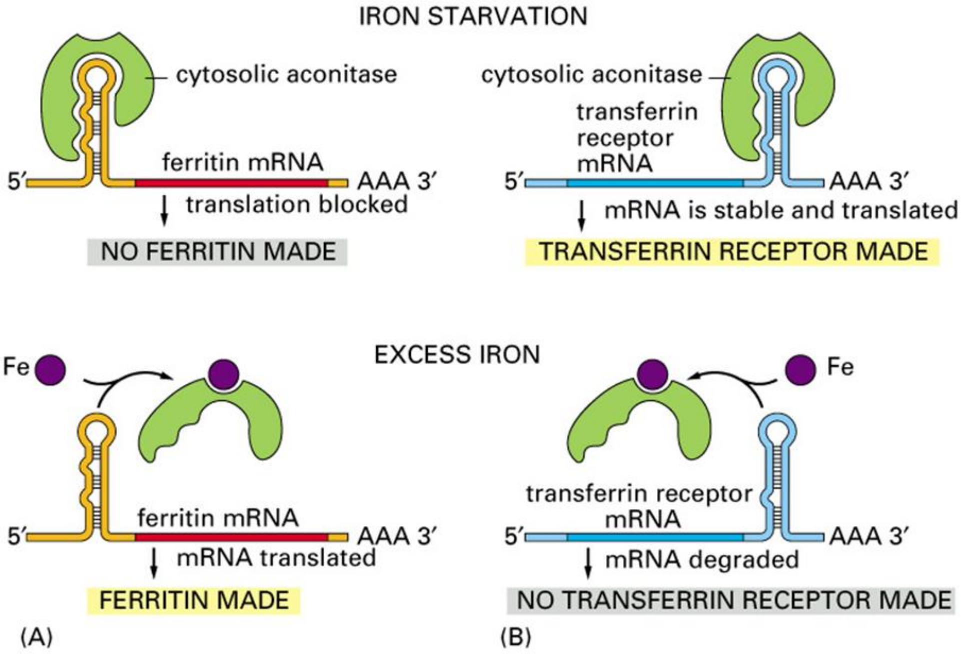
©ענת עציון

מערכת הבקרה על רמת הברזל:

IRE (Iron Response Element): רצף ב-UTR '3 וב-UTR '5 של mRNAs. הרצף יוצר לולאה שהיא אתר מטרה לחלבון ספציפי. כאשר החלבון נקשר ישנו עיכוב של התרגום (עיכוב הביטוי בשלב הממש אחרון).

מעט ברזל: ב-UTR '3 של הרצפטור לטרנספרין מופיעה הלולאה 5 פעמים. האקוניטאז נקשר ללולאות ואז ה-RNA יציב ונוצר יותר רצפטור, והתא יכול להכניס יותר טרנספרין עם ברזל פנימה. מהצד שני הוא נקשר לתעתיק של פריטין וגורם פיזית לעיכוב התרגום.

עודף ברזל: הברזל נקשר לאקוניטאז ולא מאפשר לו להיקשר ללולאה ואז יש פחות רצפטורים בתאים ויותר פריטין.



©ענת עציון