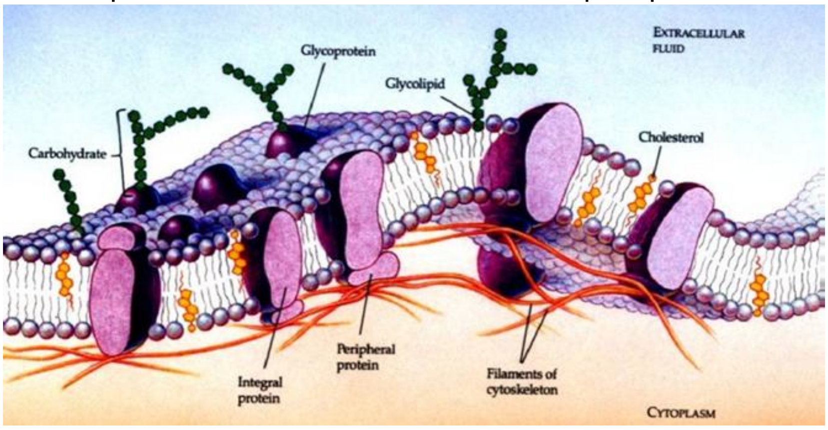
# ממברנת התא ושלד התא

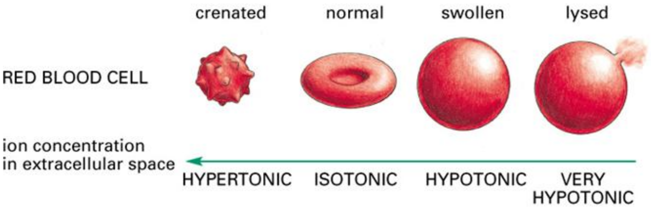
## מבנה ממברנות ביולוגיות:

הממברנה בנוייה משכבה כפולה של פוספוליפידים. יש בה כולסטרול וחלבונים, רובם חוצי ממברנה אשר קשורים אליהם מבחוץ בעיקר סוכרים ומבפנים חלבונים של השלד התוך-תאי.



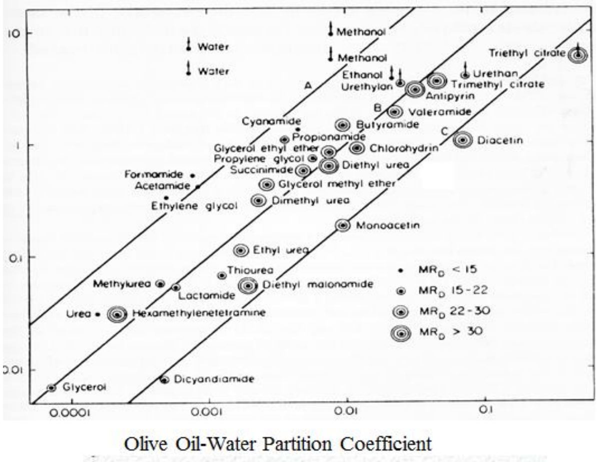

### ניסויים:

<u>מדידת קצב פיצוץ של תאים:</u> לקחו תאי דם אדומים בתמיסה איזוטונית והעבירו לתמיסה היפוטונית- מים נכנסים פנימה וגורמים לפיצוץ התא. בתאי-דם אדומים המעקב הוא מאוד נוח כי ברגע שהם מתפוצצים, הדם נהפך מנוזל אדום עכור לנוזל צלול (שאור יכול לעבור דרכו). ככל שחומרים הם חדירים יותר לממברנה, התאים מתפוצצים מהר יותר. כלומר, אפשר למדוד חדירות ע"י קצב פיצוץ התא.

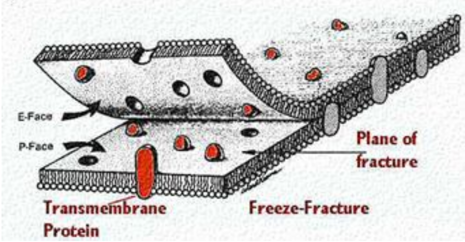



<u>חדירות הממברנה לחומרים:</u> נמצאה קורלציה בין רמת החדירות של הממברנה להידרופוביות: ככל שהחומר הוא יותר הידרופובי, כך הממברנה יותר חדירה עבורו.

היום יודעים שזה בגלל השכבה הכפולה של הפוספוליפידים.




<u>תחריט פני הממברנה:</u> לוקחים תרחיף תאים, מקפיאים אותו ושוברים אותו בוואקום. קו השבר עובר בקרח עד שהוא פוגש תא ואז קו השבירה המועדף הוא לחצות את הממברנה בין שתי השכבות. מקבלים שטח-פנים ומצפים אותו במתכת ואז מתקבל תחריט של פני הממברנה, ועליו יש גבשושיות בגלל החלבונים.

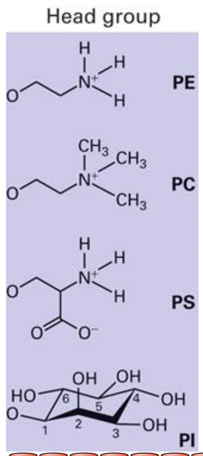



### הליפידים בממברנה:

<u>פוספוליפיד:</u> מולקולה אמפיפטית בעלת זנב הידרופובי כפול וראש המורכב מגליצרול, פוספט ושייר פולארי המשתנה לפי הפוספוליפיד.



©ענת עציון

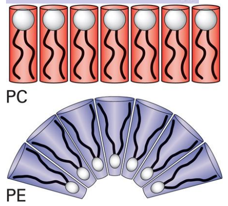



**<u>פוספטידילכולין (PC):</u>** ראש המולקולה מורכב מאלכוהול (כולין) הטעון במטען חיובי, ואילו אחד החמצנים על הפוספט בעל מטען שלילי ולכן המטען הכולל הוא אפס. הם מהווים 40% מהממברנות. הוא לא יכול להסתיר את התווך ההידרופובי ולכן לא ניתן ליצור שכבת ממברנה יציבה מתערובת שלו בלבד.

**<u>פוספטידילסרין (PS):</u>** בעל מטען ניטראלי על הראש (ולכן טעון שלילית) שמכיל סרין.

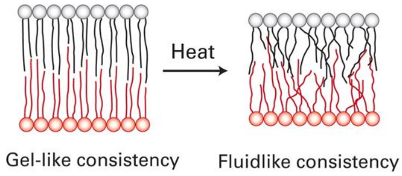
**<u>פוספטידילאינוזיטול (PI):</u>** בעל מטען ניטראלי על הראש. מכיל אלכוהול ונמצא רק ב-5% מהממברנות. הוא עובר פוספורילציה על שיירי ה-OH שלו.

<u>הערה:</u> בממברנה אין ליפידים חיוביים, כולם או ניטראליים או טעונים שלילית.




PC- שטח הראש שווה לשטח הזנבות. PE- הזנבות תופסים שטח גדול יותר מאשר הראשים. ולכן בכיפוף בממברנות, PE מתאים לחלק הקעור כי אז שטח הפנים של הראשים מתאים לשטח הפנים של הזנבות.

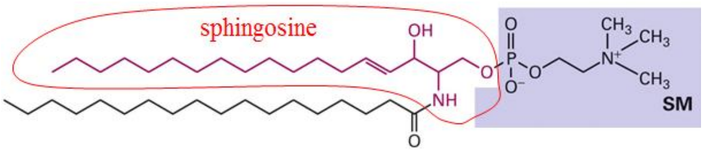
ברוב הפוספוליפידים יש לפחות קשר אחד בלתי רווי. הוא מכניס כיפוף ומוריד את נקודת הקיפאון ולכן ככל שיש יותר קשרים כפולים, הפוספוליפידים יותר נוזליים (וגם הממברנה). לתפקוד אופטימאלי- הממברנה צריכה להיות חצי נוזלית. זה נעשה ע"י ויסות כמות הקשרים הכפולים ואורך השרשראות: ככל שהשרשרת ארוכה יותר- הממברנה מוצקה יותר וככל שיש יותר קשרים בלתי רוויים, הממברנה נוזלית יותר. גם אופי הראש משפיע על כך.



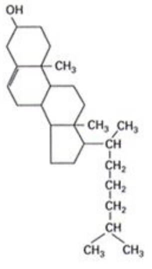

בטמפ' הגוף הממברנה במצב חצי נוזלי ואז בפנים השרשראות חופשיות לנוע. מתחת לנקודת הקיפאון, השרשראות מתגבשות במבנה מאוד מסודר ואין תנועה ואז החומרים שעוברים בדיפוזיה בד"כ לא מסוגלים לעבור דרכה.

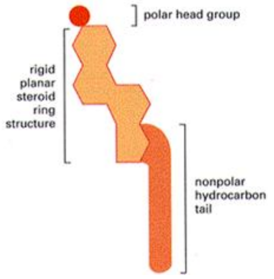
הפוספוליפידים מסוגלים להיחתך ע"י אנזימים מסוג פוספוליפאזות שמבצעים הידרוליזה לקשרים שונים. זה גורם לערעור יציבות הממברנה והופך אותה לחדירה.

**<u>ספינגוליפידים:</u>** נבדלים מהפוספוליפידים בכך שבמקום גליצרול יש להם ספינגוזין שמורכב מחנקן היוצר קשר אמידי בין חומצות השומן לפחמנים. המבנה שלהם יותר יציב והם מהווים כ-15% ממברנת הפלסמה. הם מכילים חומצת שומן אחת קבועה וראש פולארי משתנה.




**<u>גליקוספינגוליפידים:</u>** בעלי שני זנבות של חומצות שומן ובראש יש להם סוכרים. הם תורמים לכך שהחלק החיצוני של ממברנת הפלסמה עטוף בפחמימות.





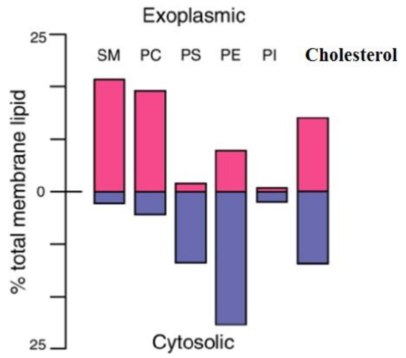

**<u>כולסטרול:</u>** סטרואיד המורכב מטבעות וחלק אליפטי. משתתף במבנה הממברנה רק בגלל הראש הפולארי שלו ורק בשיתוף עם ליפידים אחרים והוא זה שאחראי על שמירת טמפ' קבועה. הוא נכנס בין ליפידים וגורם לממברנה להיות יותר שומנית. הוא יוצר סדר בין הזנבות ההידרופוביים ומונע מהממברנה להיות נוזלית מידי. הוא מתפקד כבופר בממברנה.

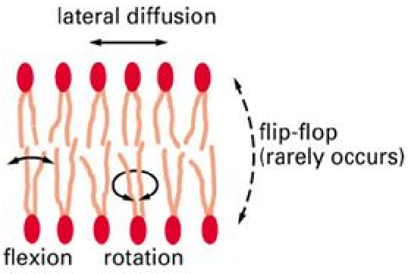
<u>הערה:</u> ניסוי הראה שככל שבממברנה יש יותר כולסטרול, הממברנה יכולה להיות חצי-נוזלית בטווח רחב יותר.



©ענת עציון

כל ממברנה מורכבת בצורה אחרת בהתאם לתפקידה. ההבדלים בין הליפידים מאפשרים יצירת סוגים שונים של ממברנות. הממברנות הן גם אסימטריות- יש הרכב שונה של ליפידים משני צידי הממברנה. PC ו-SM הם בעיקר בחוץ, PS ו-PE הם בעיקר בפנים. כולסטרול מצוי בשני הצדדים והוא לא ממש מקובע בשכבה אחת אלא עובר ביניהן ולכן ריכוזו שווה בשני הצדדים.

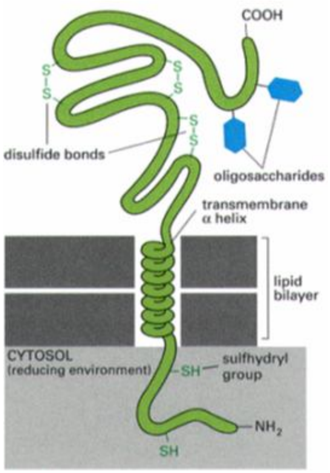



הפוספוליפידים לא מסוגלים כמעט לעבור משכבה אחת לשכבה השנייה. בשביל לעבור הם צריכים להעביר את הראש ההידרופילי שלהם דרך התווך ההידרופובי. זה נקרא: "פליפ-פלופ". האנזימים שמבצעים זאת נקראים- פליפאזות. מלבד זאת הפוספוליפידים חופשיים לנוע במישור הממברנה, השרשראות שלהם חופשיות להסתובב סביב צירן והם מקובעים רק סביב הראש.

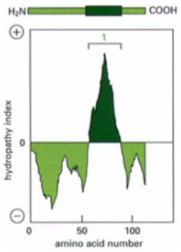
## החלבונים בממברנה:

החלבונים חוצים את הממברנה במבנה של הליקס המורכב מחומצות אמינו הידרופוביות. קטע חוצה ממברנה הוא בערך 20 חומצות אמינו באלפא הליקס בעלי שיירים הידרופוביים שפונים כלפי חוץ.




בחוץ (בממברנת הפלסמה) ישנן פחמימות וישנם קשרי S-S. פנים התא (הציטוזול) הוא סביבה מחזרת ולכן אין שם קשרי S-S.

חלבונים שעוברים בממברנה מספר פעמים יכולים להעביר סיגנאלים ע"י שינוי מיקום ההליקסים.

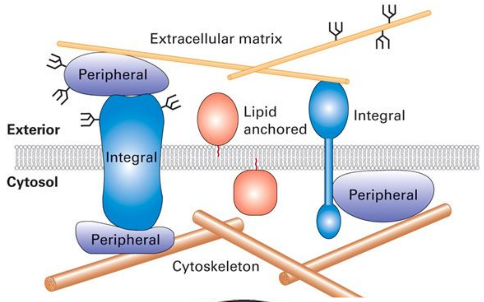



<u>זיהוי חלבונים חוצי ממברנה:</u> עושים עקום הידרופוביות. בודקים כל חומצה אמינית אם היא הידרופילית (מתחת לציר) או הידרופובית (מעל לציר). דוגמא לחלבון עם מקטע אחד חוצה ממברנה ←

<u>הערה:</u> אם לחלבון יש כמה חלקים חוצי ממברנה, רק החלקים החיצוניים שלהם צריכים להיות הידרופוביים.

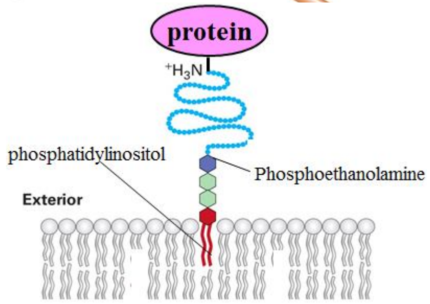
### <u>אופן עיגון חלבונים לממברנה:</u>

- <u>חלבונים אינטגרליים:</u> נמצאים בתוך הממברנה ולא ניתן להוציאם מבלי להמיס את הממברנה.
- <u>חלבונים פריפריאליים (היקפיים):</u> מעוגנים לממברנה בעזרת חלבון אחר ויכולים להתנתק ממנה ע"י ריכוז מלח גבוה או שינויי pH.



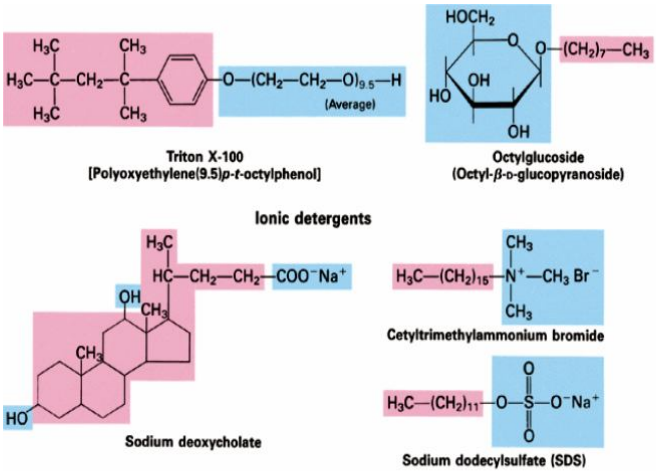

### <u>צורות קישור:</u>

- <u>זנב הידרופובי שקשור לחלבון:</u> הזנב ההידרופובי יכול להיות חומצת שומן או חומצה פרנילית.
- <u>קשר GPI מחוץ לתא:</u> מבוסס על PI שנמצא בממברנה ואליו קשורות פחמימות וחלבון מחובר אליהן דרך הצד ה-N-Terminus שלו. זהו קשר שיכול להינתק.






©ענת עציון



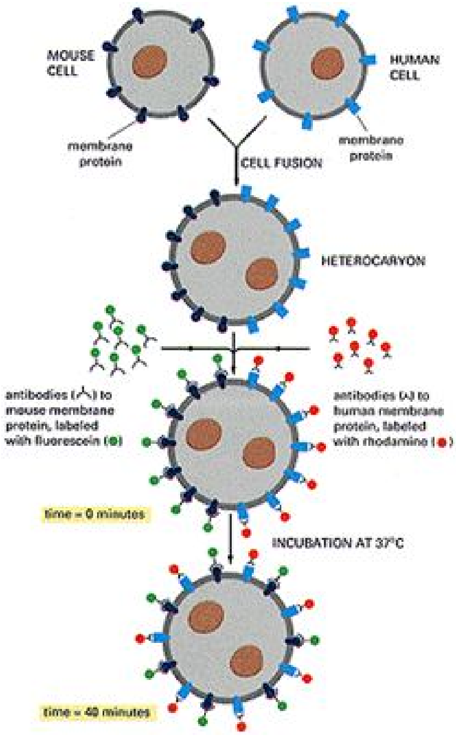

## דטרגנטים:

כדי להמס ממברנות משתמשים בדטרגנטים. יש להם חלק הידרופובי וחלק הידרופילי. ההבדל בינם לבין פוספוליפידים: הפרופורציות- בפוספוליפידים הראש קטן יחסית והזנבות בלתי מסיסים. דטרגנטים יוצרים מבנה של מיצלה, אבל הם די מסיסים במים.

אפשר בקלות להפוך פוספוליפידים לדטרגנטים: צריך להוריד להם שרשרת אחת.

<u>SDS</u>: דטרגנט חזק, ממס ממברנות. רנטורציה לאחר שימוש בו תהיה קשה.

<u>Sodium deoxycholate-ו Triton X-100</u>: דטרגנטים עדינים יותר- הם לא מפרקים את מבנה החלבון אלא מוציאים אותו כקומפלקס, ואז ניתן להחזיר אותו למבנהו המקורי ולמדוד את הפעילות שלו.




## **ניסוי על תזוזת חלבונים בממברנה:**

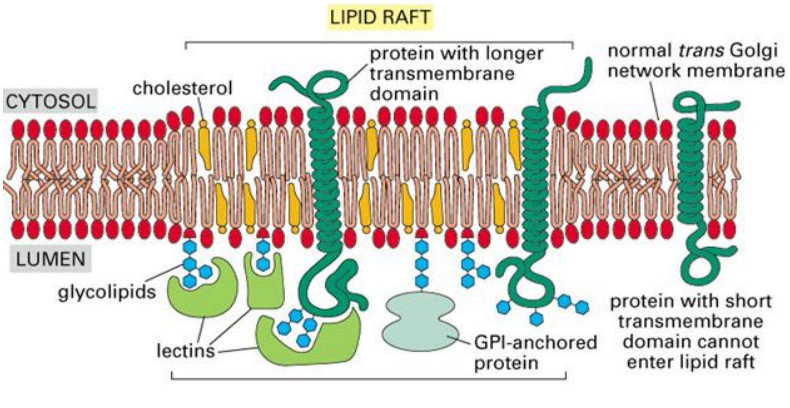
איחוי ממברנה משני תאים, אחד מאדם ואחד מעכבר. כל תא היה בעל חלבוני ממברנה מסוג אחר. משתמשים בוירוס שגורם לתא להתאחות. אם החלבונים חופשיים לנוע בממברנה אז הם יתערבבו ונקבל ממברנה אחידה. אחרת, הם יישארו נפרדים והממברנה תמשיך להיות מורכבת משני חלקים שונים. את סוגי החלבונים השונים ניתן לראות ע"י קישור נוגדנים.

**<u>תוצאת הניסוי:</u>** אחרי כשעה הממברנה מסומנת כולה בשני צבעים ולכן מסיקים כי החלבונים נעים בממברנה.

**<u>בעיות בניסוי:</u>**

- קשירת הנוגדנים יכולה למנוע את תנועת החלבונים ולכן קודם נתנו לחלבונים זמן לאחר האיחוי ורק לאחריו הוסיפו את הנוגדנים.
- איחוי התאים מצריך שינויים בתא. התברר שהוירוס מחדיר יחד איתו פרוטיאזות שמפרקות את השלד התוך-תאי. ואז החלבונים אכן חופשיים לנוע.

**<u>מסקנה:</u>** הוספת הוירוס גרמה ל-Artifact ולתוצאה שגויה.




**<u>Lipid Raft:</u>** מבנה בממברנת הפלסמה בעל הרכב חלבונים אופייני, המון כולסטרול והמון ספינגו-מיאלין. זה יוצר ממברנה יותר רחבה, פחות מסיסה ופחות נוזלית. חלבונים במבנה הם בעלי אלפא-הליקס יותר ארוך מהרגיל. חלבונים רגילים לא מסתדרים במבנה, הוא ארוך מידי בשבילם.

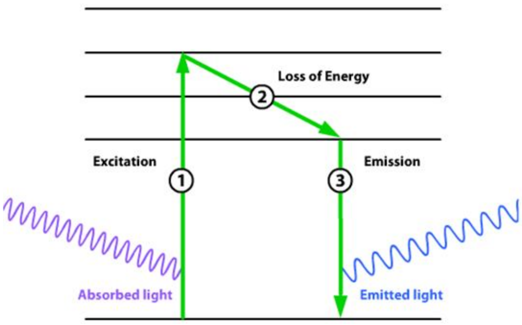
תפקידים: קישור בין תאים והעברת סיגנאלים.



©ענת עציון

# שיטות למחקר דינמיות של חלבונים:

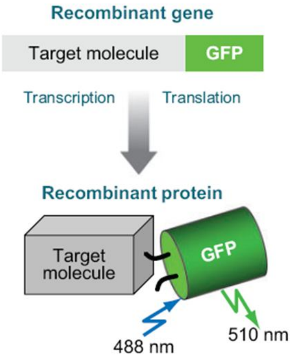
## איחוי ל-GFP:




GFP הוא חלבון פלורוסנטי- ברגע שמאירים עליו באורך גל מסוים הוא קולט את האנרגיה אליו ועובר למצב אנרגטי מעורר. זהו מצב לא יציב ואז החלבון שואף לאבד את האנרגיה הזו והיא נפלטת בצורת אור (באורך גל אחר). חלק מהאנרגיה לא ייפלט בצורת אור- יש אובדן אנרגיה.

האור שייפלט יהיה באורך גל גדול יותר. כל פעם שנקרין את החלבון הוא יעבור למצב מעורר, יפלוט אור וידעך.

בתיאוריה כל GFP יכול לעבור כמות אינסופית של מחזורים. אבל בשלב מסוים המבנה הפנימי הכימי של המולקולה נפגע והיא לא יכולה לתפקד יותר כפלאורופור. לתופעה הזו של הרס קוראים: **photobleaching.** לכל מולקולה יש טווח קליטה וטווח פליטה בעלי נקודת מקסימום (מקסימום של מולקולות שיעברו אוקסיטציה בהקרנה באורך גל זה).




**<u>השיטה:</u>** מכניסים את הגן ל-GFP לפלסמיד כאשר הוא מאוחה לגן הנבדק.

ואז נוצר חלבון שחלקו החלבון הנבדק וחלקו GFP וניתן לזהות את החלבון הנבדק ע"י הימצאות צבע ירוק של ה-GFP.

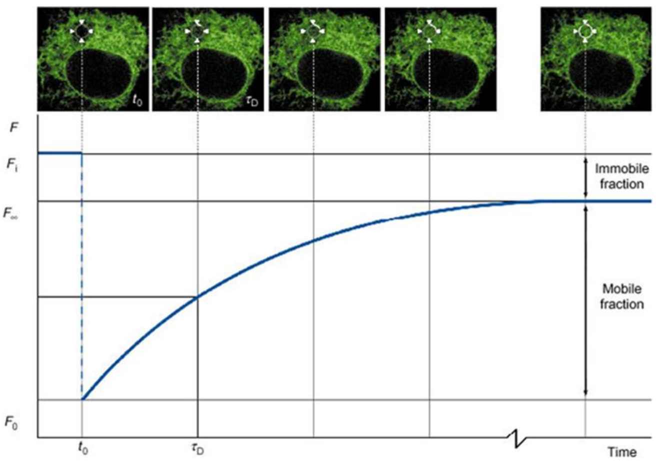
<u>הערה:</u> יצרו ווריאנטים של GFP בעלי צבעים שונים וספקטרומי קליטה ופליטה שונים. זה מאפשר לעבוד במקביל על כמה חלבונים.

## Colocalization:

צובעים שני חלבונים שונים בשני צבעים שונים. ואז מסתכלים עליהם בתא ובודקים אם יש חפיפה בין המיקום של הצבעים, אז שני החלבונים ממוקמים באותו המקום בתא.

## FRAP:

שיטה שבה מודדים את המוביליות של חלבון מסוים. מקרינים על חלבונים פלורוסנטיים במקום מסויים בתא באור חזק עד שנגרם להם photobleaching באזור זה. ואז בהתאם לקצב הדיפוזיה והתנועה של החלבון, מולקולות ישנו את מיקומן ויתערבבו עם אלה שנהרסו. מדידת הזמן שלוקח לאזור להחזיר לעצמו את יכול הפלואורסנציה היא אינדקציה למוביליות של החלבונים.




<u>Mobile fraction:</u> % המולקולות שהוחלפו ע"י אחרות.

<u>Immobile fraction:</u> % המולקולות שלא הוחלפו (לא מוביליות).

<u>שיפוע:</u> קצב ה-recovery.

**<u>סוגי חלבונים מקובעים:</u>**

- חלבוני ממברנה שהדיפוזיה שלהם מוגבלת.
- חלבונים הקשורים לשלד התוך-תאי לא יכולים לנוע בכלל.
- חלבונים הבנויים מתת-יחידות גדולות נעים בדיפוזיה בקצב מאוד איטי.



©ענת עציון

**:FRET**

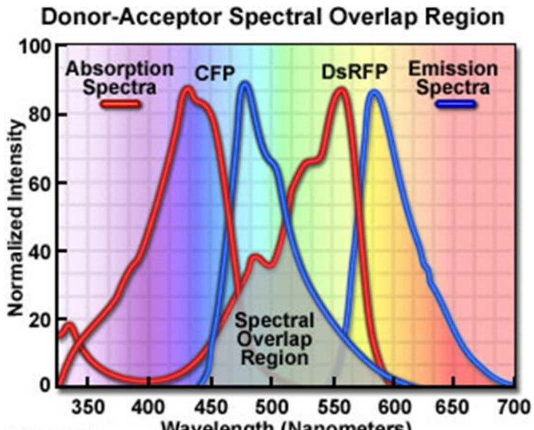


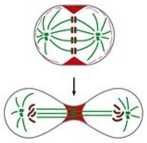
Figure 4

שיטה לבדיקת אינטראקציה או קרבה בין חלבונים. מחברים לכל אחד מהחלבונים מולקולת פלואורופור שונה. שני הפלואורופורים צריכים לקיים: עירור ע"י אורך גל שונה לחלוטין וגם ספקטרום הקליטה של ה-donor צריך לחפוף באופן משמעותי לספקטרום הקליטה של ה-Acceptor.

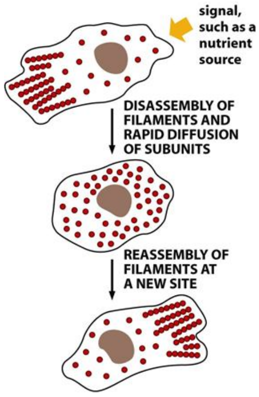
מקרינים באורך גל המתאים לספקטרום הקליטה של ה-Donor. בקרבה מספקת: האור שיפלט יהיה מה-Acceptor ולא מה-Donor. כאשר המולקולות רחוקות, פליטת האור תהיה של ה-Donor.

# השלד התוך-תאי:

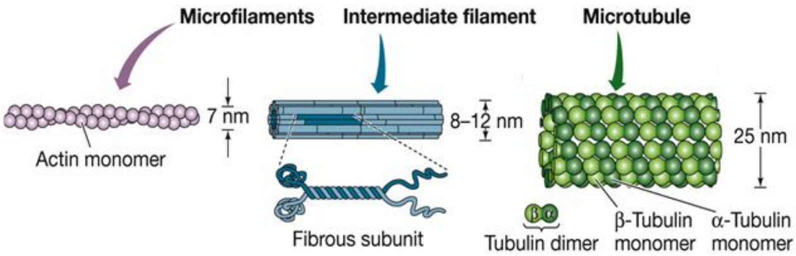
3 סוגי סיבים מרכיבים את השלד התוך-תאי: סיבי אקטין, מיקרוטובולס וסיבי-ביניים. לסיבים יש דינמיות המאפשרת להם להתפרק ולהיווצר במהירות. זוהי גמישות בתגובה לשינויים בתא.



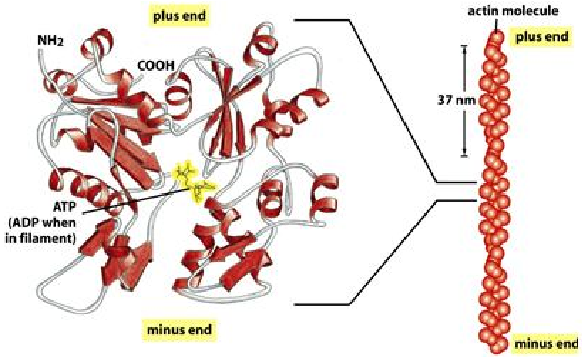
**דוגמא:** במהלך חלוקת תאים, סיבי התא נותנים כיווניות וחוזק מסוים. המיקרוטובולס וסיבי האקטין גם נותנים צורה מעוגלת שעוזרת להתחלק. ואח"כ ישנם סיגנאלים אחרים שע"י סיבים עוזרים לארגן מחדש את מבנה התא.




כל הסיבים מורכבים מתת-יחידה קטנה שחוזרת על עצמה. דיפוזיה של תת-יחידות קטנות אפשרית יותר מאשר של סיב גדול. ואז עם קבלת סיגנאל, סיב יכול להיבנות מתת-יחידות שהגיעו למקום זה.




**אקטין:**



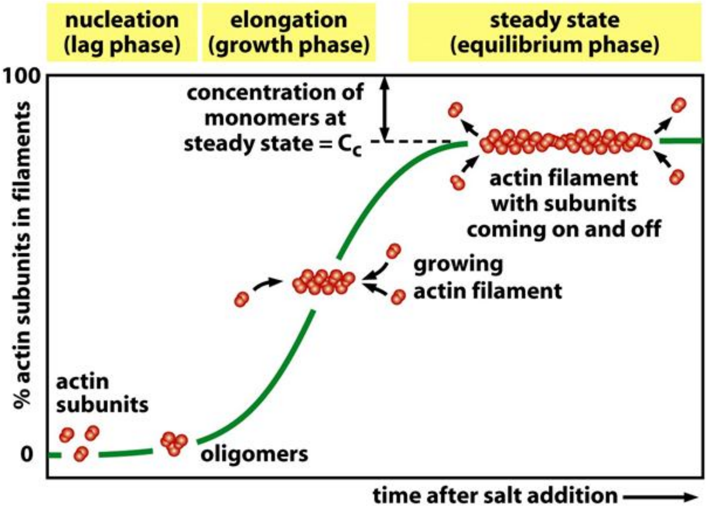

הסיבים הדקים ביותר בתא שיוצרים רקמות חיבור ויש להם יכולת לזחול בגלל הפולימריזציה של האקטין. אחראים על ייצוב הממברנה ומפעילים כוח ליצירת תנועה. בשכבת תאי האפיתל האקטין יוצר צורה מיוחדת לתא על-מנת להגן על השכבה שמתחת לממברנה. האקטין מעוגן לממברנה באמצעות adherens junctions שמקשרים ביניהם ומקנים לתא חוזק וגמישות.

האקטין הוא פולימר של יחידה אחת הנקראת: G-actin. הוא מתארגן למבנה של סליל כפול עם כיס ל-ATP.

הסיב עצמו בנוי משתי שורות של מולקולות שמלופפות אחת על השנייה. לחלבון הגלובולארי אתר שקושר ATP ואתר נוסף שקשור מיוזין (שהוא ה"מנוע" לתנועה).



©ענת עציון




בפלמור האקטין אין השקעת אנרגיה. מה שיגרום לתת-יחידות לעבור פולימריזציה זה הריכוז שלהן והתנגשות של מולקולות במרחב. כדי להתייצב, זוג מולקולות צריך לפגוש מולקולה שלישית. גרעין של 3 תת-יחידות הוא גרעין יציב שניתן להתפלמר עליו. זהו השלב הקובע-מהירות, (שלב-lag) ואז הריאקציה נוטה לכיוון התחברות אל הסיב.

הסיב מתפלמר עד שהוא מגיע לריכוז מסוים. ב-steady state הזה יש פלמור בקצב הזהה לקצב הפירוק.

<u>**הריכוז הקריטי:**</u> ריכוז התת-יחידות החופשיות בו הסיב מתחיל להתפרק.

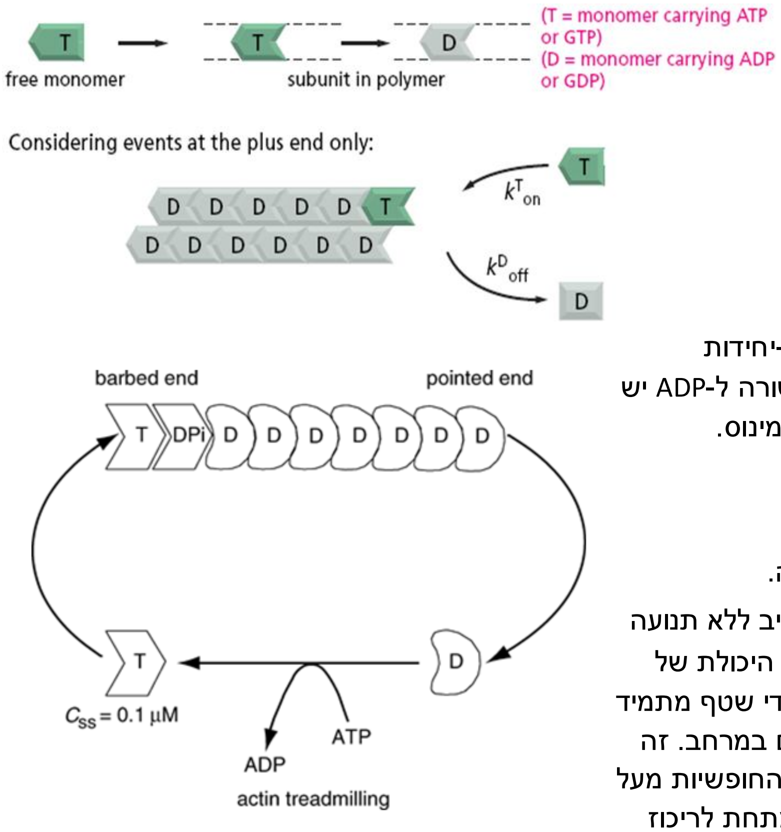
<u>**קצב התנתקות:**</u> מולקולה בסיב תתנתק לפי האפיניות שלה לסיב (ריאקציה מסדר ראשון)- $K_{off}$.

<u>**קצב פלמור:**</u> הקצב שבו יחידות יתחברו לסיב תלוי בריכוזן בתמיסה- $K_{on}$.

בריכוז הקריטי: $K_{on}[C_c]=K_{off}$

<u>הערה:</u> אם מוסיפים קטעים קצרים של גרעין הפלמור (f-actin) אז אין את שלב ה-lag ויש פולימריזציה מיידית שלהם. הסיבה היא שקשה ל-G-actin להתארגן בהתחלה אבל קל להם להאריך סיב קיים.

התת-יחידה החופשית נמצאת בקונפורמציה מסויימת ובכניסה לסיב הקונפורמציה משתנה. באזור שהשתנה- האפיניות גבוהה יותר ויתפלמרו עליו יותר תת-יחידות (בקצה הפלוס).




אקטין וטובולין יכולים לקשור ATP או GTP. כשהמולקולה נכנסת לסיב, היא קשורה ל-ATP וכשהיא נכנסת היא עוברת הידרוליזה ונשארת קשורה ל-ADP. כשהיא קשורה ל-ATP- הסיב באפיניות גבוהה יותר בצד הפלוס. ולכן יגיעו עוד תת-יחידות ובצד הפלוס יהיו יותר תת-יחידות הקשורות ל-ATP. תת-יחידה הקשורה ל-ADP יש לה נטייה להתנתק כשהיא בצד המינוס.

<u>T:</u> קשור ל-ATP.

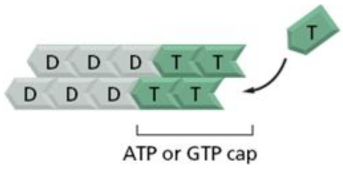
<u>D:</u> נשאר קשור רק ל-ADP.

לשני הקצוות יש ריכוז קריטי שונה.

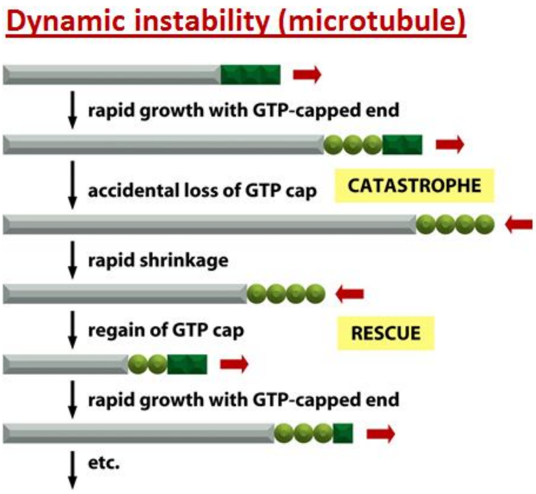
<u>**Treadmilling:**</u> התקדמות של הסיב ללא תנועה שלו. קורה רק בנוכחות ATP. זוהי היכולת של הסיב לשמור על אורך זהה תוך כדי שטף מתמיד של תת-יחידות דרכו. הוא מתקדם במרחב. זה ימשיך כל עוד ריכוז התת-יחידות החופשיות מעל הריכוז הקריטי של הצד הפלוס ומתחת לריכוז הקריטי של הצד המינוס.



©ענת עציון




**:ATP/GTP cap** בהתפלמרות מהירה מספיק נקבל אזור של כמה יחידות עם ATP ואז נוצר cap. ואז לקצה הפלוס תהיה אפיניות גבוהה יותר.



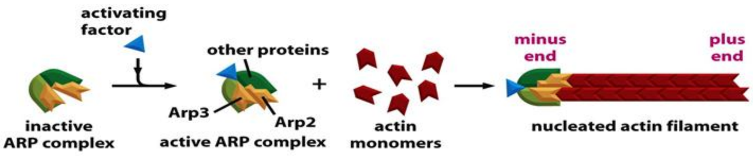

**:Dynamic instability** כאשר הפלמור גבוה מקצב ההידרוליזה נוצר ה-cap. ואילו כאשר קצב ההידרוליזה גובר על קצב הפלמור אז יש תת-יחידות עם ADP גם בקצה הפלוס ואז גם בו מתחילה נטייה להתפרקות.

**"קטסטרופה":** הסיב מתחיל להתקצר גם בצד הפלוס.

**"Rescue":** נוסף ATP בצד הפלוס ויש פלמור מחדש.

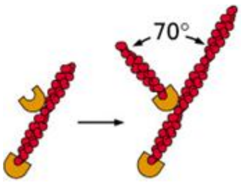
הערה: יש במנגנון הזה אובדן אנרגיה אך כנראה שמבחינה אבולוציונית זה משתלם לשמור על מנגנון שמאפשר דינמיות במבנה הסיבים.

**:Actin Binding Proteins** ישנם הרבה חלבוני עזר לשלד התוך-תאי.

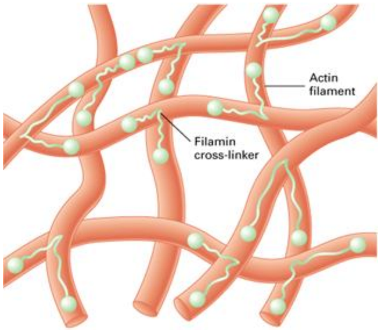



**:Nucleating proteins** חלבונים שמביאים למצב של "גרעין" וחוסכים את שלב ה-lagging. אלה חלבונים במבנה של 7 תת-יחידות.

Capping חוסם התקצרות והתארכות.



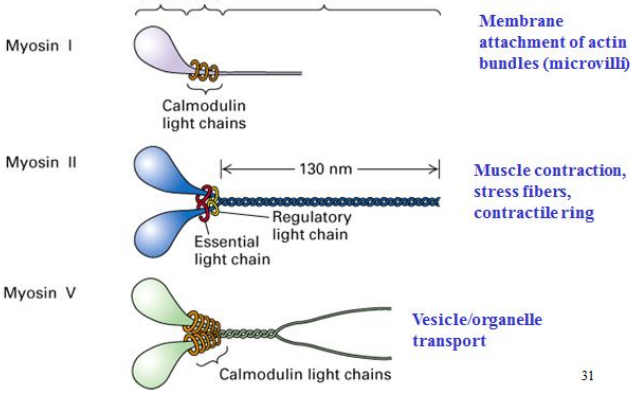

לקומפלקס יש יכולת להתיישב על סיבים קיימים של אקטין. זה גורם ל-branching, יצירת ענפים מסיבי אקטין קיימים. מצד אחד הוא יוצר התארכות ומצד שני הוא חוסם התארכות בצד שבו הוא נמצא. יצירת הענפים חשובה ליצירת רשת שמניעה את התא קדימה.




**:Cross-linking proteins** האקטין לא נמצא בתא במצב של סליל כפול, אלא הסלילים יוצרים צילובים או רשתות מכמה סיבים. הדבר נקבע ע"י המרחק בין החלבונים וה-cross linking domain.

הקצרים יותר (facsin, fimbrin) יוצרים צרור. הגמישים יותר יכולים ליצור מבנה הדומה לג'ל.

## רשתות אקטין ותנועת תאים:




המיקרופילמנטים (סיבי האקטין) בעיקר משמשים לתנועה, אבל גם לקביעת צורה. וזאת ע"י מנועים הנקראים: מיוזין.

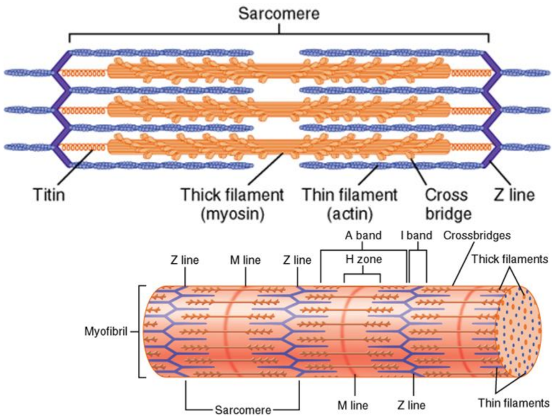
מיוזין I: משמש בעיקר כדי להזיז את סיבי האקטין יחסית לממברנות- הזנב שלו נקשר לממברנה והראש נע על-גבי סיבי אקטין.

מיוזין II: משמש לתנועה בשרירים.

מיוזין V: משמש להזזת שלפוחיות, הזנב נקשר לשלפוחית והראש (הכפול) נע על-גבי סיב אקטין.



©ענת עציון

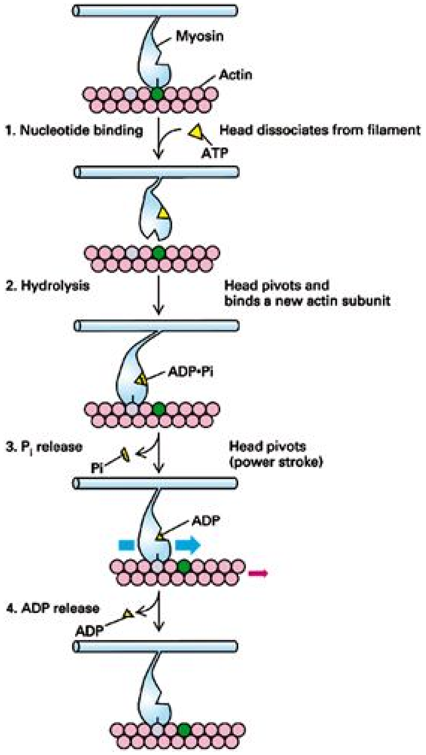



**<u>התכווצות שרירים:</u>**

כשהשריר מתכווץ הוא נעשה קצר יותר ועבה יותר. מנגנון ההתכווצות בנוי מסיבי אקטין ומיוזין. היחידה הבסיסית של המנגנון נקראת: **סרקומר**. ה-Z-line בנוי מחלבונים. סיבי האקטין קשורים ל-Z line והם פונים למרכז.

כל סיב מיוזין יש מסביבו מיוזין ו-6 אקטינים. הסיבים יכולים להתקצר או להחליק אחד על-גבי השני. התקרבות שני Z- line אחד לשני היא שגורמת להתקצרות השריר.

**<u>מעגל המיוזין II:</u>**




כשהמיוזין לא קשור ל-ATP יש לו אפיניות מאוד חזקה לאקטין. במעגל ישנם הרבה שינויים בקונפורמציה שגורמים לשינוי באזור הבקרה שקשור לאקטין ולכן מזיזים את האקטין.

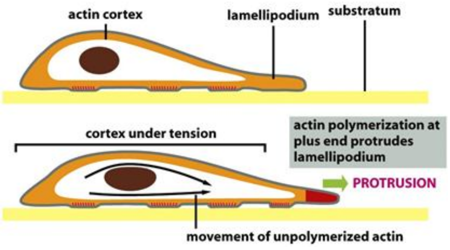
לראשי המיוזין יש פעילות של ATPase, הוספת אקטין מגבירה את הפעילות שלהם.

כאשר הראש נקשר לסיב האקטין, אין באתר ADP או ATP. ברגע שנקשר ATP הראש משתחרר מהסיב אקטין. נעשית הידרוליזה שלא כרוכה באובדן אנרגיה. לאחר-מכן הראש שוב נקשר לאקטין. בשלב השחרור של ה-Pi מתבצע "שלב הכוח"- הראש הקשור מזיז את סיב האקטין.

בכל מחזור של תנועה המיוזין משתחרר מסיב האקטין. הסיבה לכך היא שלמיוזין יש הרבה ראשים שהולכים על-גבי סיב האקטין ולכן זה לא מפריע שאחד מהראשים משתחרר. זה מאפשר תנועה מהירה יותר בניגוד לחלבונים פרוססיביים.

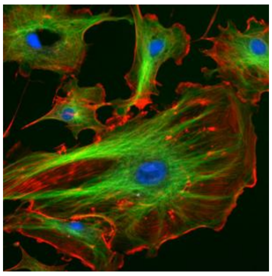
<u>ריגור-קומפלקס ("קשיון-מוות"):</u> ללא ATP המיוזין נשאר קשור לאקטין ויש שרירים צפודים.

**<u>Cell locomotion:</u>**




תא שזוחל שולח שלוחה חסרת אברונים-lamellipod והיא אשר גוררת את התא. יש בה רק אקטין. התנועה שלה נעשית ע"י צמיחה של סיבי אקטין (מיוזין לא מעורב כאן). הסיבים צומחים ודוחפים את הממברנה שלפניהם.

כדי שהוא יוכל להתקדם ישנם "כפתורי הצמדה" דרכם התא נצמד למצע שעליו הוא זוחל. ה-lamellipod נאחז במצע ומושך את עצמו ע"י התכווצויות של מיוזין וכך התא נמשך אחריו.



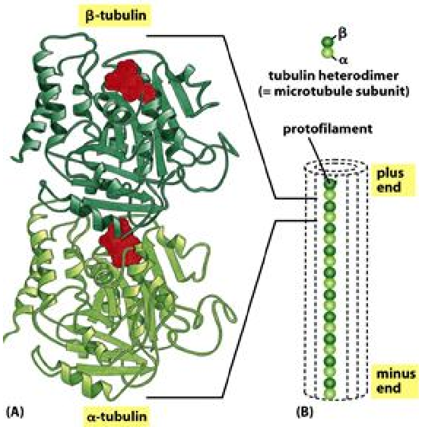
<u>פאלואידינים- כלי מחקרי:</u> חלבונים קצרים שניתן לצמדם לנגזרת של GFP ולהזריק אותם לתאים חיים/מתים. זה מביא לעצירת הפלמור של האקטין וצובע את סיבי האקטין בנקודת זמן מסויימת.

מאפשר ללמוד על מיקום סיבי האקטין בתא אבל לא ניתן ללמוד מכך על הדינמיקה כי היא נעצרת.



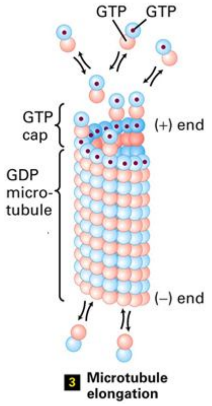
©ענת עציון

## מיקרוטובולס:

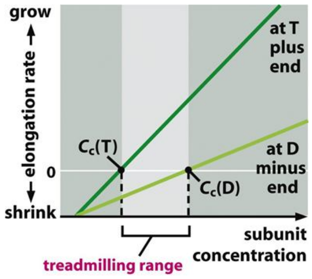



נמצאים בכל התאים ומשמשים בעיקר כמערכת הסעה בין מרכז התא לשאר האזורים. מרכיבים את כישור התא בזמן המיטוזה. הם משמשים בעיקר כמערכת הסעה בין מרכז התא לשאר האזורים. טובולין הוא דימר המורכב מ-2 תת-יחידות: $\alpha$ ו- $\beta$, הקושרים GTP. תת היחידה $\beta$ פונה לכיוון החיובי וה-GTP הקשור אליו עובר הידרוליזה במהלך פילמור הסיב (ה-GTP ב- $\alpha$ לא מתפרק). יצירת הסיב היא לאורך ולרוחב עם 13 דימרים בסיבוב כאשר לקצה הפלוס של הסיב אפיניות גבוהה יותר.

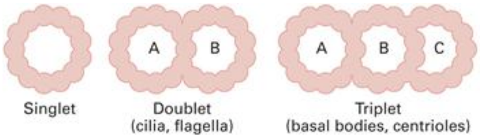
**פרוטופילמנט:** סיבון אחד בתוך הסיב הגדול. נוצר בצורה סלילית ולא כחוט ארוך בבת-אחת.



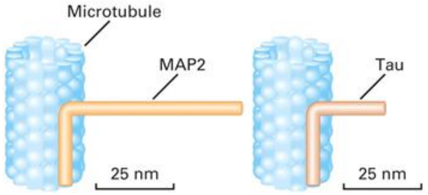

גם בטובולין ישנו capping ע"י תת-יחידות קושרות GTP בקצה הפלוס שמגדילות את האפיניות של הקצה. וגם כאן ה-GDP-טובולין בקצה המינוס נוטה להתפרק מהסיב.




גם כאן קיים **Treadmilling**: כאשר הריכוז הוא מעל הריכוז הקריטי של הקצה הפלוס ומתחת לריכוז הקריטי של הקצה המינוס.

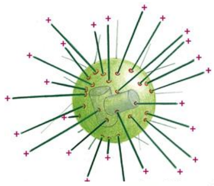



מיקרוטובולס יכולים להגיע במספר מבנים. המבנה הבסיסי ביותר נקרא סינגלט והוא מורכב מ-13 דימרים בהיקף. איחוי של שני סינגלטים יוצר דובלט (בפלגמנטים) ואילו 3 יוצרים טריפלט (בצנטריולות). המבנים האלו מאוד יציבים.

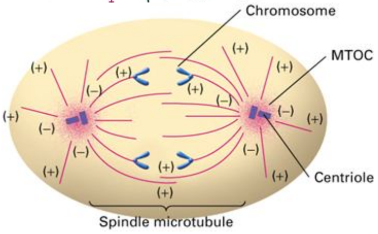



פלגמנט של מיקרוטובולס מורכב מדובלטים במעגל, כאשר במרכזם דובלט נוסף. מספר חלבונים אחראים על סידור סינגלטים מצולבים ועל המתרחש ביניהם. חלבון מסוג MAP2 גורם להם להיות יותר רחוקים וחלבון מסוג tau גורם להם להיות יותר צפופים.

כל המיקרוטובולס בתא מסודרים על-גבי מרכז מיוחד הנקרא: MTOC הנמצא סמוך לגרעין ויושב על הגולג'י. במרכזו נמצא הצנטרוזום שמארגן את כל המיקרוטובולס שכן הוא מהווה מרכז הנוקליאציה וממנו מתחילה הסינתזה שלהם.



**צנטרוזום:** הוא בד"כ ה-MTOC העיקרי והוא משוכפל במיטוזה. הוא מגדיר את מרכז התא. המיקרוטובולס צומחים מטבעות שגם הן עשויות מטובולין. בתא יש כל הזמן עודף של טובולין חופשי ולכן ברגע שחותכים את הצנטרוזום, הוא מתארגן מחדש.

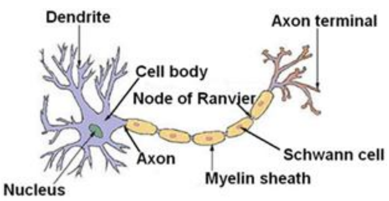



בתוך הצנטרוזום מצוי זוג **צנטריולים**. במהלך המיטוזה הצנטריולים מכפילים את עצמם וע"י המיקרוטובולס נודדים לשני הקטבים ואז מתרחשת המיטוזה.

הערה: בתאים עם זנב יש גופיף נוסף הנקרא: basal body שמהווה MTOC נוסף לסיבים שמרכיבים את הזנב.

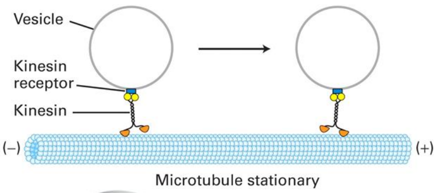


©ענת עציון

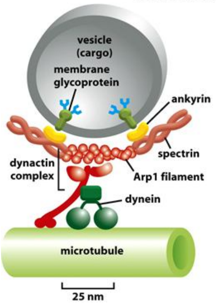



השלד התוך-תאי (חוץ מאשר סיבי-הביניים) מהווה גם מסלול עליו מובלים אברונים שונים (בייחוד שלפוחיות). לתא עצב יש גוף ויש לו שלוחה הנקראת: אקסון. כל אברוני התא נמצאים בגוף ולא בשלוחה. איך חלבונים שמיוצרים בגוף התא מגיעים לקצה האקסון בזמן סביר? ניסויים הראו שחלבונים שונים נעים בקצב שונה וישנן קבוצות חלבונים שנעות ביחד- הגיעו למסקנה שהחלבונים ארוזים איכשהו ומוסעים לאורך האקסון.

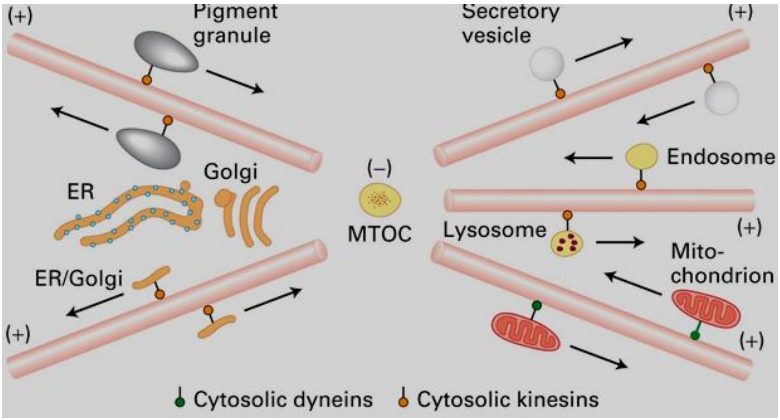
במיקרוסקופ הבחינו בשלפוחיות המוסעות על-גבי סיבי טובולין. המסילות הולכות לאורך כל האקסון והן דו-כיווניות. החלבונים לא נעים בדיפוזיה, אלא הם מוסעים. הכיוון נקבע לפי הפולאריות של המיקרוטובול. קיימים שני סוגים של <u>motor proteins</u>, כל אחד מהם מניע את השלפוחית לכיוון אחר:




**<u>קינזין:</u>** נע בכיוון החיובי (מהמרכז לפריפריה). התנועה מתבצעת ע"י 2 ראשים שמפרקים ATP ויוצרים את התנועה. אזור הזנב קושר את הווסיקולות. הראשים הולכים תמיד כשראש אחד קשור והראש השני נשלח קדימה. בניגוד למיוזין הם אף-פעם לא ניתקים בזמן ההליכה (תהליך פרוסיבי). שלב הכוח אינו פירוק ה-ATP, אלא שחרור ה-ADP ו-Pi.




**<u>דינאין:</u>** נע בכיוון השלילי (אל מרכז התא) ומשתמש באקטין בכדי לעגן את הווסיקולה. זהו חלבון יחסית גדול. מנגנון פעולתו דומה לזה של הקינזין.




## <u>רעלים הפוגעים באקטין וטובולין:</u>

**<u>ציטוכלזין:</u>** נקשר לקצה הפלוס של סיב האקטין וחוסם את התארכותו או התקצרותו בקצה החסום. מביא לבעיה בחלוקת תאים ובמורפולוגיה שלהם. פיתרון: אכילת סטייק-נא- יש בו הרבה סיבי אקטין, המעכב ייקשר רק לחלק מהם.

**<u>פאלואידינים (המשמשים גם למחקר):</u>** נקשרים לכל סיב האקטין ולא רק לקצה ומייצבים אותו במצב מסויים ללא התארכות או התקצרות.

**<u>קולכיצין, וינבלסטין:</u>** קושר יחידות של טובולין חופשי ומונע את הפלמור שלהן. תא כזה לא מסוגל להיכנס למיטוזה ומבצע אפופטוזיס (משמש כתרופה לסרטן).

**<u>טקסול:</u>** נקשר לסיבי טובולין ומונע מהסיבים להתפרק. מבחינת התא זה גם פוגע במיטוזה וגורם לאפופטוזיס.

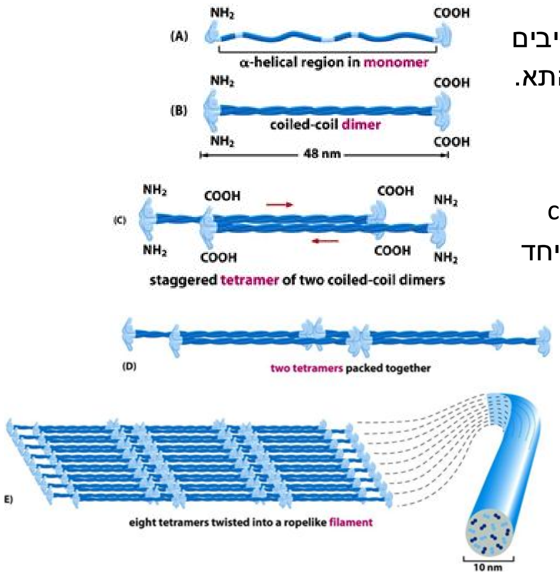
**<u>נוקודאזול:</u>** נקשר למיקרוטובולס ומונע כניסת התא למיטוזה, עוצר את התאים לפני שלב זה.

<u>הערה:</u> תאים סרטניים יותר רגישים לרעלים אלה כי הם מתחלקים יותר, יוצרים גרורות וזזים.



©ענת עציון

## סיבי הביניים:




לא קיימים בכל האורגניזמים ולא מצויים בכל התאים, ובניגוד לסיבים האחרים, אין להם פולאריות ולכן הם לא מעורבים בתנועה של התא. תפקידם העיקרי לתת חוזק ולהוות שלד לתא.

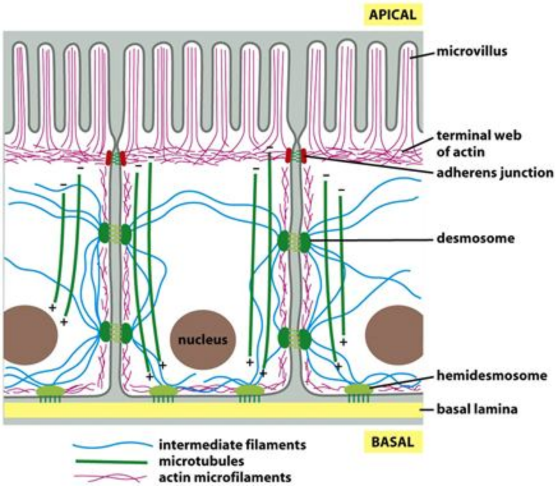
בהתחלה מסונתז מונומר, שני מונומרים יוצרים ביחד: coiled coil כאשר צד C וצד N במקביל אחד לשני. שני דימרים מתחברים ביחד ליצירת טטראמר.

שני זוגות טטראמרים יוצרים סיב חזק יותר ולבסוף 8 זוגות טטראמרים יוצרים ביחד את הסיב. נוצר מבנה מאוד חזק וסימטרי. זהו מבנה השלד.

סיבי קרטין (שהם סוג של סיבי-ביניים) הם המרכיב העיקרי בשערות, ציפורניים וקשקשים. אלה רקמות מתות שצריכות להיות חזקות. הם מתאפיינים בקשרי S-S המייצבים את המבנה ויוצרים קשר בין התאים. בשלוחות של תאי עצב, החוזק של האקסונים מתקבע בעזרת ה-IF.

ישנן מחלות גנטיות בהן סיבי-הביניים פגומים ואז העור נקרע בקלות.

## שלד תוך-תאי ברקמת האפיתל:




ברקמת האפיתל ישנם 3 סוגי הסיבים.

סיבי האקטין נמצאים במיקרווילים.

סיבי-הביניים נמצאים בכל הרקמה ונותנים לה עמידות כנגד כוחות מתיחה.

ומיקרוטובולס הנמצאים בה לא מאורגנים כיוצאים ממרכז.



©ענת עציון

# מדורי התא האאוקריוטי ומנגנוני הסעת חלבונים

## הקדמה:

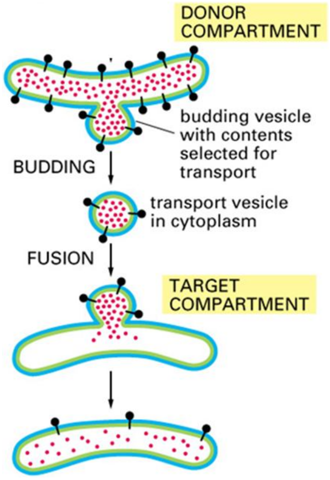
יש שני מקומות עיקריים בהם חלבונים מסונתזים:

1. בציטוזול על ריבוזומים חופשיים.
2. בריבוזומים שאחוזים בממברנות- בעיקר ב-ER וגם על ממברנת הגרעין שהיא המשכית ל-ER.

המקום הראשון שהחלבונים מגיעים אליו הוא ה-ER, משם הם עוברים לגולג'י וממנו לליזוזומים או לממברנת הפלסמה כדי להיות מופרשים אל מחוץ לתא. חלבונים המסונתזים בציטוזול נשארים חופשיים בציטוזול או מגיעים לגרעין או מגיעים למיטוכונדריה.

ER ⟶ Golgi ⟶ Lysosomes; PM; Large Vacuole of plants.

אחד הדברים שגורמים לכך שהחלבון יגיע ליעדו הוא קוד המובנה במסגרת הקריאה הפתוחה של החלבון הנקרא: **סיגנאל**, והוא אשר קובע לאן החלבון הזה יגיע במהלך הסינתזה שלו, ולאן הוא ימשיך אחריה. הסיגנאל והמסע שהחלבון עובר משפיעים על השינויים שהוא עובר. זהו מסלול ביוסינתטי של מערכת ההפרשה. הוא נקרא כך כי רוב החלבונים המופרשים אל מחוץ לתא מסונתזים במסלול הזה.




**וסיקולות:** הדרך שבה החלבונים עוברים היא ע"י ניתוק חלק ממברנאלי מאורגנלה בה הם נמצאים, הווסיקולה נעה לאיבר המטרה ובהגעה אליו, מתאחה עם הממברנה שלו ותוכנה נשפך פנימה.

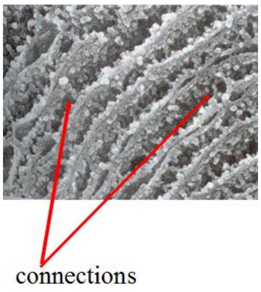
**שמירה על טופולוגיה:** הטופולוגיה של חלבוני הממברנה במסע נשמרת, כלומר: חלבונים שפונים לציטוזול באורגנלה אחת, ימשיכו לפנות לציטוזול גם לאחר האיחוי עם איבר המטרה וגם לאחר איחוי עם ממברנת הפלסמה.

<u>הערות:</u>

- הטרנספורט בין האורגנלות הוא דו-כיווני כדי לשמור על שלמות הממברנות וגם כדי להחזיר חלבונים למקומות מסויימים.
- ישנם גם ליפידים וגם סוכרים מאוד מורכבים אשר מועברים במערכת הזו, כאשר יש איחוי של הממברנות.

## ה-ER וטרנספורט תוך כדי תרגום:

ממברנת ה-ER מחוברת לממברנת הגרעין בצורה רציפה. רוב שטח הפנים שלה מכוסה בריבוזומים- ה-Rough ER וזהו למעשה ההבדל בינו לבין ה-Smooth ER. היחס ביניהם משתנה מתא לתא לפי תפקוד התא.

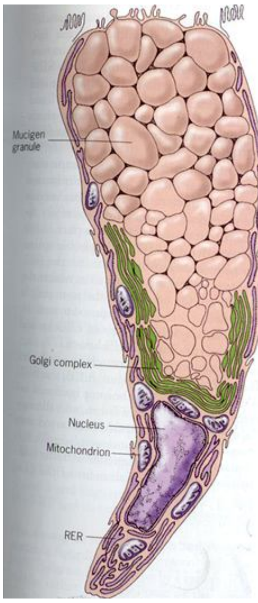



**מבנה:** מערכת של ממברנות פנימיות שמתארגנות כשקיקים שטוחים/ציסטרנות/צינוריות. בין הציסטרנות יש קשר רציף והריבוזומים נמצאים משני צידי הציסטרנה.

**SER:** גם לו יש תפקידים ייחודיים לו: ההורמונים הסטרואידיים נוצרים בו בגונדות, הוא משמש כמאגר של $Ca^+$ שמשתחרר בתגובה לסיגנאל חיצוני והוא גם עוזר להתכווצות שרירים. יש בו גם חלבונים המתפקדים בסילוק רעלים ולכן יש הרבה SER בכבד.



©ענת עציון




## מבנה פולארי של תא מפריש (ברירית המעי):

התא אינו סימטרי, יש לו כיווניות. הארגון של האורגנלות קובע אותה.

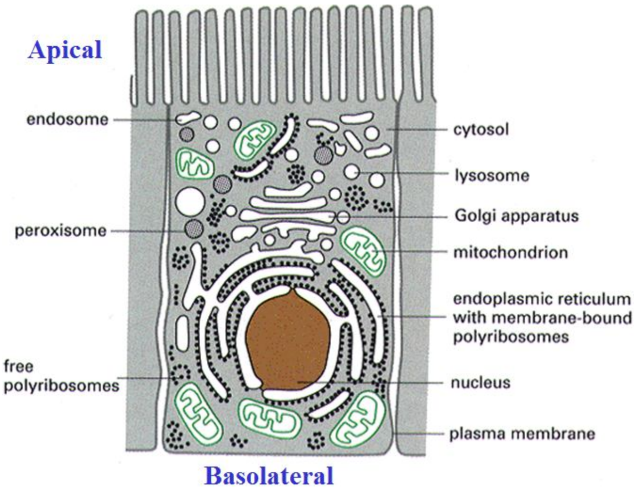
Basal side: הקצה שרחוק מהחלל של המעי.

Apical side: הקצה שגובל בחלל המעי.

באמצע מצוי הגולג'י וכל שאר התא מלא בווסיקולות מפרישות (הפרשה מבוקרת בתגובה לסיגנאל חיצוני) אשר נקראות גם: **גרנולות**. זה תא שכל-הזמן עסוק בהפרשת חומרים.

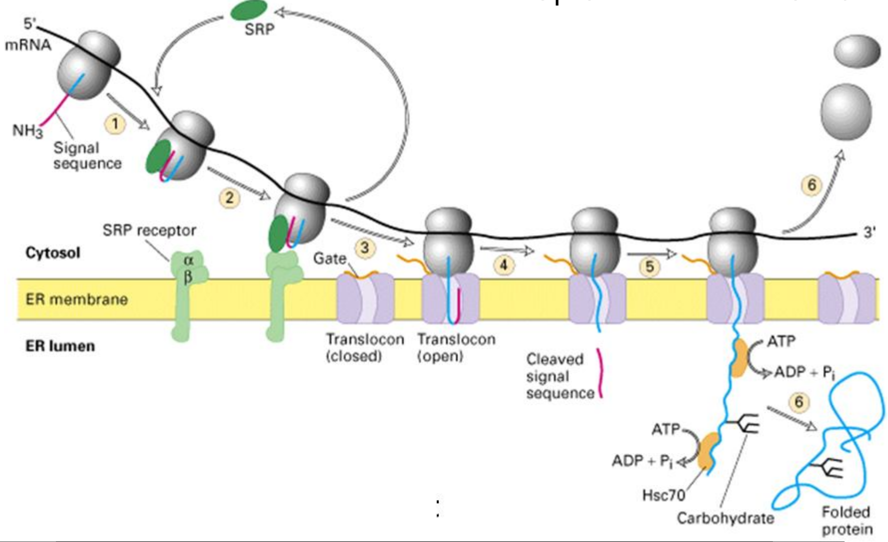
## מבנה פולארי של תא אפיתל:

גם בתאי אפיתל יש קצה בזאלי וקצה אפיקלי וגם כאן ה-RER והגרעין יותר קרובים לקצה הבזאלי והווסיקולות נמצאות יותר קרוב לצד האפיקאלי.




## סינתזת חלבונים:

הסינתזה של כל החלבונים מתחילה בציטוזול לאחר קשירת mRNA לריבוזומים חופשיים. חלבונים שצריכים להגיע למערכת ההפרשה, יש להם קוד בקצה האמיני- signal sequence שהינו 6-15 חומצות אמינו שרובן הידרופוביות. כאשר החלבונים מסונתזים, זנב החלבון משתלשל מהריבוזום והרצף בולט ממנו. ישנו קומפלקס חלבוני המכיר את הקוד- **SRP- Signal Recognition Particle**. ה-SRP בעזרת מולקולה הדומה ל-tRNA מחקה אותו ועוצר את הסינתזה באופן רגעי. על ממברנת ה-RER יש רצפטור שמכיר את ה-SRP שנקשר אליו וגורר את הריבוזום איתו.



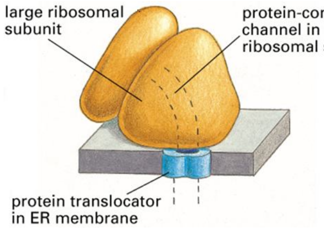

:



©ענת עציון

ורק אחרי שה-SRP מתקשר לרצפטור, סינתזת החלבון ממשיכה ואז גם הריבוזום מתקשר לתעלה בממברנת ה-RER שנקראת **טרנסלוקון** וזה גורם לדיסוציאציה בין ה-SRP לרצפטור, החלבון מושחל לתעלה ורק אז ממשיכה סינתזת החלבון תוך כדי השחלתו פנימה לחלל ה-RER.

<u>הערה:</u> GTPase על ה-SRP ועל הרצפטור שלו מבקרים שניהם את מחזור ה-SRP אל ומה-ER.




**<u>Co-translation:</u>** תרגום החלבון תוך כדי השחלתו ל-ER.

הריבוזום חייב להיקשר לטרנסלוקון, צריכה להעשות חפיפה באופן ישר בין התעלה בתת-יחידה הגדולה של הריבוזום לתעלה שבממברנה.

החלבון נכנס ל-RER כשהוא לא מקופל כי הוא צריך להיות מושחל כמו חוט כדי לעבור בתעלה (ולכן אין טעם להשקיע אנרגיה בקיפול שלו לפני-כן). החלבון משתלשל וקטע הסיגנאל נשאר קשור לתעלה. לאחר שהוא נכנס יש לחלבון נטייה תרמודינאמית להתקפל. אז נקשרים אליו צ'פרונים (אחד מהם נקרא: BIP) שעוזרים לו להתקפל נכון ומזרזים את תהליך הקיפול.

החור בתעלה יותר קטן מקוטר של הליקס ה-DNA וכאשר אין חלבון אז ישנו אלפא-הליקס שסותם את התעלה (כדי שלא יעברו חומרים קטנים ולא רצויים לחלל ה-RER שהוא סביבה מחמצנת).

לבסוף אנזים פפטידאז חותך את הסיגנאל מהחלבון. וחלבוני ממברנה מבצעים תהליך גליקוזילציה מורכב בחלבונים. שני תהליכים אלה (הקיטוע והוספת הסוכרים) נעשים ע"י חלבוני ממברנה אינטגרליים ולכן הם נעשים בסמוך לממברנה. החלבונים שמגיעים מחוץ ל-RER מגיעים מחוזרים (ללא קשרי S-S) וקשרי S-S נוצרים בתוך ה-RER, כאשר ישנו אנזים: PDI שעוזר לקישורם הנכון.

## <u>אוריינטציה של חלבונים:</u>

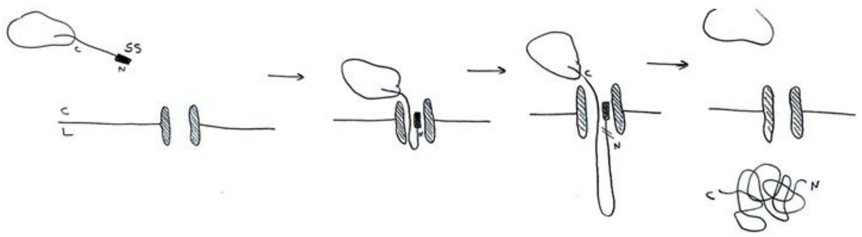
חשוב שהאוריינטציה שלהם תהיה נכונה- חלבון מסיס יישאר מסיס וחלבון ממברנאלי חשוב שהצד הנכון יפנה כלפי חוץ/כלפי פנים הממברנה.

**<u>Single pass:</u>** חלבון שחוצה את הממברנה פעם אחת.

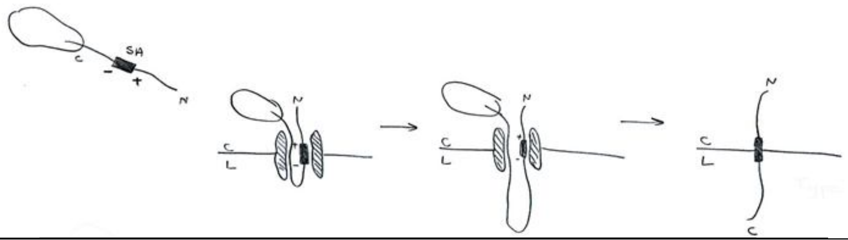
**<u>Multi pass:</u>** חוצה את הממברנה מספר פעמים.

**<u>רצפים המקודדים למידע לגבי טופולוגיה:</u>**

- <u>Signal Sequence:</u> נמצא בקצה ומגייס את ה-SRP. ה-SS נחתך. חלבון בעל רצף זה תמיד יהיה מסיס.



- <u>Signal Ancore:</u> רצף מעגן. הסיגנאל הזה מגיח באמצע החלבון, אף-פעם לא בקצה ה N-טרמינאלי, הוא לא נחתך והוא יהפוך להיות חלק טרנס-ממברנאלי. הוא גם מגייס את ה-SRP. בחלבון בעל SA לא יהיה SS אף-פעם. ב-SA כיוון ההשחלה נקבע לפי פיזור המטען מסביב לסיגנאל הראשון- הצד החיובי יפנה לציטוזול.

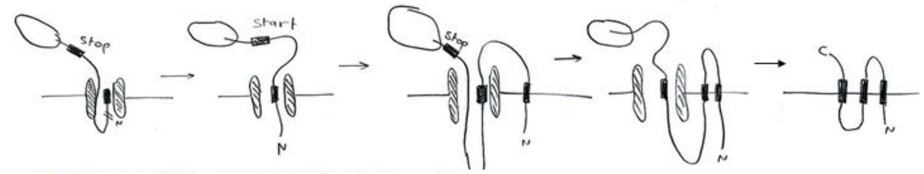




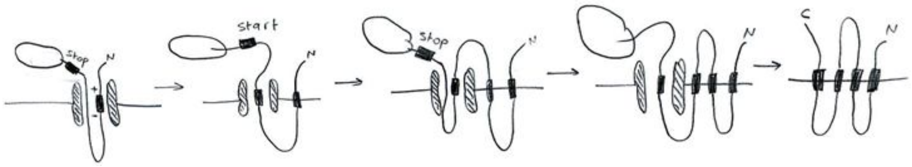
©ענת עציון

- <u>Start/Stop Transfer:</u> סיגנאלים הגורמים להשחלה או להפסקת השחלה לממברנה. הם לא מוסרים אלא הופכים לאזורים טרנס-ממברנאליים. הם תמיד מלווים ב-SS או SA. Start- מתחיל השחלה לתוך ה-ER, stop- מפסיק השחלה ל-ER.

Multipass (cleavable SS, stop, start, stop, ...)




Multipass (SA, stop, start, stop, ...)




# <u>שיטות למחקר ממברנות תוך-תאיות:</u>

**<u>סרקוז התא:</u>** על מנת לחקור מערכת תוך-תאית ונטרול כל רעשי הרקע, יש לפוצץ את התא באופן עדין כדי להפריד את המרכיבים התוך-תאיים שלו. שיטות לפיצוץ עדין:

- הזרקת התא דרך מזרק צר ובמעבר מלחץ נמוך לגבוה הוא מתפוצץ.
- סדרה של חימום והקפאה אחד אחרי השני.

ממברנה שהתפוצצה באופן עדין, חלקיה יתאחו ביניהן ויהפכו לווסיקולות.

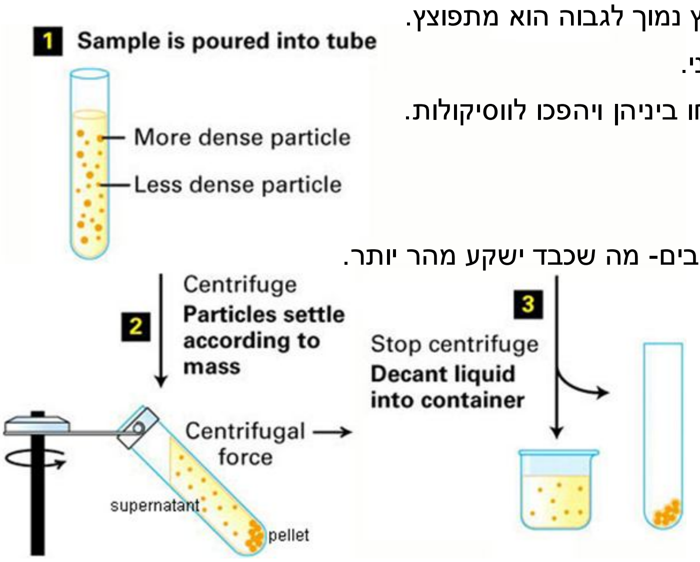
**<u>מיקרוזומים:</u>** חתיכות שנוצרו מממברנת ER.

**<u>Extract:</u>** תאים שבורים עם כל תכולתם.

ואז ניתן עם צנטריפוגה להפריד את כל המרכיבים- מה שכבד ישקע מהר יותר.

**<u>פלט:</u>** מה ששוקע למטה.

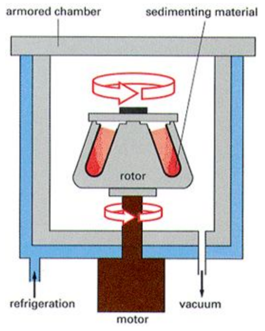
**<u>סופרנייטד:</u>** מה שנשאר למעלה.




**<u>Differential Centrifugation:</u>** הפרדת אורגנלות ב-ultra centrifuge אשר מגיעה למהירויות מאוד גבוהות וישנו וואקום.

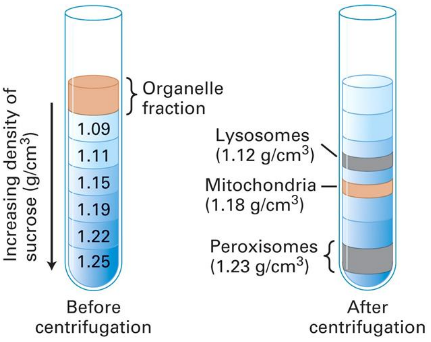
<u>אופן הניסוי:</u> מבצעים כמה מחזורים שבהם מסרקזים בכל פעם במהירות וזמן ידועים מראש לשקיעה של דברים מסויימים ואז את הנוזל מעבירים לכלי נוסף להמשך הסרקוז. ככל שמסרקזים יותר זמן, שוקעים חלקים נוספים מהתא לפי כובדם.

<u>חיסרון:</u> ההפרדה היא לקבוצות לפי משקל ולכן היא טובה רק לחלק מהניסויים.






©ענת עציון




**<u>הפרדה לפי משקל בגרדיאנט צפיפיות:</u>** לממברנות יש צפיפות יחסית נמוכה וככל שיש להן יותר חלבונים עליהן, הן ישקעו יותר. הגרדיאנט הוא חומר צפוף ולא יוני (כדי שלא ימסך אינטראקציות בין חלבונים שונים לממברנות). בסרקוז הממברנות יעברו עד למקום שבו הצפיפות שלהן שווה לצפיפות של הסביבה. היום ידוע בספרות בדיוק באיזה אזור בגרדיאנט מצויים חלקי התא המבוקשים.

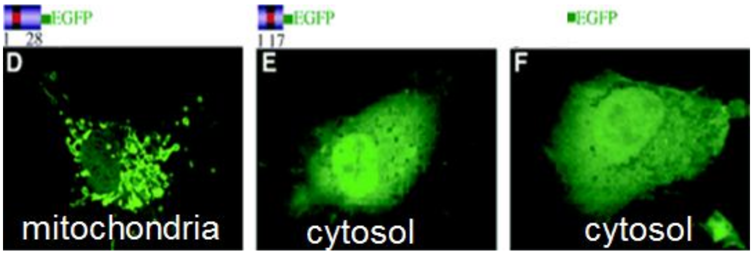
<u>הפרדת SER ו-RER:</u> מקבלים הפרדה לשתי קבוצות, ה-RER כבד וצפוף יותר בגלל הריבוזומים שעליו.

# <u>שיטות למחקר מיקום/יעד של חלבונים:</u>

**<u>בדיקת הכוונת הסיגנאל:</u>**

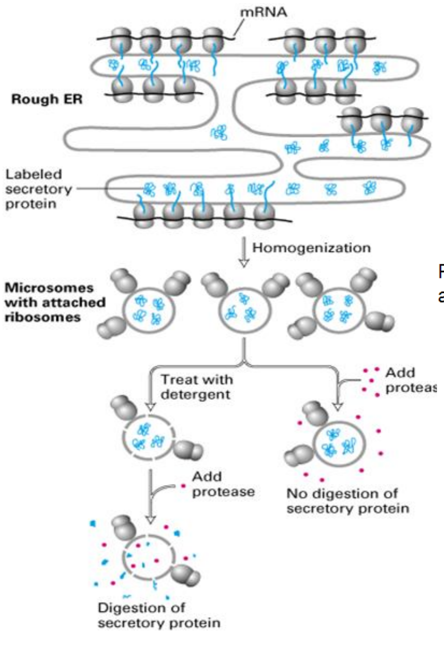
1. מאחים את הסיגנאל בפלסמיד ל-GFP ובודקים את מיקומו בתא.
2. צנטריפוגה ובדיקה באיזה מחלקי התא החלבון מצוי (נוגדן) עם ובלי מוטציה ברצף הסיגנאל.

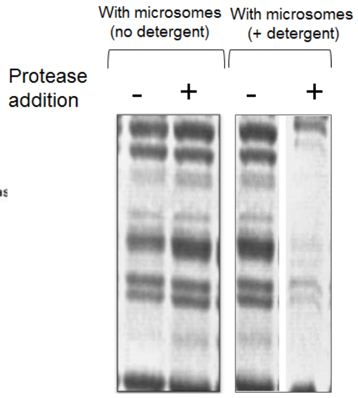
<u>דוגמא:</u> GFP שאוחה לסיגנאל לאורגנלה-A. כאשר הוכנס כל רצף הסיגנאל, הוא הגיע ל-ER. עם חצי מהסיגנאל או ללא סיגנאל הוא יופרש החוצה מהתא.




**<u>האם החלבונים המופרשים נמצאים בחלל ה-ER?</u>**

יצרו מיקרוזומים מה-RER וסיפקו לריבוזומים חומצות אמינו מסומנות רדיואקטיבית וחילקו אותם לשתי קבוצות. אחת עם פרוטיאזות והשנייה עם פרוטיאזות ודטרגנט.




הוספת הדטרגנט הביאה לפירוק הממברנה של המיקרוזומים ואזו החלבונים לא היו מוגנים מהפרוטאזות אך ללא הדטרגנט הם כן היו מוגנים בפניהם.

**<u>האם תרגום החלבון קורה תוך-כדי הכנסתו ל-ER?</u>**

לקחו שתי קבוצות של מיקרוזומים והורידו מהם את הריבוזומים.

לקחו וביצעו תרגום עם הריבוזומים שהורדו ללא SRP ואז היה תרגום של החלבון בתוספת לרצף של הסיגנאל. הכניסו מיקרוזומים, והחלבונים לאחר סיום התרגום לא נכנסו למיקרוזומים. ביצעו ניסוי נוסף ובו כל רכיבי המערכת הרגילים ואז החלבונים כן נכנסו לתוך המיקרוזומים.



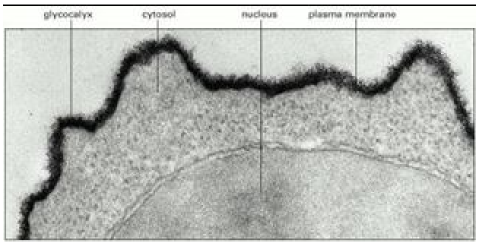
©ענת עציון

# גליקוזילציה ובקרת איכות הקיפול:

גליקוזילציה: תהליך הוספה של מספר סוכרים הקשורים בקשר קוולנטי-אוליגוסכריד לחלבון. זהו תהליך מאוד חשוב שתפקידיו:

- הוספת מעטה המגן על החלבונים על-פני הממברנה מפני פירוק
- יצירת אתרי קישור בחלבונים וביניהם גם אתרים המוכרים ע"י מערכת החיסון.
- עוזר לקיפול נכון של חלבונים ותורם ליציבות החלבון.

כל החלבונים המסונתזים במערכת ההפרשה עוברים את התהליך. ולכן כמעט כל החלבונים הללו נקראים גליקופרוטאינים.




החלקים הפונים מחוץ לממברנה מכילים את הסוכרים. בגלל שהסוכרים טעונים שלילית הם סופחים מולקולות מים ויוצרים מעין ג'לי מסביב לתא הנקרא: **Glycocalyx**.

תפקיד הג'ל: הגנה על התא מפני כוחות מכאניים. הסוכרים עצמם יכולים לשמש גם כאתרי הכרה וקישור. הג'ל מתפקד גם כחסם בררני והוא לא נותן לחלקיקים גדולים להגיע לתא. ובנוסף הג'ל והסוכרים דרושים גם להכרה בין תאים.

**שני סוגי גליקוזילציות:**

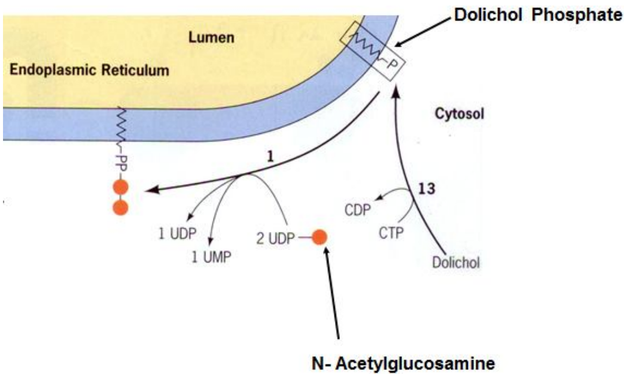
- N-linked: האוליגוסכריד מתווסף לקצה האמיני של אספרגין. הוא מתחיל ב-RER שם נוצר precursor אוליגוסכריד אשר ממשיך לעבור תהליכי עיבוד נוספים בגולג'י.
- O-linked: האוליגוסכריד מתווסף לקבוצת ההידרוקסיל של Serine או Threonine. הוא מתרחש רק בגולג'י ולא ב-RER.

## N-linked:

ישנו סדר מאוד קבוע שבו הסוכרים מתווספים.

גליקוזיל-טרנספראזות: אנזימים הקשורים לממברנה- חלבונים חוצי ממברנה שהאתר הקטליטי שלהם פונה אל מחוץ לממברנה. האנזימים הללו מכירים סוכר הקשור לנוקילאוטידים והם מוסיפים בכל פעם סוכר לקצה המתארך של אוליגוסכריד ע"י ביקוע הקשר בין הנוקליאוזיד לסוכר. לכל סוכר המתווסף יש גליקוזיל-טרנספראז ספציפי שמוסיף אותו כאשר כל אחד מהאנזימים מזהה ספציפית מבנה אחר של סוכר.

במסלול קבוע נוספים 14 סוכרים- וזהו השלד הסוכרי של כל הגליקופרוטאינים.




1. Dolichol: ליפיד חוצה ממברנה מזורחן- העוגן שעליו נבנה האוליגוסכריד.

   הסוכר הראשון שמתווסף הוא: GlcNAc. רק בסוכר הראשון שמתווסף נשאר גם הנוקליאוטיד. ואחריה מתווספת מולקולת GlcNAc נוספת בצורה ליניארית.

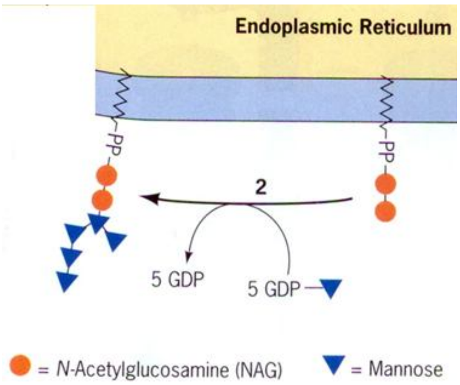
   הריאקציה: DLC-Pi+UDP-GlcNAc $\rightarrow$ GLcNAc-DLC pyrophosphate + UMP.

   ריאקציה נוספת עם UDP-GlcNAc נותנת: DLC-pp-2(GlcNAc).



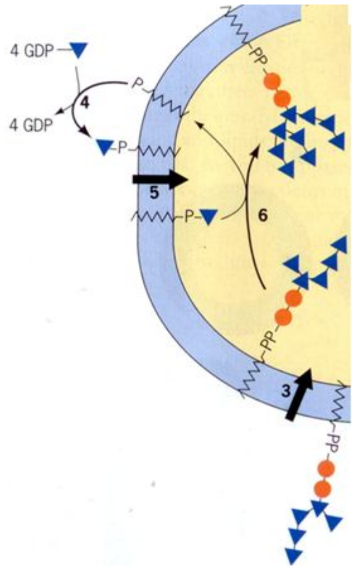
©ענת עציון

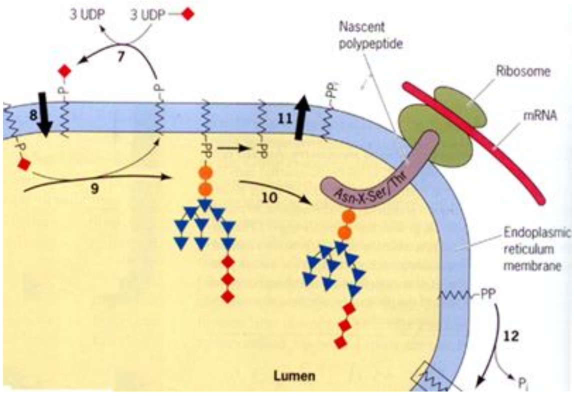
2. מתווספות 5 מולקולות של מאנוז. בשלב זה העץ הסוכרי עדיין פונה אל הציטוזול.



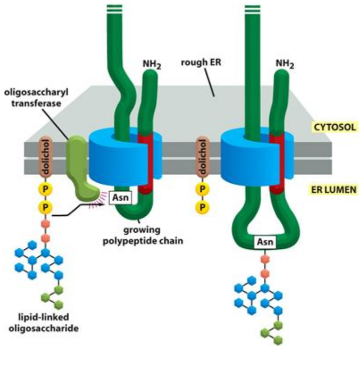

3. נעשיה ע"י אנזימי flip-flop פליפאזות אשר מכניסים את העץ הסוכרי לתוך ה-RER.

4. מתווספות 4 מולקולות מאנוז נוספות, אחת בכל שלב. זה כבר נעשה בתוך ה-RER.




7. מתווספות 3 מולקולות של גלוקוז. בסוף שלב-9 ישנם 14 סוכרים ופה נגמרת סינתזת הסוכרים ב-RER. הסוכרים הם: **2 GlcNAc, 9 Mannose, 3 Glucose**.




בשלב זה האוליגוסכריד עובר כחטיבה אחת לחלבון ע"י ביקוע קשר עתיר אנרגיה (הפוספטים המחוברים לדוליכול) ואז הדוליכול מתהפך בחזרה לצד הפונה אל מחוץ לתא.

<u>**רצף הקונצנזוס:**</u> Asn-X,Ser/Thr, זהו קוד לגליקוזילציה על אספרגין.

לא בכל מקום שבו מופיע הרצף ייתווסף הסוכר, זה נעשה תוך כדי השחלה וסינתזה של החלבון, והאתר צריך להיות חשוף מספיק בשביל לבצע את ההוספה ולכן היא לא מתבצעת בכל מקום שבו מצוי רצף ההכרה.

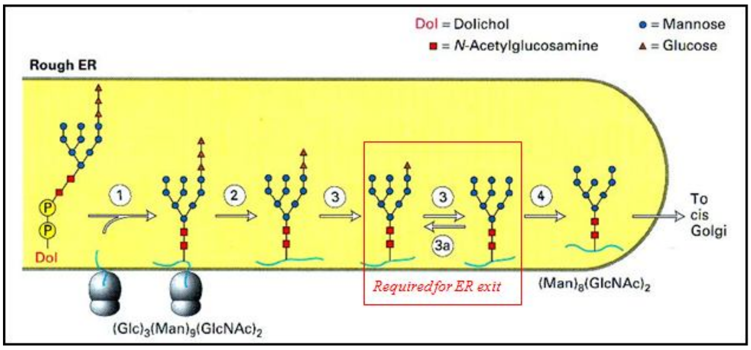
<u>**מחלות גנטיות בעקבות פגמים בגליקוזילציה:**</u>

- מוטציות שמביאות חוסר מוחלט של N-linked glycosylation מביאות למוות עוברי.
- מוטציות המפריעות לגליקוזילציה, למשל: פגיעה באנזים שהופך F6P למאנוז. זה גורם לדימום קשה. <u>פיתרון:</u> דיאטה של אכילת מאנוז.



©ענת עציון

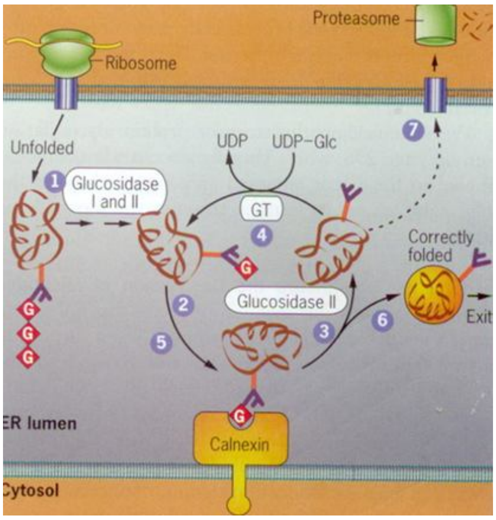
## הסרת גלוקוז טרמינלי (בקרת איכות):




חלבון לא עוזב את ה-RER לפני שמורדות ממנו שתי מולקולות של גלוקוז. מערכת בקרה מאפשרת רק לחלבון שהתקפל נכון לעזוב את ה-RER.

מורדות שתי מולקולות גלוקוז ואז מערכת הבקרה מכירה את החלבון עם גלוקוז אחד ומאפשרת הורדתו רק לאחר קיפול נכון.

סה"כ: 3 מולקולות גלוקוז ו-1 מולקולות מאנוז יורדות לפני היציאה מה-RER.




לאחר הורדת 2 גלוקוז ע"י Glucosidase I and II חלבון Calnexin הוא צ'פרון שמזהה את מבנה הסוכר עם גלוקוז אחד ומשהה את החלבון ב-ER לצורך קיפול נכון. אח"כ Glucosidae II מסיר את הגלוקוז האחרון. אם הוא לא התקפל נכון, החלבון מזוהה ע"י Glucosyl transferase אשר מכיר חלבונים לא מקופלים ע"י האזורים ההידרופוביים החשופים שלהם והוא מוסיף לו שייר גלוקוז בחזרה ומערכת הצ'פרונים שוב מכירה את החלבון ומנסה לעזור לו להתקפל.

רק כאשר החלבון התקפל נכון הוא יופרש החוצה.

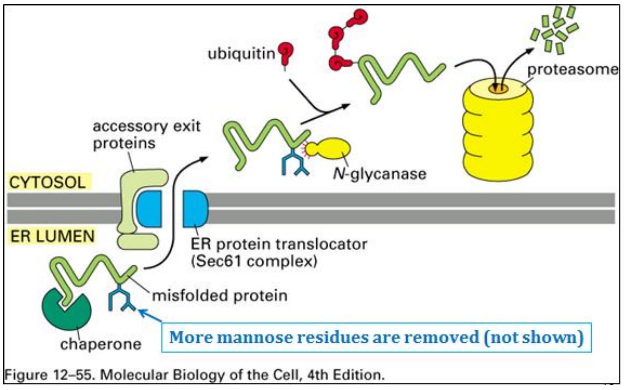
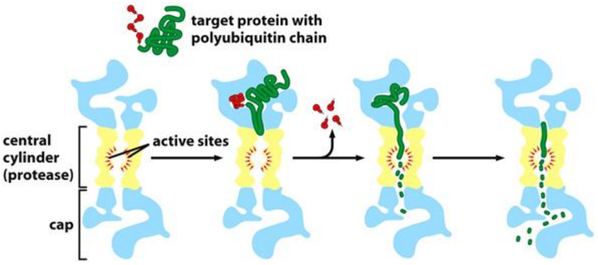


Figure 12–55. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

לאחר מספר מחזורים כאלה, אם החלבון עדיין לא התקפל כמו שצריך הוא נשלח להריסה.

החלבון עובר דרך תעלה במנגנון מיוחד ומגיע לציטוזול. שם ישנו אנזים המסלק ממנו את שרשרת הסוכרים. ואז החלבון מוכר ע"י מערכת הפרוטיאוזום בגלל יוביקוויטין הנקשר אליו קוולנטית. ושם נעשה פירוק החלבון.




חלבון שלא מקופל נכון מושחל פנימה למרכז הפרוטיאוזום ושם הוא מתפרק (ע"י אנרגיה מ-ATP). היוביקוויטין משתחרר החוצה ותוצרי הפירוק- פפטידים קצרים, יוצאים מהצד השני של הפרוטיאוזום.

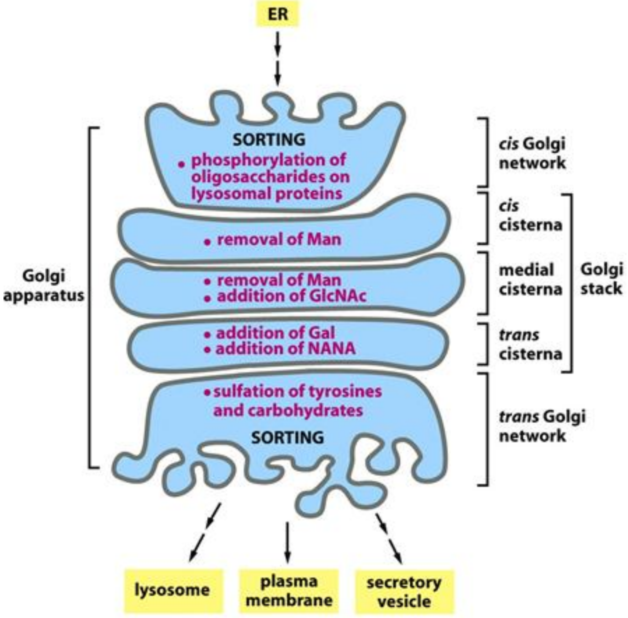

©ענת עציון

## אברון הגולג'י:

הגולג'י זו מערכת של ממברנות, מורכבת מהרבה שקים שטוחים-ציסטרנות. מה שמאפשר העברה יעילה בין ציסטרנות סמוכות. כל החלבונים שנוצרים ב-ER מועברים לגולג'י ושם הם עוברים שינויים נוספים וממויינים לאברי המטרה שלהם.

ציור סכמטי של הגולג'י ←

## תתי-מדורים בגולג'י:



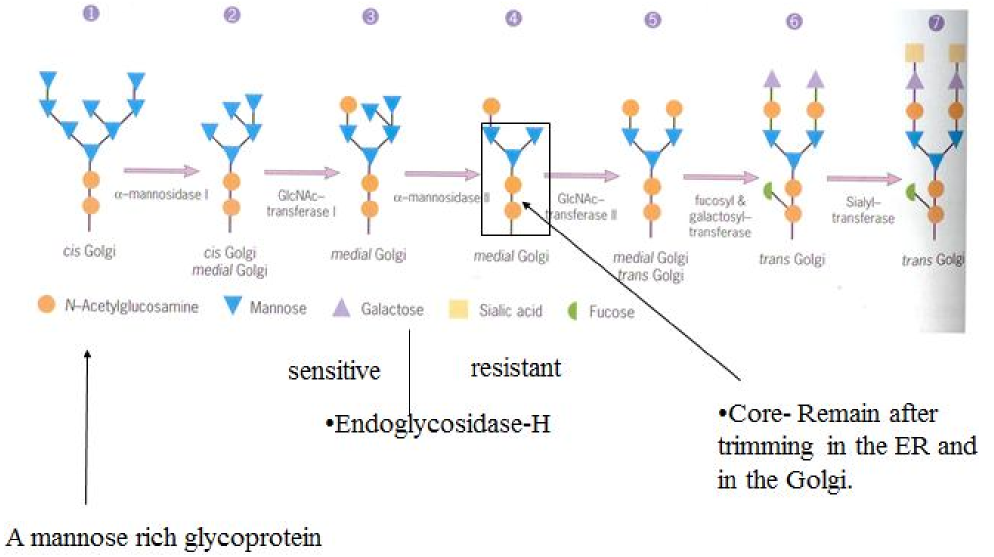

<u>Cis golgi network (CGN):</u> החלק שקרוב ל-ER. יש בו מיון לחלבונים שממשיכים הלאה בגולג'י לעומת חלבונים שצריכים לחזור אל ה-ER. נעשה בו גם זרחון של חלבוני ליזוזום.

<u>האזור האמצעי:</u> נעשה תהליך נוסף של גליקוזילציה- O linked.

<u>Trans golgi network (TGN):</u> החלק שרחוק מה-ER. נעשה מיון בין חלבונים שצריכים להגיע לממברנת הפלאסמה, לליזוזומים או בווסיקולות לאברונים אחרים. ישנה הפרשה מבוקרת של ווסיקולות. הסוכרים עוברים בו גם סולפונציה- הוספת מטען שלילי וזה גורם להם לספוח מים ולהפוך לג'ל מחוץ לתא.

## O-linked:

החלבון שעוזב את ה-RER הוא גליקופרוטאין עשיר במאנוז. נעשית הורדת סוכרים עד שמגיעים לליבה (מסומן בריבוע) ורק עליה מתבצע המשך של הוספת סוכרים. מה שמצוייר זוהי רק דוגמא אחת להוספת סוכרים על הליבה. אחרי שלב הליבה הסוכרים מתווספים בקצה ללא התפצלויות.




## הבדלה בין סוכרים שהגיעו למצב של ליבה לאלה שלא:

כל גליקופרוטאין שנשאר עשיר במאנוז יהיה רגיש לאנזים: Endoglycosidase-H ויעבור עיכול ע"י האנזים הזה. כאשר נוצרת הליבה, הסוכר נהיה עמיד לאנזים הזה. אם האנזים חתך את הסוכר, אז הוא לא הגיע לנקודה זו במסלול.



©ענת עציון

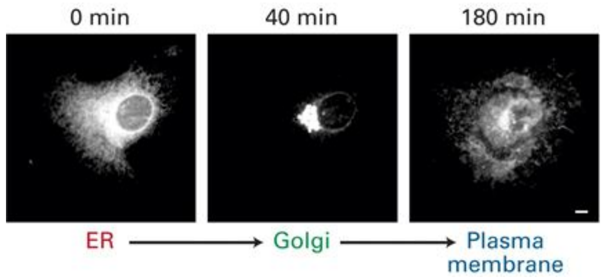
באופן כללי חלבונים אלה, המרכיב העיקרי שתורם למשקלם הוא סוכר ולא חלבון, הסוכרים המתווספים כאן שונים מאלה המתווספים על אספרגין. הפולימר שמתווסף על החלבונים הוא ליניארי- חזרות של די-סכריד (300-400 חזרות ואפילו יותר). במקרה זה החלבון פחות חשוב, הוא חשוב כווקטור שבאמצעותו הפרוטיאוגליקן מגיע למדור הנכון בתא.

**<u>ניסוי על טרנספורט במערכת ההפרשה:</u>**

כלי מחקרי-**VSVG**, חלבון הרגיש לטמפרטורה שמקורו בחלבון ויראלי טרנס-ממברנאלי שנמצא בממברנת הפלאסמה. יש לו סיגנאל SRP כדי להיכנס ל-ER. מצאו מוטנט הרגיש לטמפ' ואיחו ל-GFP:

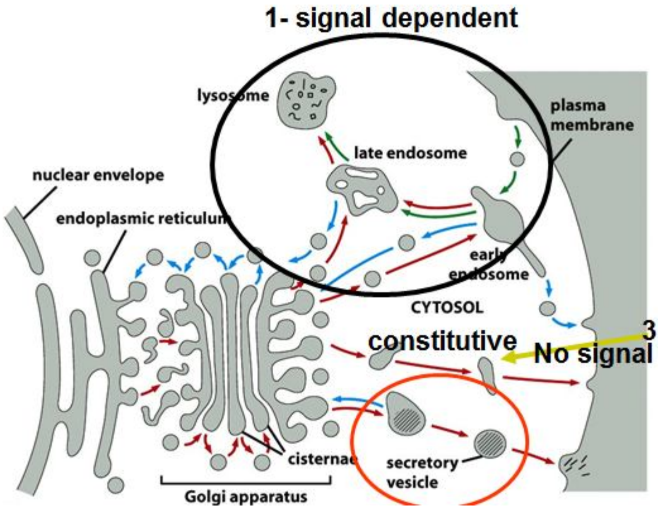
בטמפ' המגבילה (הרסטריקטיבית): 40 מעלות, החלבון לא מתקפל כראוי ב-ER ולכן לא יוצא משם.

בטמפ' המאפשרת (פרמיסיבית): 32 מעלות, החלבון עובר קיפול נכון ולכן נראה אותו מחוץ ל-ER.




זה משמש ככלי מחקרי כי כך ניתן לעכב את החלבון ב-ER ואז בבת-אחת לשחרר אותו להמשך המסלול. זה מאפשר לראות את התחנות בדרך בצורה מאסיבית ויחסית בנפרד.

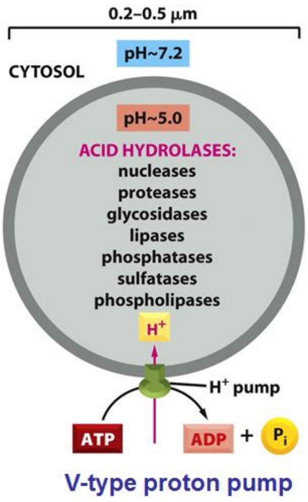
<u>הערה:</u> אם המעקב יתבצע על חלבון אחר- נראה אותו בכל התחנות בו-זמנית, לא נוח למעקב.




**<u>מסלולים מהגולג'י החוצה:</u>**

- הליזוזום- תלוי בסיגנאל על החלבון.
- ממברנת הפלסמה- הפרשה מבוקרת התלויה סיגנאל.
- ממברנת הפלסמה- הפרשה קונסטיטוטיבית, ללא סיגנאל.

# <u>מהגולג'י אל הליזוזום:</u>




**<u>ליזוזום:</u>** גופיף ממברנאלי המכיל אנזימים מסיסים שיודעים לפרק את כל החומרים שהתא יודע להתמודד איתם. ה-pH שלו הוא הנמוך ביותר מכל האורגנלות בתא והוא נוצר ע"י משאבת פרוטונים המופעלת ע"י ATP. המשותף לאנזימים הליזוזומאליים: פעילים אך ורק ב-pH חומצי: 5-6. הם לא מעכלים את ממברנת הליזוזום בגלל הרבה גליקופרוטאינים על הממברנה אשר פונים פנימה ומגנים עליה מהאנזימים.

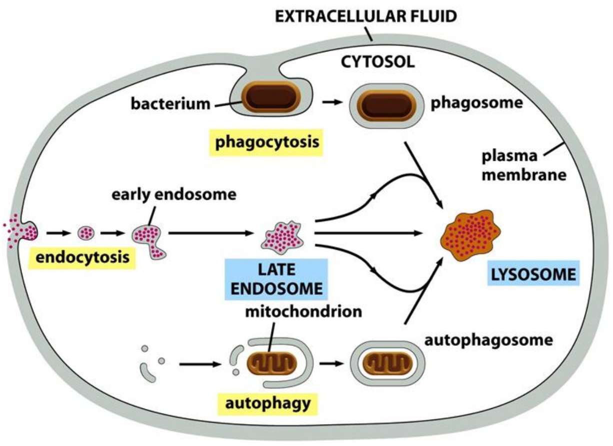
**<u>אנדוציטוזה:</u>** כאשר התא מקבל אות מבחוץ, מנצה ווסיקולה מממברנת הפלסמה ונכנסת לתא. ווסיקולה כזו מתאחה עם הליזוזום וחלבוני ממבְּנה מתפרקים ולפעמים יש מִ חזור שלהם. הליזוזום מפרק את החומרים מהווסיקולה וגם משחרר החוצה אל התא חומרים שהתא יכול להשתמש בהם כאבני-בניין של מאקרומולקולות.



©ענת עציון

**<u>פאגוציטוזה:</u>** זוהי בליעה של פולשים זרים. זו ווסיקולה ענקית שהנצה מממברנת הפלסמה והיא מכילה את הפולש הזר (לפעמים חיידק או אפילו תא אחר). הווסיקולה הגדולה הנקראת **פאגוזום** מתאחה עם ליזוזום ושם נעשה העיכול של הפולש.

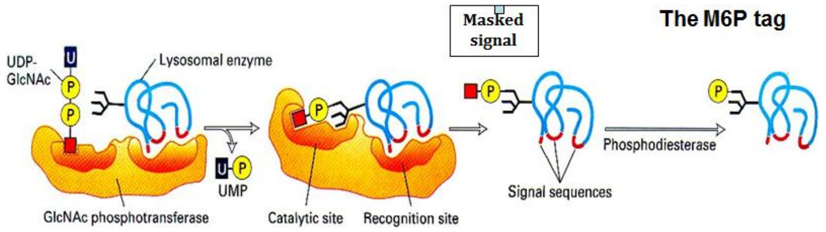
**<u>Autophagy:</u>** עיכול אורגנלות זקנות בתא. אורגנלה כזו צריכה להיות עטופה בממברנה כדי שהליזוזום יכיר אותה. הוא נעטף בממברנת ה-RER (ולא ממברנת הפלאסמה) ונוצר אוטופאגוזום המתאחה עם הליזוזום.



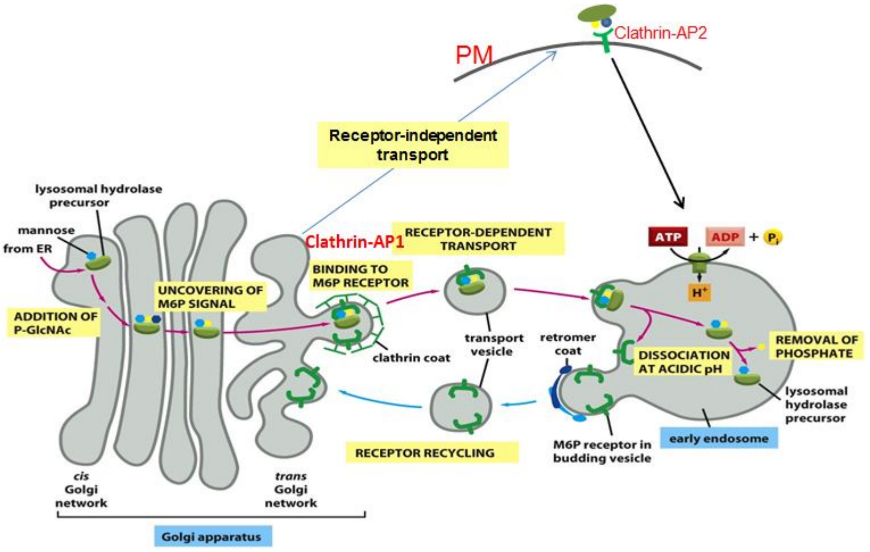

## <u>הכוונת אנזימים ליזוזומאליים:</u>

באנזימים אלה קיים **signal patch-** מקטעים לא רציפים בחלבון שמתקרבים אחד לשני בעקבות קיפול נכון של החלבון. והוא זה שגורם לסיגנאל האמיתי: **M6P tag** (מאנוז מזורחן) CGN בעמדה 6, המתווסף כבר ב-CGN, מה שמונע את המשך עיבוד הסוכרים בגולג'י.

1. אנזים phosphotransferase מכיר את ה-signal patch וקושר את ה-donor של הפוספט והחלבון בשני אתרים ומביא אותם לקרבה פיזית, ואז קורית בתוכו הריאקציה.
2. הסיגנאל עדיין ממוסך עד הגעה ל-TGN ושם מוסר: N-acetyl-glucosamine ע"י phosphodiesterage.




ישנו cargo-receptor מיוחד ב-TGN מזהה את המאנוז המזורחן ומעביר את החלבון לווסיקולות של קלתרין שנשלחות לאנדוזומים ומשם לליזוזומים. קישור ה-M6P לרצפטור-**AP1 adaptor** קורה ב-pH יותר בסיסי ולכן בהגעה אל האנדוזום ובו pH נמוך יש שחרור של החלבון מהרצפטור ומייד יש אנזים שמוריד את הפוספט מהמאנוז כדי שהחלבון לא יזוהה מחדש ע"י הרצפטור. הרצפטור ממוחזר ע"י ווסיקולה מהליזוזום אל הגולג'י. ישנו רצפטור אחר של מערכת הקלתרין **AP2 adaptor** שגם מזהה את ה-M6P (באנזימים ליזוזומאליים שיצאו מהתא בטעות) והוא מתווך חלבונים מממברנת הפלסמה לליזוזומים.






©ענת עציון

## וסיקולות קלתרין:

- ה-clathrine coat יכול להיווצר גם באופן ספונטאני- ללא ווסיקולה.
- חלבוני-Adaptor יוצרים שכבה מבודדת שנייה של coat וממוקמים בין ה-coat של הקלתרין לממברנה.
- ה-adaptors מתווכים את הקשירה של ה-clathrine coat והווסיקולות מחלבוני הממברנה.

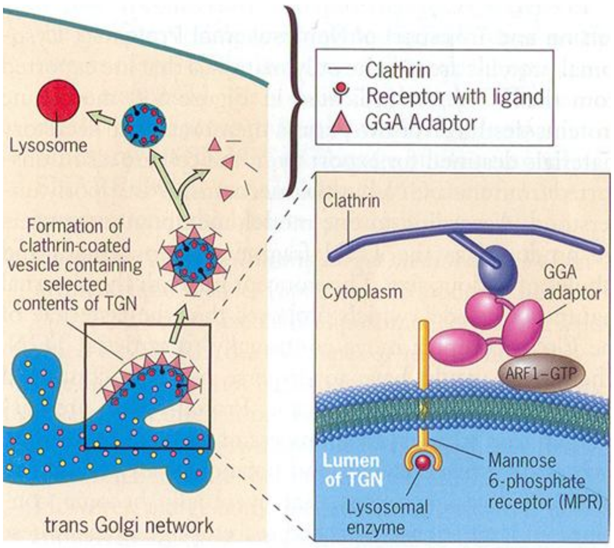
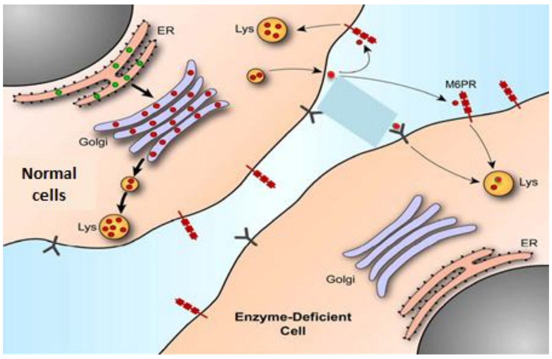



FIGURE 8.30 The formation of clathrin-coated vesicles

## מחלות אגירה ליזוזמאליות:

מביא להצטברות של סובסטראט בליזוזום אשר אינו מפורק (בהעדר אנזים מתאים).

**<u>דוגמא:</u>** מחלת I cell שבה האנזים ששם פוספט על המאנוז, פגום, ולכן כל האנזימים הליזוזמאליים מופרשים החוצה לסביבת pH שבה הם אינם פעילים.

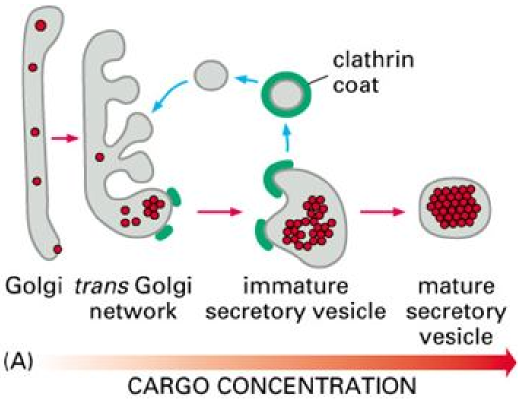



**<u>תרפיה- Enzyme replacement:</u>** לוקחים את המדיום שמקיף תאים נורמאליים ושמים בתוכו את התאים החולים. חלק מן האנזימים הליזוזמאליים יופרשו החוצה למדיום וייקלטו ע"י הרצפטור ל-M6P שהוא תקין גם בתאים החולים. זה יהיה "תיקון חלקי" לבעיה.

<u>הערה:</u> מזריקים לבנאדם את המדיום לווריד כי אלה הם חלבונים ולא רוצים שהוא יקבל אותם באכילה כי אז הם יתפרקו במערכת העיכול.

# מהגולג'י לווסיקולות הפרשה (Clathrine):

כל התאים האאוקריוטים מפרישים חלבונים שונים באופן קונסטיטוטיבי. ישנם תאי הפרשה מיוחדים אשר אוגרים בתוכם חלבונים מסויימים שמופרשים רק בתגובה לסיגנאל חוץ-תאי.




משערים שהמיון לווסיקולות בהפרשה מבוקרת נעשה ע"י אגרגציה סלקטיבית בגולג'י של החלבונים המופרשים. ווסיקולות לא בוגרות אשר רק מנצות מהגולג'י מכילות אגרגציות של חלבונים שניתן אפילו לראות במיקרוסקופ אלקטרונים.

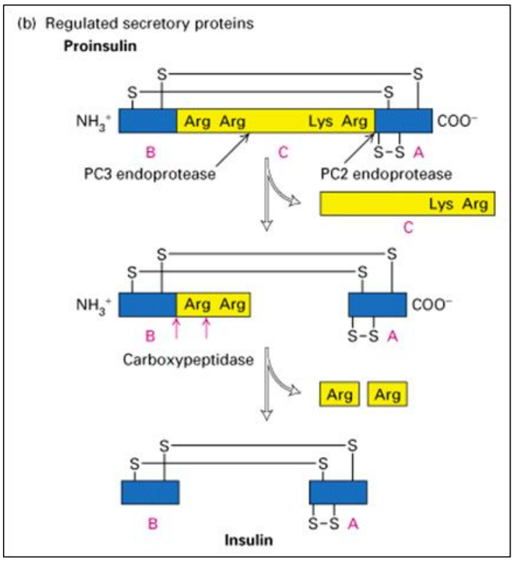
מחקרים אחרים הראו שווסיקולות של הפרשה מבוקרת מכילים 3 חלבונים: chromogranin A, chromogranin B ו-secretogranin II אשר ייתכן שעוזרים ליצירת האגרגציה.

חלבונים אשר לא עושים אגרגציה סלקטיבית כזו ממויינים לווסיקולות להפרשה לא מבוקרת.



©ענת עציון

## עיבוד פרוטיאוליטי לאחר עזיבת ה-TGN:




חלבונים רבים מסונתזים כ-precursor ארוך בלתי פעיל והם דורשים עיבוד פרוטיאוליטי נוסף כדי להפוך לחלבון בוגר ופעיל.

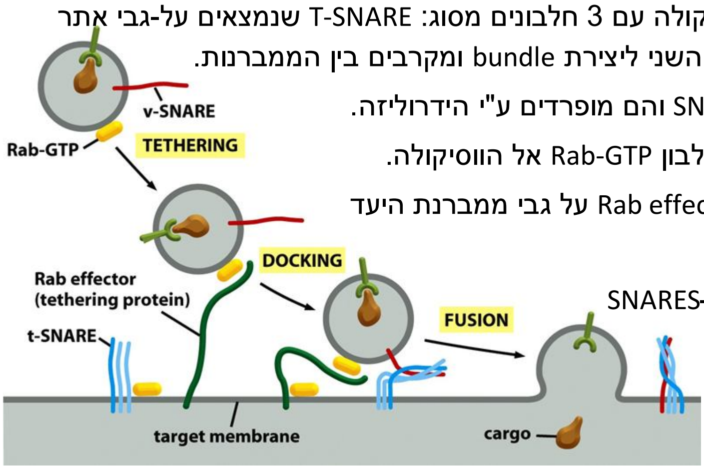
<u>**דוגמא:**</u> החיתוך הפרוטיאוליטי של פרואינסולין לאינסולין בוגר נעשה בווסיקולות (כי בווסיקולות לא בוגרות יש רק פרואינסולין ובווסיקולות בוגרות מצוי אינסולין).

הוא עובר ביקוע פרוטיאוליטי ע"י האנזימים: PC2 ו-PC3 ואז מתקבל אינסולין כמעט בוגר עם שתי חומצות אמינו-ארגינין מיותרות, ואז מוסרות שתיהן ע"י אנזים קרבוקסיפפטידאז ומתקבלת מולקולת אינסולין פעילה.

<u>שחרור לפלסמה:</u> ע"י אקסוציטוזה וכתוצאה מהעברת סיגנאל לשחרור התוכן של הווסיקולה.

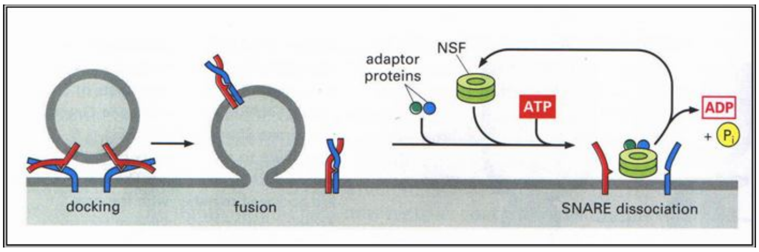
## איחוי הווסיקולות לאיבר היעד:

המנגנון מתרחש בעזרת אנזימים מסוג: SNARE. כשווסיקולה מתאחה עם איבר המטרה חל זיווג של חלבון V-SNARE המצוי על-גבי הווסיקולה עם 3 חלבונים מסוג: T-SNARE שנמצאים על-גבי אתר היעד, כאשר הם מתלפפים אחד על השני ליצירת bundle ומקרבים בין הממברנות.




לאחר האיחוי יש מִחזור של ה-SNARES והם מופרדים ע"י הידרוליזה.

1. <u>Tethering:</u> מתבצע חיבור בין חלבון Rab-GTP אל הווסיקולה.
2. <u>Docking:</u> ה-Rab מתחבר ל-Rab effector על גבי ממברנת היעד ומעגן את הווסיקולה לממברנה.
3. <u>Fusion:</u> נוצר כוח עקב קישור ה-SNARES והוא גורם לאיחוי הממברנות. הקומפלקס מקרב את שתי הממברנות בכוח כך שכל המים שנמצאים ביניהן מוּצָאים בצורה פיסיקאלית.

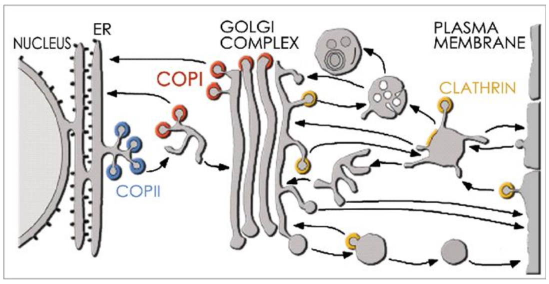



קומפלקס ה-SNARES מאוד חזק וקשה להפריד אותו לאחר האיחוי לצורך מחזור. ולכן על הקומפלקס מתלבש צ'פרון מסוג NSF בעזרת המתווך α–SNAP ו-ATP והם אלה שמפרידים ביניהם.



©ענת עציון

## סוגי הווסיקולות ומנגנון היווצרות:




ישנם 3 סוגים עיקריים של ווסיקולות:

**COP II:** ווסיקולות שמעבירות מטען מה-RER לגולג'י.

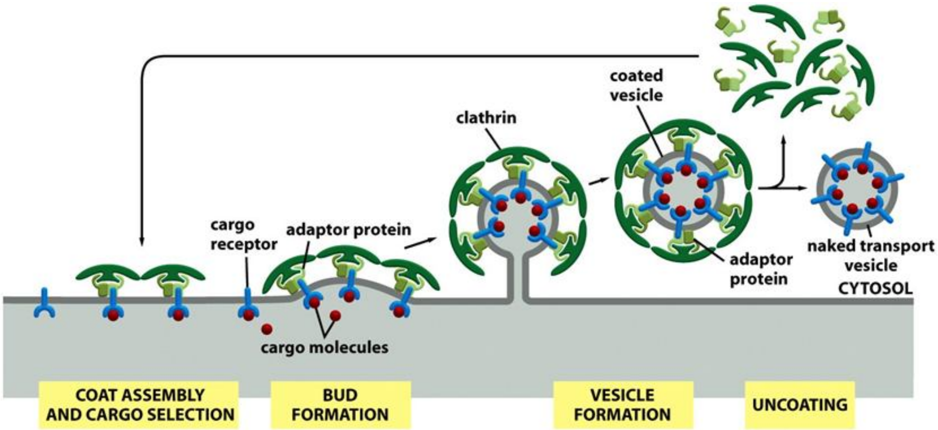
**COP I:** וסיקולות שמעבירות מטען מהגולג'י ל-RER, למשל כאשר ווסיקולה כלאה "בטעות" חלבון שהוא תושב קבוע של ה-RER ובנוסף צריך גם למחזר את חלבוני ה-COP II.

הערה: חלבוני coat גוייסו מהציטוזול ומשתחררים אליו ולכן אין צורך למחזר אותם.

**Clathrine:** ווסיקולות מעבירות מטען בין ממברנת הפלסמה, ה-TGN והליזוזום.

### שלבים עיקריים בהנצת ווסיקולה:

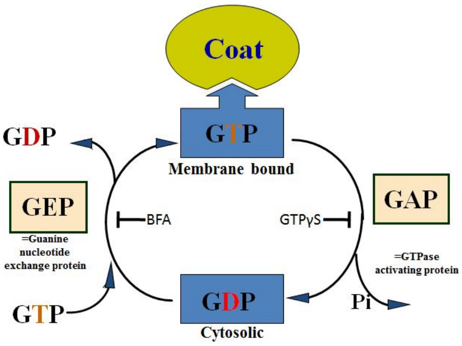
- על הממברנה יש רצפטורים למטען שמצד אחד קושרים חלבונים מסיסים שאמורים להיכנס לווסיקולות ומצד שני הם קושרים את המעטפת (ה-coat). אם המטען הוא חלבונים שאינם מסיסים, הם יכולים להיקשר בעצמם למעטפת.
- הרצפטורים קושרים את ה-adaptor protein, שהם קשיחים וזה גורם לעקמומיות של המעטפת ולבסוף הווסיקולה מנצה.
- בשביל שהווסיקולה תתאחה עם איבר המטרה- המעטפת שלה צריכה לרדת.




### מעגל GTPase של חלבוני G:

חלבוני G הם חלבונים קושרי GTP שמסוגלים להימצא בשני מצבים:

1. קושר GDP- מצב בלתי פעיל.
2. קושר GTP- מצב פעיל.




המעבר מ-GDP ל-GTP נעשה ע"י החלפת GDP ב-GTP.

נעשה ע"י פקטור שחלוף-GEP. החלבון הפעיל יכול בעצמו לקשור חלבונים אחרים ולהפעיל תהליכים ביולוגיים.

החלבונים שהוא קושר נקראים: **האפקטורים** שלו. ל- G proteins יש פעילות GTPase מאוד חלשה על עצמם ולכן גם להידרוליזה מ-GTP ל-GDP נדרש פקטור להגברתה-GAP. זהו מחזור של כיבוי והדלקת החלבון- "טיימר מולקולארי".

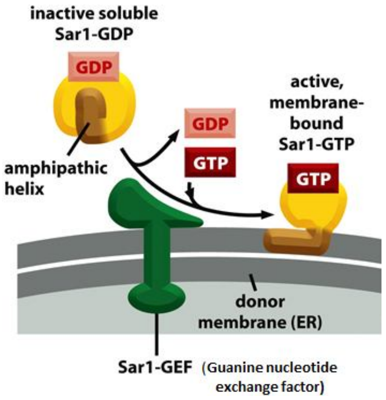
BFA: רעלן פטרייתי, מונע את שלב ה-exchange מ-GDP ל-GTP.

GTPγS: אנלוג של GTP שאי-אפשר לעשות לו הידרוליזה, ולכן הוא מונע את שלב הכיבוי.

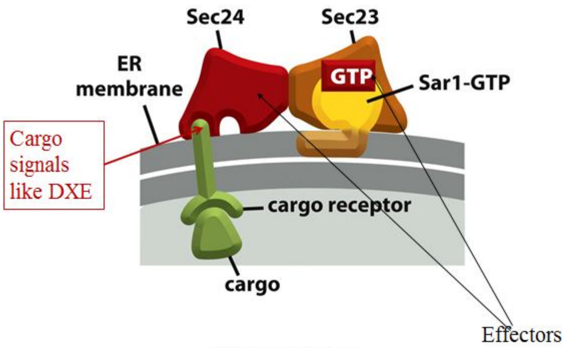


©ענת עציון

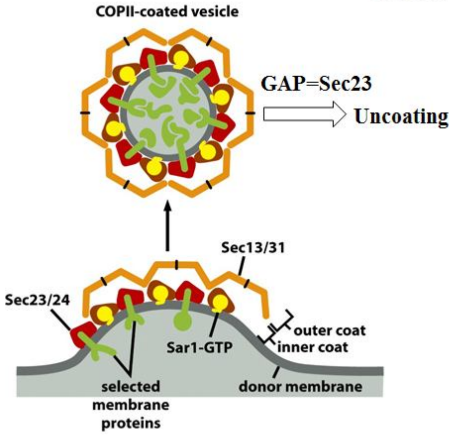
## הנצת ווסיקולות COPII:




1. במערכת זו, ה-G protein נקרא: Sar1. הפעלתו להיות Sar1-GTP גורמת לשינוי קונפורמציה שמשחרר מתוכו אלפא-הליקס הידרופובי אשר תוקע אותו בממברנה של ה-RER. Sar1-GEF הוא הפקטור שמשפעל אותו והוא תושב קבוע על ממברנת ה-RER ולכן התהליך כולו קורה ליד הממברנה של ה-RER.

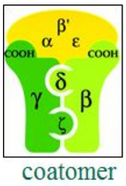



2. נקשרים שני חלבונים נוספים שהם האפקטורים של Sar1: Sec23 ו-Sec24. Sec24 מכיר את ה- cargo receptor דרך הקוד: DXE (קוד כללי: -X-[acidic][acidic]). ישנם איזומורפים שונים של Sec24 וכך הם מהווים אתרי הכרה ל-cargo receptor שונים. קשירת Sec23, Sec24 מגדילה את עקמומיות הממברנה.




3. מגוייסים שני חלבונים נוספים: Sec13 ו-Sec31 והם מהווים את השכבה החיצונית של ה-coat. זה מביא להתפלמרות של יחידות מעטפת והתעקמות הממברנה בעקבות זאת. ואז הווסיקולה מנצה.

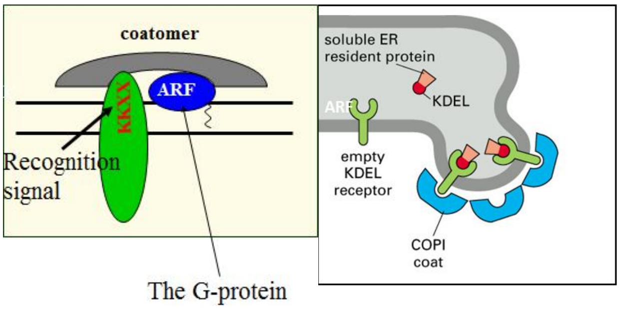
אח"כ כאשר הווסיקולה מגיעה לממברנת המטרה, יש הידרוליזה של Sar1-GTP ע"י Sec23 ובעקבותיה המעטפת מתנתקת מהווסיקולה.




**<u>מערכת COPI:</u>** אותם העקרונות. ל-G protein קוראים: Arf1 ולחלבוני המעטפת קוראים: coatomer.

**<u>מערכת קלתרין:</u>** גם משתמשת ב-Arf1.

## סיגנאלים בחלבונים במערכת COPI:




**<u>רצף KDEL:</u>** נמצא בקצה ה-C-Terminus של חלבונים מסיסים ומזוהה ע"י COPI ע"י תיווך של רצפטור טרנסממברנאלי.

**<u>רצף KKXX:</u>** נמצא בקצה ה-C-Terminus של חלבונים טרנסממברנאליים (שיש להחזירם ל-RER) אשר מזוהה ישירות ע"י חלבוני המעטפת בצד הציטוזולי.

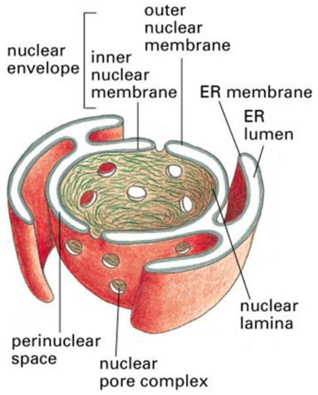
<u>הערה:</u> כאשר הרצפטור מגיע ל-RER, ה-pH שם יותר גבוה מאשר בגולג'י וזה הסימן שלו לשחרר את ה-cargo. זוהי בקרה ע"י רמות pH.



©ענת עציון

# גרעין התא וטרנספורט דרכו:

## מבנה גרעין התא:




מעטפת הגרעין מורכבת משתי שכבות בי-ליפידיות המופרדות ע"י תווך מימי. הלומן ביניהן מקושר ישירות ללומן של ה-RER. זו מערכת המשכית ולכן קשה להפריד גרעיני תאים ללא איברים נוספים בתא.

על ממברנות הגרעין יושבים טרנספורטרים סלקטיביים השולטים בתנועה בין המדורים השונים. ביטוי הגנים תלוי במעבר סלקטיבי של חלבונים בין המדורים בתא. זהו מעבר דו-כיווני מבוקר של הרבה מאוד מאקרומולקולות.

המעבר האבולוציוני בפרוקריוטים לאאוקריוטים כלל רמות נוספות של בקרה הנובעות מהמידור שהתווסף לתא.

### ניסוי לגבי סיגנאל לגרעין:

לקחו גרגירי זהב בגדלים שונים והצמידו אותם לחלבון שמצוי בגרעין. הכניסו אותם אל התא והחלבון נכנס פנימה לגרעין ביחד עם חלקיק הזהב ללא קשר לגודלו.

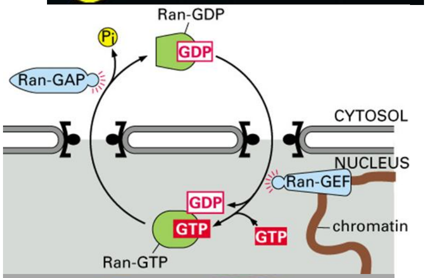
<u>מסקנה:</u> הכניסה לגרעין היא דרך pores, והחלבון נושא בתוכו את הסיגנאל (כלומר, הסיגנאל לא נחתך במהלך יצירת החלבון). זה מאפשר לחלבון להיכנס מספר פעמים אל הגרעין מכיוון שבכל-פעם שיש מיטוזה, מעטפת הגרעין מתפרקת והחלבון יצטרך להיכנס מחדש אל הגרעין החדש שנוצר.

<u>הערה:</u> ניתן לחבר את הסיגנאל לכל-מיני מקומות ואפילו לחלבון שאינו גרעיני ואז הוא ייכנס לגרעין.

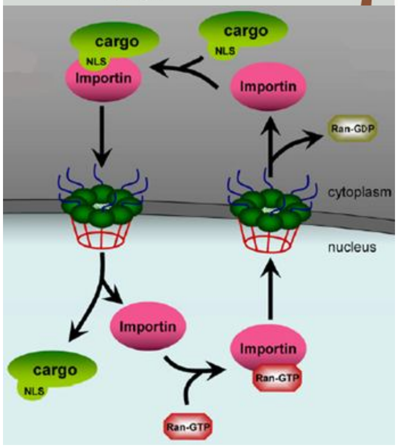
## תהליך הכניסה לגרעין:

לגרעין יש קומפלקס מיוחד שאחראי על הוצאה והכנסה הנקרא: nuclear pore complex (NPC). הממברנה חדירה ליונים באופן חופשי ומלקולות יותר גדולות צריכות סיגנאל מיוחד. הממברנה היא כפולה אבל במקומות בהם יש pores שתי הממברנות מחוברות. ה-NPC מכילים ג'ל שבתוכו יש חור שדרכו עוברות מולקולות קטנות באופן חופשי.

כדי להיכנס לגרעין, לחלבון צריך להיות סיגנאל מיוחד, החלבונים עצמם לא מכירים את ה-pore באופן ישיר והם נקשרים לחלבוני-importin. הטרודימר זה משוטט בציטופלסמה עד שהוא פוגש חלבון ובו סיגנאל הכוונה לגרעין-NLS. תת-יחידה אלפא נצמדת לסיגנאל ותת-יחידה ביטא מתווכת את המעבר דרך ה-nuclear pore.




כדי ליצור כיווניות, התא משתמש בחלבון G בשם Ran המבקר את הכניסה והיציאה. פקטורי ה-GAP וה-GEF שלו מצויים במידור מוחלט בין הציטוזול (שם מצוי ה-GEF) לגרעין (שם מצוי ה-GAP) וכך נוצר גרדיאנט בין סוגי מצבי החלבון הגורם לכיווניות. החלבון Ran תמיד יודע "איפה הוא נמצא".




זה נותן רמז מולקולארי לכל הטרנספורטרים לגבי המיקום שלהם: וזהו הסיגנאל שאומר לקומפלקס import (אלפא וביטא+חלבון) לשחרר את ה-cargo בתוך איבר המטרה, כלומר: קישור ה-importin ל-Ran-GTP גורם לשחרור ה-cargo. ובאופן דומה רק הפוך, עובד קומפלקס ה-export.

המעבר הזה לא דורש אנרגיה למרות שהוא אקטיבי. האנרגיה מושקעת רק לצורך השלמת המעגל- החזרת החלבון importin החוצה. ל-Ran-GDP יש אימפורטר מיוחד משלו המביא אותו לגרעין.



©ענת עציון

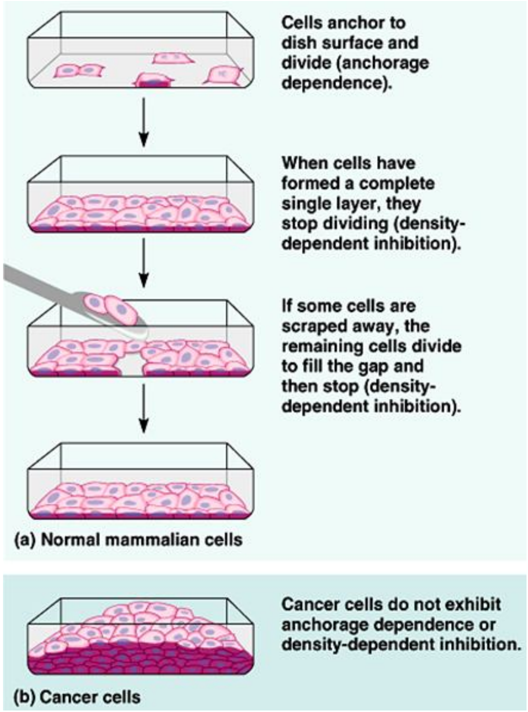
# שיטות שונות למחקר:

## תרביות תאים:

קו של תאים שמגדלים בצלחת מחוץ לקונטקסט הגופני שלהם. תרביות תאים ניתן לבודד מכל יצור ובכל שלב התפתחותי.

### הכנת התרבית:

הצלחת מהווה מצע לגידול תאים. המצע צריך להיות מצופה בחומר שתאים יכולים להידבק עליו. רוב התאים לא יגדלו ויתחלקו בתרחיף- צריכים את העיגון לצלחת. ישנם תאים בגוף המצויים בתרחיף, למשל: תאי-דם אדומים אותם ניתן לגדל בתרחיף גם מחוץ לגוף.




מלבד המצע, הגידול מחייב תנאים מתאימים: טמפרטורה, ריכוז $CO_2$ ומזון.

התאים מתחלקים עד שהם תופסים את כל המקום הפנוי על הצלחת. יש להם **contact inhibition**- התא מרגיש את התאים סביבו ומקבל איתות להפסיק להתחלק- **senescence**.

ולכן בשלב מתאים מוהלים את התאים כדי לאפשר להם להמשיך בחלוקות- שמים פרוטיאזות עדינות שלא יהרסו את התאים אך כן ינתקו אותם מהמצע. מתקבל תרחיף של תאים וניתן להעבירם לצלחת חדשה.

**<u>יוצא דופן:</u>** תאים סרטניים- לא עוצרים כאשר הצלחת מלאה ומתחילים לטפס אחד על השני, אין בקרה מתאימה.

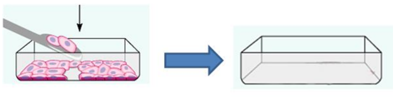
### יתרונות:

- אמנם המערכת ניסוי שונה מתנאי הגוף אך התאים שומרים על רוב ההרכב והתפקוד שלהם.
- ניתן לנטרל את ההשפעות של איברים אחרים ובכך להפחית "רעש רקע" במהלך הניסוי.
- מקטין את הצורך בניסויים בבע"ח.

**<u>חיסרון:</u>** כשהתאים נלקחים מהקונטקסט התאי, התנהגותם כן משתנה ולכן בכל-זאת דרושים ניסויים בבע"ח.

### 3 סוגי תרביות תאים:

**<u>תרבית ראשונית:</u>** מקורה באורגניזם השלם, התאים שנלקחו ממנו ישירות. אלה התאים הדומים ביותר בהרכב ובתפקוד שלהם למצב האמיתי בגוף. זה משהו שמאוד קשה לגדל, כי התאים בדרך-כלל מתים יחסית מהר (אבל תאים שהוכנו מרקמה סרטנית חיים בדרך-כלל זמן רב יותר).



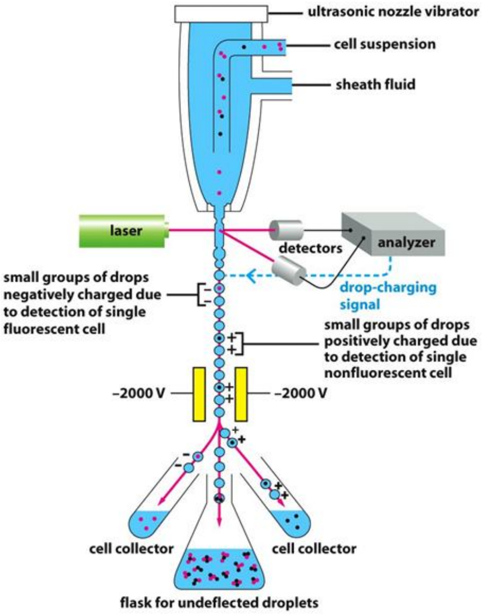

**<u>תרבית שניונית:</u>** נוצרת ע"י העברת תאים מסויימים מהתרבית הראשונית לצלחת חדשה. מכילה תאים שעברו שינוי מבחינת הבקרה בהשוואה למה שקיים בגוף והם גם מתחלקים מאוד מהר, הם עברו סלקציה מהתרבית הראשונית ולכן "אוהבים" להמשיך להתחלק. מספר החלוקות האפשרי הוא 50-70, מכיוון שישנה בקרה על מספר החלוקות של התא. לאחר-מכן התאים נכנסים למצב של עצירה ומתחילים למות באופן אינטנסיבי- מצב crisis. רק תאים ששרדו מצב זה ניתן להוציא מהם cell lines, כי אלה הם תאים בעלי יכולת חלוקה אינסופית (באופן תיאורטי), כי הם עברו בהצלחה את מצב הבקרה שגורם להפסקת החלוקה.



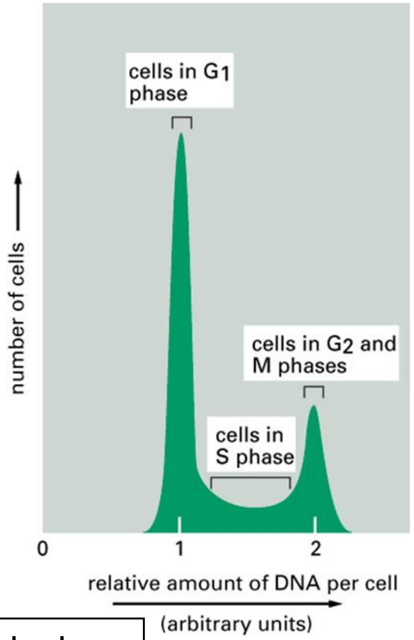
©ענת עציון

**<u>קווי תאים:</u>** תאים שבהם נגרמה איזושהי מוטציה המאפשרת להם להתחלק בצורה יעילה יותר. בתאי עכברים ישנן הרבה מוטציות ספונטניות, בתאי-אדם זה קורה פחות ולכן יש להשרות מוטציות, למשל ע"י הקרנה.

## FACS:




מכשיר המשמש למיון של התאים על-סמך הצורה, הגודל ונוכחות של סמן פלוריסנטי.מכניסים את התאים למכשיר והוא מדלל את התאים כך שבכל טיפה שעוברת ישנו בערך תא אחד, והטיפה עוברת דרך לייזר המזהה את רמת הפלוריסנציה ואז אם ישנה רמה מסויימת, המכשיר מקנה לטיפה מטען חיובי ואם אין- מקנה לה מטען שלילי. המכשיר מזהה ולא נותן שום מטען לתאים פגומים או מתים. לאחר-מכן ישנו שדה חשמלי אשר גורם לטיפות להתמיין לכלים שונים לפי המטען.

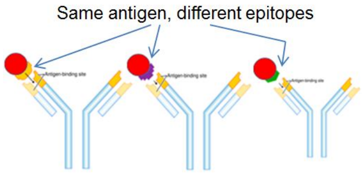



**<u>ניסוי קלאסי:</u>** מכניסים DNA מסומן פלוריסנטית. כמות הפלוריסנציה מצביעה על כמות ה-DNA.

<u>שלב G1:</u> הרבה תאים שרמת הפלוריסנציה שלהם נמוכה.

<u>שלב G2:</u> פחות תאים עם רמת פלוריסנציה כפולה.

<u>שלב S:</u> תאים שתהליך החלוקה בהם עדיין לא הושלם ולכן כמות ה-DNA בהם עדיין לא כפולה.




**<u>נוגדן monoclonal:</u>** מזהה אפיטופ יחיד של אנטיגן מסויים.
**<u>נוגדן polyclonal:</u>** מזהה כמה אפיטופים של אנטיגן מסויים.

## IP:

שיקוע בעזרת נוגדן. אפיטופ- האזור הספציפי בחלבון אליו נקשר הנוגדן. ניתן "לדוג" חלבון בעזרת הנוגדן הספציפי שלו. בסרכוז קל ניתן אח"כ להפריד בין הנוגדן לשאר הליזט.

ניתן להשתמש ב-IP על-מנת לבודד חלבון ספציפי מתוך תערובת של חלבונים. התהליך דורש כי בשלב מסויים הנוגדן ייקשר למצע מוצק.

## CO-IP:

מוציאים ע"י נוגדן לחלבון אחד את החלבון וכל החלבונים שאיתו באינטראקציה. את מה שיצא מריצים ב-western blot ומזהים ע"י נוגדן אחר את החלבון הנקשר.

**<u>יתרון:</u>** מדובר בחלבונים היוצרים אינטראקציה במצבם הטבעי ובסביבה הטבעית של התא.

**<u>חסרונות:</u>**

- לא ניתן לדעתם האם האינטראקציה היא ישירה או שאולי ישנו חלבון מתווך ביניהם.
- האינטראקציות חייבות להיות חזקות, אחרת הן ייפרדו בשטיפות שמבצעים בשיטה.
- הנוגדנים האלה חייבים להיות מאוד ספציפיים, ולכן השיטה היא יקרה יחסית.
- False positive- איתור אינטראקציות שנוצרו רק עקב ליזיס התא וערבוב המרכיבים.

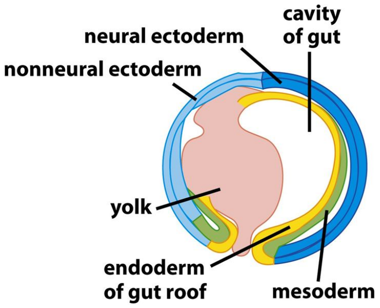

©ענת עציון

# מתא לרקמה

## הקדמה:

באורגניזמים מרובי-תאים, תאים אשר התמחו בביצוע משימה מסוימת נמצאים ביחד ברקמה במיקום שבו יש לבצע את המשימה. כדי שהאורגניזם יעשה את כל פעולותיו בצורה מתואמת, הוא צריך סידור של רקמות ואיברים וגם תקשורת ביניהם. כל רקמה היא אוסף של תאים המוחזקים ביחד ע"י קשרי תא-תא, מצע חוץ תאי או שניהם.

### התפתחות עוברית (תזכורת):




לרקמת התאים הראשונה קוראים: בלסטולה. היא מורכבת מ-3 שכבות, שמכל אחת נוצרות רקמות שונות:

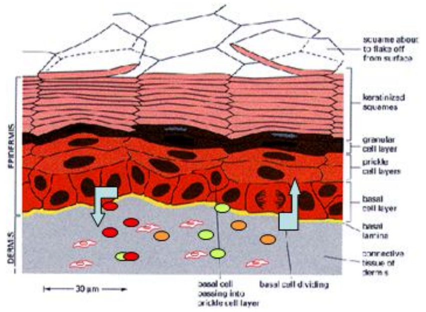
Endoderm- תאי אפיתל (מעל 80% מהתאים בגוף שלנו)

Mesoderm- רקמות חיבור, למשל: שריר, עצם, סחוס (מזנכימה).

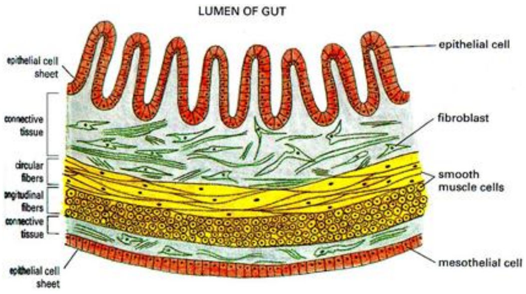
Ectoderm- העור ומערכת העצבים.

### השוואה בין תאי העור לתאי המעי הדק:

האפיתל מפריד בין החלל החיצוני של הגוף (במקרה של עור) לבין חלל הרקמה. רקמת האפיתל בעור היא רב-שכבתית ובמעי היא חד-שכבתית.



בעור התאים מאוד צפופים, יש ביניהם קשרים שגורמים להם לא לזוז האחד ביחס לשני. מתחת לשכבת האפידרמיס (מסומן בקו צהוב) יש תאי פיברובלסט, זוהי רקמת החיבור של העור- הדרמיס. ברקמת החיבור יש מעט מאוד תאים והם מפוזרים ברקמה וכל הרקמה מכילה חומר חוץ-תאי (ECM). ממברנה בזלית (BM) היא שכבה דקה המפרידה את הדרמיס מהאפידרמיס.




המעי מורכב בצורה דומה: גם האפיתל במעי מופרד מרקמת החיבור ע"י הממברנה הבזלית. תאי המעי מוחזקים קרוב אחד לשני ע"י חלבונים. הם זזים רק כאשר מתפתח סרטן ואז תאי שכבת האפיתל "פורצים" את המחסום של הממברנה הבזלית ועוברים לשכבה שמתחת. תאי רקמת החיבור מקובעים גם הם ע"י חלבון integrin שנקשר למצע החוץ-תאי ולכן הם לא "מטיילים ברקמה". תאי שכבת האפיתל שקרובים לממברנה הבזלית מקובעים ע"י חלבון שנקשר לממברנה הבזלית.

### המאפיינים של רקמות אפיתל וחיבור:

- תאים מוחזקים ביחד ברקמת אפיתל ע"י סוגים מיוחדים של junctions כאשר linkers מקשרים בין שני תאים סמוכים.
- ברקמות חיבור, תאים מופרדים זה מזה. החלל בין התאים מלא במצע חוץ-תאי (ECM) אשר מכיל פרוטיאוגליקנים וגליקופרוטאינים.



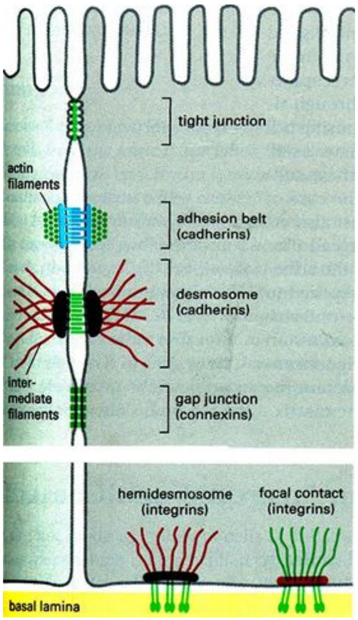
©ענת עציון

- רקמת האפיתל מופרדת מרקמת החיבור ע"י שכבה דקה של מצע חוץ תאי- הממברנה הבזלית (BM), למניעת ערבוב בין שני סוגי הרקמות.
- שכבת תאי האפיתל הסמוכה לממברנה הבזלית, מעוגנת אליה דרך linkers מיוחדים-integrins.
- תאי רקמת החיבור מוחזקים במקום דרך אינטראקציה עם ה-ECM בעזרת focal contacts. והאינטראקציה מתווכת ע"י אינטגרינים מסוג מיוחד.
- התאים משני סוגי הרקמות מתקשרים האחד עם השני דרך מולקולות מוסות מיוחדות.

## <u>הקשרים שמצמידים תאי אפיתל:</u>

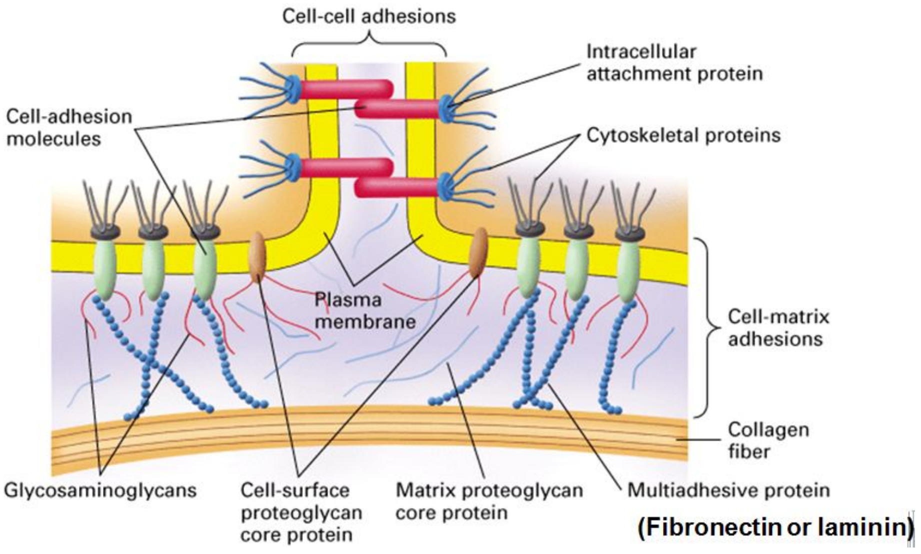
הקשרים תמיד מסודרים באותו סדר:

1. <u>Tight junctions</u>- (הכי קרוב לצד האפיתלי)- קשרי הידוק.
2. <u>Adherens junctions</u>- קשרי תאחיזה ואחריהם desmosomes.
3. <u>Gap junctions</u>
4. <u>Cell matrix</u>- קשרים הקושרים את תאי האפיתל למצע.



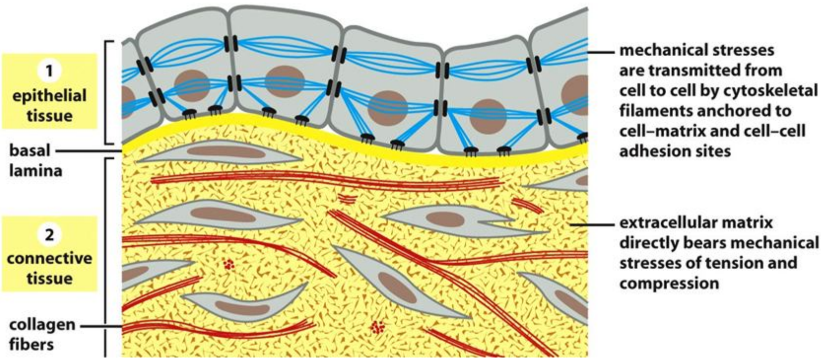

| name | function |
|---|---|
| tight junction | seals neighboring cells together in an epithelial sheet to prevent leakage of molecules between them |
| adherens junction | joins an actin bundle in one cell to a similar bundle in a neighboring cell |
| desmosome | joins the intermediate filaments in one cell to those in a neighbor |
| gap junction | allows the passage of small water-soluble ions and molecules |
| hemidesmosome | anchors intermediate filaments in a cell to the basal lamina |

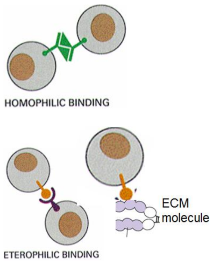
כל הקשרים מונחים ע"י עיקרון זהה: כדי לקיים את הקשר קיים חלבון חוצה ממברנה (linker). בתוך התא, כל ה-linker-ים קשורים לשלד התוך-תאי בקישור לא ישיר ע"י חלבונים מתווכים. זה מאפשר תקשורת בין שני חלקי התא.





©ענת עציון




**<u>שני סוגי אינטראקציות של לינקרים:</u>**

<u>אינטראקציות הומופיליות:</u> לינקרים מאותו סוג קשורים אחד לשני.

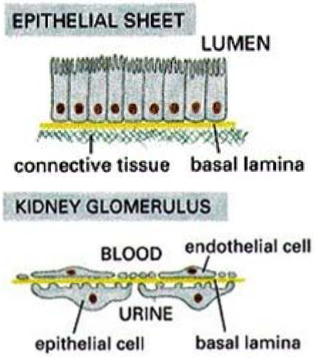
<u>אינטראקציות הטרופיליות:</u> לינקרים מסוגים שונים קשורים אחד לשני.

קשר בין תא למצע תמיד יהיה באינטראקציה הטרופילית.

# <u>קשרי תא ומצע חוץ תאי:</u>

## <u>הממברנה הבזלית (BM):</u>

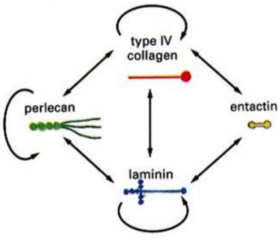
לממברנה הבזלית יש מבנה קבוע יחסית ברקמות השונות ועובי ממוצע של 40-100nm. היא ממוקמת מתחת לשכבת האפיתל ברקמות אפיתליאליות ועוטפת תאי שריר חלק, כלי דם ותאי שומן, והיא לא מאפשרת לתאים לעבור לרקמת החיבור ולהפך. הממברנה נותנת לרקמה את השלמות שלה ומעגנת את התאים אליה, משמשת כפילטר למולקולות ומכווינה אותן.




ה-laminin הוא הבסיס ל-BM והוא מורכב מ-3 שרשראות שמשולבות האחת בשנייה ויכולות לקשור כל אחד מהמרכיבים ב-ECM. הוא קושר את ה-BM לרקמות החיבור מתחת, והוא חשוב בהכוונה של התאים.

התאים שהכי קרובים לחלל כלי הדם נקראים: תאי אנדותל וגם מתחתם יש ממברנה בזלית. בדרך-כלל מבנה הממברנה הבזלית די דומה אבל יש מקומות בהם היא עבה יותר, למשל: בכלייה היא עבה פי-2.

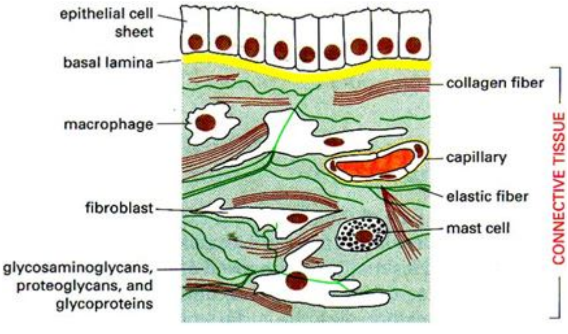
גם הממברנה הבזלית וגם החומר החוץ תאי של רקמות החיבור נוצרים ע"י התאים הקשורים אליהם.




**<u>4 מרכיביה העיקריים:</u>** למינין, perlecan, קולגן 4 ו-entactin (עליו לא נלמד).

למינין נקשר לכל האחרים וכך נוצרת רשת אשר מקנה למצע חוזק וגם מתפקדת כמו מסננת שלא מאפשרת מעבר של מאקרומולקולות.

## <u>המצע החוץ-תאי (ECM):</u>




מה שמאפיין אותו זה שונות מאוד גדולה במבנה. הוא מהווה את השלד החוץ-תאי והוא מורכב מ-<u>3 סוגי מולקולות עיקריות:</u>

1. גליקופרוטאינים- אדהזיה: לקישור התאים והמצע החוץ-תאי (פיברונקטין, למינין).
2. גליקופרוטאינים מבניים- יוצרים אינטראקציות בין חלבונים למצע, מביאים ליציבות וחוזק (קולגן).
3. מולקולות שמעניקות למצע החוץ תאי צמיגות, מסוגלות לספוח מים ולהפוך לג'לי (פרוטיאוגליקנים, GAGs).



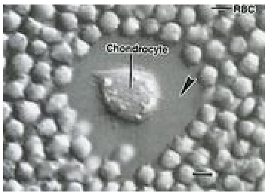
©ענת עציון

**דוגמאות:**

עצם- מורכבת ממעט תאים בקצוות ורוב העצם מורכבת מחומר חוץ-תאי. בעצם יש שקיעת מלחי סידן שנותנת לה קשיות.

סחוס- סוג של רקמת חיבור, רובו חומר חוץ תאי והוא רך (בניגוד לעצם).

אפידרמיס בעור- רקמה בעלת הרבה חומר חוץ-תאי.




**ניסוי:** ערבבו תא אחד מהסחוס עם תאי דם אדומים. ניתן לראות שבמקום שבו מופרש חומר חוץ-תאי, תאי הדם האדומים לא יכולים להתערבב עם התא.

**מאפייני מרכיבי ה-ECM:**

- שלא כמו חלבונים תוך-תאיים שהם נוטים להיות קומפקטיים וגלובולריים, החלבונים החוץ-תאיים הם מאורכים (extended).
- החלבונים מורכבים ממספר מודולים שבאמצעותם הם עוברים אינטראקציות עם עצמם ועם חלבוני מטריקס אחרים (self-assembly).

למצע החוץ-תאי תפקיד בהקניית עמידות לתא מפני כוחות מכאניים, הוא גם מהווה שלד שעליו נבנית הרקמה בזמן ההתפתחות העוברית. המצע החוץ-תאי הוא שביל שעליו נודדים התאים. הוא חשוב גם לצורך קיבוע התאים למקומם והוא נותן תמיכה לתאים.

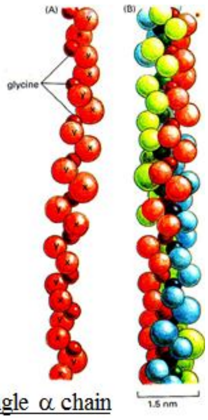
הערה: מוטציות במולקולות ה-ECM יכולות לגרום למחלות קשות.

**קולגן:**

זוהי משפחה של חלבונים (27 סוגים) שנמצאים רק ב-ECM. מה שמאפיין אותם הוא עמידות למתיחה וזמן החיים הארוך ביותר שידוע עבור איזשהו חלבון נורמאלי בבע"ח. ישנם 42 גנים בגנום האנושי שמקודדים לקולגן. רוב סוגי הקולגן יוצרים סיבים, סוג הקולגן תלוי בסוג הרקמה. הסוגים הנפוצים:

קולגן I: מהווה כ90% מסך הקולגנים, מצוי בדרמיס של העור, בעצם, באיברים פנימיים ובגידים.

קולגן II: מצוי בעיקר בסחוס.



Single α chain

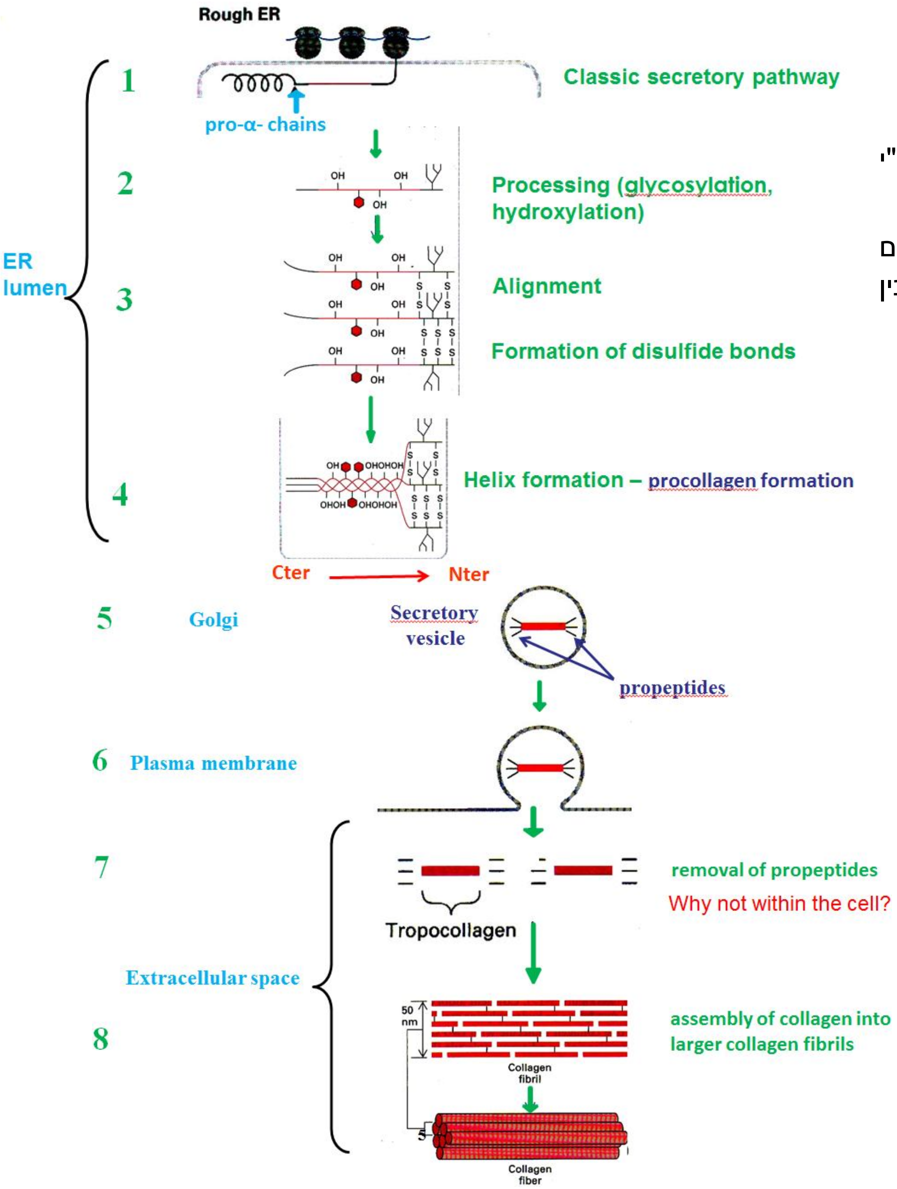
**מבנה הקולגן:** כל הקולגנים מורכבים מ-3 שרשראות אלפא שכרוכות אחת סביב השנייה, כל שרשרת מקורה בגן מסוים וסוג הקולגן נקבע לפי סוג השרשראות. כל 3 חומצות אמינו ישנו סיבוב. ישנן הרבה מאוד חזרות של **Gly-Pro-X** כאשר X היא בד"כ- ליזין. בסיבוב מצויה גליצין שהיא חומצה אמינית גמישה ללא שיירי צד וישנה פרולין לא בסיבוב, כדי לספק קשיחות.

רוב הקולגנים יוצרים סיבים אבל לא כולם. בד"כ ליזין ופרולין עוברים הידרוקסילציה וזה מאפשר הרבה מאוד קשרי מימן פנימיים בתוך ההליקס המשולש.

**סינתזה:** כל שרשרת אלפא מסונתזת באופן נפרד ויש לה בקצה רצף סיגנאל המכווין אותה ללומן של ה-ER. יש להם בקצה רצפים קצרים-פרופפטידים, שנחתכים בשלב מאוחר יותר. הם עשירים בציסטאינים שיוצרים ביניהם קשרי S-S ומונעים את יצירת הסיב. אם סיבי הקולגן היו נוצרים בפנים, זה היה חוסם מעבר של חלבונים אחרים והורג את התא. התארגנות מסיבית של סיבים לא נחוצה בתוך ה-ER.



©ענת עציון




בתוך ה-ER:

הידרוקסילציות וגליקוזילציות.

יישור של 3 שרשראות אלפא ע"י היווצרות קשרי S-S.

אפקט של זיפר נסגר: הם מוחזקים ע"י קשרי מימן בין השרשאות.

זהו הפרוקולגן.

מפרוקולגן לקולגן בוגר:

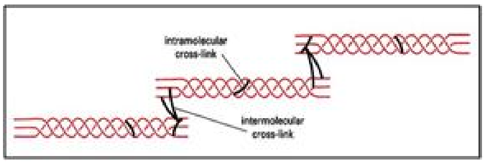
הפרוקולגן נכנס לווסיקולות הפרשה ומגיע לגולג'י. ממנו הוא מופרש אל מחוץ לתא.

בתווך החוץ-תאי יש פרוטיאז ספציפי ונעשה חיתוך של הפרופפטידים. זה מניע את יצירת הסיב. הם מתארגנים אח"כ לפיברילות ושם ישנם קשרים קוולנטים בין הליזינים (צילובים) והפיברילות מתארגנות לסיבים ארוכים יותר.

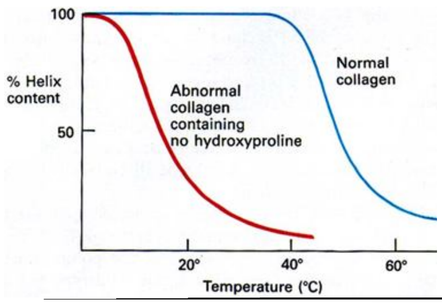
הערה: יצירת סיבים היא ספונטנית ואפשר לגרום להם להיווצר במבחנה בהינתן התנאים המתאימים.

**ג'לטין:** קולגן שעבר דנטורציה.

הצורה בה הקולגן מתארגן קשורה קשר ישיר לרקמה שבה הוא נמצא. בגיד סיבי הקולגן מאורגנים במקביל לציר האורך של הגיד. בעור סיבי הקולגן מתארגנים בצורה של "סל נצרים". זה מאפשר לעור לא להיקרע כאשר מותחים אותו. בקרנית העין הסיבים מאוד קצרים ומאורגנים בצורה של שתי-וערב. הם מאוד קצרים כי תפקיד הקרנית הוא להעביר אור ולכן הסיבים הם קצרים ולא צפופים וזה מאפשר מיקוד האור וכניסתו לרשתית.




**צילובי ליזין:** קשרים קוולנטיים בין הסיבים השונים בקולגן אשר נוצרים מחוץ לתא ע"י אנזים מיוחד. האנזים הזה יכול ליצור קשר בין שני ליזין סמוכים בהליקס משולש וגם בין הליקסים. הסיבים הללו מסודרים במקביל ולכן יכולים להימתח ואז לחזור לצורתם הקודמת.




**חיוניות ויטמין C:** האנזים שעושה הידרוקסילציה על פרולין, הקופקטור שלו זה ויטמין C. ניתן לראות בגרף שקולגן שלא עבר הידרוקסילציה, עובר דנטורציה בטמפרטורה שהיא פחות מפיזיולוגית. ולעומתו קולגן נורמאלי עובר 50% דנטורציה ב-50 מעלות. ההידרוקסילציה תורמת ליציבות הקולגן.

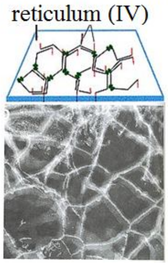


©ענת עציון

<u>הערה:</u> אנשים שהיו הרבה בשמש ובעלי מחסור בויטמין C, העור שלהם נעשה פריך וגם כלי הדם, דפנותיהם נהיים פריכים ויש דימומים פנימיים. זוהי מחלה לתלית.

## <u>קולגן לא סיבי:</u>

לא כל סוגי הקולגן יוצרים סיבים. כל הקולגנים הם חלבונים המופרשים אל מחוץ לתא וכולם מורכבים מהליקס משולש. כדי להפוך לסיב הם צריכים לעבור עיבוד שבו מורידים את הקצוות. הורדתם היא תנאי הכרחי ליצירת סיב, אך לא תנאי מספיק. המולקולה צריכה להיות מסוגלת ליצור הליקס משולש כדי ליצור סיב. בקולגנים לא סיביים יש רצפים קצת שונים אשר לא מאפשרים ליצור הליקס.




**<u>קולגן IV:</u>** מסוגל לעשות אינטראקציה עם עצמו וליצור רשת דו-מימדית שהיא התשתית שעליה נבנית הממברנה הבזלית.

**<u>קולגן IX:</u>** מחזק את הקשר בין סיבי קולגן II המצוי בסחוס.

<u>הערה:</u> קולגנים שמתווכים קשרים בין סיבי קולגן לא יוצרים סיבים בעצמם כי הם צריכים להיות גמישים יותר.

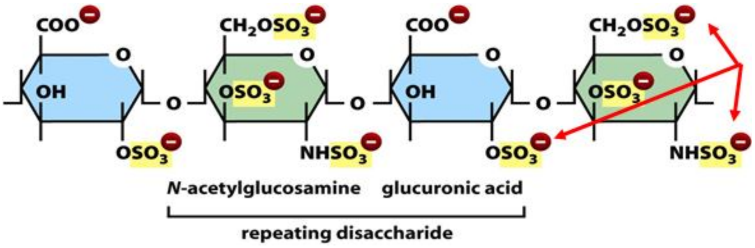
## <u>השפעת מוטציות ב-N/C-Ter על יציבות הקולגן:</u>

בגלל שתהליך הסגירה של ההליקס המשולש מתחיל מהקצה ה-C, מוטציה בו היא חמורה יותר מאשר מוטציה בקצה ה-N. כל ח.אמינו שלישית צריכה להיות גליצין (שאין לה שייר-צד) והחלפת גליצין לכל ח.אמינו אחרת תגרום להפרעה בסידור ההליקס.

- <u>Osteogenesis imperfecta:</u> מוטציות ב-Type I: עצמות שביריות, בדרגה נמוכה- נכות קשה.
- <u>Chondrodysplasia:</u> מוטציות ב-Type II: פגיעה בסחוס- גפיים מעוותות ומקוצרות.
- <u>Ehler-Danlos syndrome:</u> מוטציות ב-Type III: העור שבירי והאפיתל של כלי-הדם שבירי. גמישות יתר.
- <u>Alport syndrome:</u> מוטציות ב-Type IV: פגיעה בממברנה הבזלית של הכליות- אין פילטור יעיל של פסולת מהדם ובשלב מסוים בחיים ישנה קריסה של הכליות.

## <u>:GAGs</u>

סיבים אלסטיים ב-ECM שנמצאים באיברים שצריכים להתכווץ ולהתרחב. הם סוכרים במבנה של $[A+B]_n$ והסוג שלהם נקבע לפי סוג הסוכר בעמדה B, סוג הקשר והסולפונציה של הסוכרים. כל ה-GAGs מורכבים מיחידות חוזרות של אותו די-סכריד. בד"כ יש בו N-acetyl-galactose/glucose-amine. רוב הסוכרים עוברים סולפונציה בגולג'י. היא קורית לאורך המולקולה אך לא בהכרח באופן זהה. ישנה שונות בתבנית הסולפונציה וזה מקנה לפולימר הסוכרי תכונות שונות. הסולפונציה מקנה לסוכרים מטען שלילי וגם החומצות הקרבוקסיליות. המטענים השליליים סופחים קטיונים ואלה סופחים מים. המולקולות הארוכות האלה הופכות לג'ל והן מקנות ל-ECM את הצמיגות שלו.



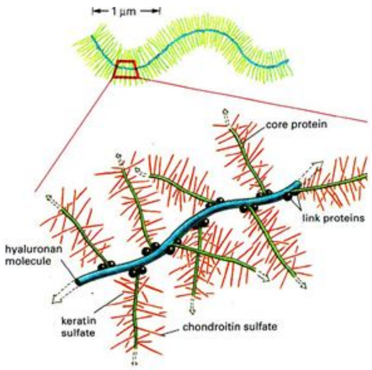

### <u>:HA (Hyaluronic Acid)</u>

אחד מה-GAGs החשובים ביותר. HA לא מסונתזת בגולג'י, אלא בציטוזול, סמוך לממברנת הפלסמה ומושחלת החוצה תוך כדי הסינתזה במנגנון מיוחד. היא מאוד טעונה שלילית בגלל המשקל המולקולארי הגבוה שלה והיא גם סופחת הרבה מים ולכן תופסת נפח מאוד גדול ב-ECM.

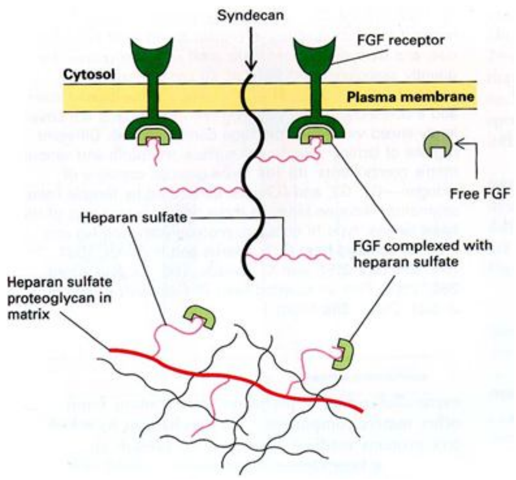


©ענת עציון

היא מאוד חשובה בהתפתחות העוברית כי היא עוטפת תאים שנודדים וממלאת חללים במהלך ההתפתחות. גם בבוגר היא חשובה כי היא מהווה חלק נכבד מהסחוס. היא גם משמשת כ"משחה" כדי למנוע חיכוך בזמן התזוזה של המפרקים או בעת הפעלת לחץ עליהם (והיא משמשת גם להזרקה בטיפולים קוסמטיים להעלמת קמטים).




**<u>אגרגט:</u>** נמצא בסחוס, אחת המאקרומולקולות הכי גדולות שמוכרות בגוף האדם. תופס נפח כגודלה של בקטריה. מורכב מציר שעשוי מ-HA (מופיע בכחול) שאליו קשורים פרוטיאוגליקנים מסוגים: Chondroitin Sulfate באמצעות חלבונים מתווכים- HA binding protein. זה נותן לסחוס את התכונות הצמיגיות שלו בגלל היכולת לספוח הרבה מים.




**<u>פרוטיאוגליקן:</u>** GAGs הקשורים לחלבון ליבה.

**<u>HS (Heparan Sulfate):</u>**

סוג מיוחד של פרוטיאוגליקנים שיש להם תפקיד בהעברת סיגנלים. הם יכולים לקשור מולקולה שמעבירה סיגנאל מחוץ לתא והם גורמים לשרשרת של תגובות (ישנן מולקולות שצריכות להיקשר ל-HS כדי להעביר את הסיגנאל, לדוגמא: פקטורי גדילה).

בנוסף, HS סופח מולקולות סיגנאל ובכך שולט על קצב ההעברה שלהן בתווך החוץ-תאי, זה מאפשר שליטה בעוצמה ובזמן שבו הסיגנאל מועבר.

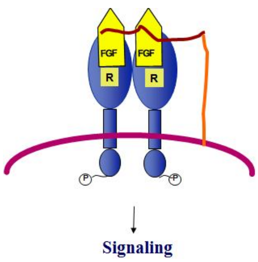
**<u>Assay Systems:</u>**

לחקירת האינטראקציה נשתמש בתרביות תאים. אם רוצים לבדוק אם ה-GAGs קשורים להעברת סיגנאל אז פוגעים בהם, למשל ע"י:

1. עיכול אנזימטי של HS ע"י אנזימים ספציפיים.
2. מניעת סולפונציה ע"י מעכבים מטבוליים.

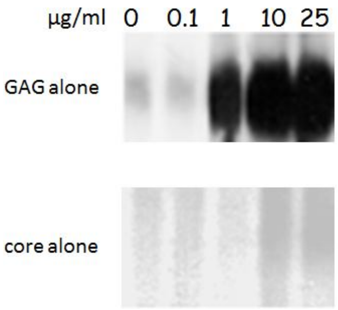
ואז ניתן לבדוק את הפלט שהיינו אמורים לקבל אם הסיגנאל מועבר.

ישנן מערכות ניסוי של תאים בהן יש נוקאאוט גם לרצפטור וגם לפרוטיאוגליקן ואז ניתן להוסיף מרכיבים ולראות איזו קומבינציה שמוסיפים מביאה להעברת סיגנאל נכון.




**<u>ניסוי:</u>**

בדקו איך פרוטיאוגליקן משפיע על העברת הסיגנאל FGF (HS-binding פקטור גדילה) שנקשר לרצפטור ובעקבותיו עובר דימריזציה הגורמת לשרשרת סיגנאלים בתא. רצו לבדוק האם הסוכר חשוב או החלבון בפרוטיאוגליקן. בניסוי מבטאים רק את החלק החוץ-תאי של הרצפטור שאמור לעבור אינטראקציה (וכך אין סיבוכים בניסוי של קיפול לא נכון בתוך הממברנה) ועושים Assay שיש בו סיגנאל אם FGF נקשר לרצפטור.



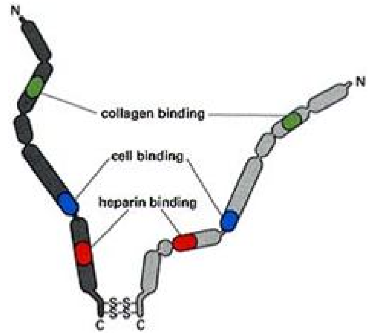

ניתן לראות שהוספת GAG (הסוכר) בריכוזים עולים, מגבירה את האינטראקציה. לעומת-זאת חלבון ליבה ללא GAG לא מאפשר אינטראקציה בין הרצפטור לליגנד.



©ענת עציון

## גליקופרוטאינים לקישור תא-מצע:

בנוסף לקולגן ולפרוטיאוגליקנים שעוברים אינטראקציה ביניהם, ישנן גם מולקולות של גליקופרוטאין שלא יוצרות סיבים. אלה מולקולות שמקשרות בין המטריקס של סיבי קולגן ופרוטיאוגליקנים לתאים.




**פיברונקטין:** מאקרומולקולה שמורכבת משתי שרשראות המחוברות ביניהן בקשרי S-S לקצה הקרבוקסילי. היא מורכבת ממודולים, כל אחד מהם מהווה דומיין בעל פונקצייה ייחודית.

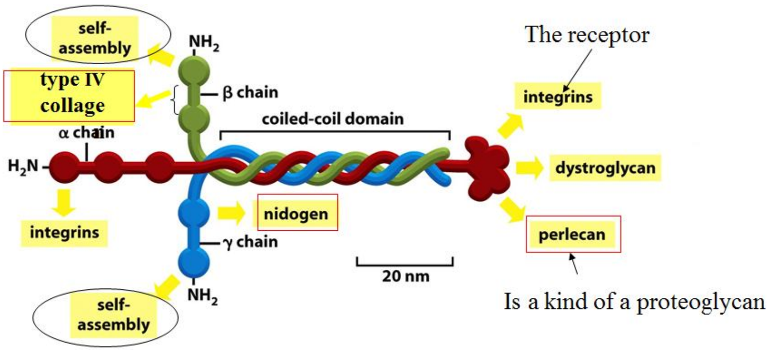
באדום- מודול שקושר פיברונקטין ל-GAGs שב-ECM.

בכחול- מודול הנחוץ לקישור לתאים.

בירוק- מודול שמקשר לקולגן.

הערה: ישנם כ-30 מודולים שונים, אלה רק דוגמאות.

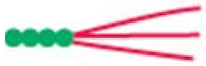
פיברונקטין חשוב לנדידת תאים- פיברובלסטים נודדים רק עליו ולא יוצאים כמעט מהגבול שהוא מתווה. והוא חשוב גם לתהליך ה-branching.




**למינין:** מולקולה המורכבת מ-3 שרשראות. יש לה אתרי קישור רבים. יכולה להיקשר ל-perlecan שהוא אחד המרכיבים העיקריים של ה-BM. יש לה גם קישור ל-linker נמצא על-פני התאים. מכילה מודול של self assembly- יכולה להיקשר לעצמה. ומודול לקשירת קולגן סוג 4- גם הוא מצוי בממברנה הבזאלית.

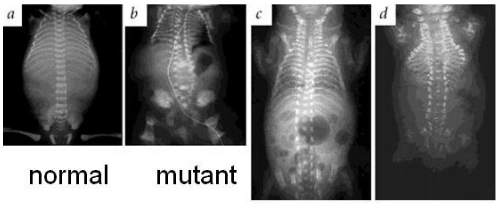
למינין נחוץ לנדידת אקסונים ולנדידת תאים: בבוגרים- בריפוי פצעים למשל ובהתפתחות העוברית.

והוא נחוץ גם ליצירת בלוטות חלב (מורפוגנזה).



**פרליקן:** פרוטיאוגליקן מאוד גדול. מכיל חלבון ליבה שאליו מחוברות 3 שרשראות HS.

חיוני לבקרה של תגובות התא לגורמי גדילה, וגם לחוזק של ה-BM.




Human fetus

Mouse embryos

פגם בפרליקן מביא למחלה גנטית- DDSH, מחלה לתלית שבה לא נוצר סחוס. בניסוי בעוברי עכבר, העוברים התפתחו במשך 9.5 ימים ואז מתו. זה בגלל שבשלב זה מתחילה ההתמיינות והלב מתחיל לפעום ואז ישנה חשיבות רבה לעמידה בפני לחצים, ואם אין סחוס אז יש קריסת מערכות ומוות.

תיקון המחלה: הכנסת פרליקן לתוך רקמת הסחוס מביאה לחזרה לפנוטיפ נורמאלי.

### תפקידי הממברנה הבזלית:

- מספקת תמיכה מכנית לתאים שקשורים אליה- אם מופעלים כוחות על הרקמה, ה-BM סופגת חלק מהם.
- מייצרת סיגנלים לשימור של חיוניות תאים- ללא פרליקן אין מעבר סיגנלים והתאים מתים.
- משמשת כמצע לנדידת תאים.
- חסם למעבר תאים- תאים מעל ומתחת ל-BM לא מתערבבים. גם מאקרומולקולות לא עוברות דרכה. (מאוד חשוב בהקשרי סרטן).

בסרטן: המחסום של BM נשבר ע"י אנזימים שמפרישים תאי הסרטן.



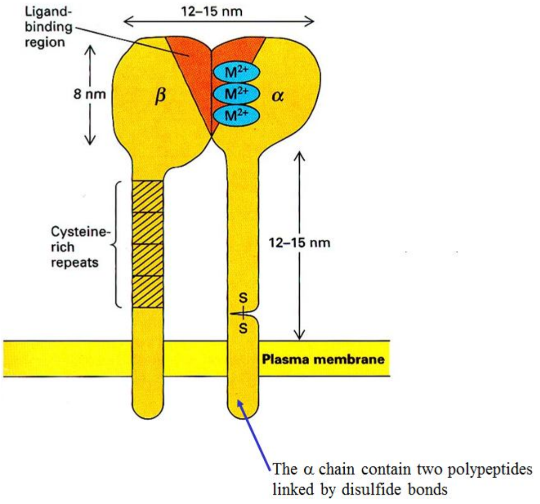
©ענת עציון

**פירוק המטריקס החוץ-תאי:**

- הפירוק מתרחש ע"י Matrix metalloproteinase, אנזימים הנמצאים מחוץ לתא- כחלבונים מופרשים או קשורים לממברנת הפלסמה.
- מעריכים כי הם מעורבים ביצירת רקמות, נדידת תאים, תהליך ריפוי רקמות ויצירת כלי-דם.
- פעילות יתר שלהם יכולה לגרום למחלות או לתרום להרעתן (מחלות חניכיים, דלקת פרקים).

# המתווכים העיקריים של קשרי תא-מצע:

## אינטגרינים:



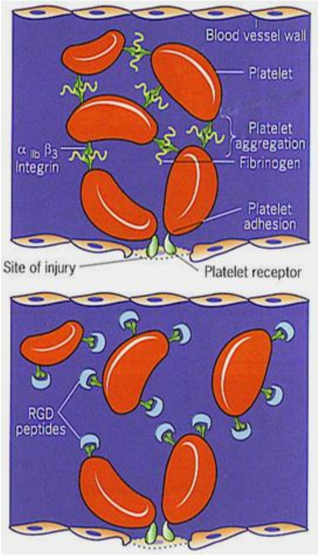

לינקרים עיקריים שנמצאים על התאים ומשמשים לעיגונם למטריקס החוץ-תאי. קיימים רק בבע"ח. אלה חלבונים ממברנאליים בעלי חלק שפונה לחוץ התא וחלק שפונה לפנים התא.

מורכבים משתי שרשראות: α ו-β, שאינן קשורות קוולנטית. ידועים 18 סוגים של α ו-8 של β מה שמאפשר קומבינציות רבות ביניהם.

בכתום- אתר הקישור למטריס החוץ-תאי.

אינטגרינים גם קושרים יונים דו-ערכיים (Ca, Mg, Mn). האפקט של כל אחד מהם לא כל-כך ברור.

אתר הקישור של האינטגרין מורכב מ-3 חומצות אמינו: RGD (זה אינו מספיק לספציפיות).

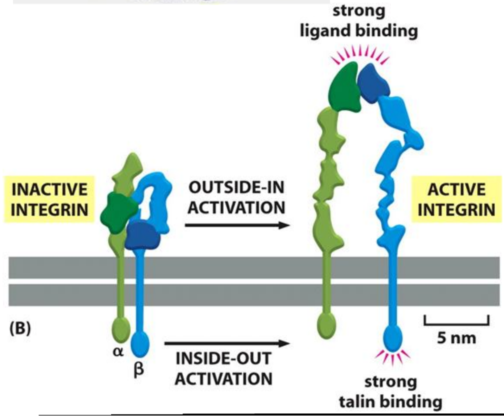



<u>בנדידת תאים:</u> הקשר למצע הוא חלש ונשבר בזמן התנועה.

האפיניות של אינטגרין למטריקס חלשה ולאינטראקציה יציבה נחוצים צברי אינטגרינים בנקודה אחת.

האינטגרינים חשובים לתהליך ריפוי של פצע- במהלך פציעה משתחרר בדם ליגנד לאינטגרין שנקרא- פיברינוגן. זה מביא לאגרגציה של טסיות הדם באזור הפצע. האינטגרין שנמצא בטסיות נקרא: aIIB3. לפיברינוגן יש כמה אתרי קישור ולכן יותר מטסית אחת יכולה להיקשר אליו וזה מה שיוצר את האגרגט של טסיות הדם.

כאשר מוסיפים לטסיות RGD סינטטי חופשי, הוא מתחרה עם הפיברינוגן על הקישור לטסיות ומונע מהן לעשות אגרגציה. תאים אלה ימותו כי הם תאים צמודי-מצע שמונעים מהם את הקישור אל המצע לזמן ארוך (רק תאים סרטניים יודעים להמשיך להתחלק מבלי להיות צמודים למצע).

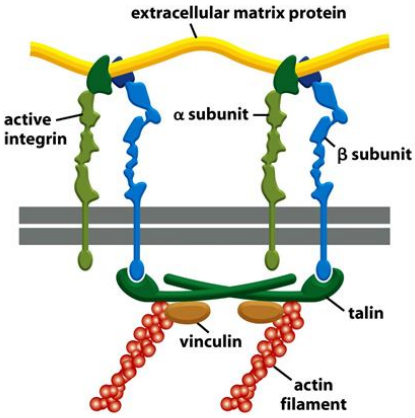



**<u>אקטיבציה של אינטגרין:</u>** כשליגנד נקשר לאינטגרין, חל בו שינוי קונפורמציה: α ו-β קרובים כשאין ליגנד, וכשיש הם מתרחקים וזה מאפשר לזנב הציטוזולי של β לקשור talin שקושר אקטין (כך מתווך הקשר בין אינטגרין לאקטין). כל קשירת סיגנל גורמת למעבר סיגנל לפנים התא לקשירת אינטגרין ו-talin. ישנו סיגנל הפוך שבא מבפנים: talin מתחרה עם α על קישור ל-β. זרחון ה-talin מאפשר את קישורו ל-β ואז יש קישור אינטגרין (מחוץ לתא) לליגנד שלו.

<u>עיקרון הפעולה:</u> שינוי קונפורמציה ושינוי אלוסטרי.



©ענת עציון

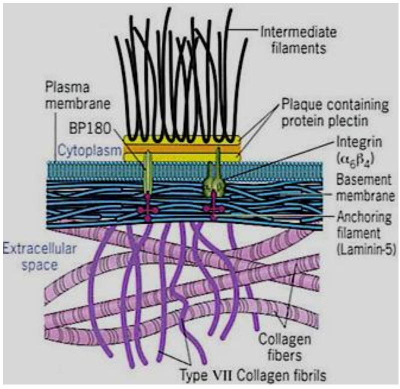



האינטגרינים בדוגמא זו קשורים לשלד האקטין (מה שקורה בדרך-כלל), אך הם יכולים להיקשר גם לשלד סיבי הביניים.

ייחוד האינטגרינים: היכולת להעביר סיגנלים בשני הכיוונים.

**2 סוגים של קשרי תא-מצע:**

**Focal Contact:** מקשר בין פנים לחוץ התא באמצעות קישור אינטגרין לסיבי אקטין. ישנה אפיניות חלשה לאינטראקציה של אינטגרין ו-ECM כדי לאפשר דינמיות של ניתוק וחיבור קשרים. הפיצוי על כך הוא שבמקום האינטראקציה ישנם צברים של אינטגרינים המאפשרים קשר חזק.




**Hemidesmosomes:** מבנה מולקולארי המקשר בין סיבי הביניים של התא ל-ECM. מצוי בעיקר ברקמה אפיתלית. גם כאן הקשר מתווך ע"י אינטגרין.

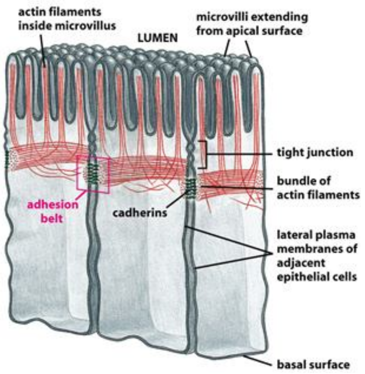
הבדלים בין הקשרים:

- סוג אחר של חלבונים מתווכים.
- ב-focal contact קצה סיב האקטין נקשר ובסיבי הביניים, הקישור לטרלי ואינו בקצה.

# קשרי תא-תא:

לתאים יש יכולת להכיר תאים מסוגם ויש ספציפיות בהכרה הזאת. אינטראקציה כזו יכולה להיות יציבה או זמנית (בעיקר בתאי מערכת החיסון).

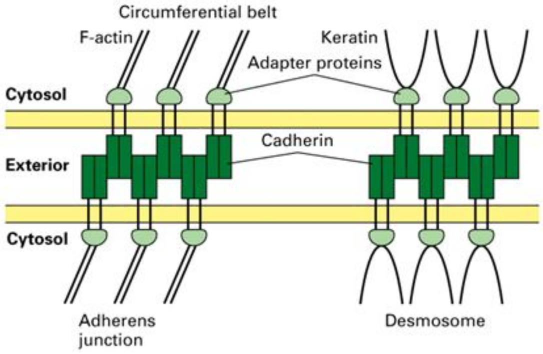
תאים מאותו הסוג נוטים ליצור אגרגטים, למשל: אם לוקחים תאים מתחילת ההתפתחות העוברית, מערבבים אותם ושמים על צלחת- הם ינדדו ויסתדרו באותה צורה שבה היו בעובר, באגרגטים.




**קדהרינים:**

קיימים בכל תאי האפיתל ומהווים את המרכיב החשוב ביותר בקשירה בין התאים. בלעדיהם לא יתקיימו הקשרים האחרים. מתווכים אינטראקציה הומופילית בין התאים. מאפשרים לתאים לזהות את עצמם בצורה ספציפית ומדוייקת. זקוקים לקלציום לצורך היווצרותם.

הקדהרינים נמצאים איפה ששלד חגורת האקטין נמצא, והם מקשרים חגורות אקטין של שני תאים אחד עם השני. ישנה פעולה קואורדינטיבית בין תאי אפיתל מבחינה מכאנית- דרך שלד התא.




הקדהרינים מתפקדים גם כרצפטור וגם כליגנד.

**Adherence junctions:** מתווך ע"י קדהרינים שמקשרים בין סיבי אקטין מתאים שכנים.

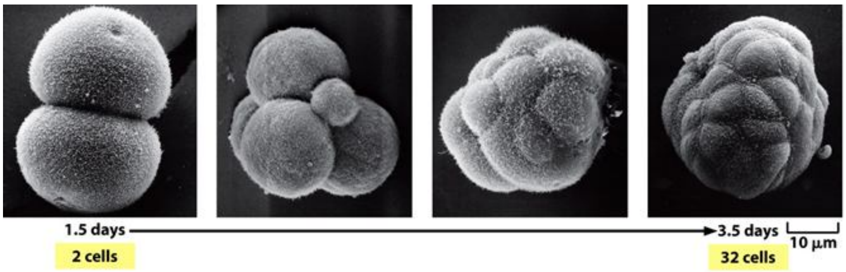
**Desmosomes:** מבנה מולקולרי מורכב המקשר בין סיבי הביניים. אחד מתפקידיו- הקניית חוזק מכני לשכבת האפיתל.



©ענת עציון

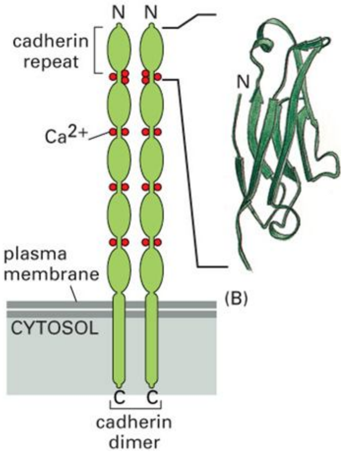
**<u>חשיבות קדהרינים בהתפתחות העוברית:</u>**

בהתפתחות העוברית לאחר הגעה ל-8 תאים ישנה תופעת compaction- דחיסה הנחוצה להמשך ההתפתחות. אם התהליך הזה לא קורה אז העובר מת. ניתן לעצור את התהליך ע"י שימוש בנוגדן כנגד קדהרין (מסוג E). שימוש בנוגדן כנגד מולקולות אדהזיה אחרות לא מונע את התהליך.




בנוסף, אם מוסיפים **EDTA** (חומר שתופס קלציום) אז הרקמה מתפוררת לתאים בודדים. ואם מוסיפים קלציום אז היא מקבלת מחדש את המבנה שלה. מה שמחזיק את התאים ברקמה העוברית ביחד בשלבים הראשונים זה קדהרינים. אבל זה רק בתחילת ההתפתחות, ביצור בוגר ישנם הרבה סוגים של קשרים המחזיקים את התאים ביחד.

**<u>מבנה הקדהרין:</u>**



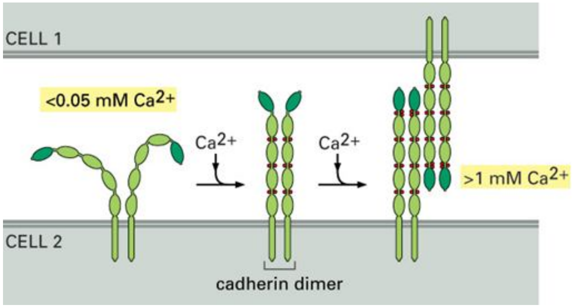

החלק התוך-תאי קצר יחסית ושמור יותר באבולוציה. הוא נקשר לסיבי האקטין בעזרת חלבונים מסוג: קטנינים ו-α-אקטינים. החלק החוץ-תאי מורכב מכמה תתי-יחידות שחוזרות על עצמן- cadherin repeats, שמקנות לקדהרין גמישות. ישנו רצף קונצנזוס בין תתי-היחידות של חומצות אמינו טעונות שלילית שתפקידן לקשור קלציום המקנה לקדהרין קשיחות.

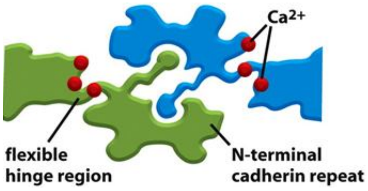
בקצה הקדהרין (ה-N-טרמינלי) מצוי רצף שדרוש לקדהרין כדי להיקשר לראש של קדהרין מתא שכן.

<u>הערה:</u> החלק שאחראי על ההכרה הספציפית הוא ה-repeats. החלפתו ברצף אחר יכול להביא לאינטראקציה הטרופילית.

ישנם חלבונים מתווכים שונים, למשל: B-catenin שמתווך בין החלק הציטוזולי של הקדהרין לבין שלד האקטין. (זהו גם פקטור שעתוק כאשר הוא מצוי בגרעין התא).

**<u>חשיבות הקלציום:</u>**




בריכוז קלציום מאוד נמוך, הקדהרינים נמצאים במונומרים על הממברנה, והחלק החוץ-תאי שלהם גמיש.

בריכוז קלציום גבוה יותר- הוא נקשר למקומות החיבור וזה גורם להקשחה של החלק החוץ-תאי, מה שנחוץ ליצירת דימרים של קדהרינים.

ואז לאחר היווצרות הדימרים משני הצדדים, האינטראקציה מתרחשת ב-repeat של הקצה ה-N-Ter.

בנוסף, קדהרינים הרבה יותר רגישים לפרוטיאוליטים ללא קלציום.



©ענת עציון

**<u>סוגים שונים של קדהרינים:</u>**

**<u>E-Cad:</u>** הסוג העיקרי. מצוי בתאי אפיתל (שהם 80% מגופנו) ובראשית ההתפתחות העוברית.

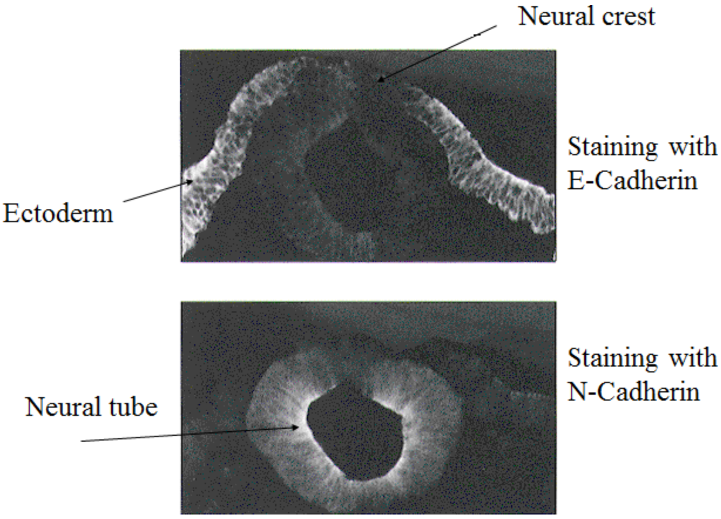
**<u>P-Cad:</u>** מצוי בקשרי תא-תא בין קיר הרחם לשלייה של העובר.

**<u>N-Cad:</u>** מצוי במערכת העצבים, בעדשות, בלב ובשריר השלד.

## <u>תפקידי קדהרין:</u>

- מאפשר לתאים בודדים ליצור רקמה מסודרת.
- מבקר אדהזיה סלקטיבית, הדרושה להיווצרות של מבנים חדשים.

בתהליך הנדידה, התאים נודדים במקומות ספציפיים ובזמן הנדידה אין קשרי תא-תא. כשהתאים מגיעים ליעדם, הם יוצרים קשר גם עם תאים מסוגם וגם עם תאים אחרים.



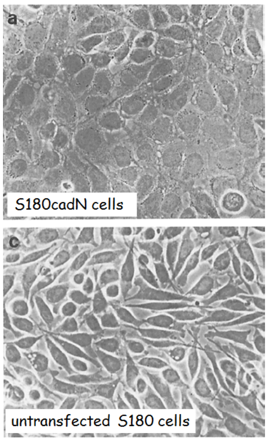

הקדהרינים מסייעים במהלך ההתפתחות העוברית ליצירת צינור העצבים הראשי. אם אין ביטוי דיפרנציאלי מתאים, של E-Cad ו-N-Cad, אז צינור העצבים לא יתנתק מהאקטודרם והתאים לא ינדדו.

בתמונה- צביעה ע"י נוגדנים ספציפיים ל-E-Cad ו N-Cad.

בזמן שצינור העצבים שוקע יש צביעה רק ל-N. כאשר התאים הופכים לתאי מערכת העצבים, חל שינוי בביטוי של קדהרין ומופיע N במקום E.

**<u>ניסוי:</u>** הזרקת E-Cad לעובר לפני שלב נדידת התאים, ואז בגלל נוכחות ה E-Cad לא נוצר צינור. זה מוכיח שהעלמותם חיונית להתנתקות התאים ולנדידה. החזרה שלהם נחוצה ליצירה של רקמות.

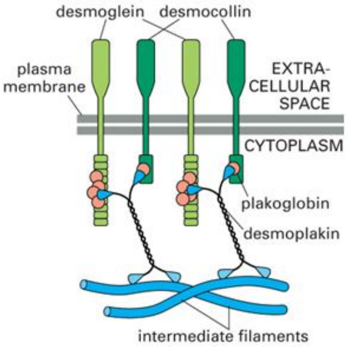
## <u>ניסויים המראים כי קדהרינים נחוצים לקשרי תא-תא:</u>




- לחוקרים היה קו תאים סרטני- S180, תאים שאינם מבטאים אף קדהרין. התאים הללו שונים מאוד מורפולוגית מתאים שמצויים באגרגט. עשו טרנספורמציה של פלסמיד עם גן ל-N-Cad. התאים הפכו להיות יותר שטוחים ועגולים ולא נשארו רווחים בין התאים.
- לאחר-מכן עשו מוטציה מכוונת לדיכוי הקדהרין, למשל: הוצאת הסידן, או נוגדן המתחרה על הקשירה לקדהרין. ואז ראו שתאי התרבית חזרו להיות ללא קשרים ביניהם, כמו שהיו בהתחלה.
- בניסוי אחר- כאשר גידלו את התאים בצפיפות נמוכה מידי, למרות הימצאות הקדהרינים לא נוצרה אינטראקציה ביניהם. דרוש כי התאים יהיו בקרבה מספקת.
- ראו במיקרוסקופ שרק בנוכחות N-Cad נוצרו בין התאים גם adherence junctions ו-gap junctions. קדהרינים זו איזושהי תשתית הנחוצה ליצירת הקשרים האחרים.
- הקשר הוא בין קדהרינים מאותו סוג- ביטוי שני סוגי קדהרין בשתי תת-אוכלוסיות שונות, הביא לכך שהן לא עברו אינטרקציה ביניהן.

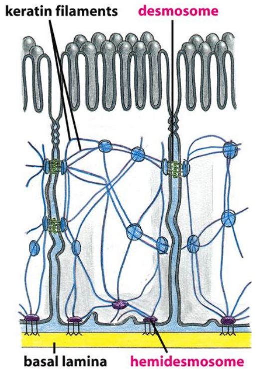


©ענת עציון




## דסמוזומים:

נמצאים מתחת ל-adherens junctions והם מחברים את שלד סיבי הביניים בין התאים. אלה אינטראקציות הומופיליות התלויות גם הן בקלציום. יש להם שני לינקרים: desmoglein-ו desmocolin. סיבי האקטין מתחברים לדסמוזומים בעזרת חלבונים בעלי מבנה דמוי כפתור.




### תפקיד הדסמוזומים:

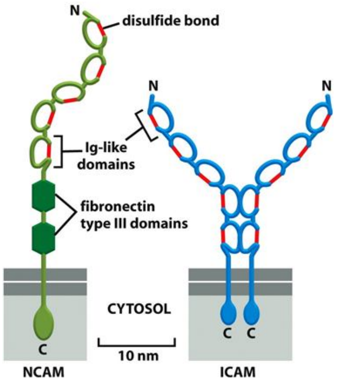
- לספק תמיכה לתא- הם מקשרים את שלד סיבי הביניים לתוך התא ונוצרת רשת המחזקת את התא.
- החזקת תאי האפיתל צמודים אחד לשני כדי למנוע מעבר של נוזלים ומולקולות קטנות אחרות בין התאים.

### סיכום כל קשרי העיגון:

**Table 19–2 Anchoring Junctions**

| JUNCTION | TRANSMEMBRANE ADHESION PROTEIN | EXTRACELLULAR LIGAND | INTRACELLULAR CYTOSKELETAL ATTACHMENT | INTRACELLULAR ANCHOR PROTEINS |
|---|---|---|---|---|
| *Cell–Cell* | | | | |
| adherens junction | cadherin (classical cadherin) | cadherin in neighboring cell | actin filaments | α-catenin, β-catenin, plakoglobin (γ-catenin), p120-catenin, vinculin, α-actinin |
| desmosome | cadherin (desmoglein, desmocollin) | desmoglein and desmocollin in neighboring cell | intermediate filaments | plakoglobin (γ-catenin), plakophilin, desmoplakin |
| *Cell–Matrix* | | | | |
| actin-linked cell–matrix adhesion | integrin | extracellular matrix proteins | actin filaments | talin, vinculin, α-actinin, filamin, paxillin, focal adhesion kinase (FAK) |
| hemidesmosome | integrin α6β4, type XVII collagen (BP180) | extracellular matrix proteins | intermediate filaments | plectin, dystonin (BP230) |

## CAMs- אינטראקציות שלא תלויות בסידן:




אינטראקציה המתווכת ע"י לינקרים, כאשר החלק החוץ-תאי מורכב מלולאות שמחוברות בקשרים דיסולפידים. נקראים גם: **Ig-super family**.

כשגילו את הנוגדנים, גילו שיש מוטיב שחוזר על עצמו בנוגדנים: לולאה שבה אחרי הציסטאין הראשון יש תמיד Trp. זהו: Ig-like domain. אחר-כך מצאו שישנן הרבה מולקולות שאינן נוגדנים שיש להם את הלולאה הזו, שהן מתווכות קשרי תא-תא וגם קיימות בחסרי חוליות (שלהם אין נוגדנים), וזה מצביע על כך שהמולקולות האלה קדמו לנוגדנים באבולוציה. ולכן הן נקראות Ig-super family.

האינטראקציות שהם יוצרים אינן תלויות בקלציום. הן יכולות להיות במערכת העצבים, החיסון ותאי שריר. בניגוד לקדהרינים- מבצעים גם אינטראקציות הטרופיליות. הם עוזרים לתאים להתקדם למקום שאליו הם אמורים להגיע.

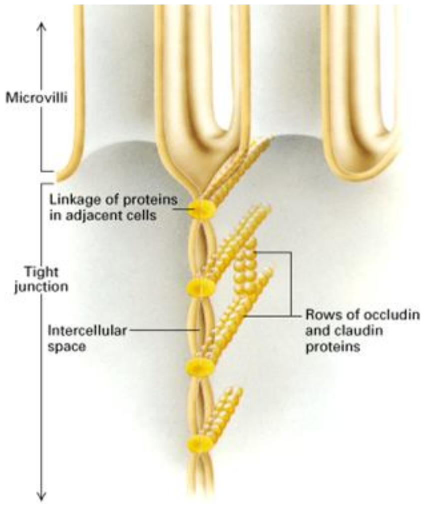


©ענת עציון

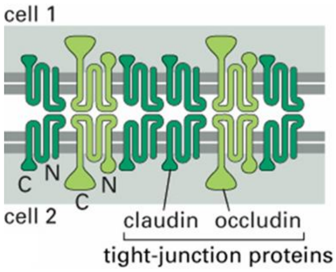
על חשיבות הדסמוזומים למדו ממחלה לתלית בעקבות מוטציה שמי שנולד איתה, יש לו ראש מלא נוזלים והפרעה מוטורית קשה עקב היעדר קבוצת אקסונים במוח ובין המוח לחוט השדרה.

בהתפתחות העוברית יש על מולקולת CAM חומצה סיאלית באחוז גבוה יחסית-25% לעומת 7% בבוגר. ולכן בהתפתחות העוברית יש דחייה חזקה יותר וקשרים חלשים יותר ודינמיים יותר. בבוגר לעומת-זאת נחוצים קשרים יציבים יותר.

## :Tight junctions




קשרים המצויים מעל ה-adherence junction. אלה קשרי הידוק במרווחים קבועים המהדקים את ממברנת הפלסמה משני תאים שכנים. כל החלבונים שיוצרים אותם הם מאוד סמוכים אחד לשני. קשרי ההידוק לא מאפשרים מעבר של- נוזלים, מאקרומולקולות ורוב הזמן גם מולקולות קטנות, בין התאים.

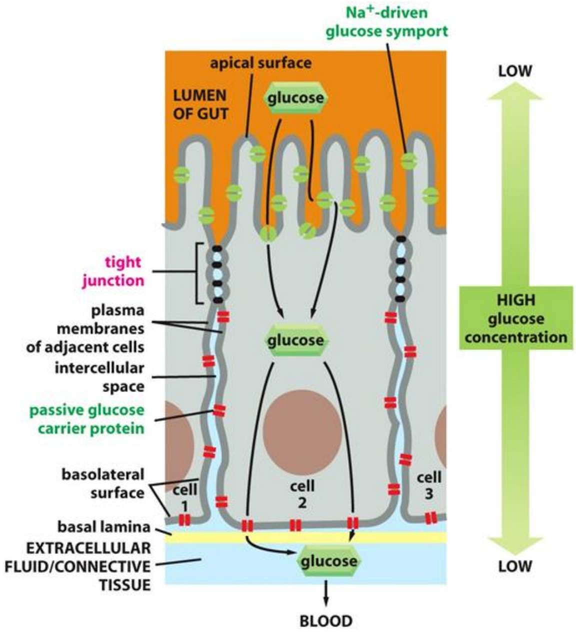



הם מורכבים משני חלבונים: claudin ו-occludin. אלה חלבונים חוצי-ממברנה, כאשר גם הם קשורים לשלד האקטין דרך חלבונים מתווכים. החלבונים המתווכים קושרים את ה- tight junction עצמו לשלד האקטין.

### :תפקידי ה-Tight junction

- הפרדת הנוזלים שמחוץ לתא ומניעת דיפוזיה של חלבונים ומולקולות קטנות בין תאים שונים. בתאים שונים יש עבירות לחומרים שונים. מה שקובע את ההבדלים האלה בין התאים הוא איזה גן מקודד לחלבוני ה-Tight junction.
- שמירה על תת-דומיינים בתוך ממברנת הפלסמה. לתא אפיתל יש מבנה פולארי, בצדדים האפיקלי והבזו-לטרלי יש הרכב ליפידים שונה וגם ישנו מידור בין חלבונים בשני הצדדים.

  <u>טרנספורט טרנס-צלולרי:</u> העברת חומר מצד אחד של התא לצידו השני. ה-tight junction יכולים להשפיע על הכיוון של הטרנספורט.
- קובעים את הכיווניות של חומרים אשר מופרשים מבלוטה, למשל- בהפרשת חלב משד האם ובהפרשת שתן החוצה.




בגלל המידור של ה-Tight junction יש צורך בשני סוגי טרנספורטרים- בשני הכיוונים. הכניסה של גלוקוז לחלל התא היא בסימפורט המונע ע"י יוני נתרן. והיציאה של גלוקוז נעשית ע"י מעבר פסיבי עם טרנספורטר אחר.

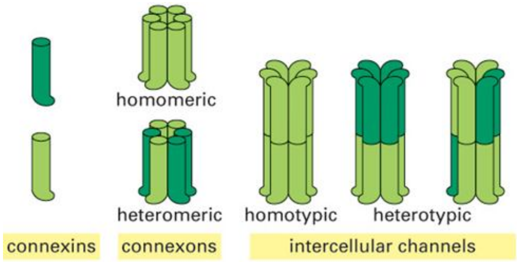


©ענת עציון

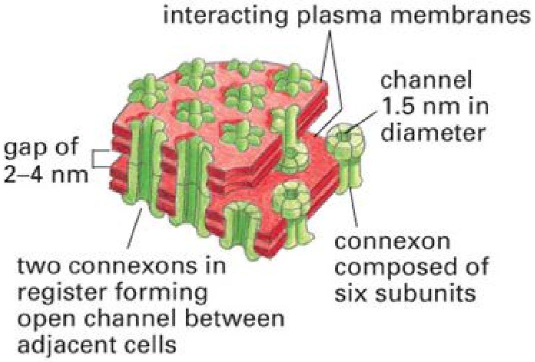
## :Gap junctions

קשרים הנחוצים לתקשורת בין תאים. יוצרים תעלה קטנה מיקרוסקופית בין התאים של 2-4nm שמאפשרת מעבר של מולקולות קטנות בין התאים. הם נקראים כך כי במקום שהם נמצאים הם מחזיקים את הממברנות במרחק מאוד קטן אחד מהשני- של כמה ננומטר. Gap junction מאפשרים תקשורת מאוד מהירה ומתוזמנת בין תאים (יותר מהירה מאשר שימוש בסיגנאלים ורצפטורים).

**מבנה:**




מורכבים מ-6 תת-יחידות של חלבון-connexin מכל תא. 6 יחידות מרכיבות connexon. גם כאן ישנם הרבה גנים המקודדים ל-connexin-ים מסוגים שונים.




לא כל מולקולה יכולה לעבור, רק מולקולות שהן לכל היותר 1000 Da. מה שיכול לעבור זה: יונים, ATP, AMP, כל אבני הבניין- חומצות אמינו, נוקליאוטידים וכו'.

דוגמאות:

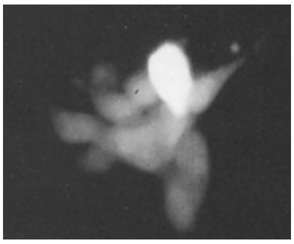
- בהתכווצות שריר לב, הם חשובים לצורך תזמון של התגובה.
- בתאי כבד רוב מעבר החומרים מתווך ע"י gap junctions.
- בהתפתחות זקיק בשחלה, תא הביצית עטוף בתאי גרנולוזה- תאי עזר שמתקשרים עם הביצית ע"י gap junctions.
- Connexin43: נחוץ ליצירת החללים בחדרי הלב.

**השפעת pH וקלציום על החדירות:**

קלציום: כאשר ריכוזו עולה, ה-gap junctions נסגרים ולא מאפשרים מעבר דרכם. ריכוז גבוה של קלציום מפעיל מערכת אפופטוזיס. הריכוז עולה למשל כאשר התא נפגע, ואז ה-gap junctions מייד נסגרים כדי למנוע נזק לתאים שבסביבה.

pH: ב-pH נמוך (חומצי) ה-gap junctions נסגרים ונפתחים שוב ב-pH בסיסי.

**ניסוי לבדיקת היווצרות gap junctions:**



בודקים האם ישנה העברת חומר כלשהו מתא לתא. מזריקים מולקולה פלוריסנטית- לוציפר צהוב לתוך תא קטן, מסתכלים במיקרוסקופ ומודדים את רמת הפלוריסנציה בתאים שכנים. אם הם נוצרו אז רואים שבכל התאים השכנים גם מתחיל להתקבל צבע פלוריסנטי.

הערה: לא ניתן להשתמש ב-GFP כי הוא חלבון הגדול פי-30 מהגודל המקסימאלי שיכול לעבור.



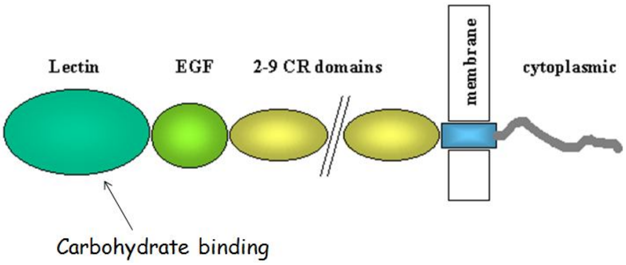
©ענת עציון

## סלקטין:

מולקולות המתווכות אינטראקציות, זהו חלבון טרנסממברנאלי שפעילותו דורשת קלציום.

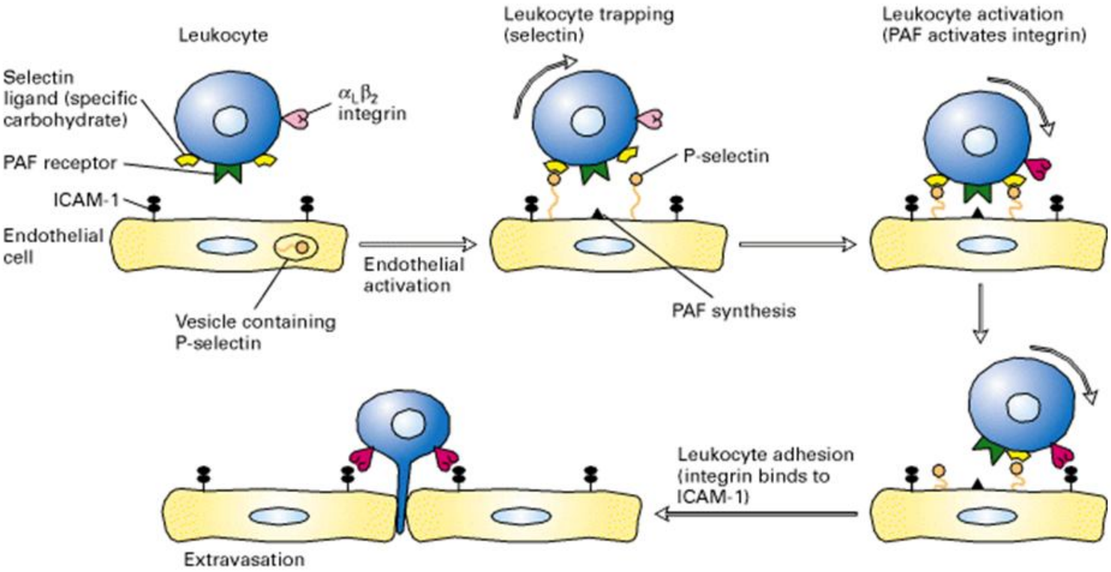
הם מתווכים אינטראקציות זמניות הטרופיליות.

<u>תפקיד:</u> מאפשר לתאי-דם לבנים לברוח מזרם הדם ולהגיע לאזור הדלקת.




## התהליך המולקולארי:

כאשר יש דלקת, מופרשות מולקולות סיגנל. הסיגנל גורם לביטוי מהיר מאוד של סלקטינים על-פני תאי האפיתל של כלי-הדם. זה קורה מאוד מהר כי סלקטינים כבר סונתזו ומצויים בגרנולות הפרשה ואז בתגובה לסיגנל הם משוחררים ומבוטאים על דופן התא.




ישנה מולקולה נוספת: PAF, היא וסלקטין מתחילים לעבור אינטראקציה עם תא דם-לבן. שתי האינטראקציות האלה מאפשרות לתאי דם לבנים להפסיק בתנועה המהירה של הדם ולכן יש גלגול על-פני דופן כלי הדם. ישנה גם אקטיבציה של אינטגרין על תא דם לבן וזו אינטראקציה שעוצרת אותו וגורמת לו לעבור בין תאי האפיתל עד למקום הדלקת.



©ענת עציון

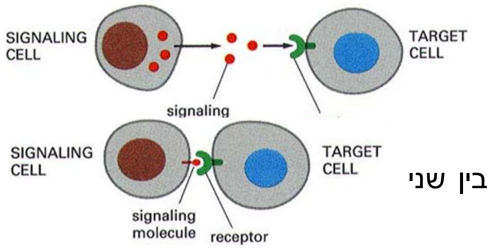
# מנגנוני תקשורת בין תאים

סיגנלים בין תאים חיוניים לשרידות ולהתנהגות של רב-תאיים, ונחוצים כדי לבצע תיאום בין התאים.

## המרכיבים של מערכת העברת סיגנאלים:

- מולקולה מעבירת סיגנאל-SM.
- העברה שלה למיקום מסויים.
- אינטראקציה בין ה-SM לרצפטור ספציפי ואקטיבציה של הרצפטור.
- הפעלת מסלולי העברת סיגנל תוך-תאיים וכתוצאה מכך שינויים בהתנהגות התא.
- הפסקת הסיגנאל.

### מולקולה מעבירת סיגנאל:

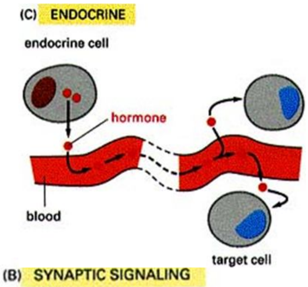


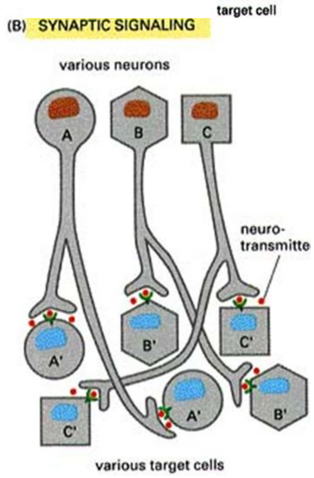

1. מולקולה שנוצרת ומופרשת החוצה באקסוציטוזה, ופועלת על תא שכן או רחוק מאוד מהמקום שבו היא נוצרה.
2. מולקולות שהן חלבון טרנסממברנאלי שחלק ממנו בולט אל מחוץ לתא ומכיר רצפטור על תא שכן. זה מצריך קרבה רבה בין שני התאים.

**שני סוגים עיקריים:**

- מולקולות מסיסות (פפטידים, חומצות אמינו, קטכולאמינים, גזים).
- מולקולות שאינן מסיסות (חומצות שומן, הורמונים).

### סוגי העברת סיגנל:




**סיגנל פאראקריני:** המולקולה מופרשת מתא אחד ופועלת בתא קרוב יחסית (נניח באותה הרקמה). מתווך ע"י מולקולות פוליפפטידיות ובגלל המרחק לא יכול לבצע תקשורת בין רקמות רחוקות.

**דוגמא-1:** תאי האפידרמיס מפרישים SM וזה גורם לתאים נוספים להפריש חומרים אחרים ונוצר מעגל של הפרשת סיגנלים.

**דוגמא-2:** גורמי גדילה הממלאים תפקיד חשוב במערכת החיסון.

**סיגנל אנדוקריני:** תיווך סיגנלים ע"י הורמונים. הם משוחררים אל זרם הדם ומוזרמים לאיבר המטרה. בהפרשה לזרם הדם הסיגנל נמהל וריכוזו יורד ולכן יש לו אפיניות מאוד גבוהה לרצפטור.

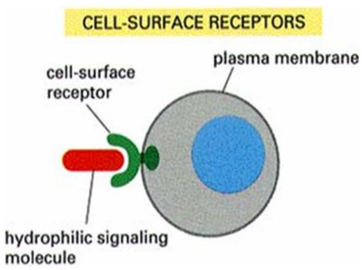
**סיגנל סינאפטי:** תקשורת בין תאי מערכת העצבים או בינם לבין תאים אחרים בגוף. המולקולה מופרשת קרוב לאיבר המטרה, ריכוז הליגנד ליד הרצפטורים מאוד גבוה והדיסוציאציה של הליגנד מהרצפטור מאוד מהירה (תגובה עצבית צריכה להיות מאוד מהירה וגם להיפסק מהר).

**דוגמא:** האפיניות של אצטילכולין לרצפטור שלו מאוד נמוכה מה שמאפשר הפסקת הסיגנל במהירות.

**סיגנל אוטוקריני:** סיגנל שהתא מפעיל על עצמו. כל תא יכול להפריש חומרים המשפיעים עליו וגם על התאים האחרים ברקמה.

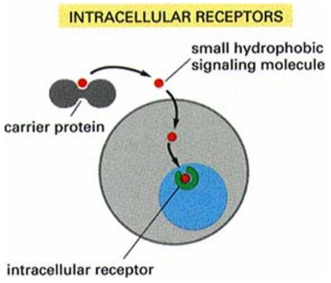
**דוגמאות:** התפתחות עוברית, סנכרון בין תאי רקמה, בזמן דלקת, התכווצות בשריר, בתא סרטני-מייצר לעצמו מולקולות שאמורות להגיע מבחוץ וכך הוא מפעיל תהליכים קונסטיטוטיביים.


©ענת עציון




## סוגי רצפטורים:

**רצפטור על-גבי הממברנה:** חלבון חוצה ממברנה שקושר ליגנד שמגיע מבחוץ ולא נכנס לתא. קישור של הליגנד מפעיל את הרצפטור והרצפטור שהופעל מפעיל קסקדה של העברת סיגנל בתוך התא שבסופה יש תגובה תאית. הליגנד במקרה זה הוא הידרופילי.



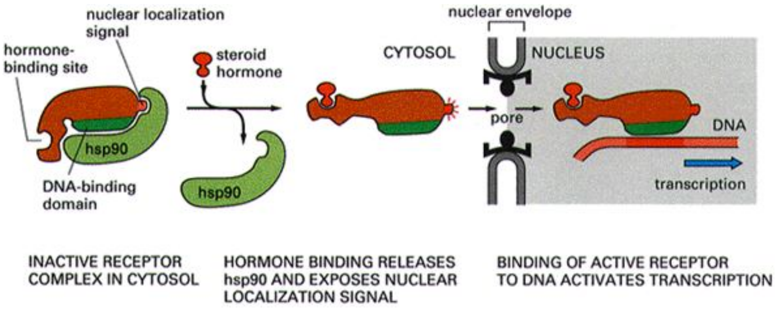

**רצפטור תוך תאי:** הליגנד צריך להיכנס לתוך התא כדי להפעילו. חלבונים גדולים לא יכולים לעבור את הממברנה ולכן מדובר במולקולות קטנות. רובן מולקולות הידרופוביות (כי הן צריכות לעבור את הממברנה) ורוב הרצפטורים הם פקטורי שעתוק אשר נכנסים לגרעין ומבקרים שעתוק. זוהי העברת סיגנל איטית יחסית כי מולקולות הסיגנל הן בדרך-כלל הורמונים וסטרואידים שבאים מרחוק.

הערות:

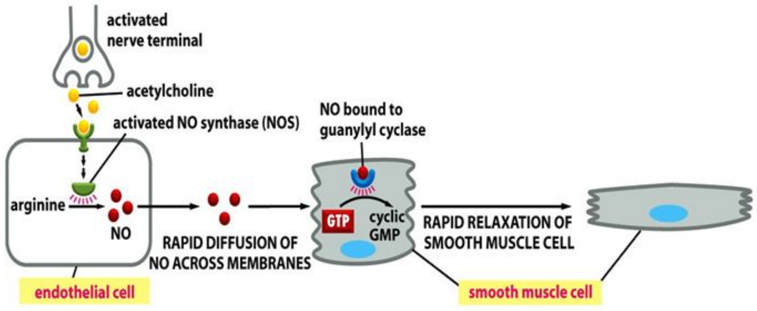
- המולקולות האלה מאוד הידרופוביות ולכן יכולות לעבור בזרם הדם ע"י חלבון-נשא אשר מגביר את המסיסות שלהן בדם.
- זמן מחצית החיים של מולקולות סיגנל תוך-תאי הוא יותר ארוך מאשר סיגנל חוץ-תאי וגם התגובה שהן מתווכות ארוכה יותר- לוקח לתאים זמן רב יותר להגיב לסיגנל תוך-תאי.

**מנגנון אקטיבציה של רצפטור תוך-תאי:**

במצבו הטבעי הרצפטור קשור לרפרסור החוסם את אתר הקישור ל-DNA. ההורמון מגיע ועקב קישורו משתנה הקונפורמציה של הרצפטור ואז נחשף אתר הקישור ל-DNA ורצף סיגנל המכוון לגרעין. ואז הרצפטור נכנס בעצמו לגרעין, נקשר לפרומוטור ומשפיע על ביטוי הגנים.




**דוגמא:** רצפטור ל-NO שאחראי להרחבת כלי הדם והרפיית שריר הלב.




תאי האנדותל מצויים בדרך-כלל בקרבה פיזית לתאי עצב, אצטילכולין מופרש מתאי עצב ונקלט בתאי אנדותל ואז כתוצאה מכך מתרחשת תגובה שבסופה מיוצר NO שיודע לעבור בדיפוזיה מתא האנדותל לתא השריר החלק. NO נקשר ל-guanylyl cyclase ומאקטב אותו, ונוצרת מולקולה: cyclic GMP שמפעילה שרשרת אירועים נוספת שבסופה יש הרפייה של השריר.

## השפעת הליגנד על פעילות התא:

**השפעת ליגנד אחד על תאים שונים באופן שונה:**

יש הרבה ליגנדים שפועלים על יותר מרצפטור אחד, שכל אחד מהם מפעיל תהליכים שונים בתא.

1. ליגנדים הנקשרים לאותו רצפטור אבל ישנה ספציפיות שונה באפקטורים בהמשך העברת הסיגנל.

דוגמא: אצטילכולין הוא נוירוטרנסמיטור. בשריר הלב הוא גורם להרפיית שריר הלב, ובבלוטות רוק הוא גורם להפרשת עמילאז. הליגנד נקשר לאותו הרצפטור בשני המקרים.



©ענת עציון

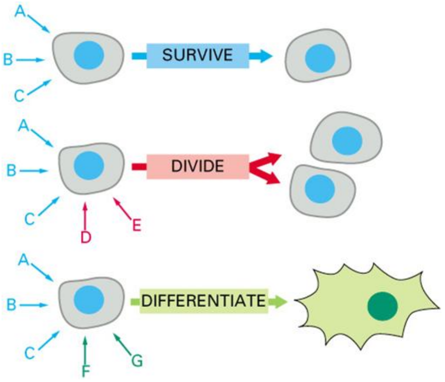
2. ליגנדים נקשרים לרצפטורים מסוג שונה.

<u>דוגמא:</u> בשריר אצטילכולין גורם להתכווצות ע"י קשירה לרצפטור אחר מאשר בדוגמא הקודמת.

**<u>השפעת ליגנדים שונים על תא באופן דומה:</u>**

הרצפטור והאפקטורים שהוא מפעיל הם שונים אך התגובה התאית זהה.

<u>דוגמא:</u> פקטורי גדילה בעלי רצפטורים ספציפיים משלהם, לא ייקשרו לרצפטור של גורם גדילה אחר אך כולם מובילים לאותה התגובה. האפקטור זהה לחלוטין וזו הסיבה לתוצאה ביולוגית זהה.




לכל תא יש תוכנית התפתחותית וסיגנלים שמוכתבים לפי התוכנית. קומבינציית הסיגנלים שהתא מקבל תקבע את התנהגותו. קומבינצייה של מספר קטן של ליגנדים מספיקה לתיווך תגובות ביולוגיות רבות.

## <u>הפסקת סיגנל:</u>

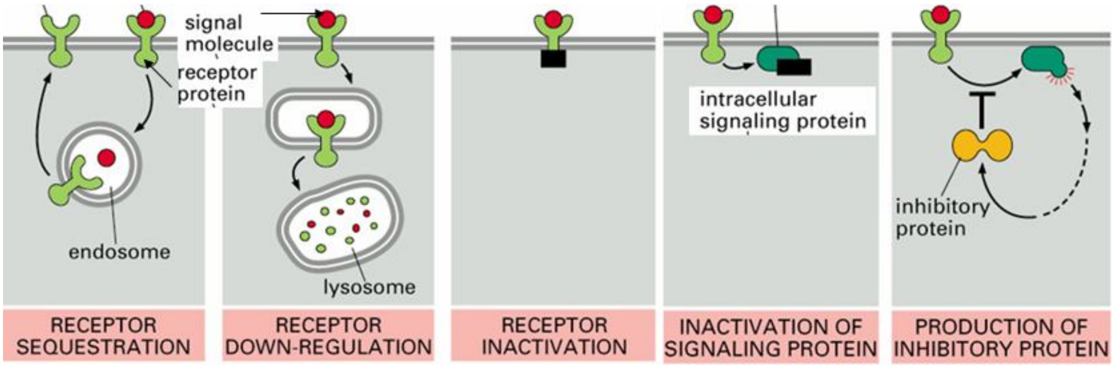
הפסקת סיגנל חשובה כמו עירור הסיגנל. הוא ייפסק כאשר כל המולקולות שהופעלו על-ידו יוחלפו במולקולות שאינן פעילות.

ניתן לפרק את המולקולות או להחליפן במולקולות חדשות. סיגנל שעובר במהירות, גם מופסק במהירות.

**<u>דרכים שונות להפסקת סיגנל:</u>**

- אנדוציטוזה של הקומפלקס ליגנד-רצפטור לתוך התא ופירוק שלו בליזוזום. כאן לא תהיה אפשרות לעירור מחדש כי הרצפטור נעלם מהממברנה ואז כשקסקדת העברת הסיגנל תסיים את תפקידה, הסיגנל ייגמר ויהיה צורך בסינתזה מחדש של הרצפטורים.
- מולקולות בתוך התא שנקשרות לחלק התוך-תאי של הרצפטור ומונעות ממנו להיקשר לאפקטור, ואז למרות שהוא קשור לליגנד- אין הפעלה של הסיגנל.
- עיכוב של מולקולה כלשהי בהמשך שרשרת התגובה שמביאה להפסקת העברת הסיגנל.
- הסיגנל משרה יצירה של מולקולה אחרת שפועל לעצירה הסיגנל.

<u>הערה:</u> סיגנלים שפועלים לפי מודיפיקציות (ולא לפי פירוק) נגמרים יותר מהר.



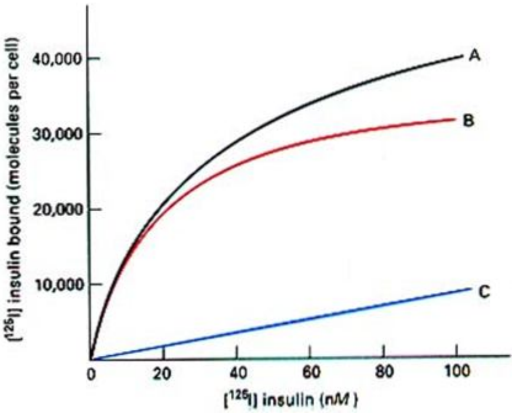



©ענת עציון

## ניסויים על פעולתם של רצפטורים:

### האם רצפטור מסויים קושר סיגנל:

מבטאים בתאים את הרצפטור ומדגירים אותם בנוכחות הליגנד שמסומן מראש, למשך זמן מסויים ב-4 מעלות. זה בגלל שבטמפרטורה זו לא מתרחשת אנדוציטוזה לרצפטור הקושר. אחר-כך שוטפים את הליגנד שלא נקשר ונשארים רק עם ליגנד שספוח לתאים. ואז לוקחים ובודקים את רמת הסימון.




עקומה-A: Total binding, הקישור הכללי בניסוי.

עקומה-C: Nonspecific binding, קישור לא ספציפי. זוהי עקומת ביקורת שנעשית ע"י הדגרה של הרצפטור עם ליגנד לא מסומן עד שכל הרצפטורים הספציפיים נתפסים. ורק לאחר-מכן מוסיפים ליגנד מסומן אשר נספח באינטראקציות נוספות שאינן ספציפיות וזה מה שנמדד בעקומה.

עקומה-B: specific binding, חיסור של C מ-A.

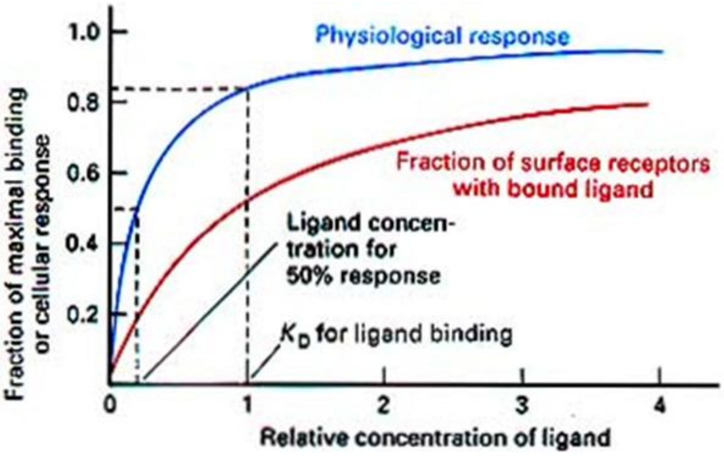
הערה: אינטראקציה ספציפית מגיעה לרוויה כאשר כל הרצפטורים נתפסים. באינטראקציה לא ספציפית בדרך-כלל אין plato.

### ניסוי תחרות:

לבדיקת קשירת שני ליגנדים ע"י אותו רצפטור ניתן להוסיף במקביל כמויות הולכות ועולות של שני ליגנדים וכך ניתן לראות באופן השוואתי את הקשירה של שניהם.

### באיזו מידה מולקולת סיגנל משפיעה על התאים:

לצורך ביצוע הניסוי יש לדעת מראש מהי התגובה הביולוגית של התא לסיגנל. למשל: בפקטורי גדילה, ניתן ללמוד מהי יכולת התאים להתחלק בעקבות הוספת פקטור הגדילה.




בונים גרף המתאר תגובה ביולוגית של התאים לאותו סיגנל.

בכחול- תגובת התאים לסיגנאל. יש תגובה מאוד חזקה ומהירה לסיגנל ביחס לכמות הליגנד- חיסכון מבחינת התא. יש גם אפקט של הגברה.

באדום- כמות הרצפטורים התפוסים. התגובה החזקה נגרמת עוד-לפני שמחצית מהרצפטורים תפוסים.

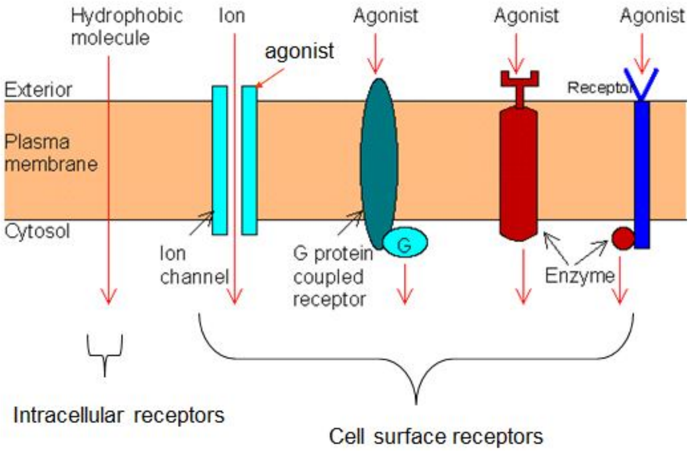
מסקנה: התגובה המקסימאלית מבחינת העוצמה מופיעה כאשר רק % קטן מהרצפטורים קשורים לליגנד.

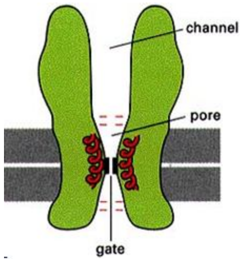


©ענת עציון

# משפחות עיקריות של רצפטורים:

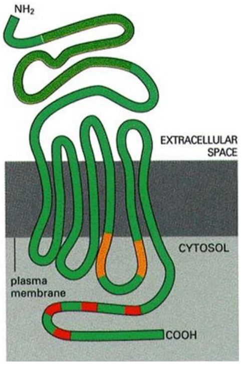
החלוקה למשפחות נעשית על-סמך דמיון במבנה ובמנגנון הפעולה.




**<u>רצפטורים שהם תעלות יונים:</u>** רצפטור שכאשר הליגנד נקשר אליו הוא מתפקד כתעלה ובהיעדר ליגנד התעלה סגורה. זה מאפשר שטף של יונים לתוך התא וזה משנה את הפוטנציאל החשמלי של ממברנת הפלסמה.

<u>דוגמא:</u> הרצפטור לאצטילכולין הוא תעלה שכאשר היא נפתחת יש עליה בריכוז הקלציום והתכווצות של השריר. הרצפטור מורכב מ-5 תת-יחידות של חלבון חוצה ממברנה. שתיים מהן זהות והן אלה שקושרות את הליגנד.




**<u>רצפטורים המצומדים ל-G proteins (GPCR):</u>** החלק ה-C-Ter של החלבון פונה לציטוזול. קישור ליגנד לרצפטור משנה את הקונפורמציה של הרצפטור וזה מגדיל את האפיניות של החלק התוך-תאי של הרצפטור ל-G protein שנקשר אליו ומתחיל להעביר קסקדה של סיגנלים בתוך התא. הרצפטורים האלה יכולים להפעיל אנזימים אבל גם יכולים לפעול ע"י פתיחה וסגירה של תעלות יונים.

<u>דוגמא:</u> רצפטור לאפינפרין וגלוקגון.

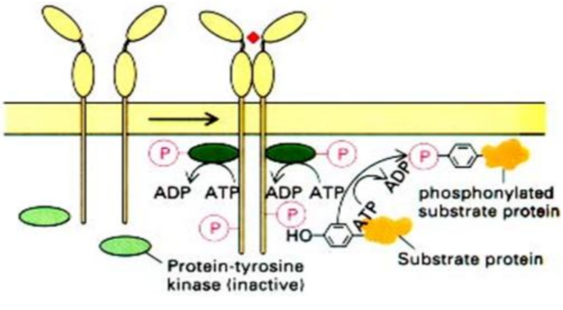
**<u>רצפטורים עם פעילות אנזימטית:</u>** בעלי פעילות קינאז, נחלקים לשני סוגים:

1. RTK (Receptor Tyrosine Kinase): רצפטורים המזרחנים טירוזין.
2. רצפטורים המזרחנים סרין או טריאונין.

<u>הערה:</u> שני הסוגים דורשים ATP לפעולת הזרחון- מעבירים את הפוספט-γ שלו לשייר הידרוקסיל של החומצה האמינית המזורחנת.

<u>הערה:</u> GPCRs מפקחים בעיקר על תהליכים מטבוליים ו-RTK בעיקר מבקרים חלוקה, ונדידת תאים.

**<u>Tyrosine kinase-like receptors:</u>** קבוצה נוספת ללא פעילות אנזימטית, מצומד לרצפטור קינאז (קשור לא קוולנטית) מסיס וכשהליגנד נקשר לרצפטור, אפיניות הזנב הציטוזולי לקינאז עולה והקינאז מופעל כתוצאה מקישור לרצפטור. הקינאז הזה מזרחן את הזנב הציטוזולי של הרצפטור וכך הסיגנל מועבר.



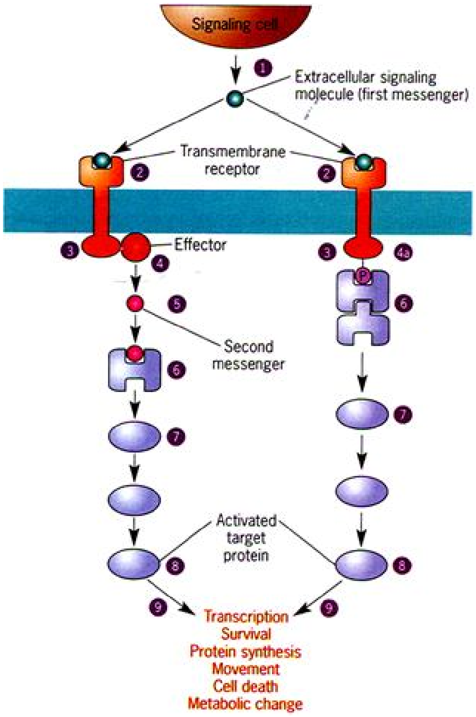



©ענת עציון

## סוגי התגובות התאיות:

1. שינוי פעילות של חלבון קיים (אקטיבציה/דהאקטיבציה)- GPCRs, RTKs.
2. שינוי ברמת הביטוי של חלבונים כתוצאה מאקטיבציה של פקטורי שעתוק- GPCR, RTKs, רצפטורים להורמונים, רצפטורים לציטוקינים (גורמי גדילה).

הערה: העברת סיגנלים מהירים בדרך-כלל נעשית ע"י הסוג הראשון.




## דרכי העברת הסיגנל בתא:

1. הרצפטור מפעיל מערכת שמייצרת שליח משני. השליח המשני מפעיל בעצמו קסקדה של העברת סיגנל.
2. הרצפטור מעביר את הסיגנל בעצמו, בדרך-כלל כתוצאה ממודיפיקציה שהוא עובר בעקבות קישור הליגנד. למשל: זרחון הרצפטור, ואז הוא מהווה עוגן- פלטפורמה לקשירת חלבונים מעבירי סיגנל ומשם מתחילה שרשרת העברת סיגנלים.

בשני הסוגים ישנה קסקדה של העברת סיגנל המורכבת משרשרת שבה אחד פועל על השני ברצף. כל חלבון פועל ע"י שינוי קונפורמציה של החלבון שמתחתיו- הפעלה/עיכוב החלבון.

### המולקולות בקסקדה:

1. G proteins.
2. קינאזות ופוספטאזות (קינאז בד"כ מאקטב ופוספטאז מעכב).
3. חלבונים ללא פעילות אנזימטית- מתפקידם כאדפטורים.

אפקטור: חלבון שמצוי ב-downstream של חלבון כלשהו (נקרא האפקטור של החלבון).

### השפעת זרחון על חלבונים:

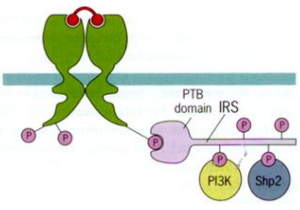
זרחון של חלבונים יכול לגרום לאחד מהדברים הבאים:

1. אקטיבציה או דהאקטיבציה.
2. הגברה או החלשה של אינטראקציה בין חלבונים.
3. מעבר ממדור אחד בתא למדור אחר.
4. סימון חלבון לדגרדציה.

### אדפטורים:

חלבונים שאין להם בעצמם פעילות אנזימטית. בדרך-כלל הם עוברים זרחון והאתרים המזורחנים משמשים כאתרי עיגון לקשירת מולקולות אחרות.

לפעמים יש רצפטור ממברנאלי המופעל אך לא יכול להיקשר לחלבון הבא בתור, ואז ישנו אדפטור הנקשר ביניהם וגורם להעברת הסיגנל ביניהם.




יש אדפטורים שיכולים לקשור רק מולקולה אחת ויש **מולטי-אדפטורים** שיכולים לקשור כמה חלבונים. בתמונה- הרצפטור מזרחן את האדפטור בכמה מקומות וכל אתר זרחון משמש כאתר עיגון למולקולות שיעבירו את הסיגנל הלאה. זה יכול לגרום לכמה מסלולי סיגנל שונים. ישנה ספציפיות גם במיקום קשירת החלבונים לאדפטור. יכול לבצע הגברה של סיגנל.

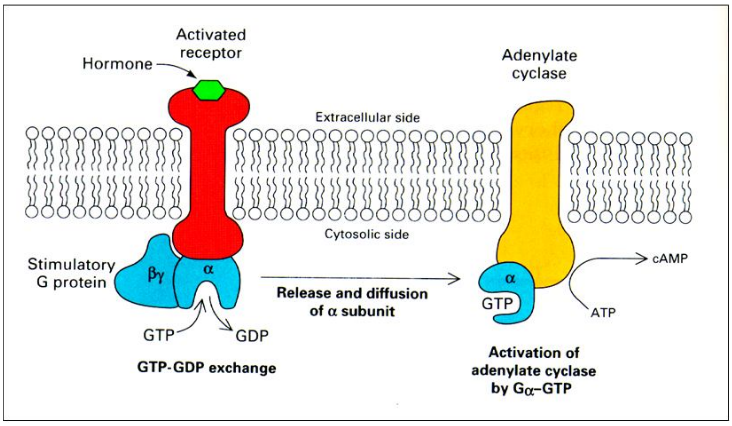


©ענת עציון

# :G Protein Coupled Receptors – GPCR

רצפטורים הפועלים על אפקטורים באמצעות- G proteins-טרימרים.

## אקטיבציה של G proteins ע"י הרצפטור:




בניגוד ל-Sar1 שהוא חלבון קטן הפועל כמונומר, ישנם G proteins הטרוטרימרים (3 תת-יחידות שונות). כשהרצפטור לא מופעל, הקומפלקס הזה אינו פעיל אך נמצא סמוך לממברנה- תת-היחידות α ו-β מעוגנות לממברנה בעוגן ליפיד, זה שומר את החלבון קרוב לרצפטור כדי שהסיגנל יעבור מהר.

הפעלת הרצפטור גורמת לשינוי קונפורמציה בחלבון ההטרוטרימרי ויש דיסוציאציה של β ו-γ מהיחידה α שהיא היחידה הקטליטית. שינוי הקונפורמציה מקטין את האפיניות בין α לשתיים האחרות, להן יש פעילות רגולטורית (יש לסלק אותן כדי ש-α תוכל תעשות את עבודתה). α צריכה להיות משופעלת ע"י החלפת GDP ב-GTP- הרצפטור מתפקד כפקטור השחלוף.

<u>הערה:</u> בזמן נתון רצפטור קושר G protein אחד, אך כל עוד הליגנד קשור אליו הוא יכול לקשור עוד ועוד G proteins נוספים.

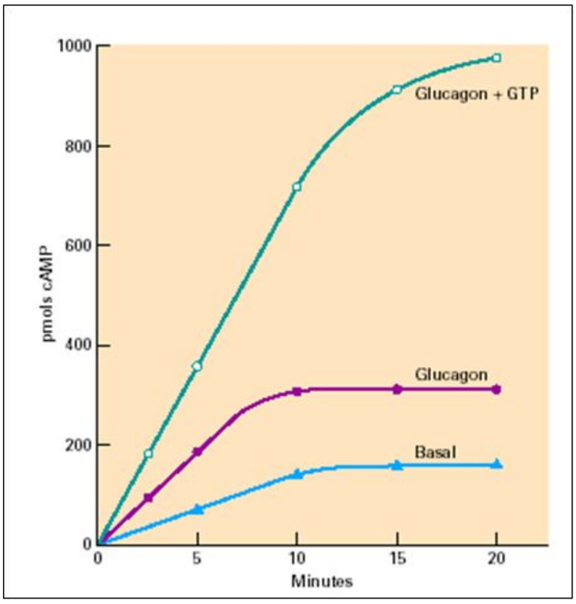
**<u>דוגמא:</u>** יחידה α מפעילה את Adenylate cyclase אשר יוצר שליח משני- cAMP.

<u>$G_s$</u>- מאקטבים אדניליל ציקלאז, <u>$G_i$</u>- מעכבים אדניליל ציקלאז, <u>$G_q$</u>- מאקטבים אנזים מפרק ליפידים.

**<u>סוגי אפקטורים:</u>**

- Adenylyl cyclase (AC).
- Phospholipase cβ (PLC β).
- cGMP phosphodiesterase.
- Ion channels.

## גילוי חשיבות GTP בתהליך העברת הסיגנלים:




ניקו ממברנות מתאים, עשו להן אינקובציה עם ATP והוסיפו להן תוספות שונות (המתוארות בגרף). בדקו יצירת cAMP (שליח משני בשרשרת העברת הסינל) כפונקציה של הזמן.

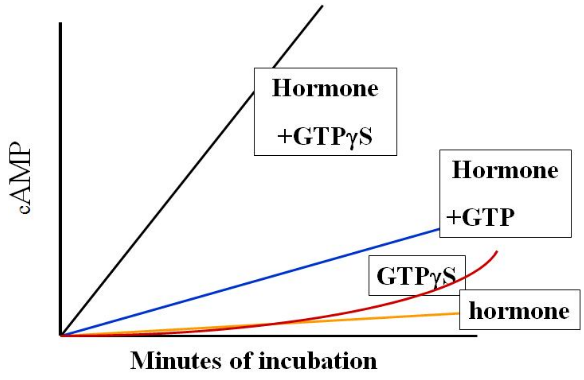
<u>גרף כחול:</u> ישנה קצת פעילות בזלית (בסיסית). זה כנראה כי לא ניתן לנקות ממברנות לגמרי ולכן יש שם עדיין קצת GTP.

<u>גרף אדום:</u> הוספת הורמון גלוקגון גרמה ליצירת cAMP מוגברת.

<u>גרף ירוק:</u> הוספת גלוקגון ביחד עם GTP גרמה להגברה משמעותית בקצב יצירת ה-cAMP.



©ענת עציון




**GTPγS:** אנלוג של GTP שלא ניתן לעשות לו הידרוליזה בגלל הגופרית.

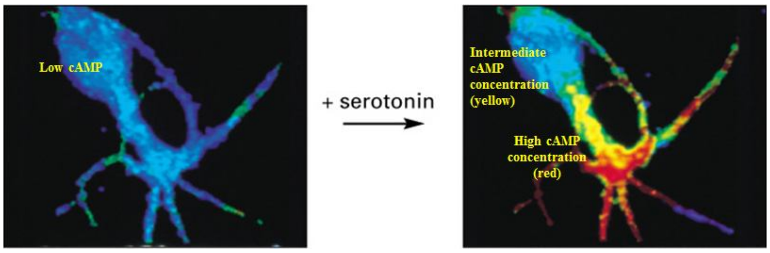
ביצעו את אותו הניסוי.

גרף שחור: הורמון והאנלוג מביאים לאקטיבציה קונסטיטוטיבית של ה- g protein ולכן יש הגברה של הסיגנל.

**cAMP פועל על:**

- cAMP-dependent protein kinase (PKA).
- Cyclic nucleotide gated ion channels.
- Certain GTP-exchanging factors.

דוגמא: קינאז המופעל ע"י cAMP (חלק מ-PKA) יכול להיכנס לגרעין ולהפעיל פקטור- **CREB** (cAMP Response Element). הפקטור גורם לשעתוק של הרבה חלבונים.




השינויים ברמות cAMP בתא הם מאוד מהירים- קורה תוך שניות מרגע העברת הסיגנל בתא.

**ניסוי:** תא עצב סנסורי שצבעו בפלוריסנציה את השינויים ברמת cAMP. רמות כחולות- הן נמוכות. תוך 20 שניות מרגע הפעלת הרצפטור לסרוטונין, משתנה הכמות. לאחר זמן רב יש חזרה לריכוז נמוך של cAMP. הסיגנל הוא מאוד מהיר ויש צורך להפסיקו במהירות. זה נעשה בכמה דרכים:

1. הידרוליזה של ה-G protein שתגרום להפסקת יצירת cAMP.
2. פירוק של cAMP שכבר נוצר בתא.
3. מנגנון של אדפטציה (מוסבר בהמשך).
4. דה-פוספורילציה של הקינאזות המעבירות את הסיגנל.

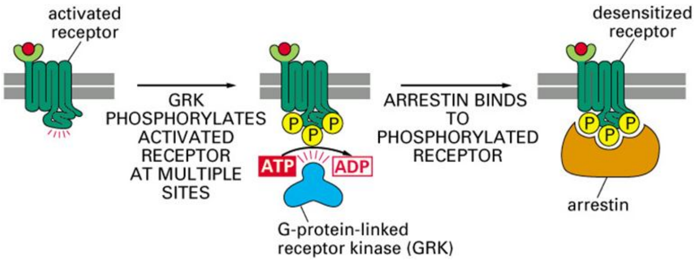
## טוקסינים פוגעים ב-G proteins:

בגלל חשיבותם למגוון פעילויות פיסיולוגיות, הם מהווים מטרה לרעלנים (טוקסינים) מחיידקים.

**דוגמא-1:** טוקסין הכולירה גורם לעיכוב ההידרוליזה של GTP ע"י החלבון Gs, מה שגורם לשפעול קונסטיטוטיבי של האדניליל ציקלאז. במעי נגרם שלשול המסכן חיים.

**דוגמא-2:** טוקסין הפרטוסיס תעכב שפעול של החלבונים Gi ו-Go ע"י רצפטורים. זה גורם לעיכוב מערכת החיסון, מונע ממנה להגיב כנגד החיידק המדביק.

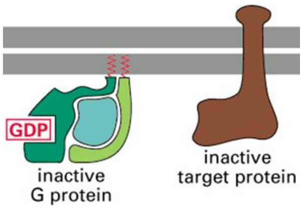
## הפסקת הסיגנל שהתחיל ב-GPCRs:




**מנגנון האדפטציה:** קינאז GRK מזרחן את הרצפטור הפעיל ואז בעקבות הזרחון נקשר לרצפטור חלבון arresin ומתחרה עם ה-G protein על הקישור לרצפטור ואז הסיגנל נפסק.



©ענת עציון




**<u>אינאקטיבציה של G protein:</u>** חלבונים הפועלים כפקטור GAP ומזרזים את פעילות ה-GTPase של תת-יחידה α. ואז כשהיא קושרת GDP, האפיניות שלה לתת-יחידות β,γ גדלה, היא מתקשרת אליהן ונוצר מחדש קומפלקס טרינארי בלתי פעיל.

## <u>סוגי הליגנדים:</u>

- ליגנדים קטנים מאקטבים את הרצפטור ע"י היקשרות לאזור הטרנס-ממברנאלי, מולקולות גדולות יותר נקשרות ללולאות בחלק החוץ-תאי.
- מספר רצפטורים ממשפחות שונות יכולים להיות מופעלים ע"י אותו ליגנד ולכן ייתכן שהתוצר הסופי שאליו הם יביאו יהיה זהה.

**<u>משפחת ה-Adrenergic:</u>** רצפטורים שאחראים על פעילות הלב, הסימפונות, העיכול, מע' העצבים.

<u>אגוניסטים:</u> הורמונים סינטטיים המחקים את פעילות האנדרנרגיק.

<u>אנטגוניסטים:</u> הורמונים סינטטיים המפריעים להם.

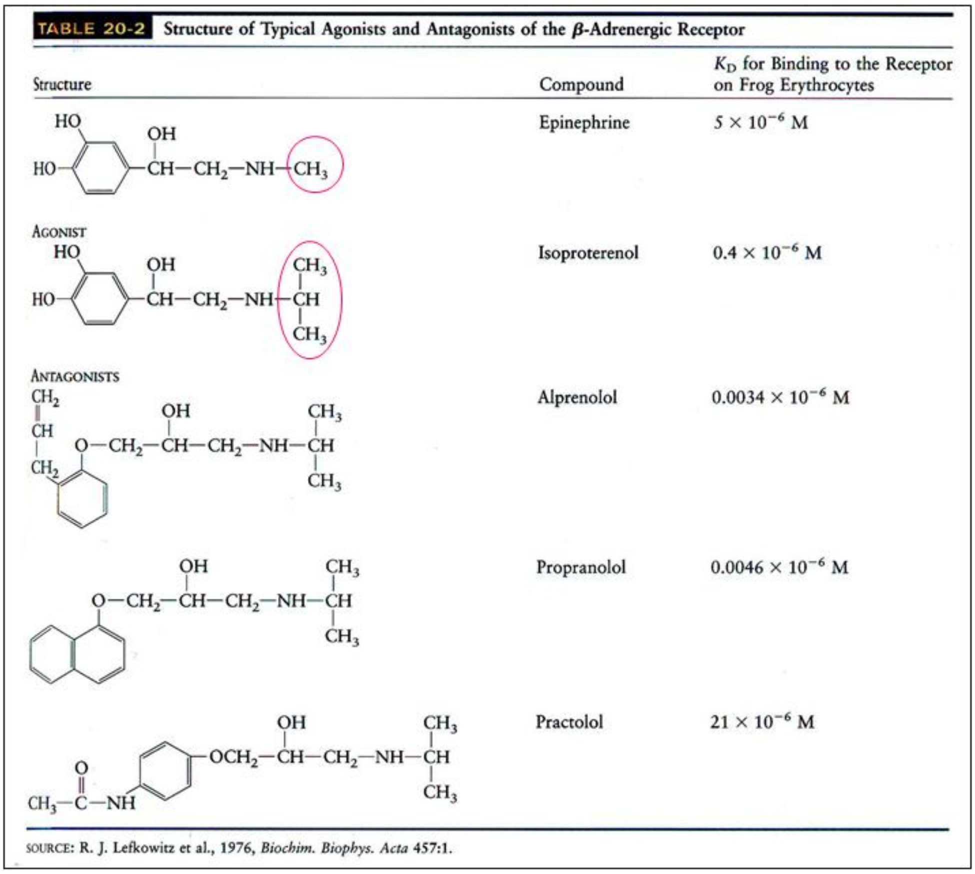


**TABLE 20-2** Structure of Typical Agonists and Antagonists of the β-Adrenergic Receptor

| Structure | Compound | $K_D$ for Binding to the Receptor on Frog Erythrocytes |
|---|---|---|
| | Epinephrine | $5 \times 10^{-6}$ M |
| AGONIST | Isoproterenol | $0.4 \times 10^{-6}$ M |
| ANTAGONISTS | Alprenolol | $0.0034 \times 10^{-6}$ M |
| | Propranolol | $0.0046 \times 10^{-6}$ M |
| | Practolol | $21 \times 10^{-6}$ M |

SOURCE: R. J. Lefkowitz et al., 1976, *Biochim. Biophys. Acta* 457:1.

## <u>אפיניות של רצפטורים α,β אדרנרגיים לליגנדים שלהם:</u>

אפינפרין נקשר לשני סוגי רצפטורים- α ו-β adrenergic receptors .

**<u>α-adrenoreceptors</u>**:
**Norepinephrine>epinephrine>>isoproterenol**
**G protein = Gq(α1); Gi (α2)**

**<u>β-adrenoreceptors</u>**:
**Isoproterenol>epinephrine>norepinephrine**
**G protein = Gs**

זה חשוב שתהיה אפיניות שונה מכיוון שבמצב מסויים זה מאפשר שונות בפעילות ומאפשר באותו התא לבצע פעולות מנוגדות (למשל- כיווץ והרפייה של השריר). אפיניות משתנה משפיעה גם על מהירות התגובה ומשך ההשפעה של הליגנד- ככל שהאפיניות יותר גדולה- יש יותר cAMP.



©ענת עציון

<u>רצפטורים β1, β2:</u> מצומדים לחלבון Gs ולכן מגבירים פעילות של Adenylyl cyclase.

<u>רצפטור α2:</u> מצומד ל-Gi ולכן מעכב את הפעילות של Adenylyl cyclase.

<u>רצפטור α1:</u> מצומד ל-Gq שמאקטב אנזים מפרק ליפידים PLCβ.

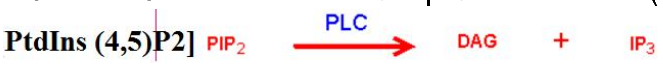
**<u>פעילות מטבולית שונה מתווכת ע"י הרצפטורים:</u>**

דרך הרצפטורים מסוג β מתבצע זירוז של יצירת חומרי המוצא לאנרגיה בכבד (גליקוגן על-מנת לשחרר גלוקוז לדם), פירוק שומנים בתאי שומן ושחרור טריאציל-גליצרול. בשריר הלב AC מגביר את קצב הלב כדי להזרים את ההורמונים מהר יותר בדם וכדי למנוע הצטברות חומצה לקטית הגורמת להתכווצות השרירים. בנוסף, יש הרפייה בפעילות המעיים והצרת כלי דם במערכת העיכול כדי לא לבזבז אנרגיה שדרושה למקומות אחרים שפועלים באופן מאומץ.

לעומת-זאת רצפטורים מסוג α גורמים להתכווצות כלי הדם ושריר הלב, כדי למתן את פעילותם כשצריך להעביר אנרגיה לשרירים. רצפטור α פחות רגיש לאדרנלין אבל במצבי לחץ זורם הרבה אדרנלין בדם ולכן הוא ייקשר לרצפטור.

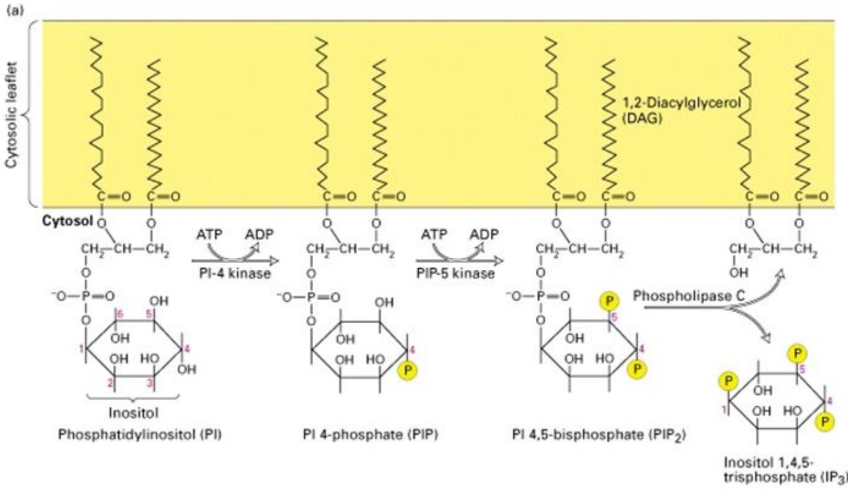
**<u>PLCβ, IP3 ו-DAG:</u>**

PLCβ- שליח משני נוסף (מלבד cAMP). זהו אנזים המפרק ליפידים. גורם ליצירת שליחים משניים נוספים: DAG (דיאציל גליצרול) ו-$IP_3$.



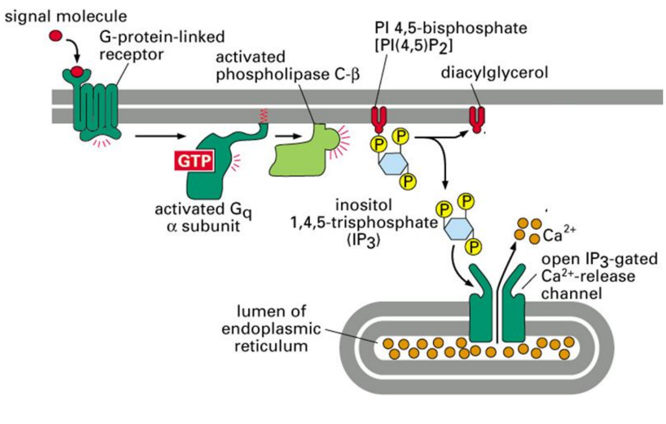

הליפידים ממשפחת ה-PI מהווים מעט מהליפידים בממברנה ויש להם תפקיד חשוב בהעברת סיגנל.

PI יכול לעבור שרשרת של זרחונים: זרחון על עמדה 4 הופך אותו ל-PIP ועל עמדה 5: $PIP_2$.




כאשר PIP2 עובר אקטיבציה ע"י PLC, ישנה הידרוליזה ואז נוצרים DAG ו-$IP_3$.

**<u>שפעול PKC ע"י קלציום, $IP_3$ ו-DAG:</u>**




$IP_3$ עובר דיפוזיה מאוד מהירה בממברנה ותפקידו לפתוח תעלות של קלציום הנמצאות ב-SER, שם נאגר רוב הסידן בתא. זוהי פתיחה רגעית הגורמת לשחרור מיידי של קלציום לתוך הציטוזול. הקלציום נחוץ לדברים רבים וביניהם-אקטיבציה של משפחת קינאזות-PKC החשובה לחלוקת תאים, התמיינות ושעתוק גנים.

PKC נמצא בציטוזול כקינאז לא פעיל. עליה בריכוז הקלציום בציטוזול גורמת לטרנסלוקציה שלו לממברנה, תהליך המלווה בביקוע. ובנוסף, האקטיבצייה נשלמת ע"י DAG.



©ענת עציון

**תהליכים ש-PKC מבקר:**

| Tissue | Response |
|---|---|
| Blood platelets | Serotonin release |
| Mast cells | Histamine release |
| Adrenal medulla | Secretion of epinephrine |
| Pancreas | Secretion of insulin |
| Pituitary cells | Secretion of GH and LH |
| Thyroid | Secretion of calcitonin |
| Testes | Testosterone synthesis |
| Neurons | Dopamine release |
| Smooth muscle | Increased contractility |
| Liver | Glycogen hydrolysis |
| Adipose tissue | Fat synthesis |

אם מבטאים בתאים מונטנט של PKC שפעיל קונסטיטוטיבית, עוקפים את הצורך בביקוע ה-PKC והתאים עוברים טרנספורמציה סרטנית בלתי הפיכה.

**תהליכים ש-$IP_3$ מבקר:**

**TABLE 20-4** Cellular Responses to Hormone-Induced Rise in Inositol 1,4,5-Trisphosphate ($IP_3$) and Subsequent Rise in Cytosolic $Ca^{2+}$ in Various Tissues

| Tissue | Hormone Inducing a Rise in $IP_3$ | Cellular Response |
|---|---|---|
| Pancreas (acinar cells) | Acetylcholine | Secretion of digestive enzymes, such as amylase and trypsinogen |
| Parotid (salivary gland) | Acetylcholine | Secretion of amylase |
| Pancreas ($\beta$ cells of islets) | Acetylcholine | Secretion of insulin |
| Vascular or stomach smooth muscle | Acetylcholine | Contraction |
| Liver | Vasopressin | Conversion of glycogen to glucose |
| Blood platelets | Thrombin | Aggregation, shape change, secretion of hormones |
| Mast cells | Antigen | Histamine secretion |
| Fibroblasts | Peptide growth factors, such as bombesin and PDGF | DNA synthesis, cell division |
| Sea urchin eggs | Spermatozoa | Rise of fertilization membrane |

בלבלב הוא נוצר בתגובה לאצטילכולין, ומבקר שחרור של אנזימים שמעכלים את המזון.

בכלי-דם/בקיבה הוא מבקר התכווציות של השריר ע"י העלאת ריכוז הקלציום.

בנוכחות גורמי גדילה, IP3 מבקר סינתזת DNA וחלוקת תאים.

## ריכוז הקלציום כבקרה על תהליכים:

באבולוציה התפתחו מנגנונים לשמירת ריכוז מאוד נמוך של קלציום בתא. בציטוזול הריכוז שלו נמוך ב-4 סדרי גודל מאשר במאגרי הקלציום ב-ER. קלציום נחוץ להרבה פעילויות וכשהוא משתחרר מהמאגרים, ריכוזו עולה והוא מתקשר לקבוצה גדולה של חלבונים קושרי קלציום: קלמודולין, המתווכים הרבה פעילויות של אקטוב קינאזות ואנזימים אחרים.

בתאים נייחים, תעלות הקלציום בממברנת הפלסמה וב-ER סגורות, וגם ישנה שאיבה אקטיבית של קלציום לתוך המאגרים. כש$IP_3$ נקשר לתעלה, יש שחרור קלציום לציטוזול ותוך זמן קצר הוא עובר מודיפיקציה והופך ל-$IP_4$ וכבר לא יכול להיקשר לתעלה ולבקר פתיחה שלה. ואז קורה התהליך ההפוך: יציאה החוצה של קלציום (גם פסיבית וגם בשאיבה) בחזרה למאגרים.



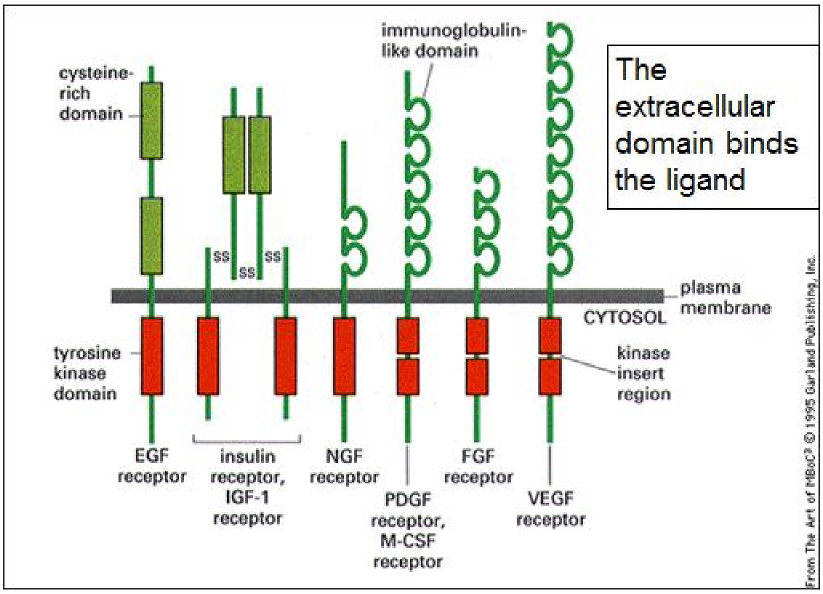
©ענת עציון

## רט"ק- Receptor Tyrosine Kinase (RTK):

חלבונים חוצי ממברנה מונומרים המשמשים בעיקר לתהליכי חלוקת תא, התמיינות ושמירה על הומיאוסטאזיס. הם מופעלים ע"י גורמי גדילה במנגנון פאראקריני. זמן החיים של גורמי גדילה הוא ארוך יחסית (דקות עד שעות). יש ל-RTKs גם השפעה על מטבוליזם אך פחות מאשר ל-GPCRs.

### חלוקת הרצפטורים לתתי-משפחות:

כל הרצפטורים האלה חוצים פעם אחת את הממברנה (יוצא מן הכלל- הרצפטור לאינסולין שנמצא כדימר המורכב מ-4 תת-יחידות). החלק הקטליטי של הרצפטור נמצא בזנב הציטוזולי.

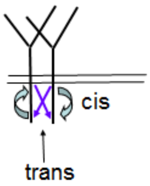



מה שמבדיל חלק מהמשפחות הוא המקטע האדום (TK domain) המכיל את הפעילות הקטליטית. לפעמים הוא מחולק לשניים ומחובר ע"י כמה חומצות אמינו, וגם מספרן מבדיל בין משפחות.

ישנו גם החלק החיצוני, ה-ligand binding domain שהוא שונה בין משפחות שונות.

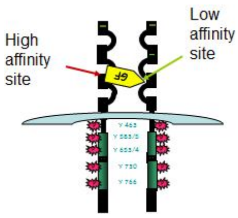
ניתן לראות בציור שחלק מהרצפטורים האלה עשירים בציסטאינים וחלק יש בהם הרבה לולאות של אימונוגלובין (IG like domain). בין כולם החלק הכי שמור הוא ה-TK domain.

### מנגנון האקטיבציה של RTK:




קישור הליגנד גורם לדימריזציה של שני רצפטורים. הרצפטור יכול לזרחן את עצמו (אוטוקטליטי) וגם יכול לזרחן מולקולות אחרות. הרצפטורים מזרחנים אחד את השני "זרחון בטרנס" ואחר-כך גם מזרחנים את עצמם- "זרחון בציס". זה דורש קרבה פיזית בין שני הרצפטורים. בעקבות הזרחון הם מהווים אתר קישור למספר רב של אפקטורים, הנקשרים לאתר ומעבירים הלאה את הסיגנל.

#### מנגנונים של דימריזצייה:




1. <u>הליגנד הוא מונומר ומכיל שני אתרי קישור:</u> ישנו אתר אחד בעל אפיניות גבוהה לרצפטור ושני בעל אפיניות נמוכה יותר. הליגנד נקשר קודם לאתר בעל האפיניות הגבוהה ורק לאחר-מכן האתר בעל האפיניות הנמוכה יוכל לגייס מולקולה נוספת ולקשור אותה.
2. <u>הליגנד הוא הומודימר:</u> הוא מכיל שני אתרי קישור הזהים באפיניות הקישור לרצפטור ושניהם נקשרים ביחד כדימר, לשני הרצפטורים.

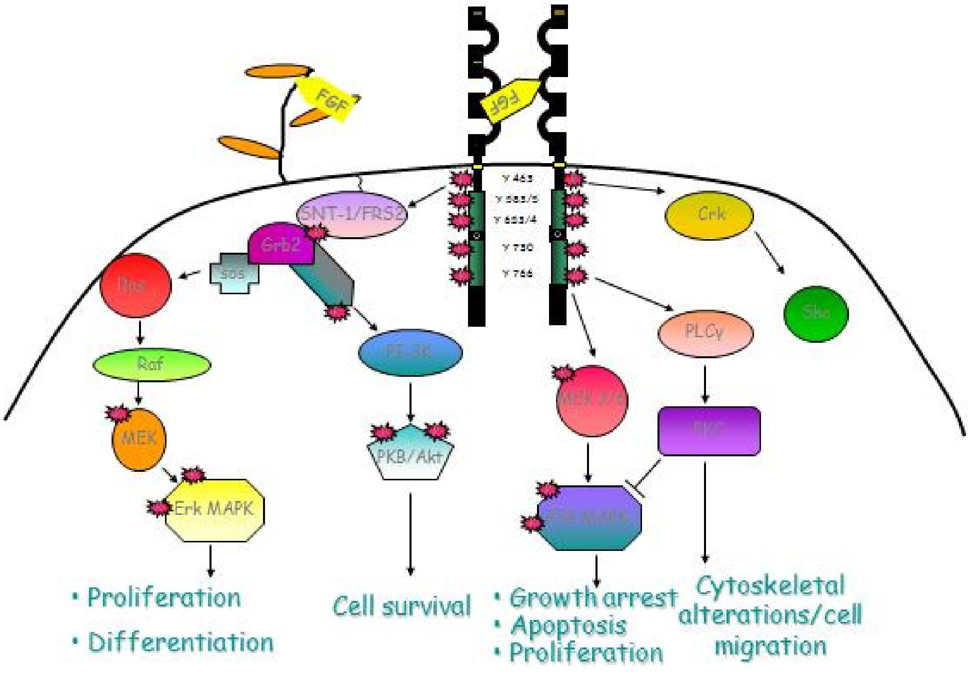


©ענת עציון

<u>הערות:</u>

- לרצפטורים יש יכולת עצמאית לדימריזציה אבל היא מאוד-מאוד חלשה ולא פונקציונאלית.
- אם מוטציה פוגעת באתר בעל האפיניות הנמוכה, הדימריזציה נפגעת אבל הליגנד עדיין נקשר לרצפטור. אם מוטציה פוגעת באתר בעל האפיניות הגבוהה, לא יהיה הקישור ליגנד-רצפטור.

**<u>המסלולים השונים ש-RTK מאקטבים:</u>**




**<u>המסלול של Ras-MAPK:</u>**

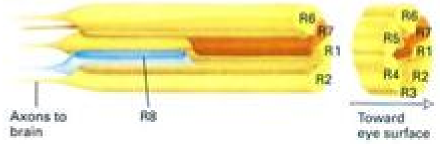
מסלול בתא שאחראי על חלוקה של התאים והתמיינות שלהם. כאשר ליגנד נקשר לרצפטור הוא גורם להפעלת קסקדה שמתחילה בחלבון Ras. הרבה גורמי גדילה מאקטבים את Ras והוא מצוי בצומת ראשי של מסלולי העברת סיגנל.

**<u>ניסויים לגילוי מנגנון הפעלת Ras ע"י הרצפטור:</u>**

**<u>הגישה הגנטית:</u>**

עבודה עם יצור שניתן להחדיר אליו גן ל-Ras עם מוטציות ובדיקת הפנוטיפים המתקבלים. הכנסת Ras עם מוטציה לפעילות קונסטיטוטיבית. <u>תוצאה:</u> חלוקה בלתי מבוקרת ללא הוספת גורמי גדילה.

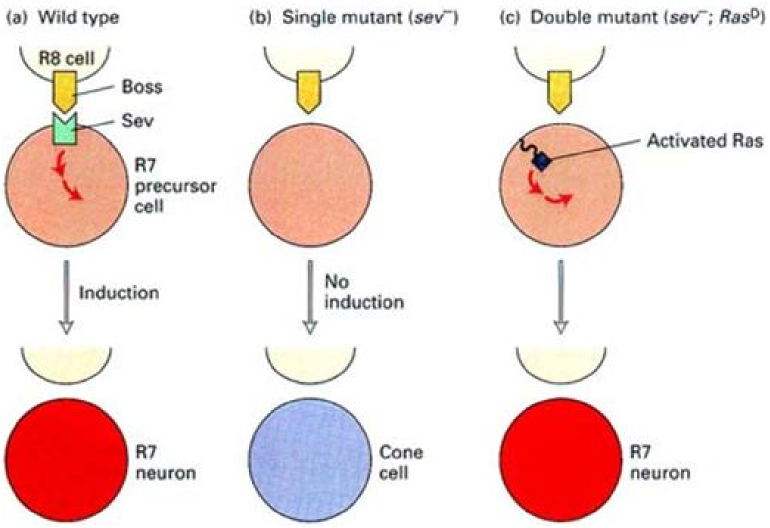
<u>ניסוי בעין של הדרוזופילה:</u> זוהי עין המורכבת מהרבה עיניות שתפקידן לקלוט אור ולהעבירו. כל עינית מורכב מ-8 תאים: R8,...,R1. 7 תאים בעינית הם נוירונים, פוטורצפטורים. יש להם צורה של גליל מאורך ובחלק הפונה אחורה יוצא אקסון המגיע למערכת העצבים של הזבוב. R7 הוא פוטורצפטור בעל יכולת לקלוט אור באורך גל קצר. כדי שהוא יהפוך להיות פעיל הוא חייב לעבור אינטראקציה עם R8 (מסומנים בכחול ואדום).




גילו שישנה מוטציה שגורמת לכך ש-R7 פעיל לא נוצר: סיגנל הנחוץ לכך מתווך ע"י RTK בשם: Sev, שנמצא על ממברנת הפלסמה של R7. הסיגנל הזה הוא סוג של גורם גדילה- Boss הנמצא על R8. הוא נקשר לרצפטור על R7 וכך עובר הסיגנל. במידה ויש מוטציה במקום כלשהו במסלול, R7 הופך לסוג תא אחר שלא יכול לקלוט אור. הכנסת Ras פעיל קונסטיטוטיבית לתאים שאין להם את הרצפטור Sev הביאה ל-R7 פעיל. זה מוכיח ש- Ras נמצא downstream לרצפטור במסלול.



©ענת עציון




במערכת שבה הרצפטור Sev רגיש לטמפרטורה, הצליחו לבודד 2 חלבונים נוספים במערכת העברת הסיגנל: Sos ו-RDK. מצאו ש-Sos הוא הפקטור שחלוף של Ras.

**<u>הגישה הביוכימית:</u>** עוסקת בחלבונים עצמם, למשל: CO-IP כדי לבחון אינטראקציות בין חלבונים. השתמשו בה כדי לאשש מסקנות אליהן הגיעו בגישה הגנטית. כך גילו את ה-Gap של Ras.

<u>טענה:</u> העובדה כי הצליחו לחקור את אותה התופעה גם בזבובים וגם בתולעים משמעה כי המערכות האלה הן מאוד-מאוד שמורות באבולוציה.

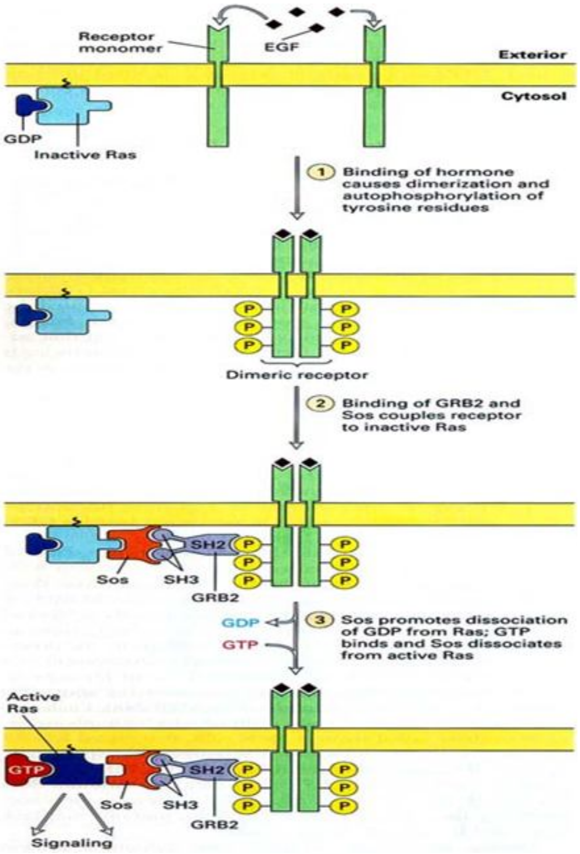
## <u>מנגנון הפעלת Ras:</u>

Ras קשור קוולנטית לליפיד המעגן אותו לחלקה הפנימי של ממברנת הפלסמה.

כדי להפעיל את Ras, Sos שהוא חלבון ציטוזולי, צריך להגיע אל הממברנה לקרבת Ras. הוא מגיע על-גבי DRK/GRB2.

הרצפטור המזורחן מכיר את DRK/GRB2 שקשור ל-Sos. והקשירה לרצפטור גורמת לטרנסלוקציה אל הממברנה.

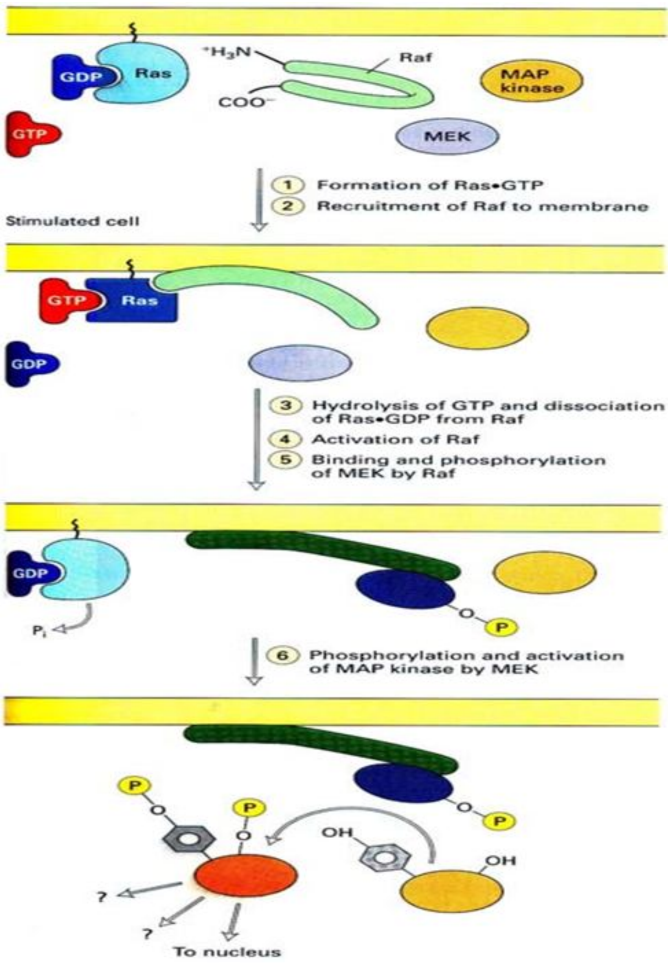
וזה מאפשר ל-Sos להפעיל את Ras. DRK/GRB2 הוא אדפטור שבהיעדר סיגנל, האפיניות שלו ל-Sos יותר נמוכה (קשר לא חזק). כאשר הוא קשור לרצפטור, האפיניות של ל-Sos גדלה.






©ענת עציון

## המנגנונים ש-Ras מפעיל:




Ras מזרחן קינאז- Raf (MAPKKK).

Ras הוא לא חלבון הנמצא בגרעין. המסלול הנ"ל גורם ל-Raf להגיע לממברנה ולשינוי קונפורמציה ב-Raf.

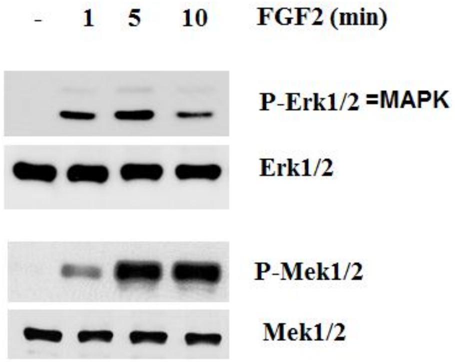
Raf מזרחן קינאז MEK-kinase (MAPKK).

MEK-kinase מזרחן קינאז Map-Kinase (MAPK) אשר נכנס לגרעין.

### ניסוי- בדיקת הפעלת MAPK ו-MEK ע"י גורמי גדילה:

למעלה רשומות דקות לאחר מתן גורם גדילה לתאים (בשם FGF2).

לאחר זמן מסויים מפוצצים את התאים (כדי להפסיק את העברת הסיגנל) ועושים western blot.



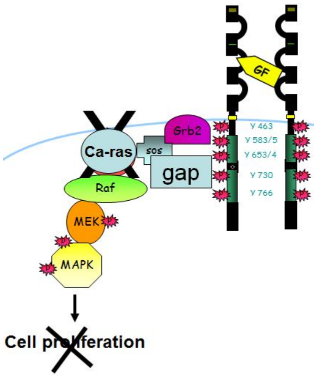

<u>שורה עליונה:</u> ללא גורם גדילה, MAPK לא הופעל, לאחר הוספתו יש הפעלה ברמה מסויימת.

<u>שורה שנייה:</u> נוגדן שאינו מבדיל בין צורה מופעלת ללא מופעלת, כלומר: יש הרבה MAPK לא פעיל בתאים.

<u>שורה שלישית:</u> תוך דקה מהוספת גורם הגדילה גם MEK מופעל, יש לו קינטיקה אחרת מאשר ל-MAPK. לאחר 10 דקות עדיין אין ירידה ברמת ההפעלה של MEK.

<u>שורה רביעית:</u> באותו-אופן כמו שורה-2, רק עבור MEK.

### ניסוי-השפעת מוטציות ב-Ras:

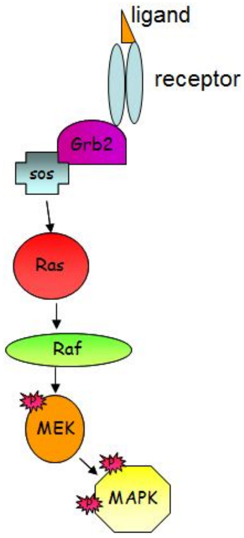



גורמי גדילה שונים מפעילים את Ras. המסלול המתואר המוביל לחלוקת תאים, נפגע כאשר Ras משותק. בתאים ישנם 2 הומולוגים של Ras ושיתוק שניהם יביא למות התא. המוטנט פועל כ-dominant-negative.

אם Ras פעיל קונסטיטוטיבית, התא יתחלק כל-הזמן, וזה יוביל לסרטן כי התא מתעלם מהצורך בהפעלת הרצפטור.



©ענת עציון




**<u>מנגנון פעולת Raf:</u>**

Raf מצוי בציטוזול כחלבון לא פעיל, מזורחן. הוא תפוס ע"י חלבון אחר: 14-3-3. שתפקידו לתפוס את Raf בציטוזול כל עוד לא הגיע סיגנל. כאשר מגיע סיגנל מבחוץ Ras מופעל ואז הוא קושר את Raf, קשירה שגורמת לשינוי קונפורמציה ב-Raf וזה משחרר ממנו את החלבון המעכב.

ואז פוספטאז מסיר ממנו את הזרחן ומשלים את הפעלתו של Raf. וכעת הוא מסוגל לקשור את MEK.

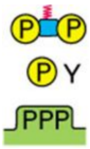
<u>הערה:</u> רוב-הזמן לפוספטאזות יש תפקיד של הפסקת פעילות, אבל לפעמים גם תפקיד של הפעלה של חלבון, כמו במקרה הזה.

**<u>סיכום מסלול Ras-MAPK:</u>**

- עד כה זוהו מספר MAPK שונים, לכל אחד מהם קסקדה משלו. עיקרון פעולתם דומה. יש מסלולים שתפקידם ארגון מחדש של שלד התא בתהליך נדידת תאים ויש מסלולים החשובים להתמיינות וחלוקת תאים.
- קיים מידור בין המסלולים השונים, ע"י קשירת מרכיבי המסלול לאיזשהו חלבון. בנוסף, סמיכות מרכיבי המסלול מאפשרת העברת הסיגנל באופן יעיל יותר.

**<u>התקשורת בין חלבונים מעבירי סיגנל:</u>**

האינטראקציות הללו מתווכות ע"י דומיינים ספציפיים:

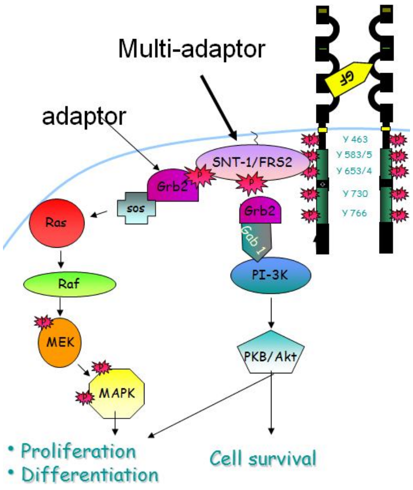



<u>PH- Pleckstrin homology domain:</u> נקשר לinositol המזורחן בעמדה-3.

<u>PTB- phosphotyrosine-binding domain ו SH2-Src homology 2 domain:</u> נקשרים לפוספוטירוזין.

<u>SH3-Src homology 3 domain:</u> נקשר למוטיבים עשירים בפרולין.

**<u>דוגמא:</u>** GRB2/RDK נקשר ל-RTK דרך הדומיין SH2 שלו, ונקשר ל-Sos דרך הדומיין SH3.




**<u>מולטי-אדפטור:</u>**

יכול לגרום להגברה של מסלול ע"י פתיחתו מספר פעמים.

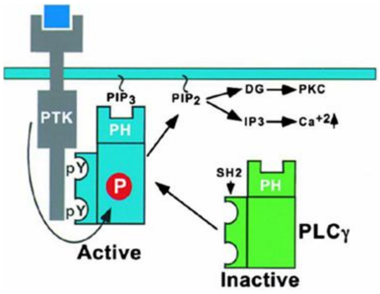
יכול לגרום לשונות בסיגנל ע"י קשירה למספר חלבונים והפעלת מספר מסלולים שונים.

**<u>דוגמא:</u>** **SNT-1/FRS2**, ישנם רצפטורים שלא יודעים לקשור Grb2 ואז המולטי-אדפטור נקשר לרצפטור ומזורחן בכמה טירוזינים. הם משמשים אתר לקשירת חלבונים אחרים ונפתחים כמה מסלולים של העברת סיגנל.

**<u>מסלולים נוספים שמאותחלים ע"י RTK:</u>**

**<u>המסלול של PLCγ:</u>**

מנגנון ההפעלה כאן שונה- כאשר החלבון לא פעיל הוא אינו קשור לרצפטור והקישור אליו מקרב את PLCγ לממברנה, שם נמצא הסובטראט שלו $PIP_3$, והוא מפעיל קסקדה של תהליכים.



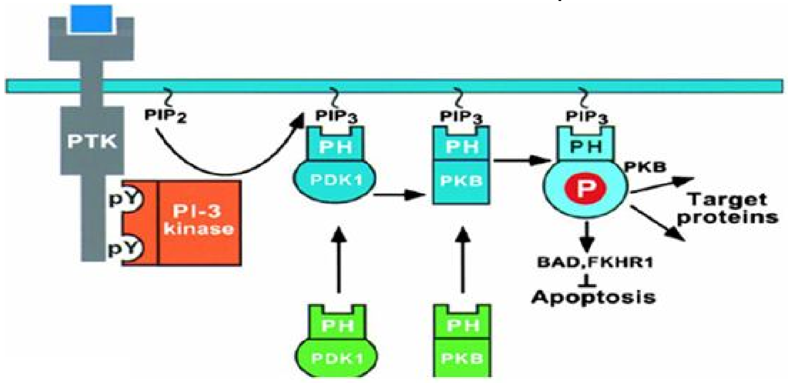



©ענת עציון

**<u>המסלול של PI-3 kinase:</u>**

PI-3 kinase משופעל ע"י כל ה-RTKs. החלבון מכיל שתי תתי-יחידות: p85- תת יחידה רגולטורית, p110- תת יחידה קטליטית. קישור האנזים לרצפטור גורם לשינוי קונפורמציה ב-p85 וזה גורם לשחרור p110 לעשות את עבודתה. לp110 יש פעילות קינאז, והיא מזרחנת את טבעת האינוזיטול בעמדה 3. מטרת הזרחון היא להביא חלבונים מעבירי סיגנל לחלק הפנימי של ממברנת הפלסמה.

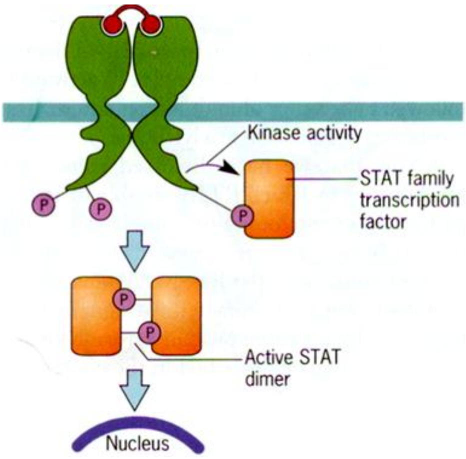
אחד מחלבוני הקינאז האחרונים במסלול- PKB/AKT, אחד מתפקידיו הוא עיכוב מסלולים לאפופטוזיס. והוא גם חשוב בבקרה על מחזור התא, על סינתזת חלבונים בתא, ועל סינתזת גליקוגן.




**<u>STATs:</u>**

משפחה של פקטורי שעתוק המכילים דומיין מסוג SH2. הם מאוקטבים ע"י רצפטור לגורם גדילה אבל מסוגלים להיות מאוקטבים גם ע"י חלק מה-RTKs.

הפקטורים פועלים כדימרים. כאשר RTK מופעל הוא קושר מונומר אחד ב-STAT ומזרחן אותו על טירוזין. שני מונומרים מזורחנים יוצרים דומיין ע"י קשירה הדדית אחד את השני דרך דומיין SH2. וכדימר הם נכנסים לגרעין ופועלים.




**<u>שאלה:</u>** מדוע צריך כל-כך הרבה RTKs אם כולם יכולים לעשות את כל הדברים?

**<u>תשובה:</u>** לא כל הרצפטורים מתבטאים באותו התא. אך זה עדיין לא מסביר את הספציפיות במלואה.

**<u>טרמינציה של RTK-signaling:</u>**

**<u>Receptor down regulation:</u>** פירוק הרצפטור ביחד עם הליגנד. הרצפטור נבלע באנדוציטוזה והווסיקולה הופכת לאנדוזום ומגיעה לליזוזום לפירוק.

<u>ניסוי:</u> לוקחים תאים שגדלים בתרבית ושמים עליהם עודף של ליגנד (ביחס לרצפטורים שעל-פני התאים). תוך חצי שעה כל הרצפטורים שעל הממברנה יעברו פירוק ואז התא לא יגיב לגורמי גדילה עד אשר יסונתזו מחדש הרצפטורים שעל הממברנה (וזה יקרה תוך 12-24 שעות). התהליך של פירוק הרצפטורים הוא תלוי טמפרטורה- קורה בטמפ' פיזיולוגית וב-4 מעלות הוא מעוכב.

**<u>אינאקטיבצייה של חלבונים מעבירי סיגנל:</u>** הסיגנל עצמו משרה ייצור חלבונים מעכבים, למשל פוספטאזות שהופכים חלבונים במסלול העברת הסיגנל לבלתי פעילים.

**<u>פעילות אנטגוניסטים:</u>** מולקולות שמונעות פיזית את המשך העברת הסיגנל, ע"י קישור לחלבון במסלול ההעברה.



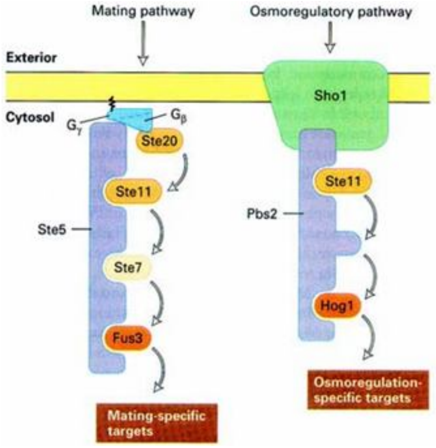
©ענת עציון

**<u>הגורמים המשפיעים על ספציפיות המסלול:</u>**

1. גיוס של מולטי-אדפטורים שונים ע"י רצפטור מסויים.
2. מידור פנים-תאי.
3. חלבונים שכל רכיבי המסלול קשורים אליהם (חלבונים מעגנים).
4. בקרה ע"י אנטגוניסטים.

**<u>תפקידם של חלבוני "פיגום":</u>**

- מחזיקים את המרכיבים של מסלול מסויים ביחד.
- מביאים למידור של signaling domains.
- מגבירים את יעילות העברת הסיגנל.
- משפיעים על הספציפיות של מסלול הסיגנל.




**<u>דוגמא משמרים:</u>**

יש להם MAPK ו-Ras אבל מי שמפעיל אצלם את המסלול הוא GPCR (אין להם RTKs). מצאו שיש בשמרים חלבוני "פיגום" שמחזיקים את כל מרכיבי המסלול ביחד. בשמרים Ste11 הוא המקביל של Raf.

**<u>ניסוי- האם חלבון הפיגום הוא זה שמאפשר את המסלול:</u>**

עשו מוטציה ב-Fus3, חלבון שנחוץ לתהליך הזיווג.

<u>תוצאה:</u> השמרים כן יצרו זיווג (למרות המוטציה) ובנוסף הם יצרו קורים- נוספה פעילות חדשה.

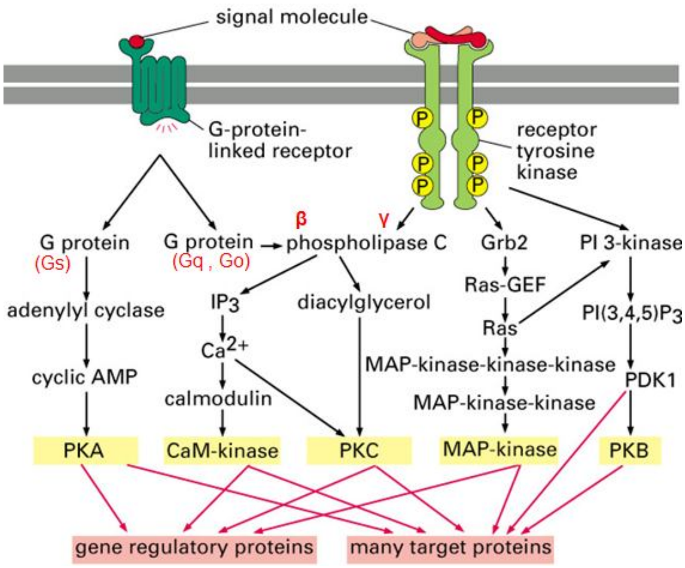
בניסוי נוסף עשו מוטציה ב-Fus3 שרק תפגע בפעילותו הקטליטית אבל לא ביכולתו להיקשר לחלבון הפיגום.

<u>תוצאה:</u> השמרים לא הזדווגו- לא הגיבו לסיגנל.

**<u>הסבר התופעה:</u>** כאשר Fus3 מצוי ונקשר לפיגום הוא חוסם את אתר הקישור ואז מולקולות אחרות לא יכולות להיקשר. כאשר Fus3 לא היה, MAPK אחר המתפקד ביצירת קורים תפס את מקומו בחלבון הפיגום. כנראה שהוא אפשר גם את הפעלת המסלול המקורי המביא להזדווגות כי ה-MAPK הללו די דומים.

**<u>מסקנה:</u>** מה שקובע הוא האפיניות. זהו מנגנון רסטריקציה, ה-MAPK שנקשר למקום מסויים מונע מ-MAPK אחרים להיקשר לאותו המקום.

**<u>סיכום 5 המסלולים המרכזיים המתווכים ע"י RTKs ו-GPCRs:</u>**

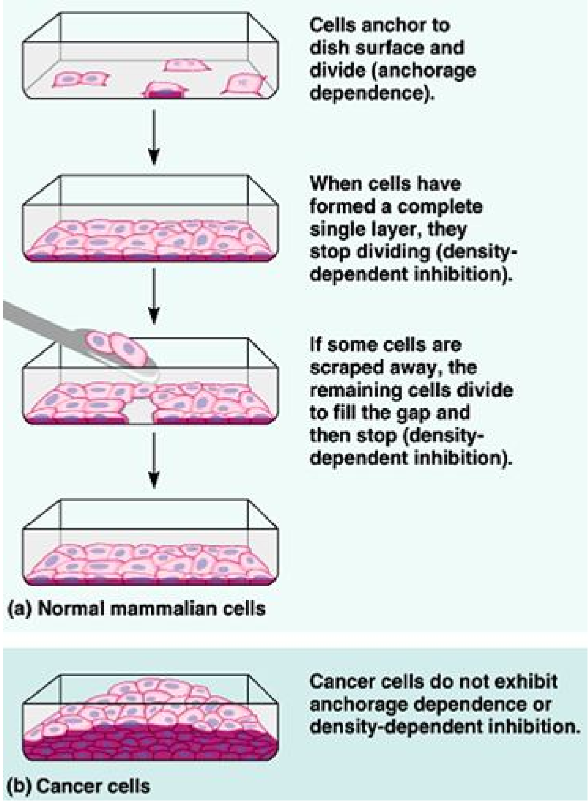





©ענת עציון

# בקרת מחזור התא

כדי ליצור רקמות בגוף, התא מתחלק ומתרבה. בהתפתחות העוברית ישנה חלוקת תאים נמרצת וגם בבוגר ישנה חלוקה פחות מסיבית, אך היא הכרחית לתפקוד התקין ולקיום האורגניזם. כאשר הבקרה על החלוקה נפגעת, יש סרטן.




(a) Normal mammalian cells

(b) Cancer cells

תא סרטני הוא תא סוציומט- רוצה להכפיל את עצמו כמה שיותר ולכן לא מגיב לבקרה שתא נורמאלי מגיב אליה.

**ניסוי:**

גידלו פיברובלסטים שעברו טרנספורמציה סרטנית בכלי תחום. תאים רגילים מתרבים וממלאים את הכלי, ואז הם מפסיקים להתחלק (עיכוב ע"י מגע), גם אם מוסיפים להם עוד גורמי גדילה.

תאים סרטניים, לא מעניין אותם שהצלחת התמלאה, הם ממשיכים להתחלק ויוצרים שכבות.

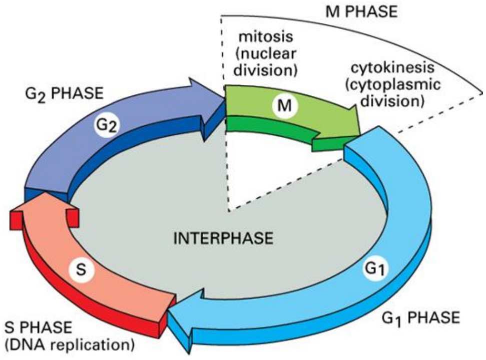
תאים נורמאליים צריכים להיות צמודים למצע מוצק (תחתית הכלי) כדי להתרבות, לעומתם תאים סרטניים מסוגלים להתרבות בתרחיף.

## מחזור התא- סקירה:

רצף אירועים ספציפי שהתא עובר, במהלכם הוא מכפיל את גודלו ומתחלק ל-2. באורגניזמים רב-תאיים התהליך משמש להתפתחות וגדילה וגם להחלפת תאים פגומים.

### מחזור התא בפרוקריוטים:

לפרוקריוטים אין אורגנלות, יש להם כרומוזום יחיד ולכן התהליך אצלם הרבה יותר פשוט: הכרומוזום משתכפל, כל עותק מתחבר לחלקים שונים בממברנה, והפרדת הכרומוזומים קורית כאשר התא משתכפל. זוהי "חלוקה בינארית".




### מחזור התא באאוקריוטים:

באורגניזמים רב-תאיים המצב הרבה יותר מורכב- יש הרבה אורגנלות שצריך לחלק. ישנו גרעין שעטוף בממברנה אותה יש לפרק כדי לחלק את הכרומוזומים. ישנו מספר גדול יותר של כרומוזומים שגודלם יותר גדול.

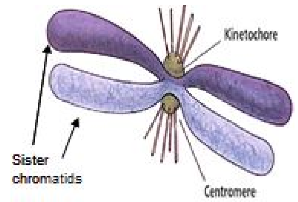
את מחזור התא ניתן לחלק באופן גס לאינטרפאזה ולכל מה שאינו בשלב זה.

השלב שאורך הזמן הוא הכי וריאבילי הוא G1, השלבים האחרים בדרך-כלל נעשים במשך זמן קבוע פחות או יותר. G0- תאים שיצאו מהמחזור והם יכולים לחזור אל מחזור התא, למשל ע"י סיגנאל. מחזור התא מורכב משני שלבים עיקריים: שלב המיטוזה (M) בו התא מתחלק לשני תאי בת ושלב ההכפלה (S) בו מוכפל ה-DNA. בין שני השלבים האלה נמצאים שלבי הביניים: G1 ו-G2, בהם התא גדל ומתפתח.



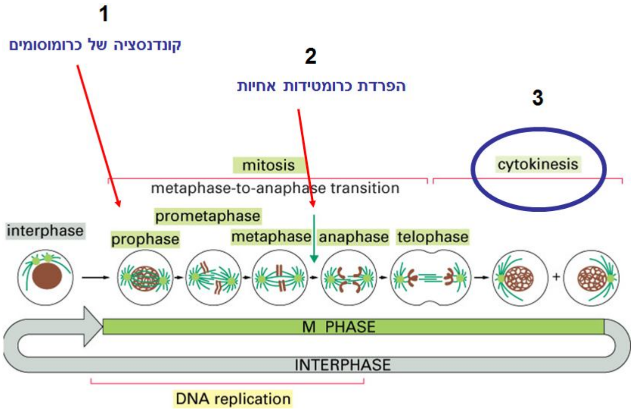
©ענת עציון

**<u>חלוקת הכרומוזומים:</u>**




הכרומטידות האחיות (לאחר ההכפלה) קשורות בצנטרומר והן צמודות אחת לשניה ע"י קומפלקס שנקרא: קוהזין. רק בין המטפאזה לאנאפזה, לפני שחלה הסגרגציה של כרומטידות אחיות לשני הקטבים, ישנו פירוק של הקוהזין.

**<u>מיטוזה:</u>**




<u>פרופאזה:</u> פירוק הגרעין ויצירת הכישור.

<u>מטאפאזה:</u> הכרומטידות מסתדרות על הכישור.

<u>אנאפאזה:</u> הפרדת הכרומטידות ונדידה של כל אחת לקוטב אחר.

<u>טלופאזה:</u> הכישור מתפרק והתא מתחלק לשני תאי בת. האורגנלות מתחלקות רנדומאלית בין התאים, ונוצרת ממברנה שמפרידה ביניהם. החומר הגנטי נסגר מחדש בתוך גרעינים.

**<u>תדירות החלוקות:</u>**

אפשר לסווג תאים לפי תדירות החלוקות שלהם:

<u>תאים עובריים:</u> מתחלקים מהר מאוד כדי לקבל כמות גדולה של תאים בזמן קצר.

<u>תאי אפיתל במעי:</u> מתחלקים כל-הזמן, בקצב של 2.5 מיליון חלוקות בשנייה.

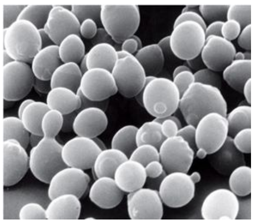
<u>תאי עצב:</u> מאבדים את יכולת החלוקה שלהם לאחר ההתמיינות (מצויים בשלב G0 כל-הזמן).

<u>תאי כבד ושריר:</u> לא מתחלקים בדרך-כלל, אבל הם יכולים להתחלק כתוצאה מפציעה למשל.

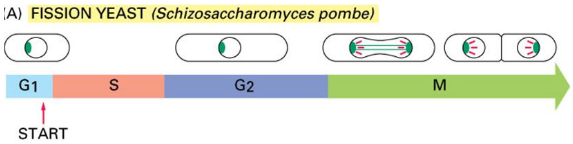
## <u>ניסויים ללמידת מחזור התא והבקרה עליו:</u>

ניתן לקחת חלבונים שמתפקדים במחזור התא ביצור אחד, להכניס ליצור מאוד רחוק אבולוציונית והם יפעלו. החלבונים המרכזיים הללו נוצרו מזמן עוד לפני הפיצול לרוב האורגניזמים ולכן הם מאוד שמורים באבולוציה. זה מאוד עוזר למחקר.

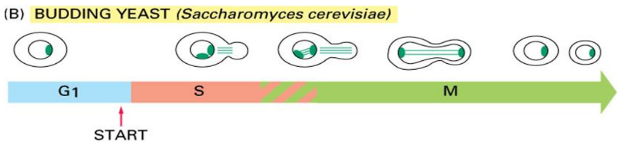
**<u>שמרים כמערכת ניסויית:</u>**



- זמן דור קצר.
- קלים לגידול.
- תאים פשוטים יחסית וקטנים.
- אאוקריוטים.
- לשמרים יש גם מצב הפלואידי וגם דיפלואידי, וזה מאפשר לחקור מוטציות רצסיביות.
- מאפשר להשליך משמרים על פעילות של חלבונים באורגניזמים גבוהים יותר.




**<u>"שמר הבירה":</u>** במהלך מחזור חייו, הוא מתארך בשני קצוותיו ובשלב המיטוזה, מעטפת הגרעין לא נעלמת, אבל החומר הגנטי הולך לשני קצוות מנוגדים והחלוקה נשלמת ע"י יצירת מחיצה ויצירת שני תאי-בת.




**<u>שמר הנצה:</u>** נקרא כך בגלל צורת הגדילה- כאשר הוא מסנתז חלבונים וגדל הוא מצמיח ניצן קטן שגדל ככל שהתא גדל. גם כאן מעטפת הגרעין לא מתמוססת ובאיזשהו שלב הניצן מתנתק ונוצרים שני תאי בת.

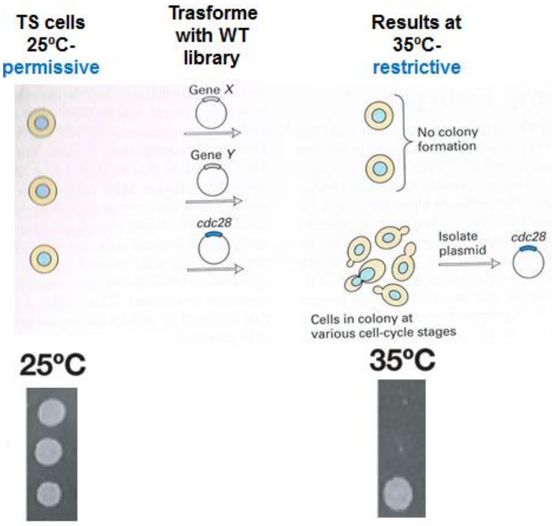


©ענת עציון

**Cdc (Cell division cycle) genes:** גנים למרכיבים קריטיים בבקרה על מחזור התא. מוטציה באחד מהגנים האלה תגרום לעצירת התא בנקודה ספציפית במחזור התא. החלבונים האלה דרושים כדי לעבור נקודות בקרה.

**בדיקה בניסוי מהי הפונקציה של חלבון Cdc:**

עושים בגן מוטציה מותנית התלוייה בגורמים חיצוניים, למשל: טמפרטורה. בטמפרטורה פרמיסיבית- התאים מתקדמים במחזור התא. בטמפרטורה רסטריקטיבית- התאים ייעצרו באיזושהי נקודה במחזור התא ונקבל תרבית תאים סינכרונית.




תחילה מגדלים תאי שמרים בטמפרטורה פרמיסיבית. ואז משתמשים בספרייה גנומית של שמרים- אוסף של פלסמידים, כל אחד מהם מכיל עותק של גן יחיד מתוך הגנום של השמר. בפלסמיד יש אתרי בקרה המאפשרים לפלסמיד להתבטא. עושים טרנספורמצייה לספרייה הגנומית כך שסטטיסטית: פלסמיד אחד ייכנס לשמר אחד. ואז מגדלים אותם בטמפרטורה רסטריקטיבית.

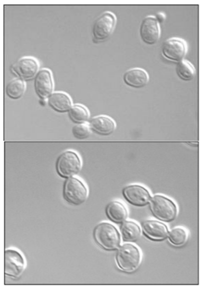
כל מושבה שתצליח לגדול, תייצג שמר יחיד שאליו נכנס פלסמיד עם הגן שאחראי על נקודת הבקרה הרלוונטית.

אז לוקחים תאים ממושבה זו, מרצפים את הפלסמיד ומזהים באיזה גן מדובר.

<u>הערות:</u>

- בניסויים אלה יש שימוש בשמרים הפלואידיים ולכן הכנס הפלסמיד יוצרת דיפלואיד חלקי, שהוא מצב תקין מבחינה גנטית, ולכן הגן שהוכנס ייחפה על המוטציה (שהיא בדרך-כלל רצסיבית).
- ניתן לשתמש בספרייה משלימה ממקור הומני כי החלבונים הללו הם מאוד שמורים באבולוציה.

**הסתכלות על מורפולוגיית תאים:**



נוח להסתכל על המורפולוגייה של תאים, שהיא שונה בין שלבי מחזור התא.

בתרבית של תאים נורמאלים, הגודל של כל אחד מהם תלוי בשלב שבו התא מצוי במחזור התא.

במוטנטים, כל התאים נעצרו בשלב זהה. במוטנט שבתמונה, האנפאזה מושלמת אבל לא מתבצעת ציטוקינזה ולכן ישנם תאים גדולים ואחידים בגודלם, ממצא אופייני לשלבים האחרונים במיטוזה.

**ניסויים ביוכימיים על מיצוי שמרים:**

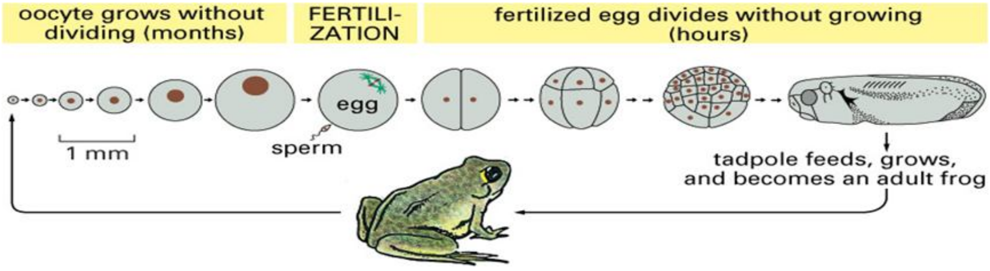
בשיטות ביוכימיות בדרך-כלל צריך להשתמש במרכיבים במיצוי תאים וזה דורש כמות גדולה של חלבון. שמר הוא תא מאוד קטן וכמות החלבון בו מאוד קטנה. אמנם ניתן לגדל מספר תאים ולפוצץ אותם אבל אז מקבלים extract שהוא לא נקי מספיק. יותר נוח לעבוד עם תא יחיד שהוא גדול מספיק ויש לו הרבה ציטופלסמה.


©ענת עציון

## ביציות של צפרדע כמערכת ניסויית (Xenopus's Oocyte):

זוהי מערכת שנחקרה היטב ולכן ניתן בקלות לעשות מניפולציות על התהליך.

זה תא ענק עם הרבה מאוד ציטופלסמה. התא נעצר ב-G2 ונמצא בו 8 חודשים שלמים שבמהלכם הוא לא מתחלק אלא רק מסנתז חומרים וחלבונים. זה קורה בביצית לא מופרית.



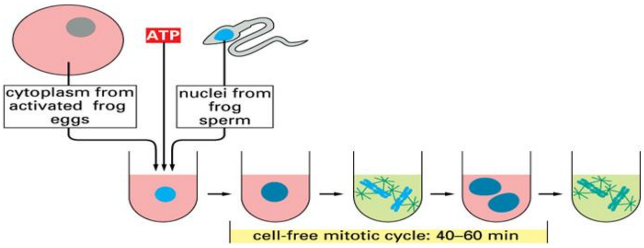

טריגר לתחילת החלוקות הינו הפרייה. הורמונים שמגיעים מתא הזרע. ואז ישנן 12 חלוקות עוקבות ללא גדילה בנפח התא. יתרונות: ניתן להפיק המון ציטופלסמה והמון חלבונים מתא בודד. ניתן בקלות להזריק עם מזרק קטן כל-מיני חומרים לתוך הציטופלסמה כדי לבחון את השפעתם.

**<u>ניסוי לבדיקת השפעת חומר מסויים על מחזור התא:</u>**

לוקחים את התא שעצור בשלב G2, מזריקים פנימה חומר ורואים האם הוא מתחיל בחלוקות.

**<u>ניסוי לבדיקת נחיצות פקטורים מהציטופלסמה לצורך החלוקות:</u>**

מבצעים הפרייה כדי שתהיה אקטיבציה לחלוקות ומפרידים in vitro ציטופלסמה וגרעין. ואז בודקים האם ההפרדה תאפשר להמשיך בחלוקות. אח"כ מכניסים לציטופלסמה גרעין של תא זרע מנוקה ובודקים את החלוקה של החומר הגנטי.



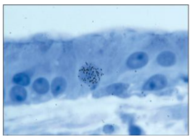

<u>מסקנה:</u> התא המשיך להתחלק ולכן הפקטורים הגורמים לחלוקה מצויים בציטופלסמה.

## מערכת ניסויית של תרבית תאים:

זו מערכת שהיא יותר קרובה למה שקורה ביצור רב-תאי. מאפשר לחקור למשל כיצד פקטור מסויים משפיע על התפתחות סרטן באותם התאים.

**<u>שימוש במיקרוסקופיה:</u>** הסתכלות איך תאים נראים במיקרוסקופ אור, המורפולוגייה של התא מאוד משתנה בשלבי מחזור התא השונים.

**<u>סמן פלוריסנטי:</u>** ניתן לצבוע כרומטין ולראות איך הכרומוזומים מסודרים. או לצבוע סיבי כישור ע"י חלבונים מיוחדים להם ולבדוק האם הוא קיים.



**<u>אוטורדיוגרפיה:</u>** מכניסים אנלוג רדיואקטיבי של נוקליאוטיד מסויים (בדרך-כלל T שמופיע רק ב-DNA), ואז שמים תמיסה מעל התאים ומעליה פילם הרגיש לקרינה רדיואקטיבית ואז נוצרים כתמים איפה שהיה DNA מסומן, וכך ניתן לדעת שהתרחשה סינתזה של DNA.

**<u>אימונופלורסנציה:</u>** שימוש בנוגדן מסומן לאנלוג של T.

**<u>FACS:</u>** שימוש בתוצאות כדי להעריך כמה מן התאים בתרבית מצויים באיזה משלבי מחזור התא (לפי כמות ה-DNA בהם). ניתן לבדוק השפעת חומר מסויים על החלוקה ע"י הוספתו ובדיקה האם כמות התאים בכל שלב לאחר פרק זמן מסויים השתנתה. למשל, אם החומר גורם לתאים להיות פחות ב-G1 ולהתחלק יותר (התפתחות סרטן) אז תאים רבים יותר יימצאו בשלבים M ו-S ופחות בשלב G1 מאשר במצב הנורמאלי.



©ענת עציון

# הבקרה על מחזור התא:

למערכת הביולוגית יש יכולת אדפטציה, היא חשה את מה שקורה בתוך ומחוץ לתא.

רובסטיות ו-redundancy: יש במערכת כמה דרכים שונות כדי לבצע משהו, המערכת לא נשענת על מסלול פעולה יחיד.

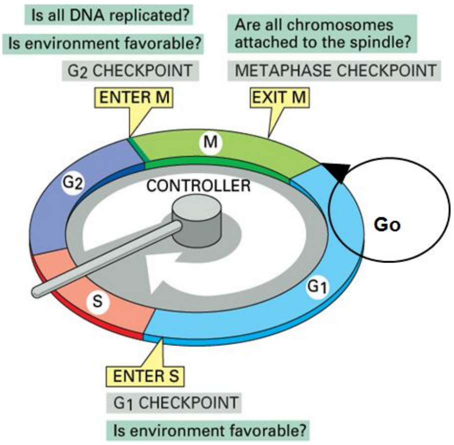
## נקודות בקרה (Checkpoints):

במערכת של מחזור התא יש סנסורים, שכאשר יש בעיה הם לא נותנים למחזור התא להתקדם.

**דוגמא:** אם התא במצב stress שפגע ב-DNA אז מחזור התא לא יתקדם עד שהנזק הזה לא יתוקן.

**דוגמא:** התא לא סיים את הכפלת ה-DNA בזמן הקצוב לשלב S אז מחזור התא לא יתקדם עד שהכפלת ה-DNA לא תסתיים.

**קיימות 3 נקודות בקרה עיקריות- בקרת על:**




בקרה זו איננה דרושה להתקדמות מחזור התא, אבל כאשר היא איננה, התא יכול להמשיך להתחלק למרות שיש בו נזקים וזה יכול להוביל למחלות.

G1 checkpoint: במעבר מ-G1 ל-S. בודקת האם התנאים מתאימים להתקדמות במחזור התא.

G2 checkpoint: במעבר מ-G2 למיטוזה. בודקת האם הכפלת ה-DNA הושלמה והאם כל תנאי הסביבה מתאימים.

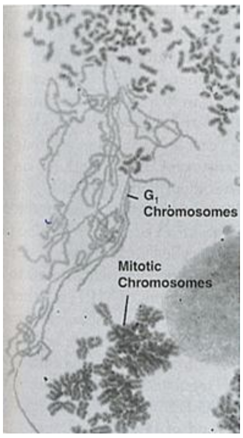
Metaphase checkpoint: במהלך הסגרגציה של הכרומטידות. מבטיחה שכל תא יקבל מספר שווה של כרומטידות.

**איך Checkpoints פועלים:**

1. ע"י סנסורים שחשים בתקלה.
2. עצירה זמנית במחזור התא.
3. אם התקלה אינה ניתנת לתיקון, שולחים את התא לאפופטוזיס.

## ניסוי- ראייה לקיום בקרה על מחזור התא:

לוקחים תאים משני שלבים שונים במחזור התא, מאחים אותם לתא אחד (ישנן שיטות לאיחוי ממברנות של תאים) ומקבלים הטרוקריון. בתא המאוחה יהיו שני גרעינים משני שלבים שונים במחזור התא. מי מהם ישפיע על מי?



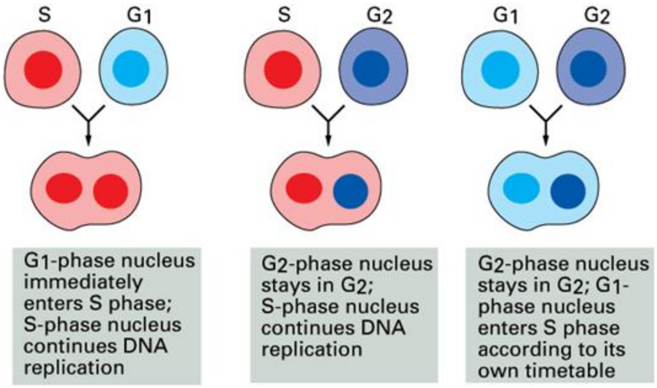

G1+M: הגרעין משלב M גרם לקונדנסציה של ה-DNA גם בגרעין מ-G1 למרות שה-DNA ב-G1 בכלל לא הכפיל את עצמו.

G2+M: הגרעין משלב M גרם כאן לדחיסה של הכרומוזומים בגרעין משלב G2.

באופן כללי: לא משנה איזה שלב ממחזור התא נבדק, במיטוזה ישנם פקטורים הפועלים באופן חיובי כדי לדחוף את התאים קדימה במחזור התא.



©ענת עציון




לוקחים תא בשלב S, בדומה לניסוי הקודם:

<u>G1+S</u>: הG1 נכנס מיידית לשלב S והגרעין של שלב S ממשיך בהכפלת ה-DNA.

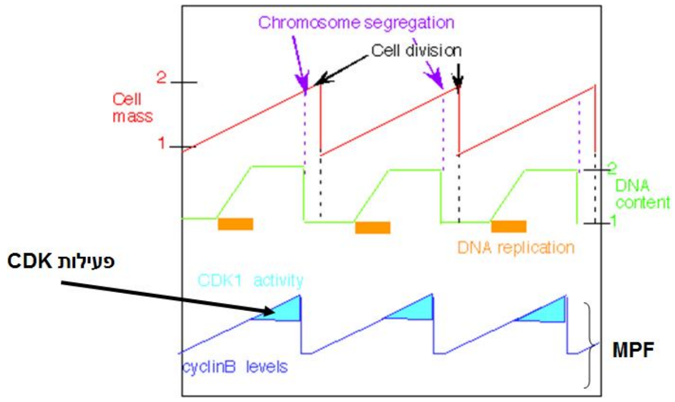
<u>G2+S</u>: התאים לא מגיבים. שני הגרעינים ממשיכים להתקדם לפי תוכניתם המקורית.

<u>G1+G2</u>: כל גרעין ממשיך להתנהג לפי התוכנית המקורית שלו.

<u>מסקנה</u>: ב-S ישנם פקטורים שיכולים להאיץ את המסלול קדימה, אבל לא אחורה.

## <u>מרכיבי מערכת הבקרה:</u>

הבקרה נעשית באמצעות חלבונים מסוג: Cdk. חלבון זה מופעל ע"י חלבון- Cyclin. המעבר משלב לשלב מצריך הפסקת פעילות ה-Cdk הרלוונטי, ע"י פירוק ה-Cyclin המתאים לו.




### <u>גילוי Cdk ו-Cyclin:</u>

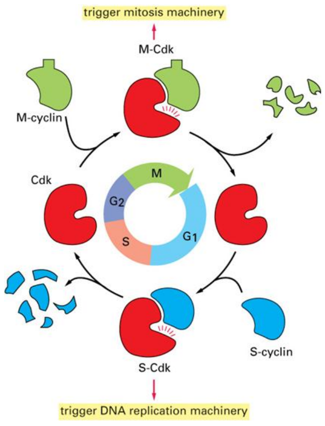
<u>MPF</u>: חוקרים בודדו מרכיב הנחוץ לפירוק הממברנה של הגרעין וכניסה למיטוזה. גילוי שהוא מכיל שתי יחידות: קטליטית ורגולטורית.

למעלה בציור- שלבי מחזור התא, עלייה במסה ובכמות ה-DNA ואז חלוקה של התא. בכתום מסומן שלב S.

הם מצאו חלבון שהביטוי שלו משתנה כתלות בשלב מחזור התא בו הוא נמצא, וקראו לו: Cyclin.

בכחול: רמת CyclinB. מגיע לשיא במיטוזה ורמתו יורדת כשהתא גומר להתחלק.

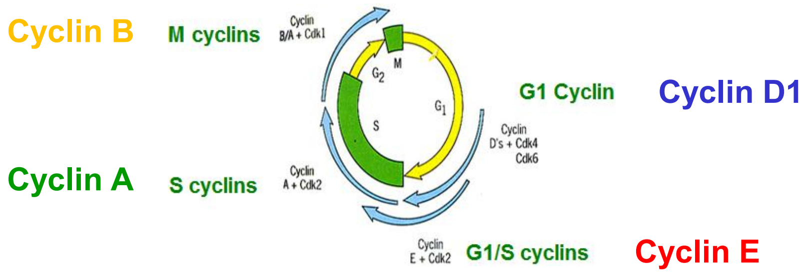
בתכלת: Cdk1, רמתו לא משתנה במהלך מחזור התא, אבל מידת הפעילות שלו משתנה- פעילות גבוהה ברמות Cyclin גבוהות. ולכן זהו Cdk-Cyclin dependent kinase.




### <u>Cdks ו-Cyclins לפי שלבים במחזור התא:</u>

בשמרים ישנו רק Cdk אחד. פעילותו משתנה בצורה מחזורית והוא יכול לקשור Cyclin-ים שונים (בתמונה משמאל).

בתאים אנימאליים יש 4 Cdks, כל אחד מהם פועל בשלב אחר של מחזור התא, כל Cdk בדרך-כלל מכיר Cyclin אחר. בתמונה למטה מופיעים ה-Cdks וה-Cyclin-ים שלהם בשלבים השונים.






©ענת עציון

## המנגנונים במערכת הבקרה:

חייבות להית כמה רמות של בקרה על מחזור התא כדי להבטיח שהתהליך ייתרחש במקום הנכון, בזמן הנכון ובמינון הנכון.

### בקרה על פעילות Cdk:

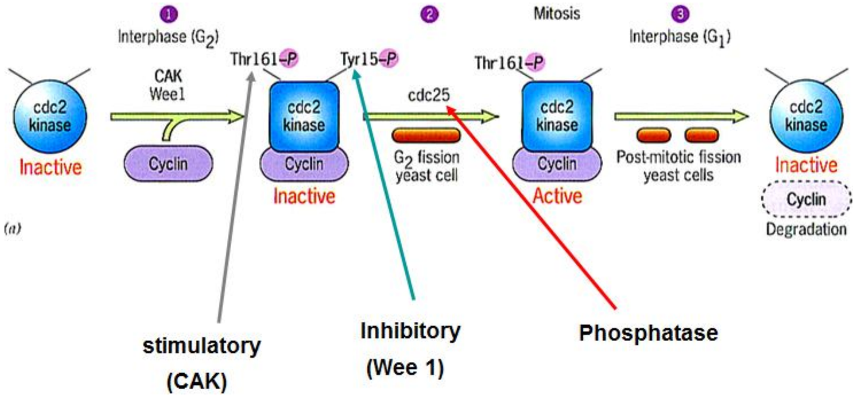
כדי להפעיל את Cdk הוא צריך להיקשר ל-Cyclin וגם להיות מזורחן על טריאונין.

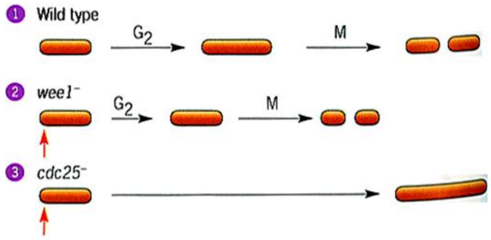
**Wee1:** קינאז שמבקר באופן שלילי את Cdk, מזרחן אותו על טריאונין אבל גם על טירוזין וזה מונע ממנו לקשור ATP. וכך הוא מונע ממנו לפעול כקינאז.

**CAK:** קינאז שמזרחן את Cdk כבקרה חיובית

**Cdc25:** פוספטאז שתפקידו להסיר את הפוספט המעכב מטירוזין ב-Cdk. תאים יכלים לעבור את נקודת הבקרה רק לאחר שהוסר העיכוב מ-Cdk.

לאחרי המיטוזה (למשל), ישנו פירוק של ה-Cyclin ואז ה-Cdk חוזר למצב לא פעיל.

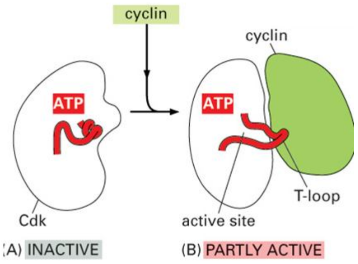



בשמר w.t החי בתנאים שאינם משתנים, לכל שלב במחזור התא יש אורך זמן קבוע. וחלוקה לתאי בת בגודל מסויים.

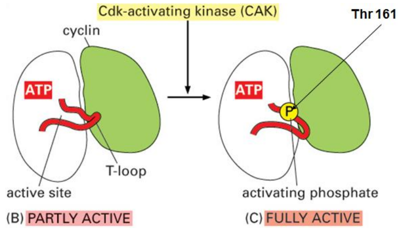
מוטציה ב-Wee1: התאים לא גדלים מספיק לפני החלוקה ולכן תאי-הבת קטנים יותר.

מוטציה ב-Cdc25: השמר לא יתחלק ורק ימשיך לגדול ולגדול ולגדול...




### אקטיבציה של Cdk ע"י קישור Cyclin:

האקטיבציה של Cdk נעשית ע"י קישור Cyclin שגורם לשינוי קונפורמציה של לופ ספציפי שנמצא בקינאז. כשהוא אינו קשור ל-Cyclin, הלופ בקונפורמציה שלא מאפשרת אינטראקציה עם הסובסטראטים של Cdk. לאחר הקישור ל-Cyclin ה-Cdk עדיין לא פעיל במלואו.

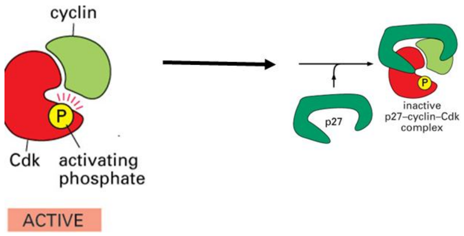



ואז ישנו קינאז אחר (CAK) המאקטב את ה-Cdk ע"י זרחון הטריאונין ב T-loop. ואז ה- Cdk פעיל בצורה מלאה.



©ענת עציון

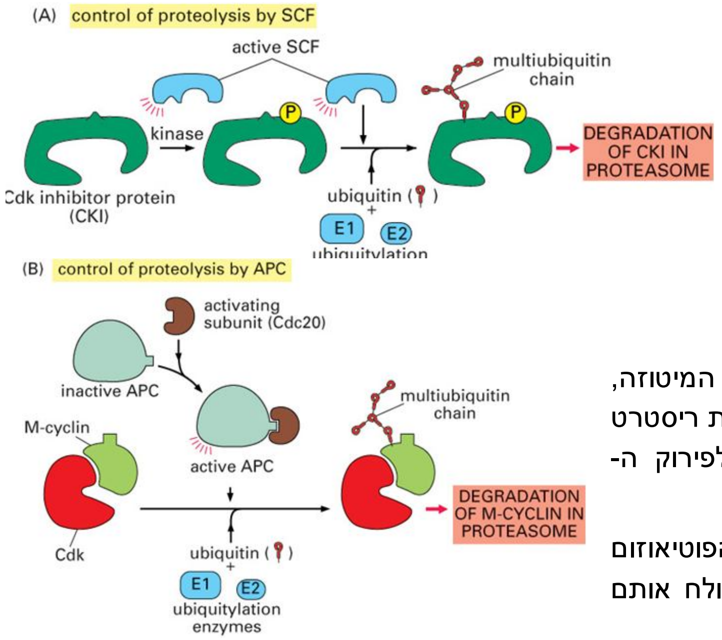
**עיכוב Cyclin/Cdk ע"י CKI:**




CKI הוא מעכב שנקשר לקופלקס ומונע ממנו לקשור סובסטרטים. בדרך-כלל פועל לעיכוב המעבר מ-G1 ל-S (p27 הוא אחד ה-CKI).

**בקרה ע"י פירוק חלבונים:**

ישנן בתא שתי מערכות לפירוק חלבונים במחזור התא: SCF ו-APC.




**SCF:**

מערכת שמכירה חלבונים מזורחנים ויודעת לשלוח אותם לפירוק. זו מערכת שפועלת לאורך כל מחזור התא והסימן שלה לפעול הוא זרחון. מערכת זו גורמת לפירוק ה-CKI, ישנה בקרה ע"י קינאז שמזרחן את ה-CKI.

**APC:**

מערכת שפועלת על ה-Cyclin M שבסוף המיטוזה, היא גורמת לפירוק שלו וזה מאפשר לעשות ריסטרט לכל המערכת. מערכת ה-APC גורמת לפירוק ה-Cyclin וכך ה-Cdk מעוכב.

APC הוא למעשה ליגאז של מערכת הפוטיאוזום שמחבר ל-Cyclins יוביקוויטין וכך הוא שולח אותם לדגרגציה.

**בקרה על ביטוי Cyclins והיציבות שלהם:**

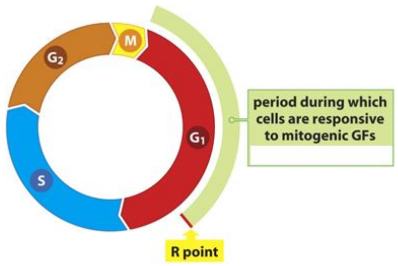
- MAPK גורם לאקטיבציה של פקטורי שעתוק הפועלים מאוד מוקדם במחזור התא ומגבירים את הביטוי של Cyclin D1.
- pKb גורם לייצוב Cyclin D1. עיכוב המסלול הזה גורם תוך כמה דקות לכך שלא יהיה Cyclin D1.

**בקרה על Cyclins ע"י מידור תאי:**

**דוגמא:** Cyclin B הפעיל במיטוזה, במהלך G2 לא נמצא בכלל בגרעין, כולו בציטוזול. במהלך המיטוזה, רובו נמצא בגרעין.

**בקרה פנים-תאית על אירועים במחזור התא:**

**הישארות תאים ב-G1 ומעבר ממנו ל-S:**




תאים לא מתחלקים נמצאים ב-G0 או ב-G1. כדי לסנכרן תאים בתרבית תאים לשלב G1 צריך פשוט לא לתת להם גורמי גדילה ואז הם לא מתקדמים במחזור התא.

אבל ישנו שלב אחד שהוא כבר בלתי הפיך, וגם הוצאת גורמי גדילה לא תעצור את מחזור התא והוא ימשיך עד סיומו.

ב-G1 ישנו שלב שבו נעשית החלטה- האם התנאים מאפשרים להתקדם במחזור התא או לא? זה נקרא: ה-**R point - נקודת האל-חזור**.



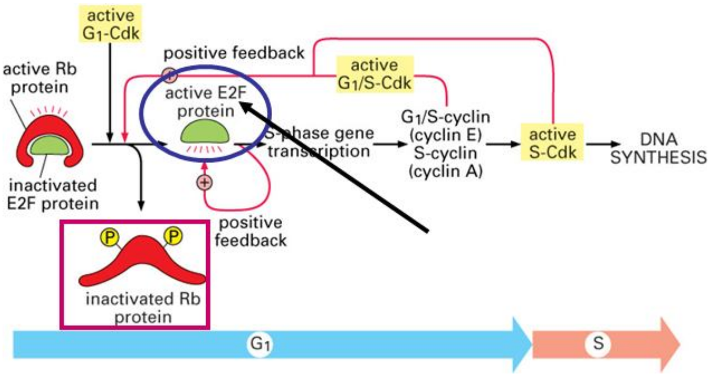
©ענת עציון

המעבר מ-G1 ל-S מצריך אקטיבציה של **פקטור השעתוק E2F.**

במהלך שלב G1, ל-E2F קשור **חלבון מעכב הנקרא: RB.**

האקטיבציה של E2F דורשת דיסוציאצייה שלו מ-RB.

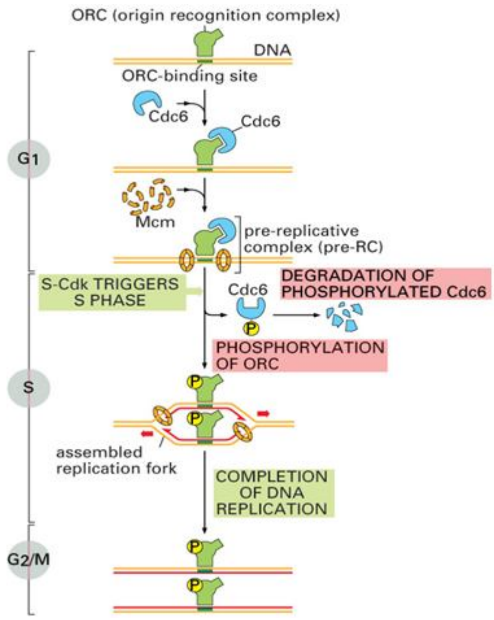
סילוק RB נעשה ע"י פוספורילציה שהופכת את RB ללא פעיל.




מי שמבקר את הזרחון של RB זה ה- G1 Cyclins. סיגנל חיצוני של גורמי גדילה גורם להגברת הביטוי של G1 cyclin ואז הוא מתקשר ל-Cdk המתאים.

קינאזות המאוקטבות ע"י סיגנל מסלקות את ה-CKI (זרחון המזוהה ע"י SCF). ברגע ש-RB עובר זרחון, הוא מתנתק מ-E2F וזו תחילת התהליך.

E2F מבקר בבקרה חיובית את הביטוי של עצמו וגם ביטוי של חלבונים ו-Cyclins הנחוצים למעבר לשלב S.




**<u>בקרה על תחילת שכפול ה-DNA:</u>**

בשלב S חשוב שלא יהיו טעויות בהכפלת ה-DNA. כשמתחילה הכפלת ה-DNA ב-Ori1, אסור שיתחיל עוד מחזור כדי שאותו מקטע לא יעבור הכפלה יותר מפעם אחת. צריך שכל מה שנחוץ להכפלת ה-DNA יהיה מוכן.

אחד מתפקידיו של **S-CDK (Cyclin S/CDK complex)** הוא אתחול הכפלת ה-DNA. ישנו קומפלקס **ORC (Origin of Recognition Complex)** שכל-הזמן יושב על ה-DNA. וכדי לאתחל שכפול צריך להגיע הליקאז אל ה-ORC לפתיחת שני הגדילים וצריך להגיע גם ה-**Pre RC**. ההליקאז מגיע בעזרת החלבון **Cdc6** שמתפקד כאדפטור. השכפול מתחיל לאחר סילוק ה-Cdc6- S-CDK מזרחן את Cdc6 וזה גורם לסילוקו.

ברגע שהתחילה הכפלת ה-DNA יש פוספורילציה של ORC כדי למנוע ממנו לקשור מחדש את ה-Pre-RC ואת ה-Cdc6 ולהתחיל מחזור שכפול נוסף. בנוסף, ה-S-CDK גם מסלק עודף של הליקאזות. הקומפלקס S-CDK ממשיך להיות פעיל גם ב-G2 עד הכניסה למיטוזה, וגם במיטוזה ישנו חלבון אחר המבצע את אותו התפקיד ולכן שכפול ה-DNA לא מתחיל פתאום שוב באמצע המיטוזה.

כל ה-Cyclins דואגים לכך שהכפלת ה-DNA תתרחש בשלב S ובו בלבד.

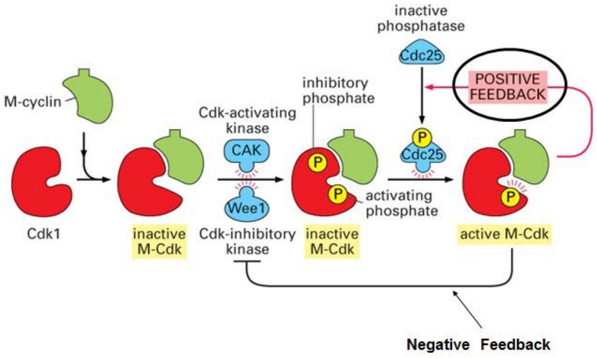
בסוף המיטוזה ישנו ריסט של המערכת- פירוק של ה-Cyclins ואז כל ה-Cdks לא פעילים יותר, ואין מי שיזרחן מחדש את ה-ORC וישנו פוספטאז המגוייס לסילוק הפוספט מ-ORC, ואז מתארגן Pre-RC.

הכפלת ה-DNA לא מתחילה ב-G1 כי עדיין אין S-CDK פעיל, זה קורה רק לאחר המעבר ב-R point.



©ענת עציון

**<u>בקרה על הכניסה לשלב ה-M:</u>**

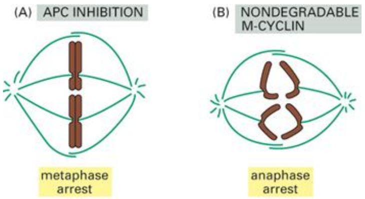



אחד השחקנים הראשיים בתהליך הוא הקומפלקס M-CDK (M Cyclin/CDK complex). הוא מופיע כאשר יש מספיק M Cyclin. רמות הביטוי של M Cyclin מבוקרות בשלבים G2 ובתחילת M.

הוא צריך להיות מזורחן למקסום הפעילות שלו. מאוקטב ע"י CAK ומעוכב ע"י זרחון של Wee1. Cdc25 כאמור מוריד את הפוספט המעכב. ו-M-CDK פעיל גם מבקר חיובית את Cdc25 וגם מעכב את Wee1.

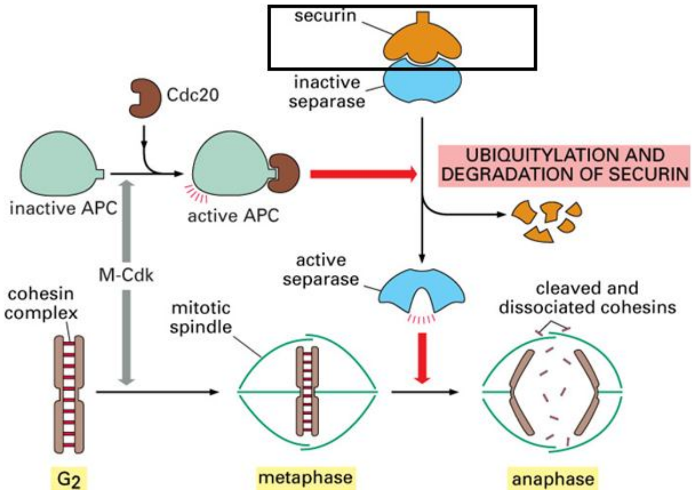
**<u>בקרה על הסגרגציה של כרומטידות אחיות:</u>**

הקומפלקס M-CDK נחוץ לפירוק הממברנה במהלך המיטוזה ויש עדויות לכך שהוא מתחיל את תהליך הקונדנסציה בגרעין והבאת הכרומוזומים לכישור. הוא גם מפקח על סגרגציה נכונה של כרומטידות אחיות. לצורך הסגרגציה יש לסלק את הקוהזין המחזיק אותן ביחד. אם מונעים את פעילות ה-APC, לא תהיה סגרגציה ומחזור התא ייעצר במטפאזה. בנוסף, סילוק M-CDK נחוץ לסיום המיטוזה, אחרת התא ייעצר באנאפאזה.

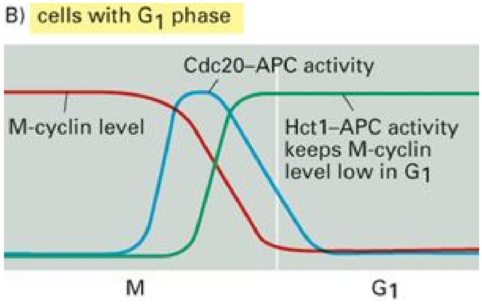



הקוהזין לא מתפרק לפני המטפאזה כי הפרוטיאז המפרק אותו- **separase** מבוקר בעצמו, ע"י קשירה למעכב-**securin**. במעבר מ-G2 ל-M, M-CDK מתחיל להיות מאוד פעיל, והוא מאקטב את ה-APC ובנוסף נקשר אל APC החלבון Cdc20 להפעלתו.

APC גורם לפירוק של המעכב securin (מוסיף לו יוביקוויטין ומסמן לדגרדציה) ואז הפרוטיאז separase יכול לפרק את הקוהזין.

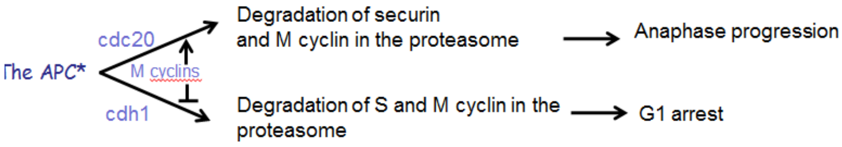



**<u>בקרה על סיום שלב M וכניסה ל-G1:</u>**



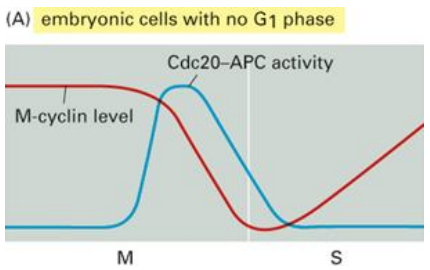

ככל שיש יותר M Cyclins הם משפעלים את APC. כאשר Cdc20 נקשר ל-APC יש דגרדציה של M Cyclins (מדביק להם יוביקוויטין). ולכן M Cyclins גורמים לפידבק שלילי על עצמם. ואז ישנה דעיכה בפעילות APC כי כמות M Cyclins יורדת.

APC יכול להיקשר גם ל-cdh1. קומפלקס זה מעוכב כשיש הרבה M Cyclins. כשרמתם מתחילה לרדת, הוא גורם לפירוק של M, S Cyclins ואז קורית כניסה לשלב G1.



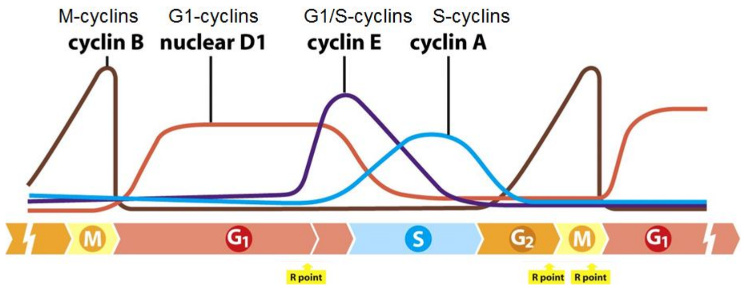



©ענת עציון




<u>הערה:</u> בתחילת ההתפתחות העוברית אין עצירה ב-G1, ישנן כמה חלוקות ללא גדילה בגודל התא. ולכן בשלב זה לא מתבטא cdh1.

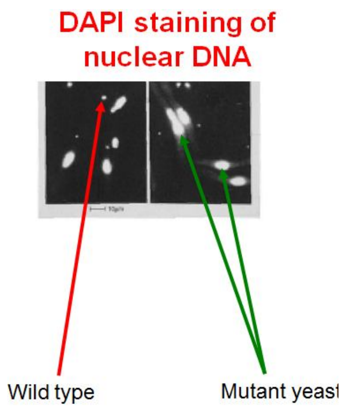
## <u>ה-Cyclins בחלוקה לשלבים השונים:</u>

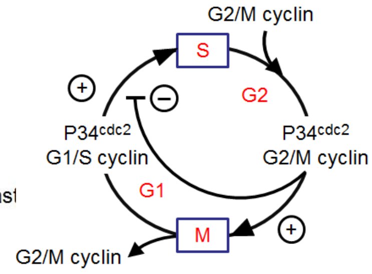



ה- Cyclin החשוב ביותר הוא D1: הוא מחייב את התא להיכנס למחזור התא, גורם למעבר ה-check point הכי משמעותי שהוא המעבר בין G1 ל-S. הוא גם מניע מעגל פידבק חיובי שגורם לזרחון RB ואקטוב E2F שמבקר שעתוק חלבונים נוספים ומביא להגברה של התהליך.

Cyclin B חשוב מאוד גם הוא: פעיל במיטוזה, וירידה ברמתו נחוצה לסיום המיטוזה ולחלוקת התאים.

## <u>ניסוי- השפעת פגיעה ב-Cyclin:</u>




בתמונה יש מוטנט של שמרים, שה-Cdk שלהם נקרא: cdc2.

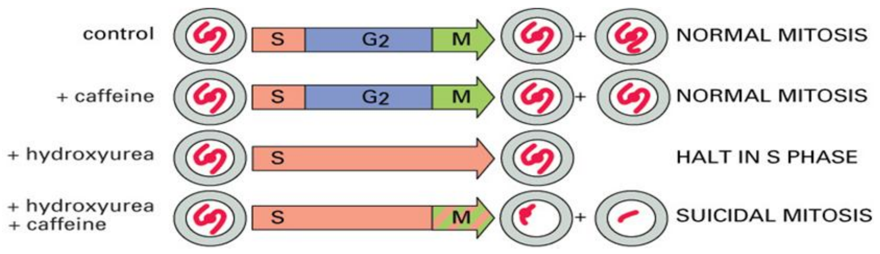
צבעו אותם ב-DAPI, חומר הצובע DNA גרעיני.

במוטנט של שמרים חלה פגיעה ב-G2/M Cyclin. תפקידיו הם:

- עיכוב סינתזת DNA.
- שפעול המיטוזה.

**<u>התוצאה:</u>** תאים שכל-הזמן מכפילים את ה-DNA שלהם שוב ושוב מבלי להתחלק. בתמונה רואים שבמוטנט יש הרבה מאוד DNA בגרעין.

## <u>ניסוי- השפעת חומרים שונים על בקרת חלוקת התא:</u>




<u>הידרוקסיאוריאה:</u> שלב S מתארך, החומר פוגע בהכפלת ה-DNA ויש עיכוב של התהליך.

<u>קפאין לבד:</u> לא עושה כלום.

<u>קפאין עם הידרוקסיאוריאה:</u> ישנו מסלול שעוקף את הבקרה על הכפלת ה-DNA והתאים נכנסו למיטוזה ללא בקרה על התקינות.



©ענת עציון