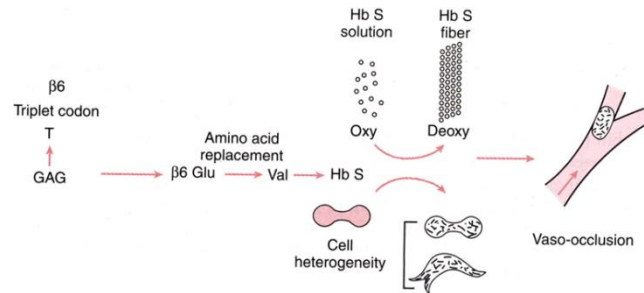


## הקדמה

**אוטוזום:** כל כרומוזום גרעיני מלבד כרומוזומי המין.  
 רב-אלליות (multi allelism): כמה אללים באתר של גן אחד.  
**סוגי הדם:** על-פני כדוריות הדם יש חלבון H שעובר גליקוזילציה. הגן על כרומוזום 9 (אשר קובע את סוג הדם) מקודד לגליקוטראנספראזת וזה משפיע על סוג הגליקוזילציה. אלל O הוא מוטציית Frameshift המביאה לאנזים לא פעיל ולכן אין תוספת של סוכרים לחלבון H.  
**קו-דומיננטיות:** פנוטיפ AB זוהי דוגמא קלאסית. B ו-A יוצרים כל אחד אנזים פעיל ללא תלות בתוצר האלל השני.

**דומיננטיות חלקית - Incomplete dominance:** מיזוג בין שני פנוטיפים. דוגמא: הכלאפת רחים לבנים ואדומים נותנת פרחים ורודים.

**אנמיה חרמשית:** מחלה פתולוגית של המוגלובינים. בהמוגלובין ישנן שתי שרשראות  $\alpha$  ושתי שרשראות  $\beta$  בתוספת קבוצת heme. במחלת האנמיה החרמשית יש מוטציה  $\beta 6 \text{Glu} \rightarrow \text{Val}$ . המוטציה לא מפריעה לקישור החמצן ופעילות ההמוגלובין, אך החלבון הופך לפחות מסיס בדם. בלחץ חמצן נמוך מולקולת ההמוגלובין מסתדרת כמקלונים הגורמים לעיוות כדורית הדם לצורת מגל קשיחה. כדורית הדם נתקעת בכלי דם קטנים וזה גורם לסתימה של כלי הדם: Vaso-occlusion, היפוקסיה, תאי דם אדומים נשברים, אנמיה.



המחלה מתפתחת במהלך השנתיים הראשונות של החיים. גורמת ל: אנמיה, פיגור בהתפתחות, טחול מוגדל, "hand-foot syndrome", מוות בגיל צעיר.  
**HbA** - אלל תקין, **HbS** - אלל מוטנטי.

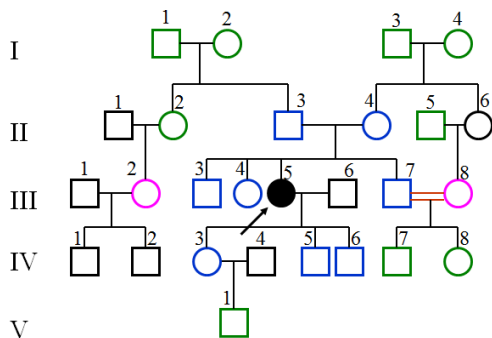
**ברמה קלינית:** המחלה היא רצסיבית.

**ברמה המולקולרית:** המחלה היא קו-דומיננטית בהטרוזיגוטים (HbA & HbS).

**ברמה הפיזיולוגית:** האלל המוטנטי מראה דומיננטיות חלקית כיוון שלהטרוזיגוטים יש אנמיה קלה.

**כלל אצבע:** תכונה היא דומיננטית כאשר הפנוטיפ מתבטא בהטרוזיגוטים. תכונה היא רצסיבית אם היא מתבטאת רק בהומוזיגוטים או בהמיזיגוטים.

## עצי תורשה:



כשמישהו רוצה לחקור מחלה גנטית, עליו להכין עץ משפחה כדי לבדוק את ההיסטוריה הרפואית של המחלה ולנתח האם המחלה עוברת בתורשה.

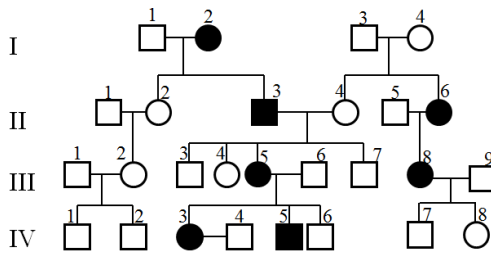
**Proband:** האדם שדרכו הגיעו לחקר המחלה במשפחה (מסומן בחץ).

**קרובים מדרגה ראשונה:** הורים, אחים ואחיות, צאצאים.

**קרובים מדרגה שנייה:** סבים וסבתות, נכדים ונכדות, דודים ודודות, חצאי אחים ואחיות, אחיינים ואחייניות.

**קרובים מדרגה שלישית:** בני-דודים ראשונים.

**Consanguinity:** קרבת דם (III 7 & 8).



**הורשה אוטוזומלית דומיננטית:**

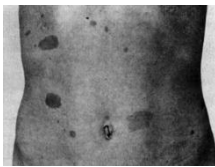
- הפנוטיפ מופיע בכל דור.
  - לצאצאים של הורים חולים יש 50% סיכוי לרשת את המחלה.
  - לזכרים ונקבות יש סיכוי זהה להיות חולים.
  - בני משפחה נורמאליים מבחינה פנוטיפית אינם מעבירים את התכונה/מחלה לדור הבא.
  - לשני הורים חולים ייתכן ילד בריא (בסיכוי של 25%).
  - לעיתים הפנוטיפ של ההומוזיגוט חמור יותר מזה של ההטרוזיגוט.
- אין חדירות – non penetrance:** קיים האלל למחלה אך אין פנוטיפ.
- חדירות חלקית:** קיים האלל למחלה אך יש ווריאביליות בביטוי הפנוטיפ של המחלה. פנוטיפ מסויים מתבטא אצל פחות מ-100% מהאנשים הנושאים את האלל האחראי לפנוטיפ.
- הערה:** חדירות חלקית ומוטציות חדשות הן הסיבה לכך שאללים למחלות קשות לא נעלמים מהאוכלוסייה.

**דוגמאות למחלות אוטוזומליות דומיננטיות:**

**Huntington:**

מחלה ניוונית של מערכת העצבים המתפתחת בעשור הרביעי של החיים. מחלות דומיננטיות רבות לא מועברות לדור הבא כי הפרטים מתים לפי הבאת ילדים. נשא למחלה זו בטוח יחלה במחלה. במחלה זו יש מוטציה של שלשות נוקליאוטידים שעוברים אמפליפיקציה.

**Neurofibromatosis-1 (NF-1):**



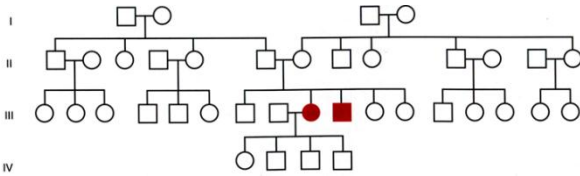
מחלה המופיעה במערכת העצבים ובמצב החמור שלה, ישנם גידולים שפירים במוח. מחלה זו מאופיינת ע"י כתמים בצבע קפה על הגוף, לפחות 6 כתמים בקוטר של: 1.5cm. המחלה הזאת מתאפיינת בווריאביליות גדולה שנעה בין פנוטיפ של כתמי הקפה בלבד ועד לגידולים במוח. המחלה יכולה לכלול: הפרעות למידה, שיתוק, עיוורון.

חלק גדול מהחולים במחלה לא ירשו אותה מהוריהם אלא קיבלו אותה עקב מוטציה בביצית או בזרע, בגן שמצוי על כרומוזום 17. כשיש מוטציה בתאי מין יכול להיווצר מצב של מוזאיקה- לא כל התאים בגוף יכולו את המוטציה, רק תאים שהתפתחו מהתא שהכיל את המוטציה. הגן שנפגע הוא tumor suppressor, ואם הוא לא קיים בשני עותקים אז יש סרטן.

**Achondroplasia:**



סוג של גמדות מחלה גנטית שהיא סינדרום. **סינדרום:** תבנית כללית אופיינית של הפרעות כשההנחה היא שההפרעות קשורות זו לזו סיבתית (כולן נגרמות ממוטציה באותו הגן). אנשים אלו הם בעלי אינטיליגנציה נורמאלית לחלוטין אך הם נמוכי קומה עקב עצירה בהתפתחות העצמות. בעלי גולגלת עגולה ותווי פנים אופייניים. תדירות המחלה היא 1:10,000 וב-80% מהמקרים מדובר במוטציות חדשות בתאי המין של אחד ההורים, בגן FGFR3- שינוי בסיס אחד בגן. יש עליה בתדירות עם העליה בגיל האב. ניתן לערוך למחלה זו אבחון טרום לידתי.



**הורשה אוטוזומלית רצסיבית:**

פנוטיפים אוטוזומלים רצסיביים הם פחות שכיחים מאוטוזומלים דומיננטיים (בערך שליש מהפנוטיפים המנדליים הידועים).

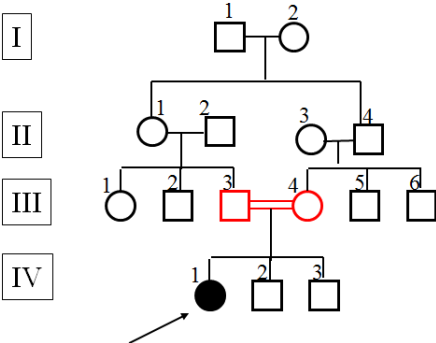
- אם פנוטיפ אוטוזמלי רצסיבי מופיע אצל יותר מבן משפחה אחד- בדרך כלל זה יהיה אצל אחד מהאחים/אחיות ולא אצל ההורים, הצאצאים או אחרים.
- הסיכוי החוזר לכל אח/אחות להיות חולים הוא 25%.
- ייתכן שההורים של פרט חולה הם קרובי משפחה (במיוחד עבור הפרעות נדירות).
- בדרך כלל זכרים ונקבות חולים במידה שווה.

**דוגמאות למחלות אוטוזומליות רצסיביות:**

**ציסטיק פיברוזיס:**

פגם בטרנספורט של יוני כלור בתאים אקסוקריניים: זיעה, לבלב, ריאה. הפגם גורם ליצירת ריריות צמיגות בריאה ובגברים זה פוגע בצינורות הזרע מהאשכים (מביא לעקרות). ניתן לאבחן את המחלה ב"מבחן זיעה": בודקים האם הזיעה מלוחה. מחלה זו נפוצה בעיקר ב-Caucasians (לבני עור), שם תדירות הנשאים היא: 1:22 ותדירות החולים הינה:  $1/22 \times 1/22 \times 0.25 = 1/1936$ . המחלה ניתנת לאבחון טרום לידתי. הגן הפגוע נמצא על כרומוזום 7 - CFTR (Cystic Fibrosis transmembrane regulator).

**קרבת משפחה בהורשה אוטוזומלית רצסיבית:**

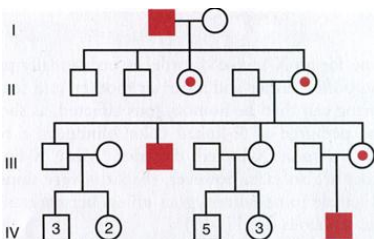


רוב האללים המוטנטים קיימים אצל הנשאים ולא אצל ההומוזיגוטים. ולכן הסיכוי ששני אללים מוטנטים "ייפגשו" בפרט עולה אם ההורים הם קרובי משפחה (אפילו קרבה רחוקה) – related by descent.

- לצאצאים של בני דודים ראשונים יש 4.5-5% סיכוי להפרעות גנטיות (ובאוכלוסיה הכללית-3%).
- **Genetic isolate**: קבוצה שהופרדה משכניה ע"י מחסומים גיאוגרפיים, דת או שפה. בקבוצות אלה יש סיכוי גבוה לשני נשאים של תכונה רצסיבית להעמיד צאצאים. הפרעות גנטיות נדירות באוכלוסיות אחרות יכולות להיות שכיחות באוכלוסיה מבודדת. **דוגמא:** האוכלוסייה באיסלנד, שבמשך דורות התחתנו רק זה עם זה.

**טאי-זקס:** מחלה שנפוצה בקרב יהודים אשכנזים, שם תדירות החולים היא: 1/3600 ובאוכלוסיות אחרות בעולם התדירות היא: 1/360,000. הורי ילדים חולים באוכלוסיה זו אינם בהכרח בעלי קרבה משפחתית גבוהה. אך לעומת-זאת באוכלוסיות אחרות- יש דרגה גבוהה של קרבת משפחה בין הורי ילדים חולים.

**הורשה רצסיבית בתאחיזה ל-X:**



- תדירות הפנוטיפ גבוהה בהרבה אצל זכרים לעומת נקבות.
- האב מעביר את המחלה רק לבנות שלו שהופכות לנשאים ומעבירות אותה הלאה.
- הגן לעולם לא עובר מאב לבן.
- נקבות הטרוזיגוטיות בדרך-כלל לא חולות במחלה.

**המיזגוט:** פרט שבגנוטיפ שלו יש רק עותק אחד של כרומוזום מסויים או מקטע כרומוזום במקום המצב הרגיל של שני עותקים. זכרים הם המיזיגוטיים לגבי הכרומוזומים X ו-Y, מלבד האזורים הסודוזומליים שלהם יש הומולוג ב-Y.

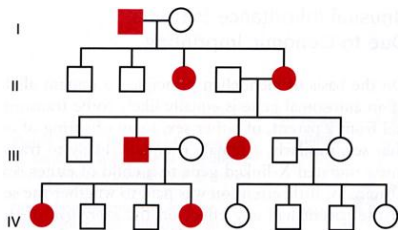
**Dosage compensation:** מנגנון השתקת כרומוזום X מאזן את רמת הביטוי של גנים מכרומוזום X בין זכרים ונקבות. בתאים סומטיים בנקבות יונקים פעים רק כרומוזום X אחד, וקיים גופיף באר אחד. בנקבה הטרוזיגוטית יכולים להיות סימנים למחלה רצסיבית האחוזת ב-X כאשר יש אינאקטיבציה ל-X התקין. האינאקטיבציה נעשית בשלבים מוקדמים של חלוקת התאים ולכן יש אפשרות למוזאיקה. הכרומוזום המושתק נבחר אקראית (יש לציין שלא כל אזור הכרומוזום מושתק). ההשתקה היא לא תמיד "50/50".

**Manifesting heterozygote:** נשים יכולות להראות פנוטיפ של מחלה רצסיבית. הנקבות הן מזאיקה ברמת הביטוי! לא ברמה הגנטית.

**דוגמאות למחלות בתאחיזה ל-X:**

**המופיליה:** בעיה בקרישת דם. נגמרת כתוצאה מפגיעה בפקטור 8 או 9 (הגורמים להמופיליה A ו-B בהתאמה). אם המחלה הייתה מאוד נפוצה אז היו גם נקבות הומוזיגוטיות.  
**G6PD deficiency:** פגיעה בגן גורמת לרגישות לפול, לסולפה ולתרופות נגד מלריה. המחלה נפוצה בעיקר בקרב גברים כרודים ועיראקיים, ובנשים זה קורה בהומוזיגוטיות.

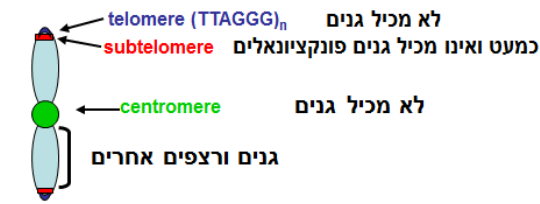
**הורשה דומיננטית בתאחיזה ל-X:**



- נקבות הטרוזיגוטיות הן בעלות פנוטיפ.
- לזכרים חולים עם בנות זוג בריאות, כל הבנים יהיו בריאים וכל הבנות יהיו חולות.
- לצאצאים של נקבה חולה, הן זכרים והן נקבות, 50% סיכוי לרשת את הפנוטיפ.
- לגבי פנוטיפים נדירים- נקבות חולות יהיו פי-2 יותר שכיחות מזכרים חולים (אך בדרך-כלל תהיינה עם פנוטיפ קל יותר מהזכרים).

**"השערות שאי-אפשר לסרק":** זו תכונה ולא בדיוק סינדרום. מתבטא בסיבים של השערות.

## ארגון הגנום



גודל הגנום האנושי:  $6 \times 10^9 bp$

גנום הפלואיד:  $3 \times 10^9 bp$

### הגנום מאורגן בכרומוזומים:

הכרומוזומים ממוספרים לפי גודל, אבל 21 ו-22 הפוכים בסדר עקב טעות במדידה (ולכן 21 הוא הקטן ביותר). כרומוזומים 21 ו-22 זהים בגודל אך לא בצפיפות של הכרומוזומים. בכרומוזום 21 יש יחסית מעט גנים פעילים ולכן ניתן לחיות איתו ב-3 עותקים.

כרומוזום מס'-1:  $260 \times 10^6$

כרומוזום מס'-21:  $50 \times 10^6$

כרומוזום Y:  $59 \times 10^6$

### מספר הגנים בגנום האנושי: כ-25,000.

הרבה חוקרים ניסו לקבוע את מספר הגנים בשיטות שונות:

- Lander et al, Nature 409, 860 (2001) - 29,691
- Venter et al, Science 291, 1304 (2001) - 39,114
- Ewing & Green, Nat. Genet. 25, 232 (2000) - 35,000

### נתונים על הגנים:

גודל: בין כמה מאות בסיסים לכמה מיליוני בסיסים. בממוצע 10-15kb (אין קשר בין הגודל הגנומי לבין גודל התוצר החלבוני).

צפיפות גנים: בממוצע גן אחד לכל 40-45kb.

רווח בין גנים: בממוצע 25-30kb (אין כמעט מצבים של גן בתוך גן).

מספר אקסונים: שונות מדהימה. יש גנים עם אקסון אחד. יש גנים עם למעלה מ-100 אקסונים.

גודל אקסון: בממוצע 200bp. יש שונות, אך לא גדולה מאוד. בדרך-כלל האקסון מכיל את ה-3' UTR הוא הארוך ביותר.

גודל אינטרון: שונות עצומה, בין כמה עשרות בסיסים ליותר מ-10,000 בסיסים.

גודל mRNA: בממוצע 2.5kb.

גודל 5' UTR: בממוצע 100bp.

גודל איזור מקודד: בממוצע 1.5-1.8kb (500-600 codons).

גודל 3' UTR: בממוצע 0.6kb וייתכן גם גדול בהרבה.

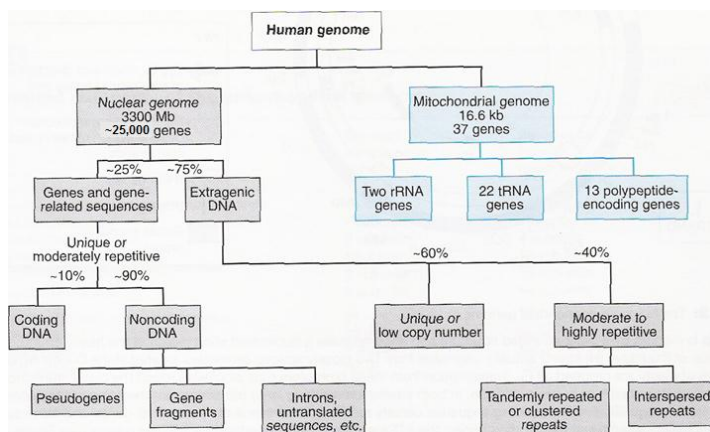
### ארגון הגנים על-פני הכרומוזומים:

הגנים מהווים חלק מזערי מהגנום, יש גנים שהם בודדים ואין דומה להם בגנום אך רוב הגנים הם חלק ממשפחות- שהינן בעלות מקור אבולוציוני משותף. יש סוגים שונים של משפחות: ככאלה הנמצאות במקומות שונים על אותו כרומוזום, וכאלה שמצויות בכרומוזומים שונים. חלק מבני המשפחה אינם מתפקדים-pseudogenes. גנים שונים ממשפחה מסויימת יכולים להופיע בצברים או כבודדים (clustered/non-clustered). ייתכן צבר אחד וייתכנו כמה צברים.

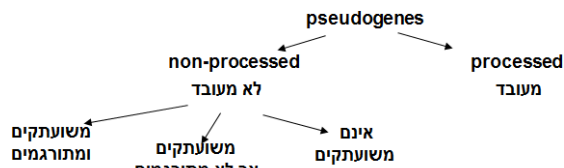
### כמה מהגנום האנושי מכיל

רצפים מקודדים? פחות מ-

1.5% מהגנום מכיל רצפים שמקודדים לחלבון. זוהי תכונה משותפת לכל היונקים.



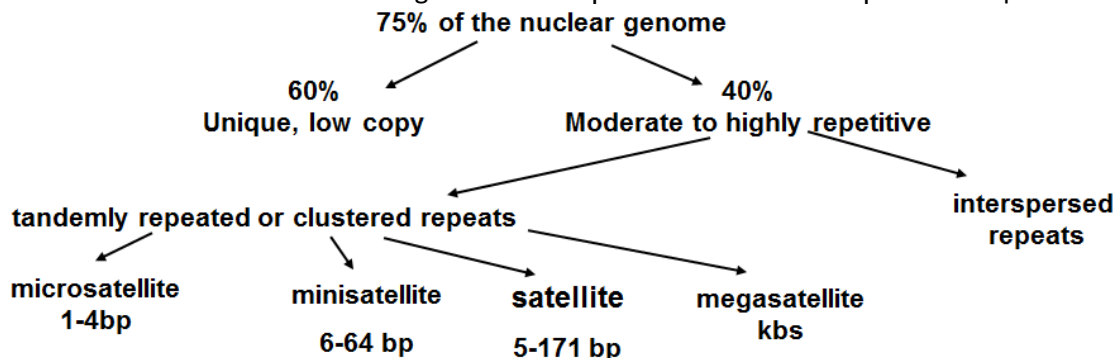
## פסאודוגנים וגנים מקוטעים:



**פסאודוגן:** עותק לא מתפקד של גן שלם או חלק של גן.

**מעובדים:** כתוצאה מ-mRNA שעבר רוורס-טרנסקריפציה ואז חזר למקום אחר בגנום. אלה פסאודוגנים שאין בהם אינטרונים. הם לא משועתקים כי אין להם פרומוטור. מהווים בעיה בדיאגנוסטיקה. איזור האינטגרציה אל ה-DNA משפיע.

**לא מעובדים:** מכילים אינטרונים. צברו לאורך הזמן מוטציות שהופכות אותם ללא פעילים. מופיעים פעמים רבות באזורים של צברי גנים של משפחת גנים. כנראה נוצרו כתוצאה מ-tandem gene duplications. הדופליקציה יכולה גם להיות חלקית וליצור truncated genes.

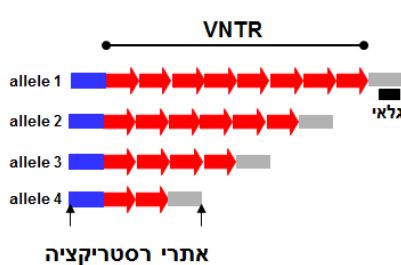


**Satellite DNA:** רצפים שחוזרים אחד על השני. החזרה יכולה להיות באורכים שונים.

## רצפי טלומרים (a mini satellite repeat):

חזרות עוקבות של הרצף TTAGGG. מופיעים בקצות הכרומוזומים. אורכם משתנה עם חלוקת תאים סומטיים. ביילוד אורך הטלומר הוא: 10-15kb. תפקיד הטלומר הוא להגן על קצות הכרומוזומים מפני דגרדציה. בתאי גזע אורך הטלומר נשמר ע"י האנזים טלומראז.

## (a mini satellite repeat) VNTRs- Variable Number of Tandem Repeats:



רצף של 50 בסיסים שחוזר אחד אחרי השני. אצל אנשים שונים מספר החזרות הרצופות הוא שונה.

מספר החזרות הוא מאוד פולימורפי, ומשתמשים בכך ל-DNA fingerprinting: לפי מספר החזרות מתקבלים פרגמנטים שונים לאחר החיתוך באנזים רסטריקציה מתאים. המונח המתאר מצב זה נקרא- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

**ישנם שני סוגי VNTRs:**

**VNTRs פשוט:** הרצף מופיע במקום אחד בלבד בגנום. לכל פרט מקסימום שני אללים.

**VNTRs מורכב:** הרצף מופיע במקומות רבים בגנום. לכל פרט אללים רבים הסיכוי לדגם זהה בין שני אנשים הוא:  $1:10^{11}$ .

**הערה:** ב-VNTR מורכב ניתן לאשש בדיקות אבהות. היום ישנן שיטות יותר מתקדמות לבדיקה זו.

## Micro satellite repeats- Mono-, Di-, Tri-, Tetra-nucleotides:

ישנם צברים של חזרות כאלה במקומות רבים בגנום. 0.3% מהגנום מורכב מחזרות של mono A או mono T. 0.5% מהגנום מורכב מחזרות של di-nucleotides CA repeats. מאוד נפוץ. CG repeats מאוד נדיר כי הוא עובר מתילציה. חזרות של tri/tetra-nucleotides הן יחסית נדירות.

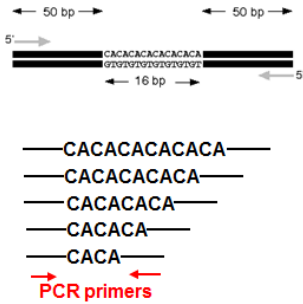
**הערה:** לזיהוי CA repeats במיקום מסוים צריך להכין פריימרים לרצפים השונים בגנום מצידי ה-CA.

**CA repeats**

חזרות שהן מאוד פולימורפיות. ייתכנו אללים רבים במקום מסויים בגנום שמכיל חזרה כזו. נדירים מאוד באזורים מקודדים.

**מהווים כלי חשוב ביותר במיפוי גנים**

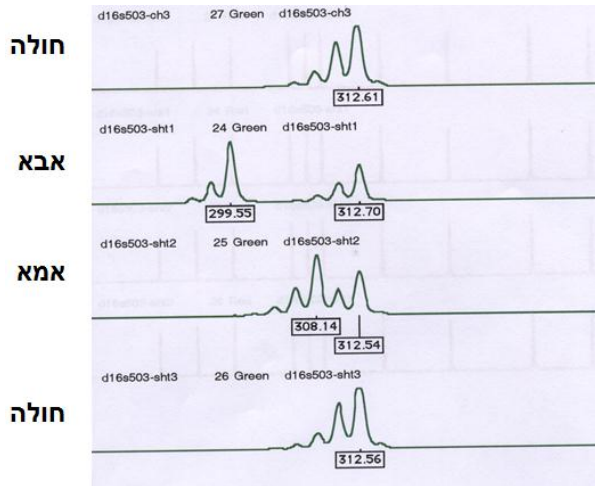
יש מספר חזרות CA ספציפי לכל אלל של הגן.



**PCR**: הבעיה איתו היא השימוש ב-taq polymerase שלפעמים קופץ או חוזר על רצפים. זה קורה בחזרות של 2.

**"Shadow bands"**: מתקבלים פסים חלשים משני צידי הפס החזק, בתוצאות האנליזה, עקב "גמגום" של ה-DNA polymerase.

דוגמא לתוצאה ממכשיר sequencing:



המיקום על הקו זה המיקום של הסימון הפלואורוסנטי. גובה הקו זה העוצמה- כמות הרצפים שסומנה באותו המיקום. לאבא ולאמא יש אלל עם מוטציה (הימני ביותר), ושני הילדים קיבלו משניהם את האלל עם המחלה. ניתן לראות גבעות קטנות ליד ה-peaks הגבוהים כתוצאה מה"גמגום" של הפולימראז.

רצפים חוזרים מפוזרים – Interspersed repeats

**LINE** - long interspersed nuclear elements

**L1 element**  
(LINE-1)

**SINE** - short interspersed nuclear elements

**Alu repeat**  
(unique to primates)

**LINE**: הרצפים החוזרים הארוכים.

שם הרצף הכי מפורסם הוא LINE-1. אורך מקסימאלי: 6.1kb, אורך ממוצע: 0.8kb. מספר עותקים: 200,000-500,000.

**SINE**: הרצפים החוזרים הקצרים.

שם הרצף הכי מפורסם הוא ה-Alu שמופיע בבני-אדם ובקופים. אורך: 280bp. מספר עותקים:  $10^6$ , מופיע בממוצע כל 1000bp ולכן מהווה בעיה לגלאים, אסור שהם יכילו את הרצף הזה. הוא מהווה מקור לבעיות גנומיות כמו: unequal crossing-over. נמצא גם באזורים לא מקודדים.

## מוטציות

**מוטציה:** שינוי קבוע בחומר התורשתי. זהו שינוי ב-DNA שיכול לגרום או לא לגרום לשינוי בפנוטיפ.  
**פולימורפיזם:** מוטציה באזור המקודד (או ברצפים המבקרים ביטוי) שאינה מביאה למחלה.

### סוגי מוטציות:

סוג	מנגנון	דוגמא	תדירות
• גנומי	chromosome missegregation	aneuploidy	$10^{-2}$ /cell division
• כרומוזומלי	chromosome rearrangement	translocation	$6 \times 10^{-4}$ /cell division
• גניות	base-pair mutations	point-mutation	$10^{-10}$ /bp/cell division

**מוטציה גנומית:** תוספת או חוסר בכרומוזום, תדירות גבוהה יחסית, קורית אחת ל-100 חלוקות. ברוב המקרים הריון כזה מופל באופן טבעי בטרמיסטר הראשון.

**מוטציה כרומוזומלית:** תזוזה של חלקים מהכרומוזום כמו: טרנסלוקציה וחיבור מחדש, נדיר יותר.

**מוטציות גניות:** מוטציות של מספר בסיסים מועט, קורה בתדירות מאוד נמוכה. ההסתברות למוטציה כזו היא פעם ב- $10^{10}$  (עקב מנגנון ה-proof reading) ויש רק  $10^9$  בסיסים ולכן הסיכוי הוא קטן מאוד.

### מקום התרחשות המוטציה:

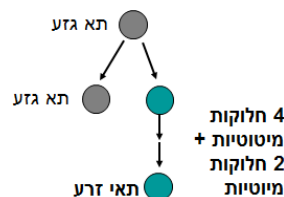
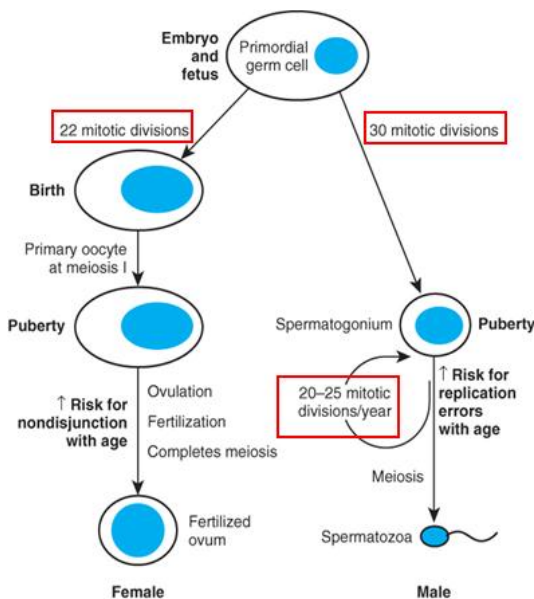
השלכות המוטציה משתנות כתלות במקום שבו היא קרתה.

- תא מין- יכול להביא למחלה דומיננטית שמופיעה בילדים של הורים בריאים.
- תא סומטי בוגר- המוטציה לא תעבור בתורשה אך יכולה להוביל לסרטן.
- תא סומטי בעובר- גורם למוזאיקה בעובר, יהיו לו שתי אוכלוסיות של תאים.

### הקשר בין מחלות לגיל האב:

**נקבות:** במהלך ההתפתחות העוברית התאים המיועדים עוברים 22 חלוקות מיטוטיות ונוצרות הרבה מאוד ביציות לא בשלות התקועות באמצע החלוקה המיטוטית הראשונה, והן יושבות בשלות. לאחר שהאישה מגיעה לבגרות, במהלך המחזור החודשי, הביצית יוצאת מהזקיף. ואז היא מסיימת את החלוקה המיטוטית הראשונה ואת החלוקה המיטוטית השנייה. ולכן אין בשלבים אלה הזדמנות לצבור מוטציות נוספות בתהליך שכפול DNA (כי ה-DNA כבר שוכפל).

**זכרים:** התאים עוברים 30 חלוקות מיטוטיות ומחכים באשכים. כשמגיעה הבגרות המינית, התאים האלה עוברים כל שנה 23 חלוקות מיטוטיות שבהן ניתן לצבור מוטציות. כל 16 ימים יש חלוקה מיטוטית אסימטרית:





מספר החלוקות	גיל
35	15
150	20
380	30
610	40
840	50

ולכן מספר החלוקות שעברו תאי זרע לפי גיל הגבר:

הסיכוי לרשת מוטציה חדשה בגן כלשהו: 1:40 (2.5%).

החישוב: בכל גמטה יש כ-25,000 גנים. התדירות הממוצעת של מוטציה לגן היא:  $10^{-6}$ .

$$10^{-6} \times 25,000 = 0.025/\text{gamete}$$

הסיכוי לצאצא לקבל מוטציה היא כפולה, כי יש לו שני הורים- 5%.

הערה: חלק גדול מהמוטציות הללו הן רצסיביות, ולכן לא משפיעות על הפנוטיפ.

## מוטציות גניות:

### החלפת בסיס יחיד (Single base substitution):

**Transitions:** החלפה בין פורינים ובין פירימידינים (  $A \leftrightarrow G$   $C \leftrightarrow T$  ) נפוץ C→T באתרי CG.

**Transversions:** החלפה החלפה בין פורין לפירימידין ולהפך (  $A \leftrightarrow C$   $C \leftrightarrow G$  )

**SNP-Single Nucleotide Polymorphism:** פולימורפיות המתבטאת בשינוי של נוקליאוטיד אחד.

כל שני אנשים שונים זה מזה בכ-2 מיליון SNPs. ישנם כמה מצבים אפשריים:

- המוטציה באזור לא מקודד.
- המוטציה לא משנה את החומצה האמינית.
- המוטציה משנה את החומצה האמינית אך ללא שינוי ברור בפנוטיפ הפרט.

**Synonymous mutations:** מוטציות שלא משנות את החומצה האמינית המקודדת.

אבל גם הן יכולות לגרום לפנוטיפ לא תקין. יכולות להשפיע על: שעתוק, splicing, mRNA transport ותהליך התרגום.

### דוגמאות:

השפעה על קצב התרגום: שינוי הקודון לכזה שמוכר ע"י tRNA נדיר יכול להשפיע על קצב התרגום. האטה בקצב התרגום יכולה לגרום לכך שהחלבון יתקפל למבנה לא תקין וזה משפיע על תפקודו.

השפעה על מבנה ה-mRNA: נוצר שינוי במבנה השניוני של ה-mRNA שהופך אותו ליציב מידי ולא נגיש ע"י הריבוזום. ואז כתוצאה מכך יש רמה פחותה של החלבון.

השפעה על ה-splicing: ישנם אלמנטים בתוך האקסונים שמשפיעים על יעילות ה-splicing-

ESE-exonic splicing enhancer, ESS- exonic splicing silencer. שינוי ברצפים האלה יכול להשפיע על המנגנון, מה שישפיע בצורה מכרעת על המבנה או הכמות של התוצר החלבוני של הגן.

### מסקנות לגבי SNP:

- כאשר SNP גורם לשינוי סינונימי- לא ניתן להניח שבגלל שהחומצה האמינית לא משתנה, אין לשינוי הזה כל משמעות פונקציונאלית.
- גם כאשר ה-SNP גורם לשינוי חומצה אמינית- המנגנון לפתולוגיה איננו בהכרח דרך שינוי תפקוד החלבון בגלל החומצה האמינית השונה. ייתכן שהשינוי משפיע על ה-splicing.
- הרבה מהפולימורפיזמים שנמצאו ונראים "תמימים"- ייתכן שיש להם תוצאות פנוטיפיות משמעותיות שלא התגלו עדיין

### שיטות לזיהוי מוטציות נקודתיות:

(1 RFLP, 2 PCR) שאחריו חותכים את התוצרים באנזים ריסטריקציה.

השיטות אפשריות כאשר המוטציה משנה אתר ריסטריקציה. כאשר אין שינוי באתר ריסטריקציה, אפשר לרצף את ה-DNA כדי לזהות את המוטציה.

w.t. **CAG** - Glu (HbA)  
 mut. **GTC** - Val (HbS)  
 no phenotype **GCG** - Ala (HbA)

**Non-synonymous mutations**

**Missense**: קידוד לחומצה אמינית אחרת.

באנמיה חרמשית, יש שתי מוטציות, אחת שגורמת למחלה ואחת נוספת ללא פנוטיפ.

**Sense**: שינוי ה-stop codon האמיתי לחומצה אמינית. גורם לחלבון ארוך יותר "read through".

**Nonsense**: מוטציה שמשנה חומצה אמינית ל-stop codon. גורמת לחלבון קצר מידי. זו מוטציה שכמעט בוודאות גורמת לשינוי בפנוטיפ.

**Splicing mutations**

w.t. ....CCAGGCTCTGgttaaggT  
 Mut ....CCAGGCTCTGcttaaggT

בטאי-זקס, המוטציה בגן HexA היא באזור שחשוב לשחבור (הנוקליאוטיד הראשון באינטרון) וזה גורם לשעתוק לא תקין עקב דילוג על אתר splicing.

**מוטציות נוספות בקנה מידה קטן:**

חסרים או תוספות: בדרך-כלל משנים את מסגרת הקריאה או מוסיפים חומצה אמינית.

**דוגמא - סוג הדם O**: נוצר ע"י deletion של בסיס אחד, ששינה את מסגרת הקריאה.  
 "A allele" CTC-CTC-GTC-ACC-CCT-T....  
**Leu-Val-Val-Thr-Pro-**

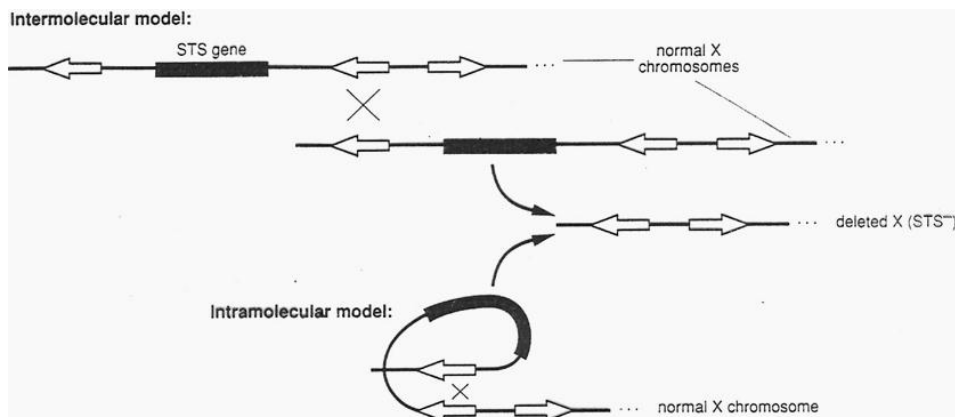
"O allele" CTC-CTC-GT -ACC-CCT-T....  
**Leu-Val-Val-Pro-Leu.....Stop** זה הביא לחוסר של חומצה אמינית אחת שהיא מאוד חשובה לתפקוד החלבון.  
**דוגמא-ציסטיק פיברוזיס**: נוצר ע"י deletion של 3 בסיסים. זה הביא לחוסר של חומצה אמינית אחת שהיא מאוד חשובה לתפקוד החלבון.

**דוגמא - טאי זקס**: מוטציה נוספת שגורמת למחלה, insertion של 4 בסיסים.  
 w.t. allele **CGT-ATA-TCC-TAT-GCC-CCT-GAC...**  
 mut. allele **GCT-ATA-TCT-ATC-CTA-TGC-CCC....TGA**

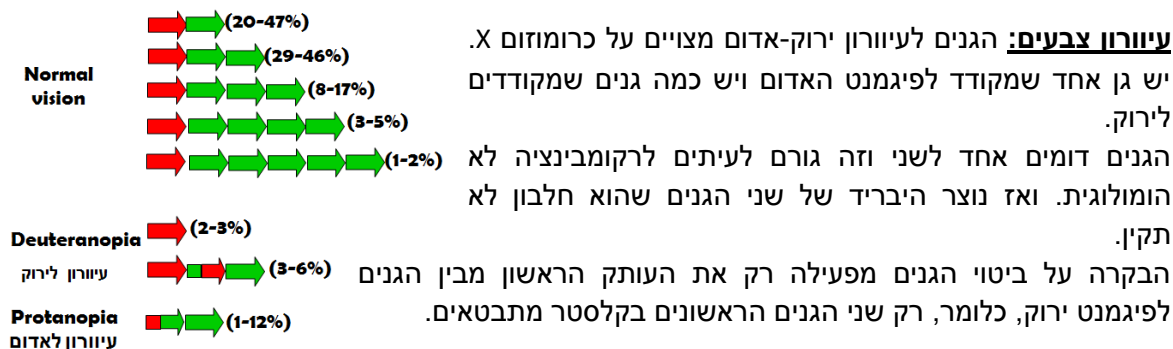
ייתכן גם דילוג של הפולימראז על בסיסים או הוספה של בסיסים תוך כדי השכפול - "slippage".

**מוטציות בקנה מידה גדול יותר:**

**Crossing over לא תקין**: יש אזורים בגנום שבגלל שמשני הצדדים ישנם רצפים חוזרים, בזמן המיזוג נעשה שחלוף למרות חוסר הומומולוגיה.  
**דוגמא**: באזור הפסאודו-אוטוזומלי ב-X שלא עובר אינאקטיבציה, קורית רקומבינציה לא הומומולוגית שגורמת לחסר של הגן: STS. זה גורם למחלה אצל גברים בלבד - העור נראה כמו קשקשים של דג. לא בטוחים באיזה מהמודלים התהליך קורה, אך העליון הוא המודל הסביר יותר:



**פסאודוגנים מבלבלים רקומבינציה**: גנים הרבה פעמים מצויים בקלסטרים ביחד עם פסאודוגנים וזה יכול לגרום לרקומבינציה לא הומומולוגית.  
 לא פונקציונאלי



**Copy Number Polymorphism (CNPs)/Copy Number Variants**

סוג של פולימורפיזם שהתגלה רק לאחרונה. יש חלקים שונים בגנום שחוזרים אצל אנשים במספר שונה. מדובר בסגמנטים גדולים בטווח של: 200bp-2Mb. CNP-ל ייתכנו שני אללים בלבד (קיום או חוסר של הסגמנט) או כמה אללים לפי מספר החזרות בו מופיע הסגמנט. גודל סגמנטים אלה קטן מידי לגילוי בשיטות ציטוגנטיות אך גדול מידי לגילוי ע"י שיטות של קביעת רצף.

**סיכום על גילוי התופעה מתוך מאמר:**

- We have generated an independently assembled diploid human genomic DNA sequence from both chromosomes of a single individual.
- The majority of genomic alternations are the well-studied class of variants based on single nucleotides (SNPs).
- Lesser-studied genomic variants, insertions and deletions, while comprising a minority (22%) of genomic variations events, actually account for 74% of variant nucleotides.
- Only 99.5% similarity exists between the two chromosomal copies of an individual.
- Genetic variation between two individuals is as much as **five times higher** than previously estimated.

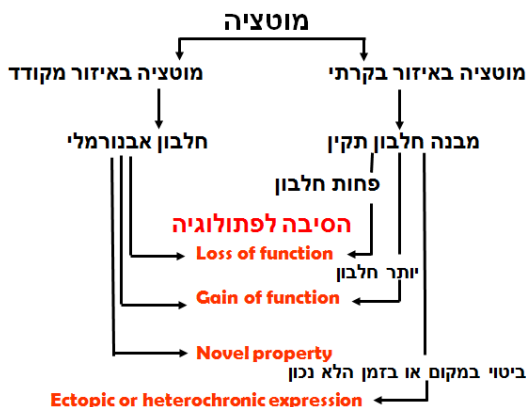
ישנן מחלות גנטיות רבות באדם הנגמרות בגלל CNVs. מספר עותקים תקין של גן חשוב לפעילותו התקינה. לא תמיד ברור באיזה מנגנון נגרמת הפתולוגיה.

**מיקום מוטציות פתוגניות:**

**מיקום:**

- איזור מקודד.
- איזורים משועתקים אך לא מתורגמים: 5' UTR, 3' UTR, consensus seq' for splicing.
- אזורי בקרה על שעתוק: Promoter, introns, LCR, enhancer.

**מגננים לפתולוגיה:**



## הסיבות לפתולוגיה:

### מוטציות Loss of function:

איבוד פונקציה היא התוצאה השכיחה ביותר של מוטציה. יכולה להיגרם ממוטציה באזור המקודד או באזור בקרה של הגן. יכולה להיגרם כתוצאה מחסרים או החדרות באזורים קריטיים.

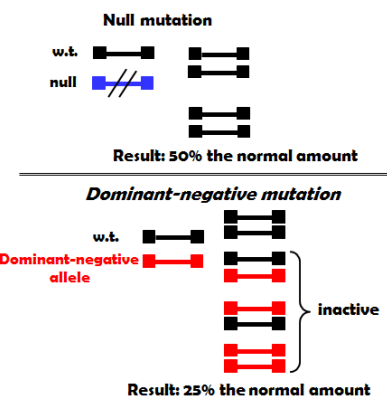
#### Null- איבוד פונקציה מלא:

1. אין תוצר חלבוני.  
2. החלבון לגמרי לא פעיל.  
הערה: כאשר הפוטיפ מתבטא רק במצב של איבוד פונקציה מלא או כמעט מלא, המחלה מורשת בהורשה רצסיבית.

#### Partial loss of function- איבוד פונקציה חלקי (haploinsufficiency):

כאשר איבוד של מחצית הכמות או הפונקציה של החלבון מלווה בפנוטיפ לא תקין. במקרים כאלה המחלה מורשת בהורשה דומיננטית כיוון שמספיק אלל אחד מוטנטי כדי שהמחלה תתבטא. זה קורה בחלבונים שצריך את הכמות המלאה שלהם.  
1. אינטראקציה בין תוצר הגן המוטנט לבין חלבונים אחרים. הסטויכיומטריה חשובה (כלומר, חשוב היחס הנכון בין ריכוז שני החלבונים שבאים באינטראקציה).  
2. שלב קובע מהירות (אנזימים קובעי מהירות שמחסור בהם יכול לפגוע בשרשרת ריאקציות).  
3. מסלול התפתחותי- חשוב שייוצר גרדיאנט של תוצר הגן לצורך התפתחות תקינה.

#### מוטציות Dominant-negative:



יצירת אלל לא פונקציונאלי שמפריע לאלל התקין בפעולתו. דוגמא: חלבון שיוצר דימר, ואז יכולים להיווצר דימרים של תקין+פגום. וישנו סיכוי של 25% בלבד ששני חלבונים תקינים ייצרו דימר. מצב זה פחות טוב ממצב של Null באחד האללים כי אז יש דימרים תקינים בכמות של 50%.

#### מוטציות Gain of function:

מוטציות יחסית נדירות.

1. עליה ברמת הפעילות של החלבון.

דוגמא: הרצפטור FGFR3 באקונדרופלסיה שפעיל גם בהעדר הליגנד.

2. עליה ברמת הביטוי של החלבון.

דוגמא: בתסמונת דאון יש עליה בחלבון בגלל עותק כרומוזומלי נוסף.

• ייתכנו גם מוטציות בפרומוטורים, או מוטציות שמייצבות RNA או חלבון.

#### מוטציות Novel property:

נדיר מאוד. שינוי בחומצה אמינית גורם לפתולוגיה בעקבות השראת פונקציה חדשה לחלבון. הפונקציה הנורמלית לא נפגעת בהכרח.

דוגמא: במחלה אנמיה חרמשית, המוטציה לא פוגעת ביכולת קשירת החמצן. התכונה החדשה: יצירת סיבים אבנורמליים המעוותים את הכדורים האדומים.

#### מוטציות ביטוי בזמן ומקום שגויים (heterochronic or ectopic expression):

כאשר הגן מבוטא במקום לא נכון או בזמן לא נכון. בעיקר קורה בהתפתחות של סרטן, עם אונקוגנים (גנים החיוניים לתפקוד תקין של התא).

## קורלציה בין הגנוטיפ לפנוטיפ:

במחלות מורשות רבות ישנה שונות בפנוטיפ הקליני (clinical heterogeneity). שונות זו נגרמת בגלל אחת הסיבות הבאות:

### 1. Allelic heterogeneity:

השונות הפנוטיפית נגרמת כתוצאה מקיום אללים רבים באותו הגן. האללים השונים יכולים להשפיע באופן הבא:

- (a) לאללים שונים תהיה שארית פונקציה (residual function) שונה.
- (b) אללים שונים ישפיעו על תת-פונקציות ספציפיות של החלבון לפי המיקום של המוטציה, למשל: מוטציות בדומיינים שונים בחלבון תשפיע על פעילותו באופן שונה.

### 2. Locus (genetic) heterogeneity:

לפעמים מוטציות בגנים שונים מובילות לפנוטיפים מאוד דומים (אותה המחלה). במבט מדוקדק ניתן פעמים רבות להבחין בפנוטיפ מעט שונה כתלות באתר שבו קיימת המוטציה.

### 3. השפעה של modifier genes:

שונות פנוטיפית קלינית יכולה להיגרם מאינטראקציה עם גורמים סביבתיים או בגלל אינטראקציה עם גנים אחרים בגנום הנקראים - modifier genes. גם כאשר יש את אותה המוטציה, ייתכנו אללים שונים של modifier genes. האינטראקציה על כן תהיה שונה בין שני הגנים, וכן הפנוטיפ הסופי.

## דוגמה - מוטציות בגן למחלה ציסטיק פיברוזיס:

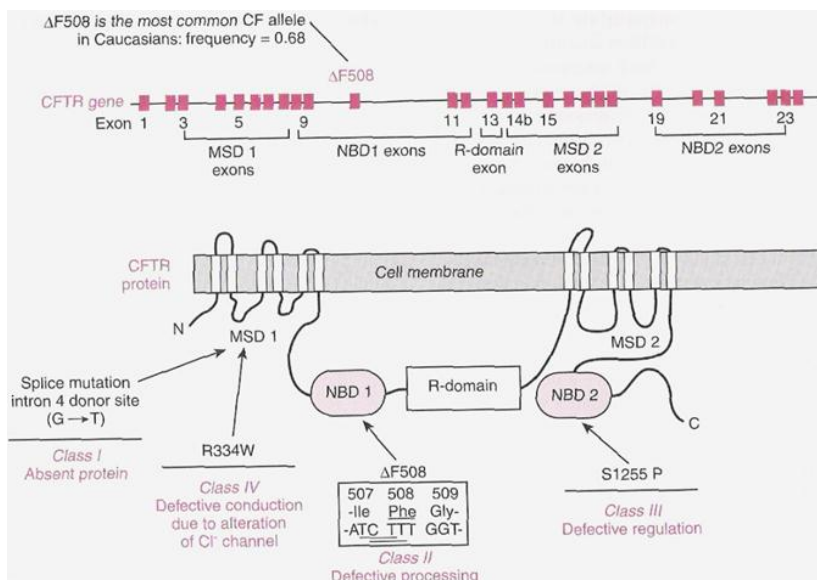
המחלה האוטוזומלית רצסיבית הנפוצה ביותר בקרב ילדים באוכלוסיה לבנת עור. שכיחות נשאים: 1:25. הגן למחלה מקודד לטרנספורט של כלור- CFTR. הוא מקודד לתעלת כלור הממוקמת בממברנה האפיקלית של תאים אפיתיליים. הבעיה: הפרעה במעבר יוני כלור. מערכות רבות בגוף נפגעות, בעיקר מערכת הנשימה, הלב, מערכת הרבייה בזכרים ודרכי העיכול התחתונות בילודים. יש הטרוגניות קלינית רבה. יש קורלציה מסויימת בין הגנוטיפ לפנוטיפ (אבל אין קורלציה ברורה וזה מקשה על הייעוץ הגנטי).

### הפתולוגיה:

- זיעה מאוד מלוחה.
- הפרשות סמיכות וזיהומים חוזרים בריאות הגורמים לחסימת דרכי הנשימה בריאה.
- במערכת העיכול יש חסרים של אנזימי עיכול המונעים עיכול תקין.
- המוות נגרם כתוצאה מכשל ריאתי וזיהומים.
- Meconium ileus - חסימת המעי התחתון ב-20%-10% מהילודים.
- CBAVD - חוסר פוריות בזכרים בגלל חוסר התפתחות ה-Vas Deferens.

### המנגנונים המשובשים:

- הפרעה ביצירת החלבון: נגרם מ-premature stop codons או ממוטציות הגורמות ל-RNA לא יציב.
- הפרעה בעיבוד החלבון: חלבון ה-CFTR הינו חלבון ממברנלי העובר גליקוליזה. מוטציות שגורמות לקיפול לא תקין משבשות פעמים רבות את המעבר ב-ER ובגולג'י. עם המוטציה: Δ508 החלבון אינו יכול לצאת מה-ER.
- הפרעה בבקרה על החלבון: מוטציות באזור ה-NBD וה-R domain.
- הפרעות במיקום החלבון בתא: למשל, כשהחלבון לא מצוי במיקום נכון על הממברנה. נגרם ממוטציות ב-MSDs (Membrane Spanning Domain).



### מתאם בין גנוטיפ לפנוטיפ:

- חולים שהומוזיגוטים למוטציה Δ508 או למוטציה null סובלים מ-PI, לבלב פגום.
- חולים בעלי מוטציות המותירות פעילות חלקית הינם PS, הבלב תקין ויש פגיעה בריאות.
- ישנם אללים "קלים" שרק גורמים ל-CBAVD (עקרות בזכרים).
- אין קורלציה ברורה בין גנוטיפ מסויים ומידת ההפרעה הריאתית, כנראה שיש modifier genes.
- דיווח ראשון על modifier gene לפנוטיפ הריאתי: TGFβ1. שני ווריאנטים של גן זה נמצאים באסוציאציה עם חומרה רבה יותר של הפנוטיפ הריאתי.

### Genetic compound: פרט הנושא שתי מוטציות שונות בגן מסויים.

- דוגמא: יכולות להיות מוטציות שונות באינטרון שלפני אקסון 9 בגן CFTR.
- אלל 5T גורם להפרעה ל-splicing, ולכן חלק מה-mRNA יהיו תקינים וחלק לא (ללא אקסון 9).
- המוטציה היא בעלת חדירות חלקית ונפוצה מאוד בקרב גברים עם CBAVD.
- החלפה של R ל-H במיקום 117 בחלבון, מוטציה קלה יחסית.

### קומבינציות של מוטציות שונות והפנוטיפ הנלווה:

$\Delta 508 + \Delta 508 \rightarrow \text{severe CF}$

$\Delta 508 + R117H \rightarrow \text{CBAVD or mild CF}$

$5T + \text{another mutation} \rightarrow \text{mild CF}$

### דוגמא - מוטציות בגן ל-PRP (Prion Related Protein):

איתה מוטציה בגן גורמת לשתי מחלות שונות לגמרי.

1. מחלת קרויצפלד יעקב (JCD): מופיע בבגרות, ניוון עצבים, אובדן זיכרון, דמנציה, התקפים אפילפטיים, מוות.
2. מחלת חוסר שינה (FFI): דגנרציה של נורונים בטלמוס, מופיע בעשור החמישי, התקפי חוסר שינה, Muscle twitches, הולוצינציות, קומה, מוות.

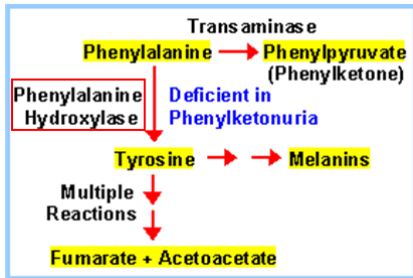
בשתי המחלות המוטציה היא בקודון 178: CAG→AAC.

Met 129	178*	FFI
Val 129	178*	JCD

ההבדל בהשפעת המוטציה נובע מ-SNP אחר (שלבדו לא גורם למוטציה) במיקום 129. כאשר זה מתוונן, התקבל FFI וכאשר זה ואלין, התקבל JCD. נגמרות מחלות שונות עקב קיפול שונה של החלבון בעקבות המוטציה.

## טעויות מולדות במטבוליזם

- 1901 - Sir Archibald Garrod מציג לראשונה את המונח "טעויות מולדות במטבוליזם". המחלה הראשונה שבה מזוהה פגם כזה: Alkaptonuria ובה יש הצטברות של homogentisic acid. במחלות מסוג זה הגוף איננו יכול לצבע תהליך כימי חיוני.
- הרוב המכריע מורש באופן רצסיבי-באופן תקין האנזימים קיימים בתא בעודף ולכן אלל תקין בהטרוזיגוטים הוא דומיננטי- מביא לתיקון המחלה.
  - כאשר הגן לאנזים ממוקם על כרומוזום X יופיע הפנוטיפי כמעט אך ורק בזכרים.



### Phenylketonuria (PKU)

פנילאלאנין היא חומצה אמינית הכרחית- חייבים לקבל אותה בדיאטה. בדרך-כלל המוטציה היא באנזים: Phenylalanine hydroxylase שאחראי למעבר  $Phe \rightarrow Tyr$ . וכאשר יש פגם באנזים אז מצטבר בתא phenylpyruvate.

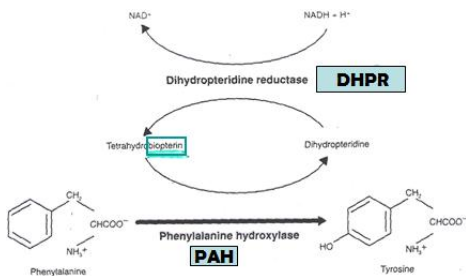
### הפנוטיפ:

- ריח טחוב בגלל הצטברות החומצה הפניל-פירובית.
- צבע השיעור והעור בהיר לעומת האחים- בגלל הפרעה ביצירת מלנין.
- הפרעות נוירולוגיות- פיגור שכלי, התכווצויות, רפלקסים מוגברים.

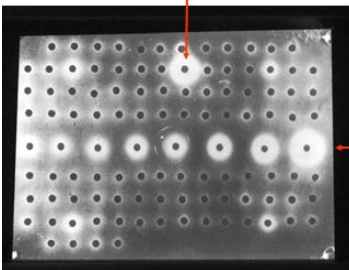
### הסיבות להפרעות הנירולוגיות:

- חומצה פניל-פירובית רעילה לתאי המוח.
- עודף פנילאלאנין שולח איתות למוח של עודף חומצות אמינו, מה שמפחית יצירת חומצות אמינו אחרות.
- טירוזין הוא פרקורסור לנוירו-טרנסמיטורים כמו דופאמין.

### Genetic heterogeneity: מוטציות בשני גנים שונים שגורמות לאותה המחלה.



### דיסקית מחולה ב-PKU



דיסקיות ביקורת שמכילות כמויות עולות של פנילאלאנין מאפשר גידול חיידקים

- מוטציה נוספת שגורמת ל-PKU: מוטציה בגן ל-DHPR או בסנתזה של biopterin.
- DHPR מחזר Dihydropteridine  $\rightarrow$  Tetrahydropterin ותוצר זה הינו קופקטור הכרחי להידרוקסילציה של פנילאלאנין והפיכתו לטירוזין.
- גלוי החולים בקרב ילודים: newborn screening את המחלה ניתן למנוע רק אם מגלים את החולים מייד עם היוולדם.

### Guthrie test

- מייד לאחר הלידה מספיגים ניטר פילטר עם דם שנלקח מעקב היילוד.
- דיסקית קטנה ספוגה בדם מונחת עם צלחת אגר המכילה אנלוג של פנילאלאנין המעכב גידול חיידקים. דיסקיות ביקורת שמכילות כמויות עולות של פנילאלאנין מאפשר גידול חיידקים.
- זורעים על הצלחת מרבד חיידקים.
- במקום שבו יש פנילאלאנין על הצלחת ישנה תחרות עם האנלוג הרעיל לחיידקים. ואם יש פנילאלאנין בכמות גבוהה מספיק- החיידקים יגדלו.
- לפרט שבדיסקית שלו יש מעל 20mg/dL פנילאלאנין- מתחילים בטיפול דיאטטי.

כל תינוק שנולד עובר את הבדיקה הזאת.

הטיפול הדיאטטי למניעת הפנוטיפ: ברחם התינוקות לא חולים כי האמא מספקת להם את האנזים התקין. כמה ימים לאחר הלידה הפנוטיפ מתחיל להופיע. דיאטת חסרת פנילאלאנין תמנע את הופעת

סימני המחלה. מטרת הדיאטה: רמת הפנילאנין בדם לא תעלה על: 7mg/dL. חומצות האמינו החיוניות, מלבד פנילאנין- ניתנות בדיאטה. האוכל דל בחלבון.

ישנו ויכוח לגבי עד איזה גיל יש להמשיך בדיאטה:

(1 עד גיל 6 כאשר המוח מפסקי להתפתח 2) עד אחרי גיל ההתבגרות.

### נשים הומוזיגוטיות ל-PKU שילדות ילדים הטרוזיגוטיים (נשאים) למוטציה:

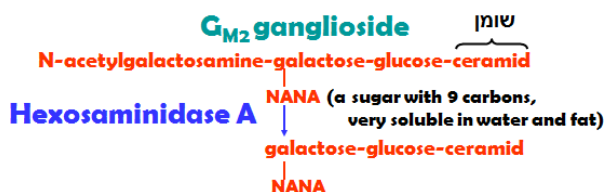
**הפרדוקס:** נשים הומוזיגוטיות למוטציה של PKU ששמרו על דיאטה והפנוטיפ שתהן תקין, יכולות ללדת ילד שהינו "רק" נשא אך מציג פנוטיפ חמור של חולה PKU. במידה ונשים אלה לא שומרות על דיאטה בזמן ההריון, יש הצטברות של החומרים הרעילים שכבר אינם משפיעים על האישה עצמה (שכבר סיימה להתפתח) אלא על התפתחות העובר, והוא ייחשף לאורך כל ההריון לכמויות עצומות של פנילאנין.

**התוצאה:** משקל לידה נמוך, הפרעות בהתפתחות הלב, התפתחות מוחית ירודה. הערה: בנוסף לכך, כן מצאו הבדלים (גם ללא קשר להריון) בין אנשים שהמשיכו עם הדיאטה לכל החיים, ואלה שלא ולכן מומלץ להמשיך איתה גם אחרי גיל ההתבגרות.

### Tay-Sachs Disease (TSD)

מחלה שאין לה טיפול, ולכן מתרכזים באיתור נשאים ולא באיתור ילודים חולים. כאשר זה מתגלה בטרימסטר הראשון של ההריון אז עושים הפסקת הריון.

**דוגמא למחלת אגירה ליזוזומלית.** ההפרעה היא עקב הצטברות סובסטראט שאיננו מתפרק בגלל העדר אנזים. הסובסטראט הינו:  $G_{M2}$  ganglioside. שהוא ממשפחת הספינגוליפידים- גליקוליפיד.



### הגנגליוזידים:

- נמצאים בכל התאים על-פני הממברנות, אך ברמה הגבוהה ביותר מתבטאים בתאי המוח.
- מתרכזים בעיקר בדנדריטים ובקצות האקסונים.
- מתפקדים ברצפטורים להורמונים גליקו-פרוטאינים.
- מעורבים בהתמיינות תאים וקשרים בין-תאיים.
- נוצרים ומתפרקים במחזוריות. הפירוק שלהם מתרחש בליזוזום.
- כאשר אין Hexosaminidase A- הגנגליוזיד מצטבר בליזוזומים.
- ייתכן שהפתולוגיה נגרמת מתוצרי לוואי רעילים של  $G_{M2}$  ganglioside.
- הנירון מפסיק לתפקד.

### מוטציות נוספות שגורמות לאותו פנוטיפ:



לאנזים Hexosaminidase A יש שתי יחידות  $\alpha$  ושתי יחידות  $\beta$ , כך ש- $\alpha$  מכרומוזום 15 ו- $\beta$  מכרומוזום 5 ועובד עם אקטיבטור שגם הוא מכרומוזום 5.

ישנם שמות שונים למחלה בהתאם לגן נושא המוטציות:

TSD: מוטציה בגן לתת-יחידה  $\alpha$ .

Sandoff disease: מוטציה בגן לתת-יחידה  $\beta$ .

Activator deficiency disease: מוטציה בגן לאקטיבטור.

### הפנוטיפ:

- התפתחות תקינה עד גיל 3-6 חודשים.
- סימנים ראשונים- אובדן "אבני דרך" בהתפתחות (שוכחים דברים שכבר למדו לעשות).
- Cherry red spot ברטינה בעין (כתם אדום של נירונים).
- התדרדרות נירולוגית הדרגתית.
- בסוף המחלה הילד משותק, עיוור, חירש ומפגר.
- מוות בגיל 2-3 שנים.



**שכיחות המחלה באוכלוסיה היהודית אשכנזית:** ברוב אוכלוסיות העולם המוטציות בגנים ל-TSD נדירות ביותר. המוטציות הן בשלושת הגנים, במקומות שונים בגנים. באוכלוסיה האשכנזית תדירות הנשאים היא: 1/27 (של מוטציה בתת-יחידה α), גבוהה פי-10 לעומת שאר האוכלוסיות. כנראה שרוב האוכלוסייה האשכנזית התפתחה ממספר מועט של פרטים שכנראה נשאו כמה מוטציות כאלה.

**אבחון נשאים:** הבדיקה המקובלת הייתה בדיקה אנזימטית על סרום הנבדק עם סובסטרט הלאכותי. היום יש התלבטויות בישראל אם לעבור לבדיקה מולקולארית.

**Pseudodeficiency in testing TSD:** ישנם שני אללים של הגן Hexosaminidase A שאינם יכולים לפרק את הסובסטרט המלאכותי שנעשה בו שימוש במבחן הסריקה, אך כן יכולים לפרק את הסובסטרט הטבעי. קיומם של אללים אלה מסבך את האבחון הגנטי.

### G6PD-deficiency

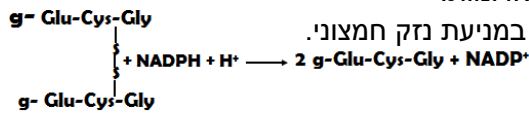
מחלה מטבולית המורשת בתאחיזה ל-X. ב-1926 פותחה תרופה חדשה למלריה: pamaquine. בקרב מספר קטן של נוטלי התרופה התגלו סיבוכים לא צפויים- המוליזה של הדם (פירוק של כדוריות הדם). אצל אותם אנשים גם קיימת רגישות לפול, לאנטיביוטיקות ממשפחת הסולפה ולנפטלין. הפגם שהתגלה אצלם: חסר באנזים G6PD.

**G6PD:** אנזים שמקטלז את השלב הראשון מתוך 3 שלבים ליצירת NADPH לחיזור רדיקלים חופשיים בתא.



### תפקיד ה-NADPH בכדוריות הדם האדומות:

- חיזור הקשר הדיסולפידי של גלוטטיון למצבו המחוזר.
- גלוטטיון פועל כאנטי-אוקסידנט ע"י חיזור קשרים די-סולפידיים שנוצרים במצבי עקה חמצוני בחלבונים תאיים שונים, בעיקר בכדוריות הדם האדומות.
- גלוטטיון גם מייצב את האנזים קאטאלאז שפעיל במניעת נזק חמצוני.



זוהי דוגמה לתגובתיות לתרופה בעלת בסיס גנטי. **יתרון להטרוזיגוטים ל-G6PD:** עמידות למלריה- פרזיט המלריה גדל טוב רק בתאים עם רמה גבוהה של G6PD.

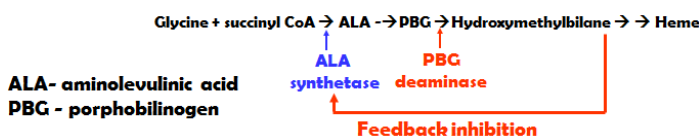
### Acute Itermittent Pophyria

דוגמה יוצאת דופן למחלה מטבולית שמורשת בהורשה **דומיננטית**. נגרמת מ-haploinsufficiency (כמות קטנה מידי עקב אלל פגום אחד).

**הפנוטיפ- מתבטא רק עקב השפעה סביבתית:** בעקבות נטילת תרופות מסויימת כגון הורמונים סטרואידים, דיאטות מסויימות, שתיית אלכוהול, חשיפה לממסים אורגניים, מתח נפשי וזיהומים. פעמים רבות לא יודעים מה הגורם לפריצת המחלה.

### ההפרעה הביוכימית:

הגורמים השונים מעלים את יצירת cytochrome P450 (נחוץ לסילוק רעלים) שגם כולל קבוצת heme. ההפרעה היא במסלול יצירת הפורפירין שהינו מרכיב של ה-heme. ואז הציטוכרום לא נוצר. המוטהציה היא בגן לאנזים BPG deaminase. בעקבות הירידה של ה-heme בכבד יש הפעלה של



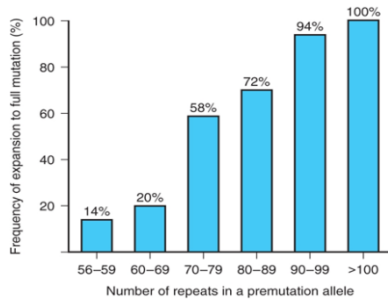
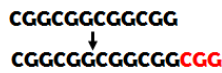
ליצירה נוספת של Heme. אבל הכמות הנמוכה של BPG deaminase אינה מאפשרת יצירה מספקת של heme. הצטברות ALA ו-BPG היא זו שגורמת למחלה הקלינית.

**הפנוטיפ:** הפרעות נירולוגיות שונות, כולל התקפות אפליסיה, כאבים בכל הגוף, דמנציה ופסיכוזיס. לשתן יש צבע של יין בגלל הפרשת פורפירין.

## מוטציות דינמיות ומחלות גנטיות

**מוטציה דינמית:** מוטציה שמתבטאת בהרחבה של trinucleotides repeats. רוב החזרות האלה בגנום אינן קשורות למחלות אך ישנה קבוצה קטנה של חזרות בגנום שהן אינן יציבות, וכשמספר החזרות גדל נגרמות מחלות. הערה: ישנן גם מחלות שנגרמות מהרחבה של חזרת 4 או 5 נוקליאוטידים, אך הרוב עקב הרחבה של חזרת 3 נוקליאוטידים.

**STR:** Simple Tandem Repeat.  
**TNR:** Trinucleotide Repeat.



### אפיונים של מוטציה דינמית:

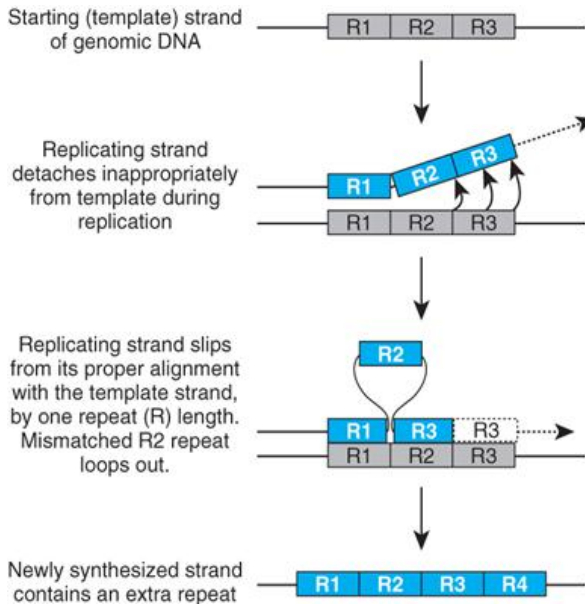
1. לתוצר המוטציה הדינמית יש סיכוי שונה לעבור מוטציה דינמית נוספת לעומת הרצף המקורי. ככל שמספר החזרות יותר גדול, הסיכוי למוטציה עולה.

2. הסבירות למוטציה דינמית של רצף חוזר פשוט היא פונקציה של מספר החזרות **המושלמות:**

**יצוב פחות** CGG CGG CGG CGG CGG CGG

**יצוב יותר** CGG CGG CGG CGG **AGG** CGG

3. המעבר ממספר חזרות בלתי מזיק למספר חזרות בלתי יציב לחלוטין- הגורם למחלה, הינו **הדרגתי** ולא אירוע פתאומי, מספר הרצפים החוזרים עולה בהדרגה.



לא ידוע עדיין מהו המנגנון שבו קורות ההרחבות. ייתכן שזה קורה עקב בלבול ב-DNA polymerase. אך זו רק השערה.



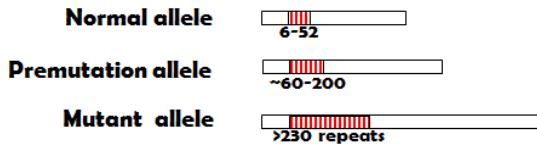
### תסמונת ה-X השביר (Fragile X syndrome):

**סינדרום גנטי:** פיגור שכלי (הנפוץ ביותר מבין המורשים), אוטיזם, פנים מאורכות, לסת תחתונה גדולה, אשכים גדולים, גמישות יתר בפרקים.

**שכיחות:** 1/1500 בזכרים. 1/3000 בנקבות (פנוטיפ קל יותר בדרך-כלל).

**סמן ציטוגנטי:** אזור שביר (fragile site) בכרומוזום X.

**הגן המוטנט במחלה: FMR-1 הממוקם על כרומוזום X באזור השביר.**

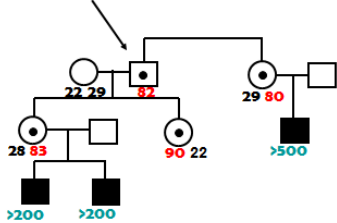


בגן הייתה התארכות באזור ה-UTR של 5' של הרצף החוזר: CGG. כשישן מעל 230 חזרות אז כל רצפי ה-CG עוברים מתילציה- גם בפרומוטור וגם בגן עצמו ואז הגן עובר השתקה-מוטצית Null.

אין קשר בין כמות ה-X-ים הפגועים לחומרת המחלה, החזרות נמצאות בחלק שלא מתורגם.

**ההרחבות מתבצעות במעבר בין דורות:**

**Normal transmitting male !!**



ההרחבה מתרחשת רק במעבר דרך נקבה, לא ידוע למה. ייתכן כי בין הדורות תהיה קפיצה קטנה מאוד או קפיצה גדולה מאוד. הקפיצה היא לא יציבה ומתקבל מגוון רב של מספר חזרות, בעיקר בכאלה הגורמות למחלה.

**תפקיד החלבון המושקע:**

הוא עובר אינטראקציה עם 4% מכלל ה-RNA. העוברי במוח, וזה יכול להסביר את הפגיעה באיברים רבים כל-כך.

תפקידו כנראה קשור להוצאת mRNA מהגרעין החוצה, כחלק ממערכת התרגום.

הוא מתבטא גם סמוך ללידה במוח, באשכים וברחם.

הערה: תועד חולה אחד בעל מוטציה נקודתית בגן, באזור המקודד לאתר קישור ה-RNA.

**הפלוטיפים "מועדים להרחבה":**

כשיש יותר מ-24 חזרות בצורת רצפות בקצה ה-UTR 3', יש סיכוי מאוד גבוה להרחבה. מעל 35 חזרות- חוסר יציבות רבה. מעל 70 חזרות- hyper-expansion.

לפעמים יש אנשים ולהם יש AGG ואחריו 24 CGG, כאשר ה-A מונע הרחבות. וכאלה שאין להם את ה-A, נוצר אצלך מקטע בעל 35 חזרות ומעלה ואז כן קורית הרחבה.



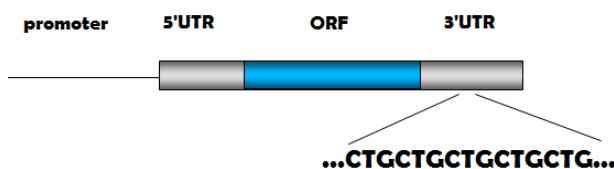
**Fragile X Tremor/Ataxia Syndrom (FXTAS)**

**פנוטיפ (לזכר):** רעד (tremor), ירידה קוגניטיבית, אימפוטנציה. יותר נדיר אצל נשים.

רמות ה-RNA היו גבוהות פי 2-4 מהרגיל. הסבר אפשרי: gain of function. ייתכן שקיום מולקולות RNA עם מספר רצפים גבוה של CGG גורם לתפקוד לא תקין.

**Myotonic Dystrophy**

**פנוטיפ הסינדרום:** מיטוניה- הפרעת שרירים, ניוון של מספר שרירים, פנים חסרות הבעה, קטרקטים, פדחת, אשכים קטנים.



**הגן המוטנט:** מקודד ל-Myotonin-serine--threonine kinase.

קורית הרחבה של TNR, של הרצף: CTG המצוי ב-UTR 3' על כרומוזום 19.

המחלה היא אוטוזומלית דומיננטית.

חושבים שהמחלה משבשת את השחבור החליפי.

**חומרת המחלה במתאם ישיר עם אורך ה-TNR:**

Normal	5-30
mildly affected	50-80
severely affected	>2000

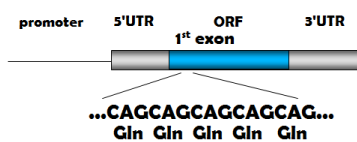
גם כאן לשלב הביניים יש פנוטיפ דומה למחלה אבל קל יותר. **Anticipation:** החומרה של המחלה עולה בדורות הבאים עקב התרחבות הרצף, והמחלה גם מתרחשת בגיל צעיר יותר.

## Polyglutamine disorders: CAG expansions

מחלות עם חזרות של CAG המקודד לגלוטמין, אשר מופיעות באזור המקודד. תמיד מדובר על חריגה לא מאוד גדולה ממספר החזרות הנורמלי, כי זה מתבטא ישירות בחלבון. קבוצה זו של מחלות הרחבה קיימת רק אצל בני-אדם ואפילו לא בבעלי-חיים הקרובים ביותר אלינו.

### Huntington's disease

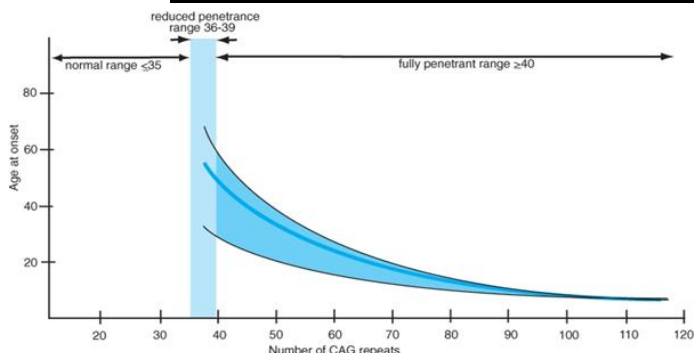
**הפנוטיפ:** מחלה נוירו-דגנרטיבית, דמנציה פרוגרסיבית, תנועות שרירים בלתי מבוקרות, שינויים באישיות. המחלה מתחילה בסוף העשור הרביעי לחיים או בתחילת העשור החמישי (לאחר שכבר מעמידים צאצאים).



<b>Normal</b>	<b>9-35 (18-19)</b>
<b>affected (partial penetrance)</b>	<b>36-39</b>
<b>affected (full penetrance), late onset</b>	<b>40-60</b>
<b>affected (full penetrance), early onset</b>	<b>60-121</b>

יש קורלציה בין מספר החזרות לגיל הופעת המחלה.

### רוב ההרחבות מתרחשות במעבר דרך זכרים:



### Spinobulbar Muscular Disease (Kennedy's disease)

**הפנוטיפ:** חולשת שרירים המתחילה בבגרות, ניוון הניורונים המוטורים, ליקויים בפוריות. **הגן המוטנט:** מצוי בתאחיזה ל-X: Androgen receptor gene. בתהליך ההתפתחות המינית של העובר הוא זה שקושר סטטוסטרון וגורם להתפתחות כזכר. הורשה רצסיבית. במחלה זו מתקבל חלבון שונה אך לא ידוע האם זה Gain of function או New function.

**Clinical heterogeneity:** שתי מוטציות שונות באותו הגן מביאות לשני פנוטיפים שונים: **Loss of function:** מתקבלת המחלה Testicular Feminization, אברי המין לא מתפתחים בצורה תקינה ורק חיצונית הם נראים תקינים, מחלה בה מקבלים גבר שחיצונית נראה כמו אישה (לדוגמא: השחקנית ג'ימי לי קרטיס).

### מדוע הרחבת הפוליגלוטמין גורמת לפתולוגיה:

כנראה לא בגלל איבוד פונקציה: עותק אחד בלבד של הגן למחלת הנטינגטון לא גורם למחלה. וידוע שב-Kennedy's disease איבוד פונקציה גורם למחלה אחרת לגמרי. **המסקנה:** המוטציה גורמת ל-gain of function או ל-novel property.

### ידוע כי:

- הרחבה של חזרות CAG גורמת בחלבון ליצירת אגרגטים ושקיעה בגרעינים של נוירונים.
- לאגרגטים יש כנראה פעילות טוקסית שבהדרגה הורגת את התאים (תאי העצב).
- בכל מחת CAG expansion שונה- החלבון המוטנטי מזיק לתת-אוקלוסיה אחרת של נוירונים.
- בנוסף- נוצרים בגרעינים nuclear inclusion bodies שמכילים חלבונים שונים וגם את החלבון בעלי רצפי הגלוטמין המורחבים. לא ברור אם לגופיפים אלה יש השפעה טוקסית: החלבון נמצא פתולוגי גם כשאיננו ממוקם בגרעין (כאשר הוא ממוקם בציטופלסמה למשל).
- ייתכן של-polyglutamine track ללא הקונטקסט החלבוני יש תכונות רעילות.
- רוב המחקר מתמקד במודלים בעכבר (שבאופן טבעי אין להם כלל מחלות כאלה).

## מחלות יוצאת דופן מבין מחלות ההרחבות:

### Friedrich's Ataxia:

מחלה נירוביולוגית אשר מורשת אוטוזומלית רצסיבית.  
**הפנוטיפ:** ניוון איטי של חלקים מהמוח כולל הצרבלום וגזע המוח. גם עצבים בחוט השדרה ועצבים פריפריים עוברים ניוון. הסימפטומים מופיעים בגיל 5-15. המחלה מביאה למוות בעשור השלישי. תדירות המחלה: 1:22,000.

**אין anticipation:** המחלה לא עוברת הרבה מדור לדור כי החולים בד"כ לא מספיקים להביא צאצאים.

**הגן המוטנטי:** ממוקם על כרומוזום 9 ונקרא: Frataxin. הרצף המורחב: GAA, והוא נמצא באינטרון של הגן (בניגוד לשאר המחלות). הסיבה למחלה היא פגיעה במנגנון ה-splicing אשר גורמת ל-Loss of function.

**מספר חזרות באלל נורמלי:** 10-21.

**מספר חזרות באלל מוטנטי:** 200-900.

### Myotonic Dystrophy 2:

מצאו שישנו גן נוסף שאחראי לקבלת המחלה Myotonic Dystrophy מלבד הגן ל-Myotonin (הרחבת חזרת CTG ב-3' UTR).

**ההפתעה:** נמצאה הרחבה של tetranucleotide repeat של CCTG באינטרון הראשון בגן-ZNF9 שנמצא על כרומוזום 3. ההרחבה יכולה להגיע ל-144kb.

**מנגנון הפתולוגיה:** ה-RNA בעל החזרה המורחבת איננו מתורגם. כנראה של-RNA זה יש פעילות חדשה (novel property) שמשבשת פונקציות תאיות שונות, כולל פגיעה ב-alternative splicing של גנים שונים. ייתכן שה-RNA קושר אליו כל-מיני פקטורים שצריכים לפעול במקומות אחרים בתא ובכך הוא מפריע לפעילותם התקינה.

**אופן ההורשה:** אוטוזומלי דומיננטי.

### Spinocerebellar Ataxia (SCA) 10:

ישנן מספר מחלות כאלה הנגרמות ממוטיציות בגנים שונים, חלקן נגרמות מהרחבה של TNR. SCA10 נגרם מהרחבה של רצף חוזר של 5 בסיסים: ATTCT.

**אופן ההורשה:** אוטוזומלי דומיננטי.

הרצף נמצא באינטרון התשיעי של הגן.

**מספר חזרות באלל נורמלי:** 10-20.

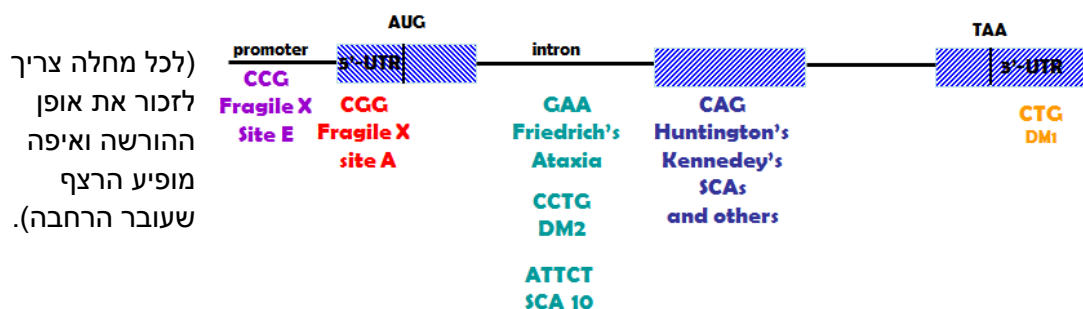
**מספר חזרות באלל מוטנטי:** עד 4500 חזרות.

ככל שההרחבה גדולה יותר- המחלה מתחילה בגיל צעיר יותר. ההרחבה מתרחשת בעיקר במעבר דרך האב. כאשר המוטציה עוברת דרך האם היא כמעט ולא משתנה. יש anticipation- מספר החזרות גדל מדור לדור והמחלה נהייתה יותר ויותר חמורה.

**הגן המוטנטי:** גן שמתבטא במוח ופעילותו לא ידועה.

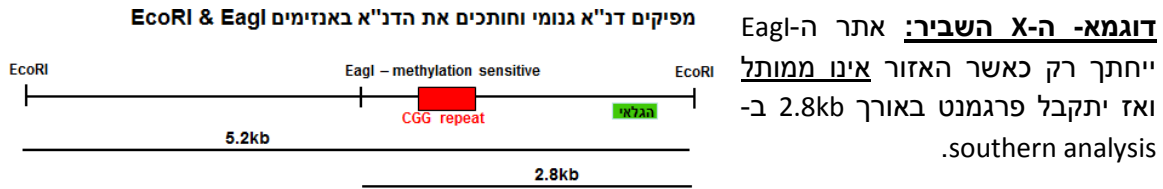
**הפנוטיפ:** אטקסיה ואפליפסיה.

## סיכום מחלות הרחבת microsatellites: סוג הרצף ומיקומו בגן:

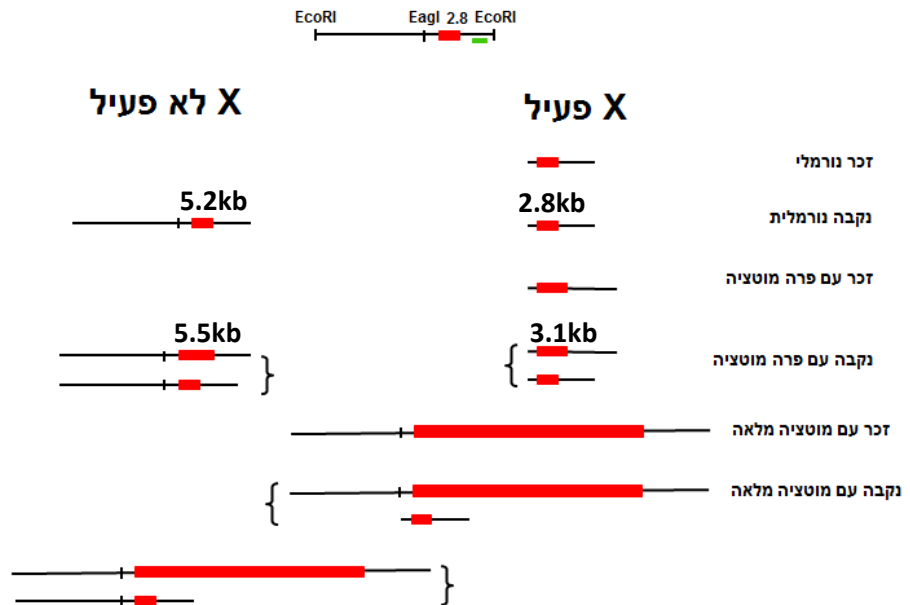


## אבחון מולקולרי של הרחבת TNR:

- במחלות שבהן ההרחבה היא קצרה ניתן לעשות PCR לגילוי ההרחבה.
- ניתן לבצע RFLP, ולחתוך עם אנזים ריסטריקציה שלא מושפע ממתילציה של ה-DNA, למשל: EcoRI ועם אנזים נוסף שכן רגיש למתילציה.



- חשוב לזכור:** בנקבה יש שני כרומוזומי X שאחד מהם אינו פעיל וממותל באופן נורמלי בלי קשור למחלת ה-X השביר.
- בנקבה נורמלית:** מתקבלים פס אחד בגודל 2.8kb שמקורו ב-X הפעיל ואחד בגודל 5.2kb מהכרומוזום שאינו פעיל.
- בזכר נורמלי:** יש כרומוזום X יחיד שהוא תמיד פעיל ולכן ללא ממותל, ויתקבל פס בגודל 2.8kb.
- גדלי הפרגמנטים לפי זכר/נקבה וחומרת המוטציה:**



- אצל נקבה לפעמים הפרה-מוטציה על הכרומוזום הפעיל: הרחבה של 2.8kb ל-3.1kb, ולפעמים על הכרומוזום הלא פעיל, הרחבה של 5.2kb ל-5.5kb.
- הערה:** לכל אישה שיש לה מוטציה מלאה יהיו אללים נורמלים בשני הגדלים של ה-WT, גם 2.8kb וגם 5.2kb כי כל פעם מושתק באופן רנדומלי כרומוזום X אחר (ולכן ה-X התקין יהיה לפעמים פעיל ולפעמים מושתק).

## שיבוט גנים

ב-1986 שובט בפעם הראשונה גן למחלה, ללא כל ידיעה מוקדמת על מהות החלבון הפגוע. עד 1995 שובטו 42 גנים בלבד. אחר-כך הטכנולוגיות השתכללו וגנים שובטו מהר יותר. מרבית המחלות הגנטיות, עדיין לא ידוע מהו הגן שגורם להן.

### אסטרטגיות לשיבוט גן למחלה:

**Functional cloning:** שיבוט על בסיס מידע הקיים אודות הפגם הביוכימי, ללא כל התייחסות למיקום הכרומוזומאלי של הגן.

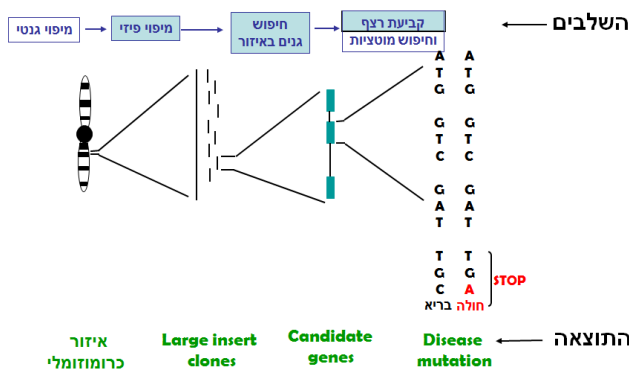
**Positional cloning:** שיבוט גן על סמך זיהוי המיקום הכרומוזומלי שלו, ללא כל ידיעה מוקדמת על החלבון הפגוע במחלה.

**Candidate gene approach:** איחוד של שתי הגישות הראשונות. מערב מיפוי ראשוני גס, ואחר-כך בדיקת גנים מועמדים מהאזור (לאחר שגמרו את המיפוי של הגנום, ידעו איזה גנים קיימים באזור).

**Deep sequencing:** שיטות חדשות מאוד שמתבססות על ריצוף של כלל הגנום או של האקסונים בלבד.

### Positional cloning

#### בעבר:



פעם היה צריך לשבט לבד את האזור הרצוי ב-DNA, שאותו רוצים לחקור. תחילה עושים מיפוי פיזי ע"י חתיכת DNA עם חפיפה קלה המכסה את כל האזור ושם מחפשים את הגן. קובעים רצף של כל גן חשוד גם בבריאים וגם בחולים. אם מתקבלת מוטציה בחולים בלבד, זהו הגן המבוקש. שנים רבות נעשה שימוש בשיטה זו למציאת גנים למחלות מנדליות ובהן יש גן אחד מרכזי שגורם למחלה.

#### היום:

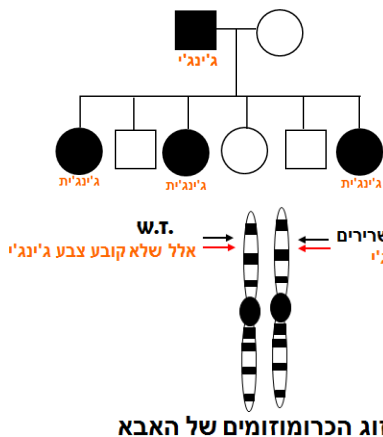
נחסכים שני השלבים הראשונים כי כבר נעשה מיפוי הגנום וכבר ידועים כל הגנים באזור מסויים.

#### איך מוצאים את המיקום הפיזי של הגן?

- הפרעות כרומוזומליות- ניתן לראות אותן בתמונת קריטיפ ואז מתרכזים רק במקום ההפרעה.
- Loss of heterozygosity - בצורה מולקולרית מגלים שיש חוסר הטרזיגוטיות במקטע מסויים. עוזר בעיקר למיפוי של tumor suppressors.
- קביעת תאחיזה (linkage analysis): תאחיזה בין הגן למרקר פולימורפי.

#### מיפוי גנטי ע"י אנליזת תאחיזה:

במחלה הבאה ישנם חולים במחלת ניוון שרירים המורשת בהורשה אוטוזומלית דומיננטית. בנוסף, חלק מבני המשפחה הם ג'ינג'ים- **תאחיזה בין שתי תכונות**. במשפחות נוספות על חולים במחלה זו נמצאה תכונת צבע השיער הג'ינג'י אצל החולים בלבד או אצל הבריאים בלבד.



**מסקנה:** הגן למחלה מצוי בתאחיזה לגן המקנה צבע שיער ג'ינג'י. אם ידוע היכן ממוקם הגן לצבע השיער- אז ניתן להסיק מכך איפה ממוקם הגן למחלה.

←לכל ילד ג'ינג'י נוסף שייולד למשפחה זו יש סיכוי גבוה לחלות במחלת ניוון שרירים.

זוג הכרומוזומים של האבא

**תאחיזה עם רצפים פולימורפיים:**

במשפחה שבה אין תכונה פנוטיפית בולטת שנמצאת בתאחיזה נעזרים במרקרים פולימורפיים בגנום, למשל: CA repeats שיש מסביבם רצפים שונים (כדי לשכפל אותם יש שימוש בפריימרים שונים ב-PCR). ואז ניתן למצוא את ה-CA repeat שתמיד האלל שלו (מספר מסויים של CA) עובר בתאחיזה עם הגן למחלה.



**הערה:** אמנם לפעמים מספר החזרות של ה-CA גדל בין דורות אבל זה יחסית נדיר. אך מכיוון שזה קיים משתמשים ביותר ממרקר אחד שמצוי בתאחיזה.

**התהליך:**

**דרישות:** דורש איסוף משפחות עם המחלה. דורש הורשה מנדלית ברורה.

**בעיית השונות הגנטית:** ייתכן ושני גנים או יותר אחראים לאותו הפנוטיפ.

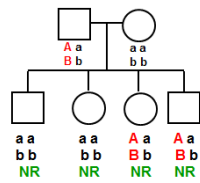
**מה עושים:** מפיקים DNA מכל נציגי המשפחות ובודקים אזורים פולימורפיים ב-DNA:

- רצפי CA ו-microsatellites אחרים.
- SNPs.
- VNTRs.
- RFLPs.

$\theta = \frac{\# \text{ recombinants}}{\# \text{ recombinants} + \# \text{ non-recombinants}}$  חישוב מידת התאחיזה בין שני אתרים/תכונות:

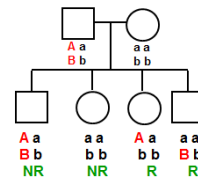
מודדים את תדירות הרקומבינציה. ככל שהמרחק קצר יותר בין שני האתרים- פחות רקומבינציה מיוטית. (נמדד ביחידות של centimorgan).

**תאחיזה מלאה**  
שני האתרים קרובים מאוד זה לזה לעולם אין ביניהם רקומבינציה



$\theta = \frac{0}{4} = 0$

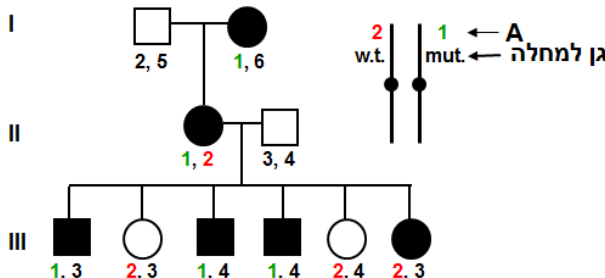
**סרגרציה חופשית:**  
שני האתרים על כרומוזומים שונים או ששני האתרים על אותו כרומוזום אך מרוחקים מספיק כך שתמיד יופרדו על-יד אירוע רקומבינציה



$\theta = \frac{2}{4} = 0.5$

**מצבי הקיצון:**

**דוגמא:** לפעמים יש CA repeat בתוך ה-UTR של הגן. ואז הוא תמיד עובר ביחד עם הגן- תאחיזה מלאה לגמרי.



**דוגמא:** במשפחה הבאה, האם יש תאחיזה בין אתר פולימורפי A בעל 6 אללים, לבין מחלה שמופיעה במשפחה זו?

כל בני המשפחה מלבד הפרט III-6 מתאימים למצב שבו אתר A סמוך לגן של המחלה והאלל המוטנטי לאלל 1 של אתר A. שני מצבים אפשריים:

1. יש תאחיזה בין A לגן של המחלה אך שני האתרים לא מספיק קרובים ולכן ב-III-6 קרתה רקומבינציה ביניהם.
2. אין תאחיזה בין אתר A לבין הגן של המחלה. רק במקרה נראה כאילו שיש תאחיזה במשפחה זו. כדי להכריע בין ההשערות בודקים את: **יחס ההסתברויות**- היחס בין ההסתברות לתאחיזה וההסתברות למקריות.



**יחס ההסתברויות – Relative likelihood or odd ratio:**

**Odd ratio = likelihood of linkage / likelihood of chance**

לדוגמא, נניח ש-  $\theta = 0.1$ .

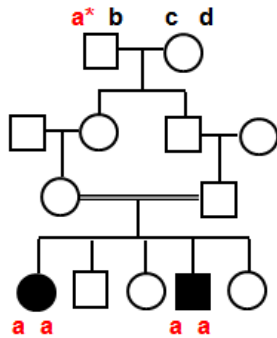
מה יחס ההסתברויות של המשפחה שתוארה קודם?

$$\text{Odd ratio} = \frac{(0.9)^5 (0.1)}{(0.5)^5} = 3.776$$

**הערה:** כדי להקל על החישובים מחשבים את ה-log odd ratio שיוצא 0.577. נקרא: **LOD score**.  
**LOD score חיובי:** מונה גדול ממכנה- יותר סיכוי לתאחיזה מאשר למקריות.  
**LOD score שלילי:** מכנה גדול מהמונה- יותר סיכוי למקריות מאשר לתאחיזה.  
**בעיה:** בדרך-כלל לכל משפחה יש מספר קטן של צאצאים ולכן ה-LOD score איננו יכול להיות גדול. לכן אוספים כמה שיותר משפחות וקובעים LOD score לכל משפחה כאשר מחשבים אותו לערכי  $\theta$  שונים. ומצרפים את המידע של כל המשפחות ביחד.  
**Maximum likelihood value of  $\theta$ :** ערך  $\theta$  שבו מתקבל ה-LOD score הגבוה ביותר.  
**הערה:** כאשר LOD score = 3, המשמעות: הסיכוי לתאחיזה בין סמן מסויים לגן למחלה הוא פי 1000 יותר מהסיכוי לחוסר תאחיזה ומקריות בלבד. זה ציון טוב.

**Homozygosity mapping:**

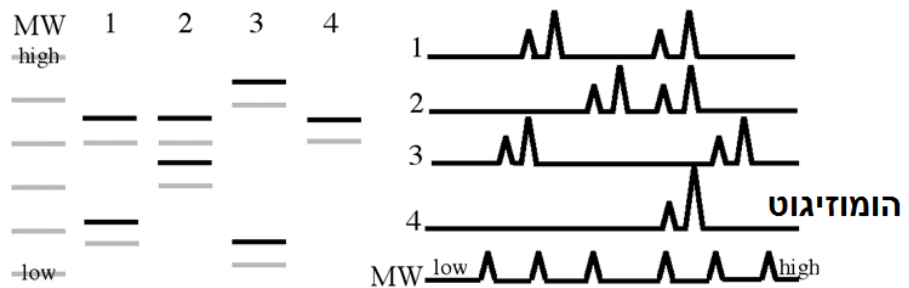
שיטה למיפוי תכונות רצסיביות ע"י שימוש בצאצאים של נישואי קרובים, אחת הדרכים שעוזרת במקרה שבו אין הרבה משפחות בהן התגלתה המחלה. באופן כזה אפשר להסתפק בהרבה פחות פרטים כדי להגיע ל-LOD score גבוה.



מסתכלים על כל הצאצאים של בני-דודים ראשונים ומחפשים אתר פולימורפי שיהיה במצב אוטוזיגוטי אצל החולים. בכל אתר עם סמן פולימורפי, הסיכוי לכל צאצא של בן-דוד ראשון להיות הומוזיגוט הוא: 1/16, והסיכוי שההומוזיגוטיות תהיה של המחלה: 1/64.  
**אצל החולים הסמן שבאתר שבסמוך לגן המחלה יהיה במצב הומוזיגוטי.**

**capillary electrophoresis בדיקה-**

דוגמא לתוצאות בדיקה-PCR נערך כאשר אחד משני הפריימרים מסומן בחומר פלוריסנטי. מריצים את התוצרים של ה-PCR במכשיר sequencing בהפעלה מיוחדת שמודדת את אורך המקטעים שהתקבלו ב-PCR. אורך המקטע מתגלה ע"י גובה ה-peaks.



בהומוזיגוט- שני האללים שלו נותנים את אותו ה-peak.

בלשב הזה של הבדיקה מקבלים 5CM ובו מבצעים "מיפוי עדין" של הגנים- מזמינים פריימרים ל-CA repeats באזור זה ומצמצמים עוד את האזור.

**haplotype:** הרבה מרקרים שמצויים בתאחיזה אחד עם השני. ככל שיש יותר מידע ניתן לצמצם את האזור של ה-haplotype (כשיש עוד צאצאים ועוד משפחות). בדרך-כלל לכל מי שחולה יש פעמיים את המקטע של ה-haplotype ולמי שבריא יש רק סט אחד או אפס שלו.

11	12	13	14
D11S1052	2.2	2.2	2.2
D11S1053	1.1	4.4	1.1
D11S1054	1.1	2.2	1.1
D11S1055	1.1	2.2	1.1
D11S1056	1.1	2.2	1.1
D11S1057	1.1	2.2	1.1
D11S1058	1.1	2.2	1.1
D11S1059	1.1	2.2	1.1
D11S1060	1.1	2.2	1.1
D11S1061	1.1	2.2	1.1
D11S1062	1.1	2.2	1.1
D11S1063	1.1	2.2	1.1
D11S1064	1.1	2.2	1.1
D11S1065	1.1	2.2	1.1
D11S1066	1.1	2.2	1.1
D11S1067	1.1	2.2	1.1
D11S1068	1.1	2.2	1.1
D11S1069	1.1	2.2	1.1
D11S1070	1.1	2.2	1.1
D11S1071	1.1	2.2	1.1
D11S1072	1.1	2.2	1.1
D11S1073	1.1	2.2	1.1
D11S1074	1.1	2.2	1.1
D11S1075	1.1	2.2	1.1
D11S1076	1.1	2.2	1.1
D11S1077	1.1	2.2	1.1
D11S1078	1.1	2.2	1.1
D11S1079	1.1	2.2	1.1
D11S1080	1.1	2.2	1.1
D11S1081	1.1	2.2	1.1
D11S1082	1.1	2.2	1.1
D11S1083	1.1	2.2	1.1
D11S1084	1.1	2.2	1.1
D11S1085	1.1	2.2	1.1
D11S1086	1.1	2.2	1.1
D11S1087	1.1	2.2	1.1
D11S1088	1.1	2.2	1.1
D11S1089	1.1	2.2	1.1
D11S1090	1.1	2.2	1.1
D11S1091	1.1	2.2	1.1
D11S1092	1.1	2.2	1.1
D11S1093	1.1	2.2	1.1
D11S1094	1.1	2.2	1.1
D11S1095	1.1	2.2	1.1
D11S1096	1.1	2.2	1.1
D11S1097	1.1	2.2	1.1
D11S1098	1.1	2.2	1.1
D11S1099	1.1	2.2	1.1
D11S1100	1.1	2.2	1.1

**SNP Chips**



צ'יפ DNA זהו מתקן מניאטורי (ס"מ מרובע) הכולל אלפי רצפי DNA שונים המקובעים לפני השטח. הרצפים המקובעים הינם אוליגונוקליאוטידים באורך של כ-25 נוקליאוטידים.

DNA המכיל SNP מסוים עובר היברדיזציה לצ'יפ. ניתן לזהות ע"פ ההיברדיזציה איזה SNP מכיל ה-DNA.

**Genotyping**: התהליך של זיהוי האלל באתר SNP. ניתן לעשות בו-זמנית genotyping להרבה SNPs.

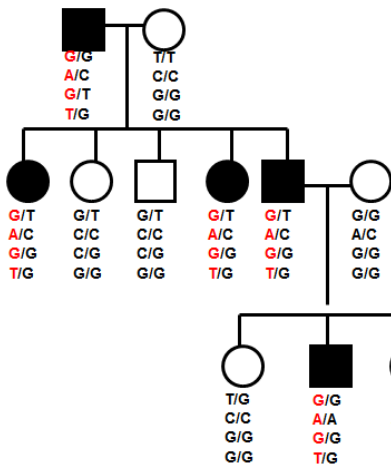
**הכנת ה-DNA להיברדיזציה:**

ה-DNA מופק, נשבר לפרגמנטים קטנים. כל חתיכה מסומנת בקצה עם חומר פלוריסנטי. במקום ההיברדיזציה יש סיגנל פלוריסנטי. המחשב מפענח את סדרת הסיגנלים ונותן פלט שבו הוא מציין בכל אתר פולימורפי מה האללים שהיו ב-DNA הנבדק.

**SNP Chip Vs microsatellites analysis**

עדיף לעשות SNP Chip ל-SNPs שיש להם רק שני אללים כי מספר ריאקציות ה-PCR הרבה יותר קטן, ומספר חישובי ה-LOD score גדול אבל זה נעשה ע"י המחשב.

סוג המרקר	מספר מרקרים	מספר ריאקציות ה-PCRs	רזולוציה	מספר חישובי ה-LOD scores
Micro-satellites	400	8000	10cM	400
SNP	10,000	80	3cM	10,000



**Linkage with SNP**

הסתכלות על תבנית הורשה של הפלוטיפ מעלה את ה-LOD score.

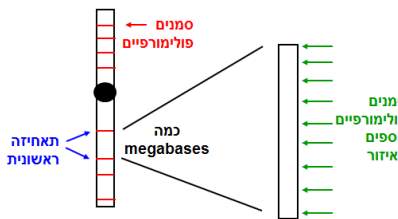
בדוגמה הזאת, לפי האות העליונה בלבד: 0.9 אבל בתוספת שאר האותיות: 2.0.

**Expression chips**

צ'יפים שבודקים ביטוי של גנים באופן דומה: על הצ'יפ שמים אוליגו-נוקליאוטידים שמייצגים מגוון רחב של גנים. מכינים cDNA מהרקמה או מהתאים שנבדקים ומסמנים בסימון פלוריסנטי. עורכים היברדיזציה ומגלים את הגנים.

**מיפוי גס:** קביעת התאחזה הראשונית. טוב למטרת דיאגנוסטיקה- גם ללא ידיעת הגן.

**מיפוי עדין:**



צמצום האזור הקנדיטי ע"י בדיקת סמנים נוספים באזור ובדיקת כמה שיותר משפחות. מחפשים בתוך האזור מרקרים נוספים כדי לצמצם אותו. כשעושים זאת עם SNP Chips בדרך-כלל מגיעים לצמצום גדול כבר בשלב הראשון, אבל בשימוש ב-microsatellites, ניתן פעמים רבות לצמצם ע"י חיפוש מרקרים נוספים.

**דוגמא:** בילד 4 רואים שרק האזור העליון של ה-haplotype עבר ביחד עם המחלה, וזה מביא לצמצום האזור הקריטי.

I	1	2	3	
II	1	2	3	4
D12S 84	8	10	8	10
D12S 105	3	4	3	3
D12S 234	8	6	8	2
D12S 129	2	4	2	3
D12S 354	7	1	7	5
D12S 79	10	6	10	8

### לאחר צמצום האזור הקריטי- זיהוי גנים מועמדים (candidates):

המעבר משלב התאחיזה לזיהוי הגן באזור הקריטי יכול לקחת זמן רב. **בעבר:** לפני שמיפו את כל הגנום, לא ידעו איזה גנים מצויים באזור הקריטי ולכן עשו cloning של האזור ועשו northern blot עם הרבה גלאים לגנים מוכרים. עקרונות בזיהוי גנים:

- לפי ביטוי ב- Northern blots.
- לפי שמירה על רצף ה-DNA לאורך האבולוציה: Zoo blot.
- לפי רצפים ב-DNA האפיינים גנים (splicing junctions, CpG islands).
- לפי הומולוגיה לרצפי EST.

### EST- expressed sequence tagged sites:

EST הינו מקטע מגן שלם, שמאפיין בדרך-כלל גנים מרקמה מסויימת. זה עוזר לזהות גנים לא ידועים ולמפות אותם בגנום. גודלו: 200-500bp. התקבלו ע"י קביעת רצף של cDNAs מרקמות שונות ומשלבים שונים במהלך ההתפתחות. בגלל שהם מהווים רק חלק קטן מהגן הם קרויים -tags.

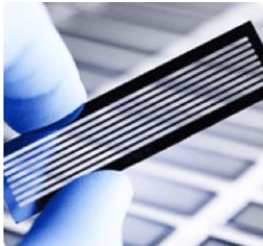
**היום-לאחר סיום פרויקט הגנום:** לאחר צמצום האזור הקריטי לגודל מינימאלי- מחפשים במאגרי המידע כדי לזהות את כל הגנים הקיימים באזור הקריטי. אלה יכללו: גנים ידועים ומאופיינים, גנים שפעילותם לא ידועה, פסאודוגנים, גנים פיוטטיביים=משוערים (putative genes).

### כיצד מזהים מתוך המועמדים את גן המחלה:

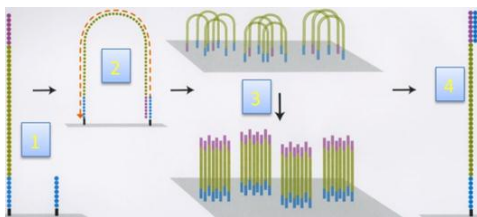
לפעמים בתוך האזור הקריטי ימצאו 50 גנים או אפילו יותר. הרבה מהגנים הראשונים ששובטו נתגלו בזכות שינויים כרומוזומליים וזאת בגלל הקושי הרב לפעמים "לנחש" מיהו הגן הנכון. Candidate gene approach:

- מגיעים לאזור הקריטי.
- בוחנים את הגנים הידועים מהאזור.
- מחליטים "להמר" על אחד או מעט גנים לפי:
  - תבנית ביטוי ופונקציה.
  - הומולוגיה לגן אנושי אחר ידוע או ל-EST.
  - הומולוגיה לגן רלוונטי מאורגניזם אחר (משמר ועד עכבר).

### Next generation/ deep sequencing:



מאפשר לבצע קביעת רצף של גנום שלם במהירות ובעלות יחסית נמוכה. קביעת הרצף נעשית ע"י Flow cell, תוך כדי סינתזה. ב-Flow cell יש 8 נתיבים ובכל אחד מהם ניתן להריץ 12 ניסויים שונים (12 אנשים). מפיקים DNA, שוברים אותו לחתיכות קטנות, מכניסים למכשיר והוא מסנתז וקובע רצף תוך כדי.



מחברים linkers למקטעים. את חתיכות ה-DNA מחברים ל-Flow cell. על הזכוכית יש חתיכות שמכילות רק את החלק הכחול. ואז יש ריאקציית- Bridge hybridization והמולקולה מתקפלת ומתחברת לחלקים הכחולים הקטנים. לאחר-מכן זה עובר ריצוף ונהיה דו-גדילי. ואז עושים דנטורציה ושני הגדילים נפרדים. חוזרים על התהליך כמה פעמים ובכך "מעשירים" את הקלסטר- הרבה חזרות של רצף מסויים.

כל גדיל כזה עובר ריצוף שוב עם נוקליאוטידים פלוריסנטיים. בכל-פעם שוטפים את ה-flow cell מוסיפים פנימה סוג אחד של נוקליאוטידים, שוטפים שוב ובודקים איפה הוא התחבר.



בדרך-כלל עושים sequencing בחתיכות של 50 בסיסים, ואחר-כך עושים alignment של כל החתיכות הקטנות אל מול הרצף. מה שחשוב זה מהו ה-coverage של אותו אזור. באדום: SNP, משהו ששונה מה-reference seq. בסוף מקבלים פלט של כל ה-SNPs בגנום וכל המוטציות.

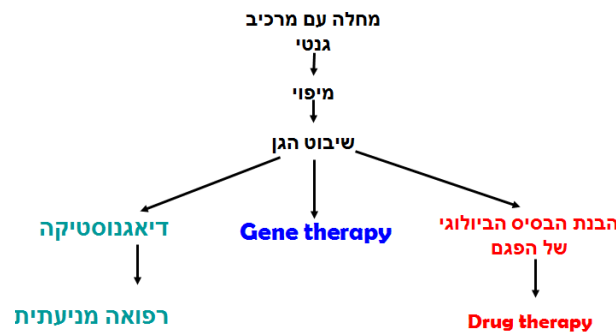
**הקושי העיקרי בשיטה:**

- ניתוח המידע וביואינפורמטיקה.
  - התמודדות עם מאגר מידע כה גדול.
  - חיבור תוכנות שיוכלו להתמודד עם האינפורמציה הרבה ולהבדיל בין עיקר ותפל.
- הקומבינציה המצליחה כיום: קודם קבועים תאחיזה לאזור מצומצם בגנום. אחר-כך מבצעים deep sequencing למספר קטן של פרטים במשפחה. מחפשים מוטציות רק בתוך האזור הקנדידיטי.

**כיצד מוודאים שאכן יש בידינו את הגן הגורם למחלה/פנוטיפ:**

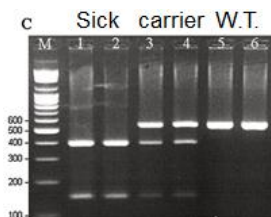
- חיפוש מוטציות אצל חולים נוספים.
- סגרגציה מושלחת של המוטציה עם החולים בלבד.
- החזרת הפנוטיפ התקין in-vitro.
- יצירת מודל של המחלה בבע"ח אחר.

**נמצא הגן! מה הלאה?**



**דוגמא- מחלת Brittle Cornea Syndrome:**

מחלה אוטוזומלית רצסיבית. גורמת להפרעות קליניות בקרנית העין המבילות לעיוורון, גמישות יתר של הפרקים, ירידה בשמיעה ועוד. בישראל המחלה מופיעה בעיקר בקרב יהודים ממוצע טוניסאי. נמצא שלכל החולים האלה מלבד אחד- יש שיער ג'ינג'. לאחרונה זוהתה גם משפחה פלסטינית עם נישואי קרובים רבים וחולים במחלה. לאף-אחד מהחולים הפלסטינים אין שיער ג'ינג'. נמצא שלמשפחה הטוניסאית ולמשפחה הפלסטינית יש הפלוטיפים שונים לגמרי- עזר מאוד לצמצם את האזור הקריטי של הגן למחלה. באזור המצומצם יש 50 גנים ידועים. הניחו שהגן של מחלת BCS מתבטא בפיברובלסטים. קבעו רצף של כל 32 הגנים באזור הקריטי שמתבטאים בין השאר גם בפיברובלסטים.



בגן אחד נמצאה במשפחה הטוניסאית מוטציה הומוזיגוטית של חסר בגן: ZNF469. החסר גורם ל-frameshift וכעבור 16 חומצות אמינו יש stop codon. במשפחה הפלסטינית נמצאה מוטציה הומוזיגוטית אחרת בגן- גם חסר.

**הגן המוטנט:** הגן התבטא ברקמות רבות ביניהן בקרנית העין. הדבר נבדק ע"י RT-PCR של mRNA שהוצא מקרנית נורמאלית. הגן שייך למשפחת גנים עם zinc finger domain. לחלבונים אלה מיוחסים תפקידים בקישור ל-DNA וכן יכולת קישור ל-RNA וחלבונים. ייתכן שהחלבון משמש כפקטור שעתוק.

## פרוייקט הגנום:

### מטרות הפרוייקט:

1. מיפוי הגנום האנושי. יצירת מפות גנטיות ופיזיות. קביעת רצף.
2. זיהוי גנים, סמנים ואזורים אחרים בעלי עניין ביולוגי.
3. קביעת רצף גנומי של אורגניזמים נוספים.
4. פיתוח בדיקות גנטיות. טיפול במחלות גנטיות.
5. פיתוח גישה נוחה למארגי מידע ממוחשבים.
6. פיתוח מדיניות המטפלת בבעיות חוקתיות, רפואיות ואתיות המתעוררות עקב הפרוייקט.
7. פיתוח טכניקות חדשות, לקביעת הרצף, לאיתור מוטציות ועוד.

### יצירת מפות פיזיות של הגנום:

דורש לשבט את כל הגנום בחתיכות קטנות של DNA (ספריות גנומיות).  
**ספריות גנומיות** יכולות להיות משובטות בווקטורים שונים. חותכים את ה-DNA הגנומי לגודל רצוי ומשבטים בוקטור המתאים. כל **clone** מכיל מקטע DNA אחר מהגנום.  
**פאג' P1:** משבטים DNA לאחר חיתוך למקטעים בגודל ממוצע של 85kb. אורזים בתוך הפאג' שהוציאו ממנו את כל הגורמים מלבד אלה הדרושים להתרבות, ומדביקים חיידקי E.Coli. הפאג' הופך לפלסמיד בתוך החיידק.  
**PAC (Phage Artificial Chromosome):** כרומוזום מלאכותי של P1. אותו הוקטור כמו של ה-P1. ההבדל - מוחדר לחיידק באמצעות אלקטרופורציה. יכול להכיל לכן פרגמנטים גדולים יותר.  
**BAC (Bacterial Artificial Chromosome):** ווקטור שמקורו ב-F factor. מוכנס לחיידק ע"י אלקטרופורציה. יכול להכיל מקטעים עד גודל של: 130kb.

ה-clones הגנומיים עברו ריצוך חלקי בכדי לזהות בהם מקטעי DNA שמופיעים אך ורק פעם אחת בגנום הפלואידי: STS- Sequence tagged site.

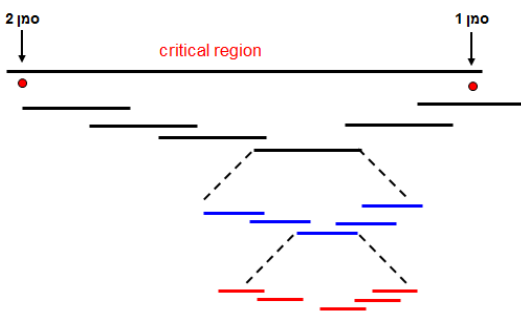
### סוגי STS:

- Polymorphic microsatellites (CA repeats, etc.)
- רצפי DNA יחידאיים (unique sequences).
- ESTs- Expressed Sequence Tag. ESTs רבים זהו במהלך פרוייקט הגנום ומופו לאזורים גנומיים שונים.

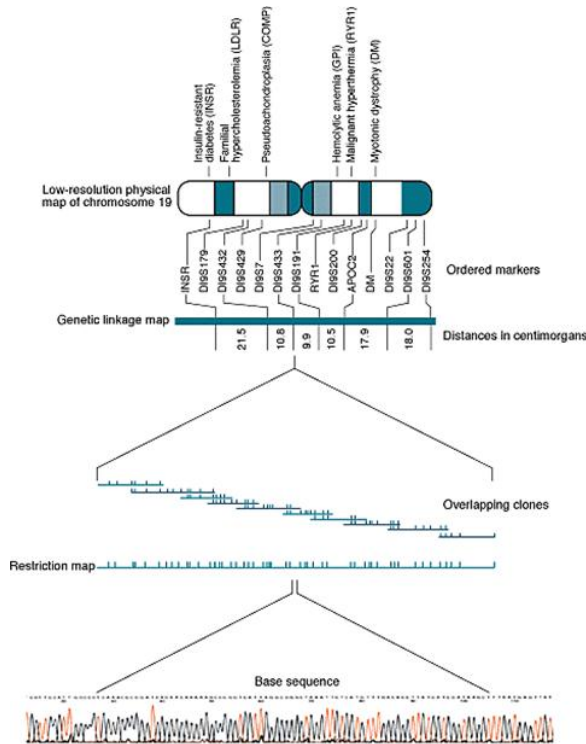
**המכנה המשותף:** את כולם ניתן להגביר (to amplify) ע"י PCR ממקום אחד בלבד בגנום.

### יצירת מפה פיזית של האזור הקריטי:

- שיבוט האזור הקריטי בין שני הסמנים הקרובים ביותר לגן.
  - חיפוש סמנים חדשים.
  - יצירת מפה מדוייקת של האזור הקריטי.
- כל פרגמנט DNA מקורו מ-clone שנלקח מספריה גנומית.



בסריקה ראשונה מגלים את סמנים 1 ו-2. מקבלים מושבות המכילות מקטעים חופפים ביניהם יש חור. ומוצאים אותם ע"י מרקרים חדשים - סמני STS נוספים.



בסופו של דבר כל ה-clones של כל כרומוזום יחוברו לרצף אחד ארוך. בכל מקטע יקבע בשלב זה הרצף של ה-DNA.

**המפות הכרומוזומליות מהוות את אחד ההשגים הגדולים של הפרוייקט.**

תוך-כדי ואחרי השלמת כל מלאכת הריצוף-מנסים לזהות את כל הגנים בכל הכרומוזומים. מנסים לשייך כל גן לרקמה ומנסים לקבוע מהו הפרטואר הביטוי של כל רקמה. בסופו של דבר רוצים לזהות את כל הגנים הגורמים למחלה על-פני כל כרומוזום.

כתוצאה מהידע הרב שפרוייקט הגנום תרם, התפתח מאוד תחום ה- **Functional Genetics**: **Transcriptomics**: כולל אנליזה בקנה-מידה רחב של מגוון ה-mRNA שמשועתקים מהגנים הפעילים ובאלו תנאים הם מתבטאים. מספר mRNA רב מאוד לעומת מספר הגנים בגלל ריבוי ה-alternative splicing. **Proteomics**: מחקר התבטאות החלבונים והפונקציות שלהם. זה מלמד בצורה טובה יותר מה באמת מתרחש בתא. **Structural genomics**: פענוח מבנה תלת-מימדי של חלבונים, מה שנותן רמזים לגבי מנגנון הפעולה של החלבון. עוזר לפיתוח תרופות. **Knock-out studies**: שיטות ניסיוניות המאפשרות להבין את פונקציה רצפי ה-DNA. **Comparative Genomics**: אנליזה של רצפי DNA של אורגניזמים שונים זה ליד זה הפך לאחת האסטרטגיות החזקות ביותר בכדי לזהות גנים ולהבין את פעילותם. **Epigenomics**: אנליזה של המאפיינים האפיגנטיים של הגנום. כולל מתילציית DNA ומודיפיקציות של היסטונים.

## גנטיקה מולקולרית של סרטן

**סרטן:** מחלה שבה יש התרבות בלתי מבוקרת של תאים המובילה לקבלת מסה או גידול (neoplasm). בסוף התהליך נשלחות גרורות מהגידול המרכזי לחלקים אחרים בגוף.

### שלושה סוגים עיקריים של סרטן:

- Sarcomas:** גידולים ברקמות מזנכימליות: עצם, שריר או רקמת חיבור.
- Carcinomas:** גידולים שמקורם ברקמת אפיתל כגון התאים שעוטפים את המעי, הסימפונות או ה-mammary ducts.
- Hematopoietic and lymphoid malignancies:** גידולים כמו לימפומות או לויקמיות שמתפשטות דרך מח העצם, מעכת הלימפה ומערכת הדם ההיקפית.

### סרטן היא מחלה הנגרמת כתוצאה משינויים גנטיים:

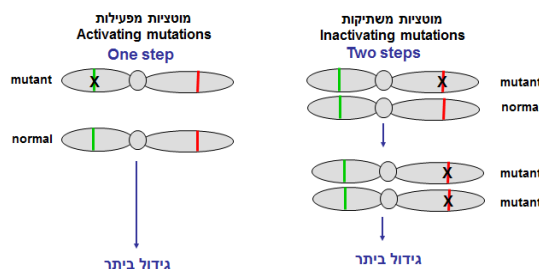
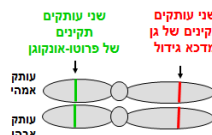
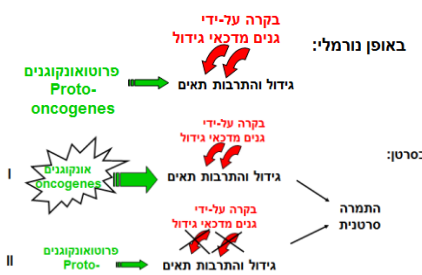
לפעמים המחלה מורשת וברוב המקרים היא ספורדית- נרכשת, כלומר: לפעמים הסרטן לא עובר בתורשה אך אם להוריה יש סרטן גם לבנו יהיה בסבירות גבוהה כי לשניהם יש גנים אשר מעלים את הסיכוי לסרטן. המוטציות מתרחשות בגנים רבים ומצטברות בהדרגה. מספר מינימאלי של מוטציות צריך להתרחש **באותו** התא בכדי לאפשר התמרה סרטנית. לכן- הסרטן היא מחלה קולונלית. כל התאים בגידול מסויים- מקורם מתא אחד משותף. ניתן להוכיח שגידול הוא קולונלי (התפתח מתא אחד) **לפי תבנית ההשתקה של כרומוזום X** בגידולים בנקבות: בשלב מוקדם הוחלט איזה כרומוזום X יתבטא בתא אצל האישה, ואם הגידול מקורו בתא אחד, אז כל תאי הגידול יבטאו את אותו כרומוזום X.

### גנים שונים מעורבים בתהליך ההתמרה הסרטנית:

גנים אלה מקודדים ל-

- חלבונים המעורבים בהעברת אותות במסלולים האחראים על התרבות תאים.
- מרכיבים של ה-cytoskeleton המעורבים בתהליכי contact inhibition.
- בקרים של מחזור התא המיטוטי.
- צרכים של התוכנית למוות מבוקר של תאים (אפופטוזיס).
- חלבונים האחראים לגילוי ותיקון מוטציות בתא.

**פרוטו-אונקוגנים:** גנים שמביאים לגידול והתרבות תאים, פעילותם נחוצה לגדילה תקינה של התא. גנים דומיננטיים שיכולים לעבור התמרה סרטנית ע"י מוטציה. הם מבוקרים ע"י גנים מדכאי גידול. **אונקוגנים:** פרוטו-אונקוגן שעבר התמרה והפך להיות גן שמעודד סרטן. בנוסף, יכול להתפתח סרטן גם אם חלה פגיעה בבקרה של הפרוטו-אונקוגנים ע"י הגנים מדכאי הגידול.



## אונקוגנים:

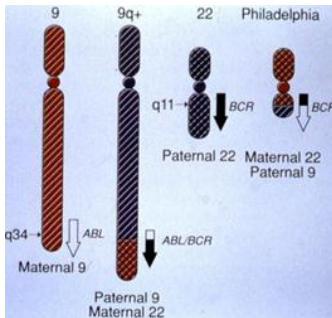
האונקוגנים הם עותקים מוטנטיים של גנים תקינים הנקראים פרוטו-אונקוגנים. גנים אלה מעורבים בבקרה על התרבות תאים והתמיינות. באופן נסיוני הם מזוהים ע"י יכולתם להתמיר תאים בתרבית. זוהו לראשונה ב-retroviruses. מקור הגן מהמאכסן שעבר לוירוס בתהליך טרנסדוקציה.

### משמשים כ:

- פקטורי גדילה
- רצפטורים לפקטורי גדילה.
- מוליכי סיגנלים (קינאזות ו-GTPase).
- פקטורים גרעיניים המבקרים שעתוק/חבור.

### הפעלה של פרוטו-אונקוגנים:

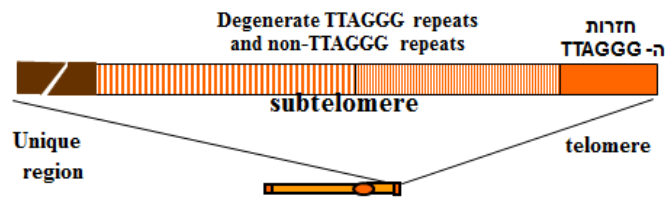
- מוטציות בגן: לעיתים מוטציה בנוקליאוטיד אחד יכולה להפוך אותו לאונקוגן. מוטציות אלה הינן דומיננטיות ברמה התאים על-פני העותק התקין של הגן.
- אמפליפיקציה גנית: ריבוי של מספר העותקים של פרוטו-אונקוגן שמביא לעליה בתוצר האונקוגן. דוגמא: N-myc עובר אמפליפיקציה עד פי 200 ב-40% של ה-neuroblastomas. זה בדרך-כלל קורה בשלב מאוחר יותר בהתפתחות הגידול.
- טרנסלוקציה כרומוזומלית: כאמור הפעלה של פרוטו-אונקוגן ביתר שאת הופכת אותו לאונקוגן. דבר זה יכול להיעשות ע"י טרנסלוקציה כרומוזומלית.



דוגמא: הפעלת הפרוטו-אונקוגן *abl* ע"י טרנסלוקציה בסמוך לגן *bcr*: שינוי זה מתרחש ב-Chronic Myelogenous Leukemia (CML). *abl* הוא טירוזין-קינאז ופעילות *bcr* אינה ידועה. החיבור בין השניים מביא לפעילות מוגברת של הטירוזין-קינאז.

### תפקיד הטלומרים בסרטן:

**טלומרים:** קומפלקס DNA-חלבון הקיים בקצוות של כרומוזומים אוקריוטים. ה-DNA בנוי מהרצף החוזר: TTAGGG (ביונקים) ואורך החזרות בבני-אדם הוא: 5-15kb. תפקיד הטלומרים הוא להגן על קצוות הכרומוזומים מפירוק ומהכרה כרצף DNA שבור. **מבנה האיזור הטלומרי**



בכל שכפול הכרומוזום מתקצר ב-100 בסיסים פחות או יותר. קיצור הטלומרים מהווה את הבסיס לשעון המיטוטי. לפי אורך הטלומרים ניתן לדעת מהו מספר החלוקות שהתא עבר.

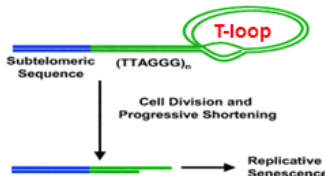
### השעון המיטוטי: המנגנון לספירת מספר הפעמים שהתא מתחלק.

**Hayflick limit:** יכולת החלוקה של תאים פיברובלסטים מאדם בתרבית מוגבלת (100-50 חלוקות).

**Replicative senescence:** כשהתא מגיע לגבול יכולת החלוקה הוא "מזדקן" ומפסיק להתחלק.

### מדוע מפסיקים התאים להתחלק כשהטלומרים מגיעים ל-Hayflick limit?

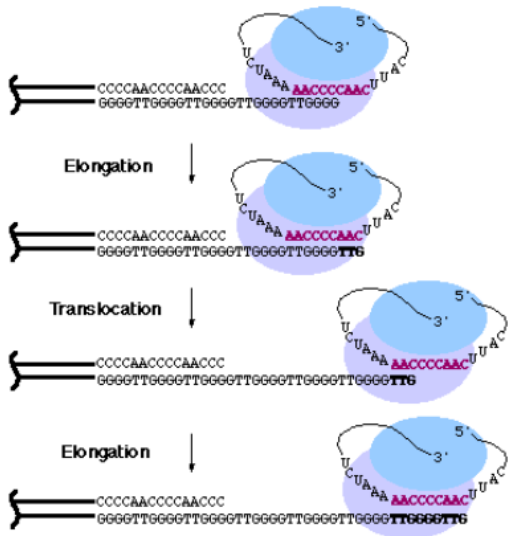
ייתכן והטלומרים הקצרים אינם מסוגלים ליצור T-loops. מבנה ה-T-loop מגן על קצה הכרומוזום. אם הטלומרים מתקצרים עוד: הם ימצאו במצב של "uncapped telomeres". התא מפסיק במצב כזה להתחלק כי זה ממש מסוכן עבורו לעבור חלוקות-אנזימי ריסטריקציה ונוקליאזות יכולים לחתוך את המבנה הזה (ללא הלולאה).





**כיצד פותרים תאים מסויימים את בעית שכפול הקצה:**

תאי גזע ותאי עובר מתפתח חייבים להתחלק פעמים רבות. כיצד הם מתגברים על ה- end replication problem?



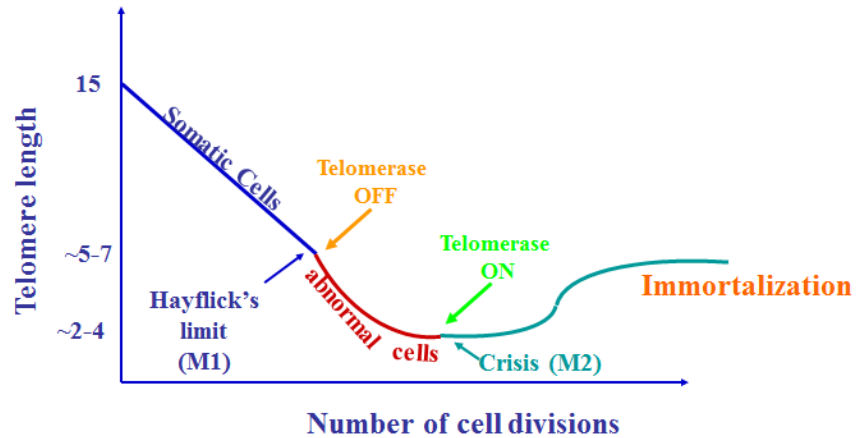
הפיתרון: אנזים טלומרז. זהו קומפלקס ribonucleoprotein שמרכיביו העיקריים הם האנזים טלומרז (Telomerase Reverse Transcriptase) TERT ותת-יחידה של RNA: TER. הטלומרז מאריך את הטלומר שמתקצר. הוא פעיל רק בתאי גזע כמו: תאי מין ותאי מח עצם, ובתאים עובריים. בשאר התאים הוא מושקע! הארכת החור החסר מאפשרת לקומפלקס של פולימראז להיקשר ל-DNA ולשכפל.

ניסוי: ביטוי של hTERT בתאים פיברובלסטים הופכת את התאים בעלי כושר חולקה בלתי מוגבל.

**טלומרז וסרטן:**

לטלומרז יש שני תפקידים בהתפתחות סרטן:

- בשלבים מוקדמים של התפתחות גידול- טלומרז חייב להיות מושקע.
  - בשלבים מתקדמים של התפתחות הגידול- טלומרז חייב להיות מופעל.
- אורך הטלומרים בתאים שונים במחזור חיים של תא נורמאלי:**



Number of cell divisions

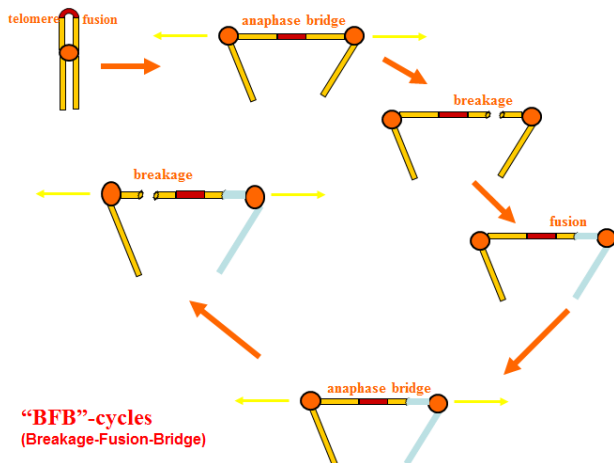
לכל סרטן יש מנגנון לשמירה על טלומרים ארוכים.

ניתן לעשות תכנות מחדש של תאים סומטיים להיות תאי גזע, וזה כולל התארכות של הטלומרים ע"י הטלומרז. זה נעשה ע"י החדרת גנים שלו אל התא.

**BFB cycles:** בין M1 ל-M2 יש שלב

שנקרא: breakage fusion bridge cycles. מנגנון של אמפליפיקציה ובו יש שבירה ואיחוי מחדש של כרומוזומים הכרוכים באיבוד הטלומרים.

התפתחות חוסר יציבות גנומית הוא אחד השלבים החשובים הנחוצים לגידול סרטני.



### חוסר יציבות כרומוזמלית בסרטן:

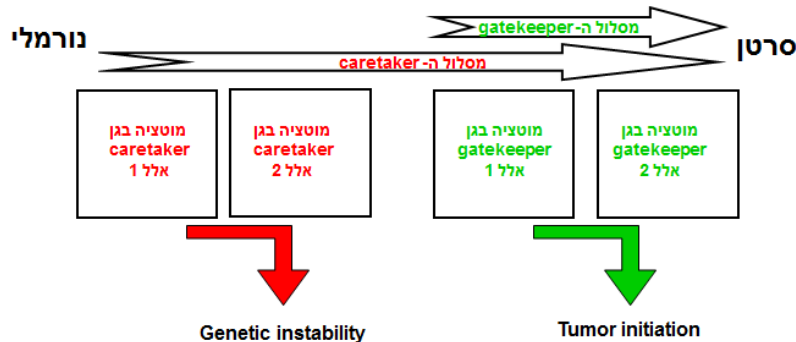
אחת הסיבות העיקריות לחוסר היציבות היא התקצרות הטלומרים, ובעקבות זאת חוסר תפקוד הטלומר ← מחזורי BFBs. לתאים סרטניים יש מספר כרומוזמים לא תקין-aneuploidy. בעקבות זאת יש איבוד של גנים מדכאי גידול והגדלה במספר הפרוטו-אונקוגנים. מצבים אלה גורמים להמשך התפתחות הגידול והפיכתו לאגרסיבי יותר.

### האם חוסר-יציבות כרומוזמלית גורמת לסרטן או נובעת ממנו?

תשובה: במחלה גנטית נדירה- MVA (Mosaic variegated aneuploidy), סינדרום הכולל פיגור בגדילה, מיקרוצפלוס (ראש קטן), סרטן בילדות ומוזאיקה לחסר ועודף של כרומוזמים בתאי הגוף. הגן המוטנט: BUB1B שמקודד לחלבון BUBR1. זהו חלבון חשוב מאוד ב- mitotic spindle checkpoint. כאשר ה-checkpoint הזה איננו פועל, אין חלוקה שווה של כרומוזמים לתאי הבת בזמן האנאפזה. ממצא זה תומך בקשר בין אנאפלואידיה והתפתחות סרטן.

### גנים מדכאי גידול – Tumor suppressors:

תפקידם לחסום גידול לא תקין והתמרה סטרינת. המוטציה ברמה התאית היא **רצסיבית**- יש צורך לפגוע בשני העותקים על-מנת לאבד את תפקוד הגן. בניגוד לאונקוגנים שבהם המוטציות פועלות במנגנון של- gain of function/abnormal function, המוטציות בגנים מדכאי גידול פועלות במנגנון של: loss of function. לגנים מדכאי גידול תפקידים שונים. ניתן לחלק אותם לשתי קבוצות עיקריות: **Gatekeepers:** מעורבים ישירות בבקרת מחזור התא, עיכוב גדילה ע"י מגע בין תאים, אפופטוזיס. לתאים מסוגים שונים יש gatekeepers שונים. מוטציה בהם- פיתוח מיידי של סרטן. **Caretakers:** מעורבים ב"תחזוקה"- תיקון נזקי DNA ודאגה לשלמות הגנום. הם כלליים לכל סוגי התאים. מוטציה בהם גורמת לעליה ב**סיכון** לסרטן, אך לא גורמת לסרטן באופן ישיר. כאשר יש מוטציות בשני עותקים של caretakers- הדבר יוביל לסרטן **באופן עקיף**. ההפרעה לשלמות הגנום תגרום למוטציות משניות בגנים אחרים- פרוטו-אונקוגנים או גנים מדכאי גידול אחרים.



כשיש מוטציה אחת בגן **gatekeeper** צריך רק עוד מוטציה אחת נוספת להתחלת התהליך הסרטני. מי שירש מוטציה כזאת הוא בעל סיכוי מוגבר פי **1000** לחלות בסרטן לעומת שאר האוכלוסייה. כשיש מוטציה אחת בגן **caretaker** צריך עוד 3 מוטציות להתחלת התהליך הסרטני. מי שירש מוטציה כזאת הוא בעל סיכוי מוגבר של פי **5-50** לחלות בסרטן לעומת שאר האוכלוסייה.

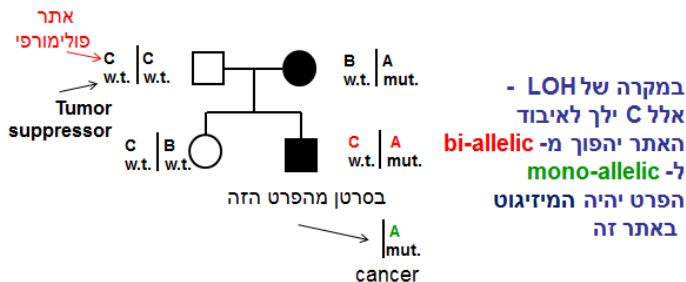
### היפותזת "המכה הכפולה" – The "two hit" hypothesis:

איבוד שני האללים של גן מדכאי גידול יכול להתרחש גם בסרטן מורש וגם בסרטן ספורדי. **בסרטן מורש:** הפרט יורש עותק אחד מוטנטי ורוכש מוטציה באלל השני באחד התאים בגוף. **בסרטן ספורדי:** הפרט צריך לרכוש שתי מוטציות, כל אחת באחד מעותקי אותו הגן, **באותו התא**. כאשר לפרט יש מוטציה אחת בכל תאי גופו, הסיברות שירכוש בתא אחד בגופו מוטציה באלל השני היא גבוהה מאוד. לכן הסיכויים לפרט כזה לחלות בסרטן גבוהים מאוד. ניתן לומר שאופן ההורשה של סרטן כזה הוא דומיננטי.

**הפרדוקסי:** ברמה התאית המוטציה היא רצסיבית, כיוון ששני האללים צריכים לאבד את פעילותם. אך ברמת ההורשה- המוטציה היא דומיננטית כיוון שמספיק עותק אחד מוטנטי בכדי שהפרט יחלה בסבירות גבוהה.

**Loss of heterozygosity (LOH) – אחד הרמזים לקיומו של גן מדכא גידול:**

בניגוד לאונקוגנים- קשה להוכיח שגן הוא מדכא גידול באופן נסיוני. פעמים רבות גנים מדכאי גידול מתגלים בגלל שהאזור הכרומוזמלי בו הם שוכנים "הולך לאיבוד" בגידולים רבים. זהו אחד המנגנונים של פגיעה בפעילות הגן. איבוד של אזור כרומוזומלי גורם פעמים רבות לאיבוד הטרנזיגוטיות: המקטע שכולל את האלל ה-w.t. הולך לאיבוד. האתר הופך מ: bi-allelic ל: mono-allelic הפרט יהיה המיזיגוט באתר זה.



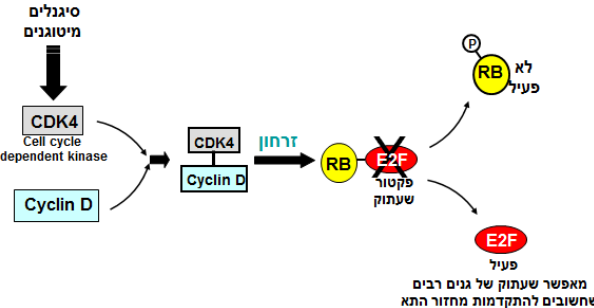
**ישנם מספר מנגנונים לרכישת המוטציה השנייה, ה- "second hit":**

- איבוד הכרומוזום נושא הגן.
- איבוד הגן.
- איבוד ו-reduplication.
- רקומבינציה סומטית (לפעמים קורית רקומבינציה במיטוזה ואז מרקרים מתחלפים).
- מוטציה נקודתית או אירוע אחר מקומי.
- השתקה בעקבות שינוי אפיגנטי (למשל: השתקת העותק התקין ע"י מתילציה).

**RB- אב טיפוס של גן מדכא גידול:**

מוטציה בו גורמת לרטינובלסטומה. זהו סרטן נדיר- מתפתח ברטינה (רשתית העין) של ילדים קטנים. 40% ממקרי הסרטן הם מורשים. החדירות במקרים המורשים היא 90%. בדרך-כלל מקבלים סרטן בשתי העיניים ואם מגלים את זה מספיק מוקדם, ניתן להוציא את העיניים כדי למנוע התפשטות הסרטן בשאר הגוף. הגן RB: ממוקם בכרומוזום 13. משתרע על אזור גנומי של 200kb.

החלבון RB: חלבון של 110 חומצות אמינו. תפקודו משתנה לפי מצב הזרחון. בעל יכולת קשירה ל-DNA וממוקם בגרעין. מתבטא בכל שלבי מחזור התא- גם בתאים מתחלקים וגם בתאים נחים. פעילותו מבוקרת בסינכרוניזציה עם מחזור התא. הוא מהווה nuclear switch- מבקר מעבר משלב אחד לשלב אחר במחזור התא- למעשה:



מבקר את הכניסה ל-S phase במחזור התא. E2F- פקטור שעתוק שמפעיל הרבה גנים שהפעלתם גורמת לכניסה ל-S phase. כש-RB מזרחן E2F משתחרר לאקטב את השעתוק. כאשר RB נאבד או צובר מוטציות שמונעות קישורו ל-E2F, אז E2F פעיל קונסטיטטיבית.

**באילו מצבים RB איננו קשור ל-E2F וחלבוני טרנסקריפציה אחרים:**

- כשהוא עובר זרחון.
- כשהוא קשור לחלבונים אונקוגנים ויראליים (כגון מאדנו-וירוס או SV40).
- כאשר קיימות מוטציות ב-RB באתרי קשירה לחלבונים.

**מוטציה ב-Cyclin D:** זרחון ה-RB נעשה ע"י CDK4 שעובר הפעלה ע"י Cyclin D שנקשר אליו רק כאשר התא מקבל סיגנל להתחלק. מוטציה שגורמת לביטוי יתר של הגן ← זרחון אבנורמלי של RB ← איבוד ה-checkpoint בין G1 ל-S.

**הערה:** בחלק מסרטני הד נמצא ביטוי ביתר של Cycin D1.

**כאשר עושים knock-out ל-RB אצל עכברים:** העכברים מתים בגיל 14/14 כי התאים לא מפסיקים לגדול ומתחלקים ללא הפסקה. הפיברובלסטים שלהם קטנים מהונרמאלי (לא מספיקים לגדול מבחינת הגודל כי אין את שלב G1 במחזור התא).

**P53 and Li Fraumeni syndrome**

ישנן "משפחות סרטן" נדירות שבהן יש היסטוריה בולטת של סוגים רבים ושונים של סרטן שרבים בבני המשפחה נגועים בהם. זוהי מחלה בה נולדים עם גן אחד פגום ל-p53. המחלה מופיעה בגיל מוקדם, 50% מנשאי המוטציה יפתחו סרטן לפני גיל 30. דגם ההורשה דומיננטי.

הגן המוטנטי במשפחות אלה הוא P53.

**הגן P53:** גן מדכא גידול. מוטציות בגן זה הינן השינוי הנפוץ ביותר הנמצא בגידולים סרטניים. לפחות ב-50% מהסרטנים הוא מוטנטי. ברוב המקרים יש איבוד פונקציה של שני האללים. ישנם מקרים בהם יש מוטציות dominant-negative ואז מספיקה מוטציה אחת. מוטציות בגן זה מעורבות הן בסרטן מורש (Li Fraumeni) והן בסרטן ספורדי.

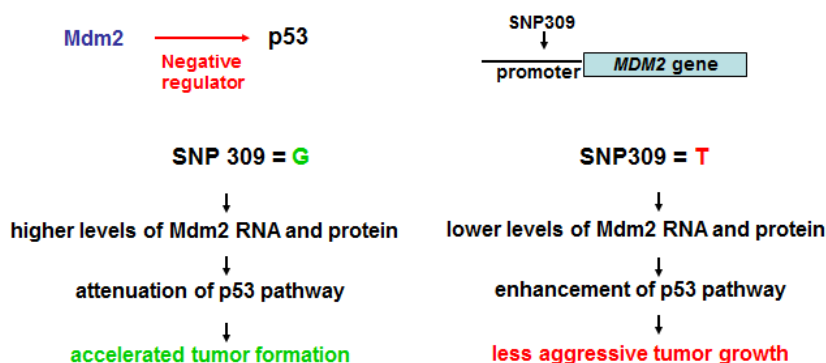
- התוצר התקין של הגן פועל בצורת הומו-דימר.
- חלבון קושר DNA - פקטור שעתוק של גנים המעורבים במחזור התא.
- פועל כבקר שלילי של גידול תאים: עוצר תאים ב-G1 וגם ב-G2.
- אחד החלבונים הראשונים שחש בנזקי DNA.
- במקרים של נזק DNA חמור, מעורב בהשראת אפופטוזיס בתא.

**בהעדר פעילות p53 התא ימשיך להתחלק גם אם רכש נזקי DNA קשים.** דבר זה יגרום להמשך צבירת מוטציות חדשות.

**פולימורפיזמים באדם שמשפיעים על התפתחות הסרטן:**

מי שיש לו G בתא- יש לו פחות p53 בתא ואז הגידולים מתפתחים מהר יותר.

מי שיש לו T בתא, יש אצלו יותר p53 (שמתקן נזקי DNA) ולכן הגידולים מתפתחים לאט יותר.



**סרטן השד והגנים BRCA1 and BRCA2**

כ-10% מהנשים באוכלוסייה המערבית מפתחות סרטן שד במהלך חייהן. ישנו גורם גנטי חשוב בהתפתחות המחלה- הסיכוי עולה פי-3 אם קרובה מדרגה ראשונה חולה. אם הופעת המחלה היא בגיל 40 או פחות מכך בקרובת המשפחה החולה- הסיכוי עולה עוד יותר (זה כי יש במשפחה זו יותר אתרים "מועדים לפורענות" ולכן המחלה בסיכוי סביר תעבור הלאה). ישנן משפחות בהן המחלה מופיעה בנשים רבות ודגם ההורשה הינו דומיננטי.

**הגנים BRCA1 & BRCA2:**

לפני כמה שנים נערכו מחקרי תאחיזה ע משפחות עם הופעה מוקדמת של סרטן השד והתגלו שני גנים שמעלים מאוד את הסיכוי לחלות. BRCA1 אחראי למחצית מהמקרים המורשים ו-BRCA2 לשליש מהם. שניהם אחראים רק ל-5% ממקרי סרטן השד הספורדיים. מוטציות בגנים אלה מעלות את הסיכוי גם לסרטן שחלות בנקבות ולסרטן השד בזכרים. לנשים הטרוזיגוטיות למוטציה בגנים אלה יש סיכוי של 80% לפתח סרטן שד במהלך חייהן. תוצרי גנים אלה הם חלבונים גרעיניים השייכים לאותו קומפלקס. הקומפלקס מזוהה עם תגובה תאית לשברי DNA דו-גדיליים. בחולים הטרוזיגוטיים רואים פעמים רבות LOH באתרי הגנים הללו בתאי סרטן.

**האם יש גורמים סביבתיים בישראל המשפיעים על החדירות של המחלה?**

לנשאות שנולדו ב-40 שנה האחרונות יש סיכון גבוה יותר לחלות מנשים הנושאות את אותן מוטציות שנולדו בשנים שלפני-כן. אולי זה קשור לשינויים באורחות החיים בדור האחרון.

**גורמים גנטיים, כלומר - modifier genes?**

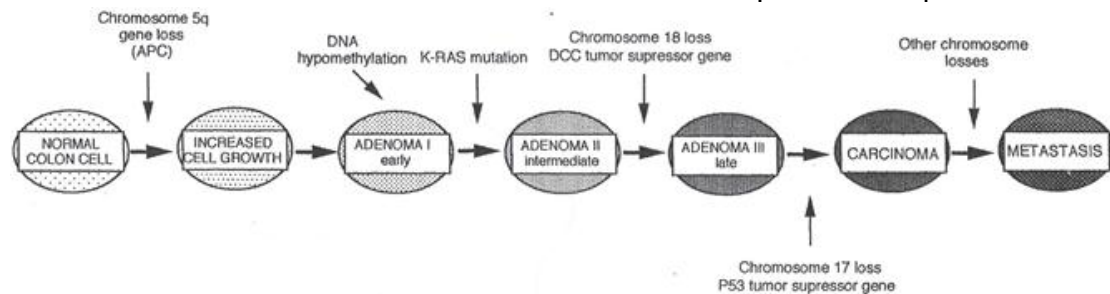
לאחרונה התגלה שלפולימורפיזם בגן RAD51 יש השפעה על החדירות של מוטציות ב-BRCA2.

**התפתחות גידול- תהליך רב שלבי:**

לקבלת גידול ממאיר נדרשים מספר שינויים גנטיים שחייברים להתרחש באותו התא. הסדר של הופעת המוטציות הוא חשוב.

**סרטן המעי הגס (Colorectal cancer):**

סרטן זה ממחיש היטב את השלבים הרבים הדרושים: לפחות 7 שינויים גנטיים דרושים ובדרך-כלל רכישתן מתרחשת במשך כמה עשרות שנים. חלק מהמוטציות הן בפרוטוונקוגנים וחלקן בגנים מעכבי גידול. חלק מהמוטציות הן אפיגנטיות.



זהו אחד מסוגי הסרטן הנפוצים ביותר. כ-5% מאוכלוסיית העולם המערבי מפתחים סרטן זה עד גיל 70. אחוז קטן מהחולים יורשים גן דומיננטי האחראי להתפתחות הסרטן. ידועים שני סינדרומים שבהם מוטציה בגן בודד מעלה במידה רבה את הסיכוי לחלות בסרטן המעי הגס:

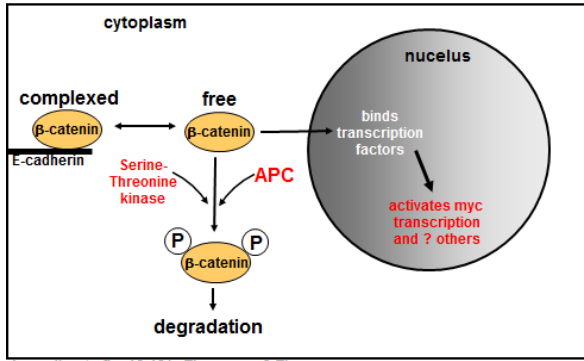
**The APC gene and FAP (Familial Adenomatous Polyposis):**

בהטרוזיגוטים ל-FAP גדלים מאות עד אלפים של פוליפים שפירים במעי המלך שני העשורים הראשונים לחיים. כמעט בכל המקרים פוליפ אחד או שניים מקבלים מוטציה נוספת ומתפתחים לסרטן ממאיר. הסרת הפוליפים מונעת את התפתחותם לסרטן- בדיקות רוטיניות גם לקרובי משפחה אך כאשר יש כל-כך הרבה פוליפים, הסיכוי שאחד מהם יהפוך מגידול שפיר לממאיר היא גבוהה יחסית. לחלק מהחולים יש גידולים ופנוטיפים נוספים- סרטן במוח, גידולים בשריר הבטן ועוד.

**הגן-APC:**

באחת המעבדות המובילות בעולם לחקר הסרטן גידלו שיש משפחות בעולם שבהן זה מורש דומיננטית ע"י LOH. חיפשו אזור בגנום שבו יש להרבה חולים חסר בגנום מצאו מרקר שהלך לאיבוד ברוב החולים בכרומוזום 5. ואז עשו: Positional cloning למציאת ה-APC.

APC הוא ה-gatekeeper של התאים האפיתליאליים של המעי. הגן מקודד לחלבון ציטופלסמי



According to fig. 16-13 in Thompson & Thompson

איבוד של APC גורם להצטברות של β-catenin חופשי בתא שעובר טרנסלוקציה לגרעין ומפעיל טרנסקריפציה של גנים האחראים לחלוקת תאים

**β-catenin**  
 בדרכי בקומפלקס עם E-cadherin  
 התא לא מתחלק  
 כאשר יש עודף של β-catenin  
 משרה APC זרחון של β-catenin והעודף מתפרק  
 כאשר התא צריך להתחלק  
 β-catenin נכנס לגרעין  
 פועל כפקטור שעתוק ומפעיל גנים כמו myc ואחרים  
 חלוקת התא

שמבקר את החלבון β-catenin, חלבון המאקטב שעתוק חלבונים שגורמים לחלוקת התא. כשהוא לא צריך להתחלק אז β-catenin מצוי בקומפלקס עם E-Cad. כשיש מוטציה ב-APC, אז β-catenin לא עובר דגרדציה, הוא מצוי בעודף וגורם לחלוקה קונסטיטטיבית של התא.

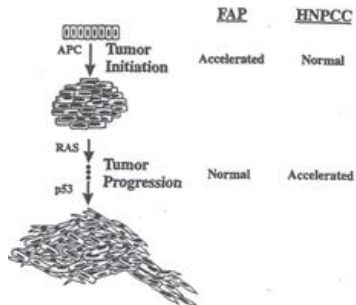
**Hereditary Non Polyposis Colon Cancer (HNPCC)**

סוג אחר של סרטן המעי הגס המופיע במשפחות אך ללא הופעת פוליפים רבים. אחראי ל 2-4% ממקרי סרטן המעי הגס. ההורשה היא אוטוזומלית דומיננטית. לגברים הטרנזיגוטיים יש 90% סיכוי לפתח במהלך חייהם סרטן זה. לנשים יש 70% סיכוי לפתח סרטן המעי ו-40% סיכוי לפתח סרטן של מעטפת הרחם. יש עליה בכיסוי לפתח סוגים נוספים של סרטן. הגידולים מופיעים בדרך-כלל בעשור החמישי לחיים.

**כיצד פוענחה הפתוגנזה המולקולרית?**

- 3 כיווני מחקר הביאו למציאת הגן הראשון מתוך חמשת הגנים שאחראים למחלה זו:
1. אנליזה של תאחיזה: משפחות גדולות רבות הראו הורשה מנדלית ותאחיזה ל-3p21 ול-2p16.
2. חיפוש אחר LOH ע"י בדיקת אללים פולימורפיים של microsatellites כמו CA repeats: במקום למצוא LOH התגלה משהו מפתיע מאוד- במקום איבוד אללים מופיעים אללים חדשים שאינם קיימים ב-DNA ברקמות הבריאות!  
**התופעה**: חוסר יציבות כללית גנומית בכל ה-di and tri-nucleotide repeats.
3. מחקר בסיסי על אמינות שכפול ה-DNA ביצורים חד-תאיים: בחיידקים ישנן מוטציות בגנים האחראים על תיקון של מצבי mismatch. לדוגמא: mutL, mutS, הידועות משמרים. במוטנטים אלה היה ידוע כי יש חוסר יציבות של חזרות קצרות.

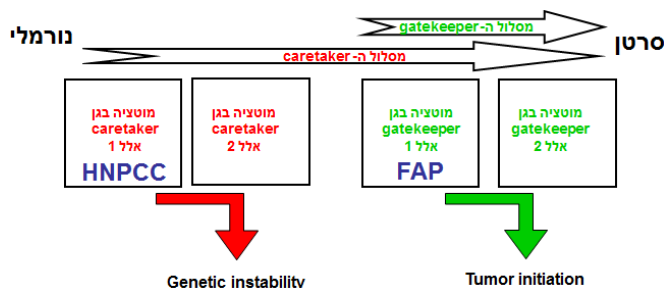
**הרעיון שהועלה**: ב-HNPCC ישנן מוטציות בגנים האנושיים ההומולוגיים ל-mutS, mutL.  
**האסטרטגיה**: הגנים ההומולוגים באדם שובטו על-סמך דמיון ברצף. הגן הראשון שמופה שובט ל-2p- ונקרא: hMSH2. הגן נבדק במשפחות עם HNPCC ונמצאו מוטציות בחלק מהמשפחות.  
**המסקנה**: ישנם מספר גנים שפועלים יחד בגרעין כדי לתקן mismatches. גנים אלה הם **caretakers**- מעורבים ב"תחזוקה" של הגנום. לבעלי מוטציה באחד מהגנים הללו יש עליה בחוסר היציבות בגנום.



**ההבדל בין APC ו-HNPCC באבולוציה של הגידול:**

כל סרטן "בוחר" מסלול אחר להתפתחות.	(15%) HNPCC	(85%) FAP
	חוסר יציבות כללית ורכישה מהירה של מוטציות	אין חוסר יציבות כללית בגנום
	לא רואים הרבה שינויים כרומוזומליים	רוב המוטציות הנוספות מתרחשות ע"י שינויים כרומוזומליים
	רכישת הפוליפים היא בקצב הרגיל כמו בשאר האוכלוסיה	המעבר מאדנומות לסרטן ממאיר הוא מאוד איטי
	ברגע שנמצא אדנומה היא חוכשת מוטציות חדשות בקצב מהיר בהרבה לעומת החולים ב-APC	

לכל אחד מהם יש מסלול אחר להתחיל את הגידול. ב-FAP הסיכוי ל-initiation גדול יותר, כי ב-HNPCC צריך שחוסר היציבות הגנטית היא זו שתגרום למוטציה ב-gatekeeper. שתי המערכות הפוכות, ל-HNPCC לוקח הרבה זמן להתחיל אך היא מתפשטת מהר (כאשר אין תיקון, המוטציות מתפשטות בקצב מהיר) ול-APC לוקח מעט זמן להתחיל אך הרבה זמן להתפשט (דרושה מוטציה שנייה ב-APC).



### השלכות קליניות ופסיכולוגיות:

- ניתן לגלות מוטציות ב-FAP ב-85% מהחולים וב-HNPCC ב-5-60% מהחולים.
- בני משפחה יכולים לבדוק האם הם נשאי המוטציה- בדיקות תקופתיות.
- מאידך- מי שאיננו נשא יודע כי איננו בסיכון גבוה יותר מאשר שאר האוכלוסייה.
- גידולים עם מוטציות ב-caretakers לא יכולים לתקן DNA ואת זה ניתן לנצל בטיפולים בסרטן- הטיפולים הכימותרפיים וההקרנות פוגעים ב-DNA, שוברים אותו וגורמים לחלוקות קיצוניות כך שהתאים הסרטניים מתים.

### Recessive inherited cancer syndromes involving chromosome instability:

#### שם המחלה: Xeroderma Pigmentosum.

אחת מהמחלות הגנטיות המורשות בהורשה אוטוזומלית רצסיבית, מעלה את הסיכוי להתפתחות גידולים סרטניים. גורמת לחולים לפתח סרטן עור לאחר חשיפה יחסית קצרה לאור. מחלה נדירה. הורשה רצסיבית מרמזת על כך שהפגם הוא בחלבון אנזימטי. חלבונים אלה מעורבים בדרך-כלל בתיקון DNA ושמירה על שלמות הגנום, גן caretaker. ברוב המחלות הללו ישנה עליה בשברים כרומוזומליים- chromosome instability.

#### דוגמאות נוספות:

המחלה	סיכון לסרטן:	רגישות ל-
Ataxia telangiectasia	לויקמיה, לימפומה	קרינה מייננת
Bloom syndrome	לויקמיה ועוד	קרינת UV
Fanconi anemia	לויקמיה	קרינה מייננת
Nijmegen breakage syn.	לימפומה	קרינה מייננת, כימיקלים
Xeroderma pigmentosum	מלנומה	קרינת UV, כימיקלים

► החשש: **הטרוזיגוטים**, הנפוצים הרבה יותר מהומוזיגוטים למוטציות, יהיו אף הם רגישים יותר לגורמים סביבתיים ובסיכון גבוה יותר משאר האוכלוסייה להתפתחות סרטן.

## דרכי הורשה לא מנדליות

### מוזאיקה:

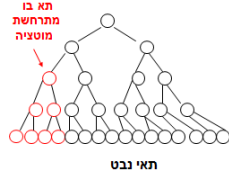
מצב שבו בפרט או ברקמה יש לפחות שני קווי תאים השונים גנטית ומקורם מאותה זיגוטה. ישנה מוזאיקה ברמה **סומטית** או ברמת **תאי הנבט**. כלומר, המוטציה התקבלה לאחר קבלת הזיגוטה בנקודה מסויימת בתהליך התפתחות העובר. ככל שהמוטציה מתרחשת מוקדם יותר בהתפתחות העוברית, כך % יותר גדול של התאים יישאו את המוטציה.

### מוזאיקה בתאי הנבט של חולה במחלה דומיננטית:

- ההורים של החולה בריאים ואינם נושאים את המוטציה למחלה.
- הפרט החולה הינו בעל מוזאיקה, ותאי המין שלו נושאים את המוטציה.
- הילדים של הפרט החולה יכולים לחלות במחלה אך לא בצורה סגמנטלית (אם הם יקבלו את המוטציה, הם יקבלו אותה בכל תאי גוף).

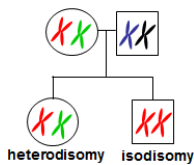
### מוזאיקה בתאי נבט בהורי הפרט החולה:

רואים במקרים נדירים של מחלה דומיננטית: שני ההורים בריאים ויש יותר מילד אחד חולה. אפשרות אחת להסבר התופעה: מוזאיקה בתאי הנבט של אחד ההורים. הערה: השאלה היא (בזמן ייעוץ גנטי) האם המוטציה בתאי הנבט קרתה רק בביצית אחת או שישנו מאגר של ביציות המכילות את המוטציה.



### Uniparental Disomy:

המצב כאשר אצל פרט מסויים שני הכרומוזומים של אותו זוג באים מאותו מקור הורי, ללא נציג מההורה השני. זה בדרך-כלל לא משנה ולא מביא לפנוטיפ, אלא אם כן מקבלים שני עותקים מאותו כרומוזום שעליו ישנו אלל רצסיבי למחלה מסויימת, ואז יהיה הפנוטיפ של המחלה.



**Isodisomy:** אותו הכרומוזום בשני עותקים.

**Heterodisomy:** זוג הכרומוזומים מהורה אחד ללא עותק מההורה השני.

הערה: תיתכן גם בכרומוזומי מין, אך מאוד נדיר.

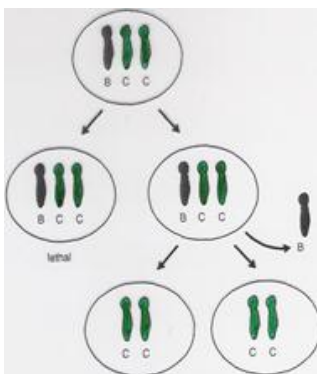
**דוגמא:** בן שירש מאביו המופיליה כיוון שקיבל ממנו את שני כרומוזומי המין (ירש ממנו גם את Y וגם את X, כאשר המופיליה בדרך-כלל לא מועברת מאב לבנו).

### השלכות של uniparental disomy במחלות אוטוזומליות רצסיביות:

**דוגמא:** CF בילד כתוצאה מאיזו-דיזומיה אימהית. במקרה זה האם נושאת מוטציה בגן ל-CF באחד מכרומוזומי 7 שלה. בשלב הראשון העובר הוא טריזומי לכרומוזום 7 ואחר-כך קורה איבוד של כרומוזום 7 האבהי. לילד יש קריטיפ שהוא לכאורה "תקין" אך הוא נושא שני עותקים של אותו כרומוזום 7 מאימו.

**בסקירת מוטציות אצל ההורים- ימצא רק הורה אחד נשא והעובר לא ייבדק עבור מוטציות בגן.**

טריזומיה באופן כללי: כאשר היא קורית בכרומוזום 21 אז יש תסמונת דאון. בכרומוזומים אחרים העובר בדרך-כלל לא מפתח. אך לפעמים בזמן החלוקות המיטוטיות בשלב מוקדם של ההתפתחות העוברית אובד אחד מהשלושה ויש "הצלה של המצב" עקב סלקציה שמביאה את רוב התאים להתפתח מהתא ובו שני כרומוזומים בלבד.





## אפיגנטיקה:

**אפיגנטיקה:** "מעל הגנים", הורשה המשפיעה על ביטוי הגנים שלא דרך רצף ה-DNA, אלא ע"י מודיפיקציה של בסיסי ה-DNA או של הכרומוטין העוטף את ה-DNA. המודיפיקציות הן בדרך-כלל מתילציות ואצטילציות. וישנה גם מודיפיקצייה שהתגלתה לאחרונה: 5hmc שכנראה קשורה לאקטיבציה של גנים.

**החתמה גנומית:** לפי עקרונות מנדל- שני ההורים תורמים באופן שווה להרכב הגנטי של הצאצא (כרומוזומי המין הם המקרה יוצא הדופן). בדרך-כלל שני האללים של כל גן פעילים- גם כאשר אלל אחד דומיננטי על-פני האלל השני.

אם לשני ההורים יש תרומה שווה,

**מדוע יש הבדל בתוצרי הכלאיים של חמור וסוס?**

האמא סוס והאבא חמור:



האמא חמור והאבא סוס:



**דוגמא נוספת - עוברים המתפתחים עם מערכת כרומוזומים לא תקינה:**

גידול של תאים  
שמתמיינים בצורה  
לא מסודרת

2 sets of <b>paternal</b> chromosomes	Hydatidiform mole	Hyperplasia of trophoblast absent fetus
2 sets of <b>maternal</b> chromosomes	Ovarian teratoma	Completely disorganised fetus
2 sets of <b>paternal</b> + 1 set maternal	Triploid fetus	Large cystic placenta, small and malformed embryo
2 sets of <b>maternal</b> + 1 set paternal	Triploid fetus	Small fibrotic placenta, underdeveloped embryo

אף הריון כזה בדרך-כלל לא מגיע אל סופו, אבל אם יש תוספת של גנום אבהי אז רואים שהעובר מפותח יותר ברקמות החוץ-עובריות. ואם יש תוספת של גנום אימהי, הרקמה החוץ עוברית כמעט ולא מתפתחת.

**עודף גנום אבהי:** רקמות חוץ עובריות מפותחות ביתר, העובר לא מפותח.

**עודף גנום אימהי:** רקמות חוץ עובריות לא מפותחות, העובר פחות פגוע.

**החתמה- באתר גנטי מסויים יהיה ביטוי שונה של האלל האבהי לעומת האלל האימהי.**

**האם יש הרבה אתרים מוחתמים? האם יש אתרים כאלה בכל הכרומוזומים?**

יוצרים הכלאות בין שני עכברים עם טרנסלוקציות רוברטסוניות שונות- התחברות צנטרומרים של שני כרומוזומים שונים. זה יכול לגרום לשני עותקים מאותה הורה של כרומוזום מסויים. מבצעים הכלאות מתאימות ובהן כמות מטען גנטי תקין ומשווים בין עכברים אלה שיש להם כרומוזום מהורה אחד בלבד לבין עכברים רגילים. לפעמים זה משפיע ולפעמים זה לא.

**דוגמא:** בכרומוזומים 2 ו-11, שני עותקים מהאם- עכברים קטנים והיפואקטיביים. שני עותקים מהאב- עכברים גדולים להיפראקטיביים.

**איתור גנים מוחתמים באזורים גנומיים מוחתמים:**

עד כה זוהו כ-50 גנים מוחתמים.

**דוגמא לשני סינדרומים בעלי פנוטיפים שונים הקשורים למערכת העצבים.**

שניהם נובעים משוני באזור מוחתם על כרומוזום-15.



Angelman syndrome (AS)

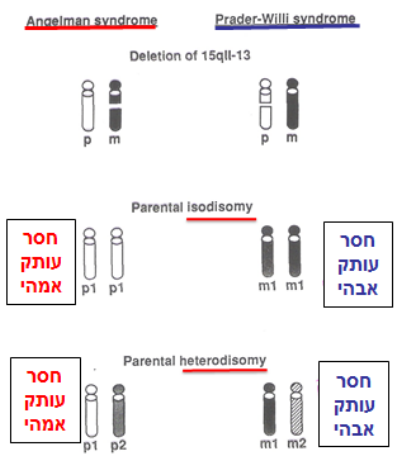


Prader-Willi syndrome (PWS)

**Angelman syndrome (AS):** אטקסיה, תנועות "puppet-like", היפראקטיביות, פיגור שכלי עמוק, צחוק "חסר קשר", לסת תחתונה גדולה, פה רחב, לשון בולטת, "happy puppet syndrome".

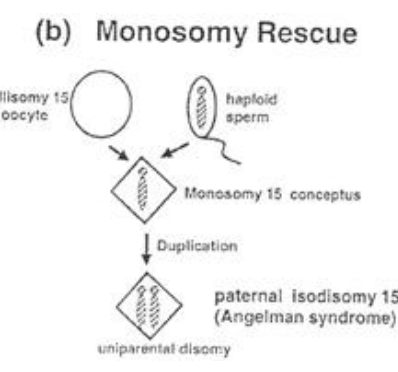
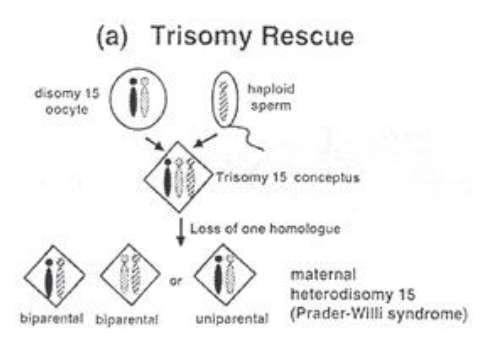
**Prader-Willi syndrome (PWS):** היפוטוניה ניאונטלית, פיגור בהתפתחות, obesity, היפו-גונדיזם, כפות ידים ורגליים קטנות, פיגור שכלי קל עד בינוני, Failure to thrive.

**כיצד מתקבלות שתי תסמונות כה שונות ע"י אותה הפרעה כרומוזמלית?**



ב-PWS החסרים תמיד בכרומוזום ממוצא האבהי.  
ב-AS החסרים תמיד בכרומוזום מהמוצא האימהי.

ניתן לקבל אחת מהתסמונות ע"י "הצלת טריזומיה" או "הצלת מונוסומיה".



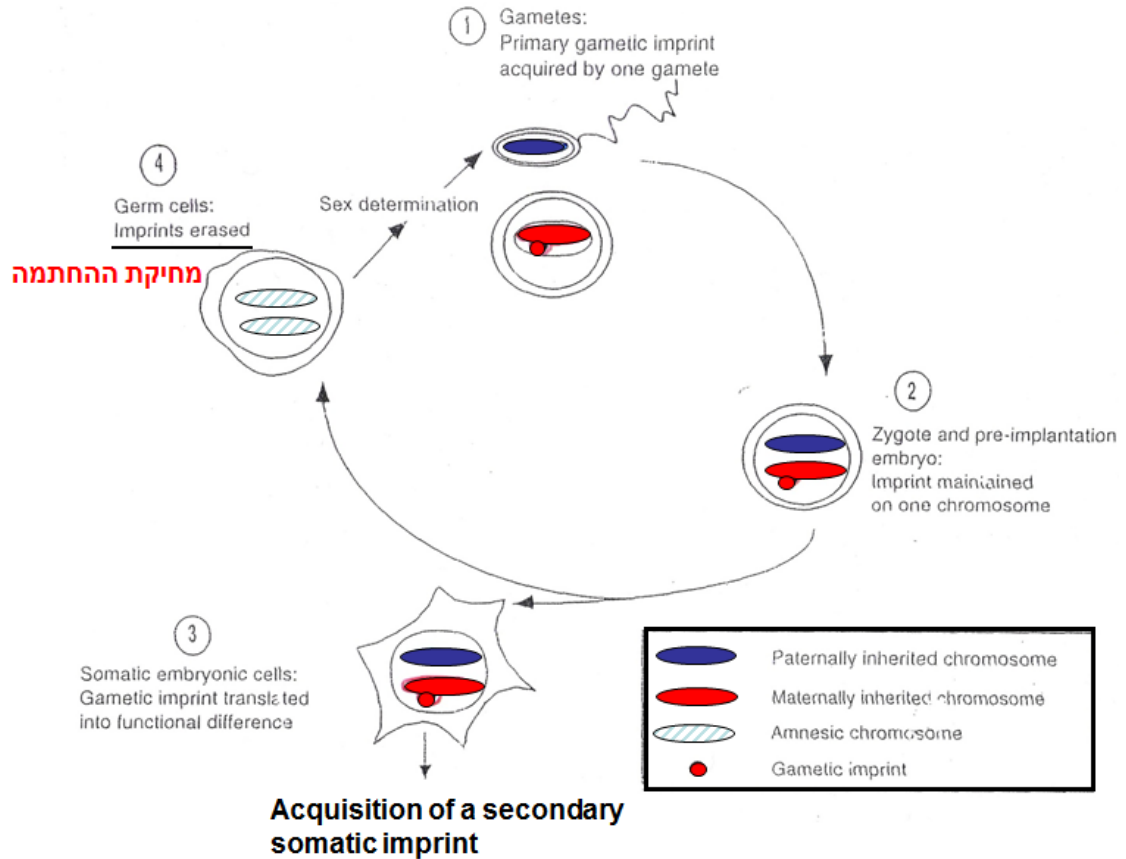
**מונוסומיה:** מתחילים מעובר שיש בו רק כרומוזום 15 אחד, אבל במהלך חלוקה מיטוטית מוקדמת נוצרה הפרעה שגרמה לשני כרומוזומי 15 ואז בסלקציה חיובית מתא זה ייווצרו מרבית תאי העובר.

**עוד מנגנון לקבלת התסמונות- פגיעה בגנים ספציפיים:**  
מדובר בשני אזורים קריטיים שונים עבור שתי התסמונות: שני גנים שונים הממוקמים באותו אזור כרומוזומלי, אך באזור זה יש החתמה הפוכה, באחד שוכן הגן ל-AS ובשני הגן ל-PWS.

**הגן ל-AS:**

Ubiquitin-protein ligase gene -UBE3A. ההפתעה- הגן מתבטא משני האללים. מדוע? גילו שיש שלב עוברי שבו במהלך התפתחות המוח רק העותק האימהי מבטא את הגן וללא כרומוזום אימהי, אין ביטוי של הגן בשלב התפתחותי זה. החתמה איננה תמיד בכל הרקמות או בכל השלבים ההתפתחותיים. במקרים רבים הגן יהיה מוחתם רק ברקמות מסוימות או רק בשלב התפתחותי מסויים.

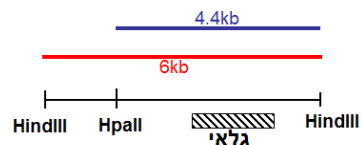
**מה קורה לאזורים מוחתמים לאורך ההתפתחות?**



בדרך-כלל השינויים הם מתילציה של DNA שיכולה לעבור מדור לדור ע"י מודיפיקציות של היסטונים. לכל כרומוזום יש "זיכרון" לגבי זהותו הקודמת- האם הגיע מזכר או מנקבה. כאשר הנקבה/הזכר מייצרים תאי מין, נמחקת ההחתמה הגנטית והתאים מקבלים החתמה בהתאם למין: אצל הנקבה שני הכרומוזומים מקבלים זהות של נקבה ואצל הזכר להפך.

**אבחון מולקולרי של החתמה- על סמך מתילציה:**

מכיוון שמתילציית DNA מעורבת בקבלת החתמה ניתן לעשות אבחון מולקולרי לפיה. **באיזור 15q11-13 ישנם הבדלי מתילציה בין העותק האמהי והאבהי** אם עותק אבהי חסר- אין מקטע של 4.4 ואז יש PWS. אם עותק אימהי חסר- אין מקטע של 6 ואז יש AS.



**העותק האמהי ממותל באיזור זה – נותן מקטע של 6kb**  
**העותק האבהי לא ממותל – נותן מקטע של 4.4kb**

**כיצד נוצרת ההחתמה?**

- השינויים האפיגנטיים כוללים מתילציה של DNA ושינויים בכרומטין.
  - ישנם אזורים בציס שמפקחים על קבלת החתמה- מאוד מוקדם בהתפתחות העוברית יש מחיקה מאסיבית של מתילציה בגנים מלבד באזורים המוחתמים, וישנם אזורי בקרה הסמוכים לאזורים המוחתמים שמבקרים את המתילציות.
  - רוב ההחתמות הן בגנום האימהי- גנום אימהי חסר החתמות דומה מאוד לגנום אבהי.
  - ישנם אנזימים שאחראים על המתילציה במהלך יצירת תאי המין, העיקרי- DNMT3A. אחד הקופקטורים החשובים לפעילותו- חלבון DNMT3L.
- הערה: יש לזכור שייטכנו מוטציות גם באזורים שאחראים על יצירת החתמה (אזורים בציס).

### סינדרום קשה כתוצאה מהפרעה באתר אחד מוחתם:

מספיק שבאזור קטן תהיה הפרעה בהחתמה כדי לקבל סינדרום קשה-AS, PWS. מה יקרה כשתהיה הפרעה כללית בהחתמה בכל הגנום? במאמר מתוארת אישה שהרתה 6 פעמים בהריונות שהתפתחו ל-hydriform moles עם תרומה של חומר גנטי משני ההורים. העובר השישי נבדק ונמצא כי:

- הוא נראה כעובר עם גנום אבהי בלבד (mole).
- מכיל גנום אימהי ואבהי ביחס נכון.
- חסר כל סימני החתמה על הגנום האימהי.

**המסקנה:** בתהליך יצירת תאין מין באישה זו נמחקו כל ההחתמות הקודמות (מצב נורמאלי) אך לא נוצרו החתמות חדשות נקביות. בגלל שרוב ההחתמות הן בגנום האימהי- העוברים נראו כאילו נוצרו רק מגנום אבהי.

### מוטציה בגן Dnmt3L בעכברים:

Dnmt- DNA methyl transferase. העכברים מתפתחים באופן נורמאלי, אך ההפרעה מתבטאת בתאי המין ובדור הבא: הזכרים ההומוזיגוטים חסרי זרע. בנקבות ההומוזיגוטיות יש התפתחות של ביציות אבל: עוברים הטרוזיגוטיים שמתפתחים בתוך עכברה הומוזיגוטית, מתים מוקדם בהתפתחות מייד לאחר השרשה. אין החתמה אימהית (כלומר, גנים ממקור אימהי אינם מוחתמים כראוי). כל שאר המתילציה בגנום תקינה. נבדקה האישה עם 6 העוברים, ואיננה נושאת מוטציה בגן זה. מסתבר ש-Dnmt3L הינו קופקטור עבור שני אנזימים המבצעים מתילציה בהתפתחות העוברית: Dnmt3a and Dnmt3b. כשאין Dnmt3a יש איבוד של החתמה אימהית.

### השתקה אללית – Allelic inactivation:

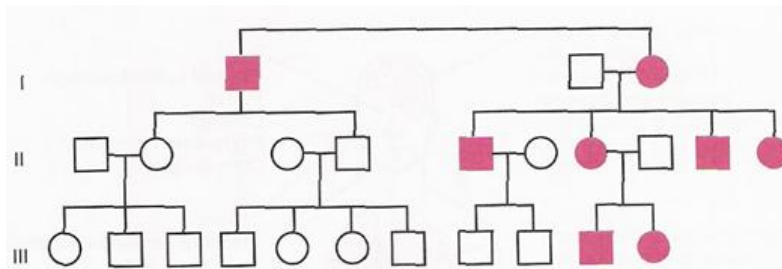
**הכלל:** שני האללים בכל גן מתבטאים. **היווצרים מן הכלל:** כרומוזום X המושתק בנקבות יונקים. הגנים המוחתמים. קבוצות גנים שבהם רק אלל אחד מתבטא, ללא החתמה.

כיום ידועות מספר קבוצות גנים שבהם אלל האללים מושתק. בכמה מהן מובן "ההיגיון הביולוגי". לדוגמא: בגנים לאימונוגלובינים- כל תא צריך לבטא רק שרשרת אחת כבדה ואחת קלה. במקרה זה הביטוי של האלל קשור ישירות לסידור מחדש של ה-DNA הגנומי.

- ביטוי מונו-אללי יוצר שונות בתבניות הביטוי של גנים.
- 371 גנים זהו שמתבטאים בצורה מונו-אללית (כ-10% מהגנים שנבדקו).
- חלק מקבוצה זו לפעמים מתבטאת בצורה בי-אללית.
- בשורות תאים קלוניאליות יש שונות בתבנית הגנים המתבטאים בצורה מונו-אללית.
- לא ברור עדיין איך זה נוצר בתאים סומטיים.
- תופעה זו יכולה להשפיע מאוד במצבים של haploinsufficiency או במצבים של איבוד פונקציה של tumor suppressor genes- אם האלל הנורמאלי מושתק והאלל השני הוא מוטנטי אז יש פנוטיפ של מחלה.

## הורשה מיטוכונדראלית:

האמא מעבירה את המחלה לילדיה והאב לא מעביר אותה.



### דוגמא- מחלת LHON- Leber's Hereditary Optic Neuropathy:

איבוד ריאה דו-צדדי מהיר- מוות של עצב הראיה. חולים גברים ונשים צעירים. כל החולים קרובי משפחה דרך אם משותפת. גברים חולים אף-פעם לא מעבירים בהורשה את המחלה.

## המיטוכונדריה- "הכרומוזום ה-24":

- המיטוכונדריה היא אברון תוך תאי האחראי ליצירת אנרגיה.
  - בכל תא יש אלפי מיטוכונדריות.
  - בכל מיטוכונדריה יש 2-10 עותקים של ה-DNA המיטוכונדריאלי.
  - במיטוכונדריה מתרחשים מעגל קרבס ותהליך החמצון הזרחוני.
  - חמישה קומפלקסים אינזמטיים גדולים אחראים על שרשרת מעבר האלקטרונים ויצירת ATP.
  - סה"כ מעורבים בתהליך זה 80 חלבונים. מלבד 13- כולם מקודדים בגרעין.
- הערה: אפשר לקבל פנוטיפ לא תקין במיטוכונדריה גם ע"י גנים המקודדים במיטוכונדריה וגם ע"י גנים ב-DNA הרגיל- מחלה מנדלית.

### שריד לחיידק קדום?

ה-DNA המיטוכונדריאלי הוא מעגלי. גודלו כ- 16.5 kb. הוא מקודד ל-13 גנים (מעורבים בזרחון המחמצן), ל-22 tRNA, ל-2 rRNA.

הוא מאוד קומפקטי. יש ניצול של כמעט כל הגנום. הקוד הגנטי שונה במקצת ודומה לזה של חיידקים. ישנה השערה כי זוהי סימביוזה של חיידק קדום. יש ב-DNA המעגלי origin of replication, ישנם heavy ו-light strand (הירוק והאדום) כתלות במספר ה-CG. בתהליך השכפול יש מקטעים שנשארים חד-גדיליים למשך כמה דקות והם לעיתים אובדים בגלל זה.

### מוטציות במיטוכונדריה:

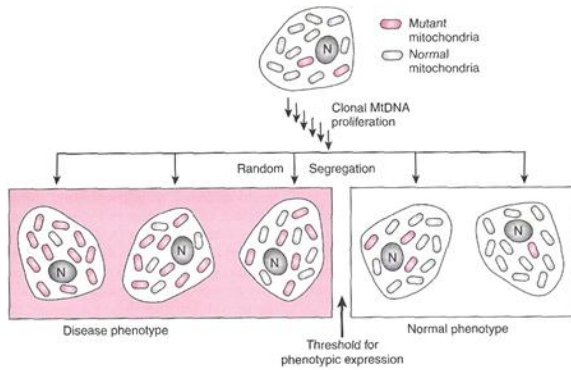
ה-proof reading מאוד נמוך, יש צבירת מוטציות גדולה יחסית ל-DNA שבגרעין. רצף הנוקליאוטידים משתנה פי 6-17 מהר יותר לעומת ה-DNA הגרעיני. האזור שמשתנה הכי הרבה הוא אזור ה-D-loop שאינו מקודד. חלק גדול מהשינויים הם ניטראליים. שינויים אלה מתפשטים באוכלוסיה בסחף ניטראלי ובעזרתם ניתן לעקוב אחרי נדידת המרכיב האימהי של האוכלוסיות. בהשוואה בין שני פרטים אקראיים- ייתכנו 15-30 הבדלים ברצף המיטוכונדריאלי, כתלות במידת הקרבה דרך האם.

## הורשה מיטוכונדראלית:

- ההורשה של mtDNA היא תמיד אימהית. ה-DNA המיטוכונדריאלי של תא הזרע נהרס לאחר שהוא חודר לביצית המופרית.

- ישנם מצבים שבהם יש יותר מסוג אחד של mtDNA בתא.
  - Homoplasmy**: כל ה-mtDNA בתא זהים.
  - Heteroplasmy**: יש יותר מסוג אחד של mtDNA בתא.

אופן ההורשה של מחלות מיטוכונדריות תלוי בהומופלסמיה/הטרופלסמיה.



- מולקולה מוטנטית אחת עלולה בסופו של דבר להתבטא בפנוטיפ בגלל סגרגציה אקראית של mtDNA בעת חלוקת התא. יכול לקרות סחף אקראי שבו דווקא המוטציה הזאת משתלטת- יש חלוקה אקראית של המולקולות ואז ניתן להגיע למצב שיש תאים המבטאים את הפנוטיפ ויש תאים נורמאליים.
- בפרט מסויים בעל הטרופלסמיה- ברקמות שונות יהיו אחוזים שונים של mtDNA

מוטנטי. **ברקמות מתחלקות** בקצב מהיר תיתכן סלקציה נגד המולקולות המוטנטיות- דבר שיוביל להומופלסמיה של המולקולות התקינות. **ברקמות שאינן מתחלקות** בקצב מהיר כיוון שעברו התמיינות סופית, המיטוכונדריות תמשכנה להתחלק ואחוז המולקולות המוטנטיות יעלה עד שהתא ימות. רקמה שמתחלקת הרבה- צריכה הרבה אנרגיה. אם המוטציה פוגעת בייצור האנרגיה בתא אז יש סלקציה לכיוון תאים חסרי מוטציות. ודווקא בתאים ללא קצב חלוקה מהיר יכולה להיות השתלטות של המוטציות עד כדי ביטוי של פנוטיפ.

- המיזוג בין מולקולות תקינות ומולקולות מוטנטיות באותו התא אינו מוביל למיזוג פנוטיפי הדרגתי ישנו "אפקט הסף" - **Threshold effect**. כאשר אחוז המולקולות המוטנטיות מגיע ל- 60-90% יש אפקט ← מופיע פנוטיפ.
- ישנו הבדל בין הרשמות ב-threshold effect לפי דרישת האנרגיה של אותה רקמה. הפגיעות יותר הן: המוח, שרירי השלד, הלב, הכליות, הכבד.

### מחלות ממוטציות במיטוכונדריה:

- מוטציות שפוגעות באחד מהחלבונים המקודדים במיטוכונדריה.
- מוטציות בסינתזת כל החלבונים של המיטוכונדריה (ב-tRNA או ב-rRNA).
- מוטציות של depletion- פוגעות בדרך-כלל בסינתזת ה-mtDNA.

**מוטציות קלות:** בדרך-כלל הומופלסמיות. קשורות בדרך-כלל למחלות עם גיל הופעה מאוחר. יכולות להופיע ב-lineage מסויים (קבוצת אנשים ממקור גנטי משותף). מוטציות "עתיקות" יותר.

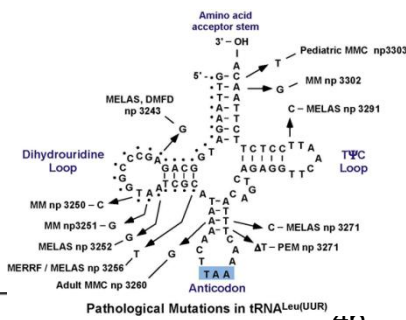
**מוטציות חמורות:** הטרופלסמיות. יכולות להראות טווח רחב של תופעות קליניות כתלות באחוז המולקולות המוטנטיות וההתפלגות ברקמות הנגועות. מוטציות "חדשות" יותר.

**המוטציות שפוגעות בגן לאחד החלבונים בד"כ קלות יותר ממוטציות בגן ל-rRNA או ל-tRNA כיוון שבמקרה השני יש פגיעה בסינתזת כל חלבוני המיטוכונדריה.**

**יתר מולקולות מוטנטיות**  
 Neurosensory hearing loss  
 Mitochondrial myopathy  
 Ragged red fibers  
 And -  
 Myoclonic epilepsy  
 (MERRF)

**פחות מולקולות מוטנטיות**  
 Neurosensory hearing loss  
 Mitochondrial myopathy  
 Ragged Red Fibers (RRF)

גם המוטציות ב-tRNA יכולות להראות פנוטיפים שונים בחומרם לפי אחוזי המולקולות המוטנטיות ברקמות הנגועות, לדוגמא- מוטציה ב-tRNA שמקודד ל-leucine



השונות בפנוטיפים נובעת ממיקום המוטציות וממספר המולקולות המוטנטיות.

### מוטציות בסדר גודל קטן לעומת מוטציות בסדר גודל גדול:

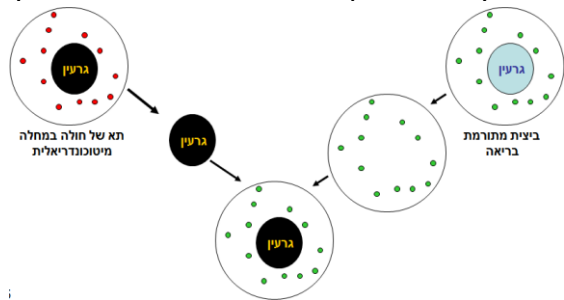
המוטציות הקודמות שתארנו הינן מוטציות נקודתיות הפוגעות בגן אחד. לעומתן יש מוטציות במיטוכונדריה הגורמות לחסרים גדולים הכוללים מספר גנים: **Rearrangement mutations**. סידורים מחדש של מיטוכונדריה יכולים לגרום לכך שיהיו בתא תערובת של מולקולות תקינות, מולקולות עם חסרים ומולקולות עם חלקים מוכפלים.

### מוטציות סומטיות במיטוכונדריה והזדקנות:

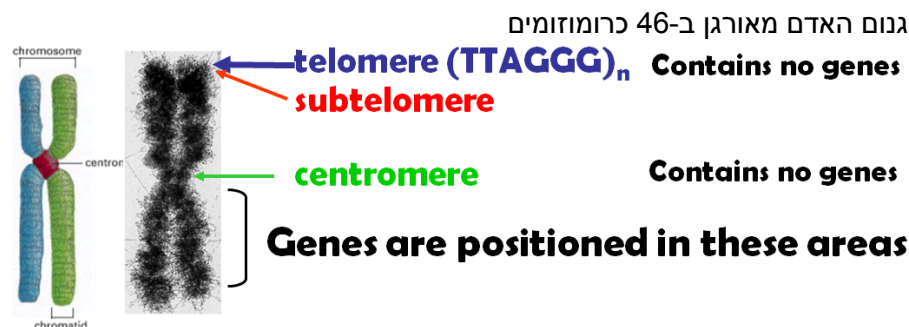
- פעילות האנזימים המעורבים בפוספורילציה מחמצנת יורדת עם הגיל בשריר, בכבד ובמוח. מרגישים יותר עייפים.
- במהלך השנים יש הצטברות של מוטציות סומטיות ב-mtDNA.
- ייתכן מאוד שהצטברות מוטציות ב-mtDNA מהווה פקטור חשוב בירידה בתיפקוד רקמות עם הגיל.
- חלק גדול מהמחלות המיטוכונדריות מופיעות בגיל מאוחר.
- ייתכן שהצטברות של מוטציות סומטיות עם הגיל בנוסף למוטציה מקורית מביאה את התא לסף שמעבר לו מופיע הפנוטיפ.

### החשיבות של DNA מיטוכונדריאלי ושיבוט:

דולי- הכבשה המשובטת: אמנם ה-DNA הגרעיני נלקח מכבשה בוגרת אך ה-DNA המיטוכונדריאלי מקורו בביצית שממנה הוצא הגרעין. נשים עם מחלה מיטוכונדריאלית שאינן רוצות להוריש אותו לילדיהן- יכולות לקבל תרומת ביצית מאישה שאין לה את המחלה.



## מבנה של כרומוזומי האדם

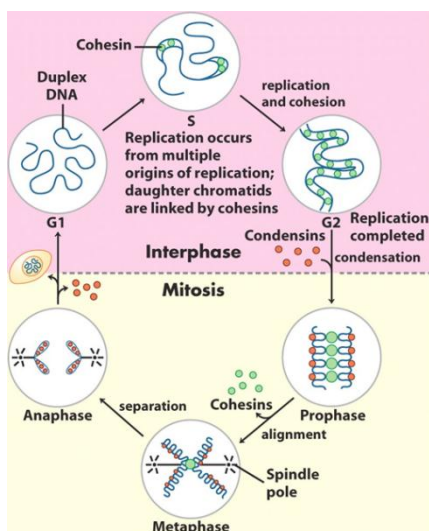


גנום האדם מאורגן ב-46 כרומוזומים

**telomere (TTAGGG)<sub>n</sub> Contains no genes**  
**subtelomere**

**centromere** Contains no genes

**Genes are positioned in these areas**



### מבנה הכרומוזומים משתנה במהלך מחזור התא:

אינטרפאזה: DNA לא דחוס.

מיטוזה: DNA דחוס.

הקונדנסציה של ה-DNA מתחילה בפרופאזה ושיאה במטאפזה.

בתחילת שלב ה-G1 ה-DNA נהיה לא דחוס.

שלב המיטוזה הוא מאוד קצר, יכול להיות רק 2% ממחזור התא. לתאים שונים יש משך זמן שונה של G1.

**condensins**: החלבונים שאחראים לכיווץ הכרומוזומים.

### הכנת כרומוזומים:

#### ניתן להכין כרומוזומים מ:

- דם טרי (לימפוציטים).
- קווי תאים שגרמו להם להיות בעלי פוטנציאל גדילה אינסופי.
- ביופסיה של תאי עור (פיברובלסטים).
- תאי עצם.
- מי שפיר או סיסי שלייה.

#### הכנת כרומוזומים מדם:

- מגדלים תרבית של תאים.
- מוסיפים קוצלמיד: חומר שמפרק את סיבי הכישור, מה שגורם לתאים להיתקע בשלב המטאפזה.
- שמים את התאים בתמיסה היפוטונית- התאים מתנפחים והממברנה נהיית מאוד דקיקה.
- מבקעים את התאים ומטפטפים אותם על slide.
- הממברנה מתפוצצת ומה שנשאר דבוק ל-slide זה גרעיני התאים.
- מפוצצים את הגרעין ומקבלים את הכרומוזומים מפוזרים על ה-slide ואז צובעים אותם.

**הכנת כרומוזומים ממי שפיר:** ניתן לבצע זאת החל מהשבוע ה-14 בהריון. תחילה מגדלים את התאים על הצלחת כדי שיהיו מספיק תאים לבצע את הבדיקה.

**הכנת כרומוזומים מסיסי שלייה:** מבצעים בשבועות 10-12 בהריון. עושים ביופסיה לסיסי השלייה כי זה מאפשר בדיקה בשלב מוקדם יותר של הריון, ועושים זאת כשיש סיבה טובה לכך.

### ניתוח כרומוזומים:

בהתחלה כשהיו צובעים כרומוזומים, הצביעה הייתה הומוגנית- כל הכרומוזום צבוע בצבע אחד. והבדילו בין הכרומוזומים לפי הגודל והצורה. הכרומוזומים מוספרו לפי אורכם (אבל עשו טעות ו-21 יותר אורך מ-22).



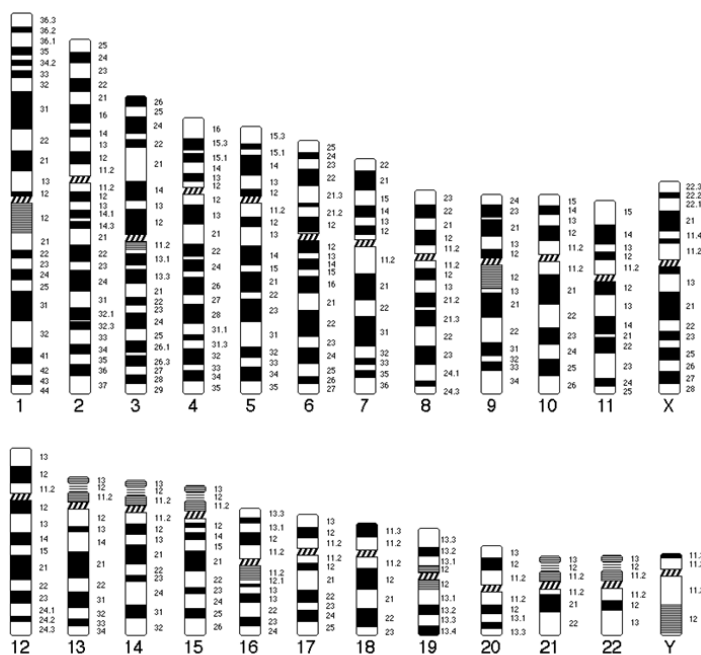
**שיטות לצביעה עם פסים:**

בתחילת שנות ה-70 פיתחו שיטה שמפספת את הכרומוזומים. לכל כרומוזום יש תבנית של פסים שחוזרת על עצמה.

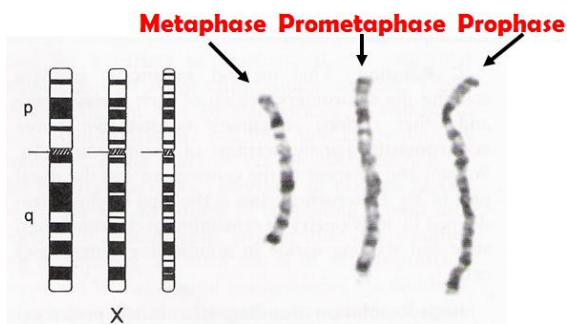
**קרייטיפ:** לכל מין (sex) יש קבוצה של כרומוזומים. הקרייטיפ מאפיין במספר וצורת הכרומוזומים.

**G-banding:** השיטה הנפוצה ביותר להכנת קרייטיפ:

- שמים את הכרומוזומים על slide.
  - מטפילים בהם עם טריפסין אשר מעכל את המרכיבים החלבוניים של הכרומוזום.
  - צובעים את ה-slide עם Giemsa (נוזל כחול).
- אזורים כהים: מקומות בהם הכרומוזום יותר מכווץ ולכן הטריפסין פחות מעכל אותו.  
אזורים בהירים: מקומות פחות מכווצים.
- Ideogram של כרומוזומים של האדם:** (תמיד מעמידים למעלה את הזרוע הקצרה יותר)



**הערה:** ישנן תוכנות שניתן להזין להם תמונת של קרייטיפ שצולמה במצלמה.

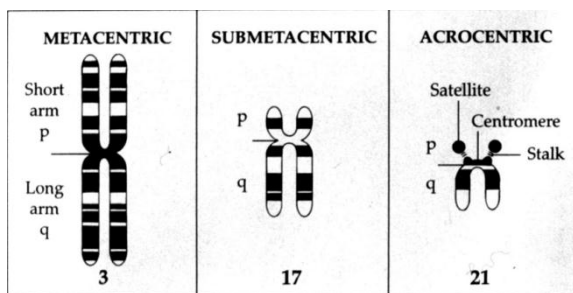


לכרומוזום X יש 3 מצבים של כיווץ כשמותחים את הכרומוזום מתגלים עוד פסים. כשרוצים לבדוק משהו צאוס ספציפי עדיף לעבוד עם כרומוזומים בשלב בו הם הכי ארוכים כי אז רואים יותר פרטים.

**ארגון הגנום לפי סוגי הפסים:**

**G-bands (dark G bands):** אזורים עשירים ב-AT, מעט גנים שרובם אופייניים לרקמה מסויימת, הרבה CpG Islands, L1 repeats, מעט CpG Islands. אלה אזורים שמשתכפלים מאוחר בשלב ה-S.

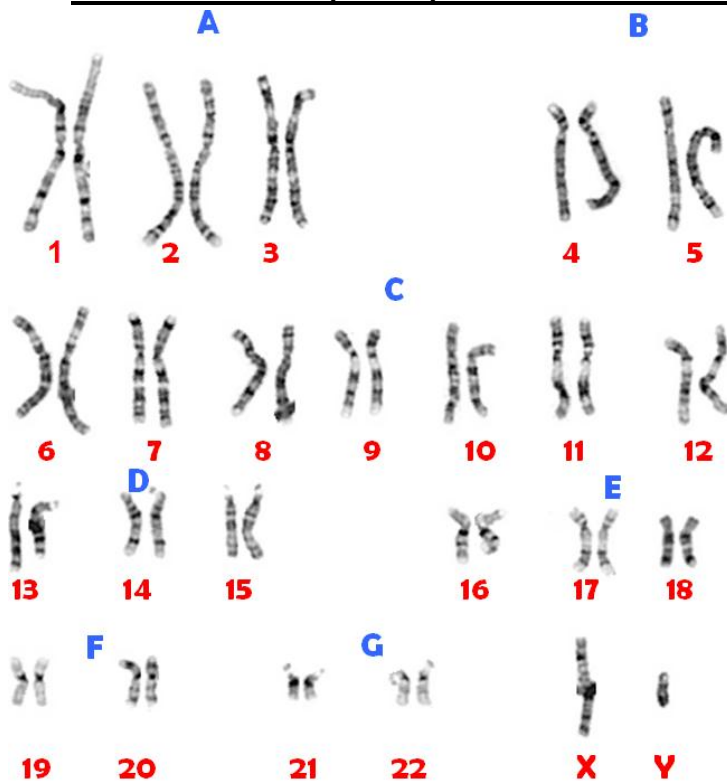
**R-bands (light G bands):** אזורים עשירים ב-GC, רוב הגנים, למשל housekeeping genes וגם גנים שאופייניים לרקמה מסויימת, הרבה Alu repeats, הרבה CpG Islands. אלה אזורים שמשתכפלים מוקדם בשלב ה-S.



**P:** הזרוע הקצרה של הכרומוזום  
**q:** הזרוע הארוכה של הכרומוזום.  
 הגנים ל-18s ו-28s מסוג rRNA ממוקמים בזרוע ה-P (הקצרה) של כרומוזום אקרוצנטרי.

**הכרומוזומים באדם מחולקים ל-7 קבוצות לפי גודל וצורה:**

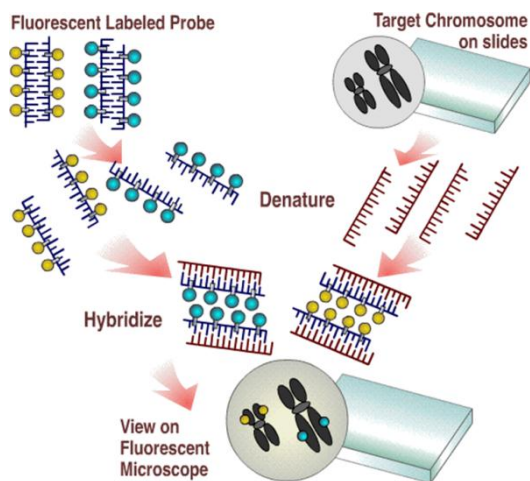
X שייך לקבוצה C.  
 Y שייך לקבוצה G.



**FISH- Fluorescence In-Situ Hybridization**

זו שיטה למיפוי של רצפי DNA על-גבי הכרומוזומים.

- מכינים DNA חד-גדילי לבדיקה.
- לוקחים prob מסומן רדיואקטיבית. הוא מוצא את המקום הנכון לזיווג (גם הוא חד-גדילי).
- היום- משתמשים בסימון לא רדיואקטיבי ומדוייק יותר, למשל: ביוטין.
- לאחר שה-prob נדבק למקום הנכון בכרומוזום לוקחים נוגדן שניוני שמכיר את הביוטין ואליו מחברים חומר פלואוריסנטי כדי שאפשר יהיה לראות.

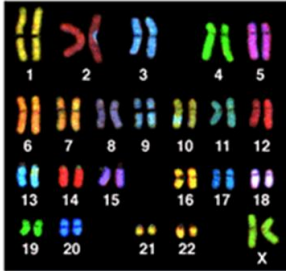


לכרומוזומים יש מקומות קבועים שהם תופסים בתוך הגרעין, יש קורלציה גבוהה בין הביטוי למיקום בגרעין- קרוב לעטפת הגרעין- נטייה להשתקה, קרוב למרכז- נטייה לביטוי.  
 ל-prob-ים שונים יש דגם שונה של היברידיזציה וסימונים במיקומים שונים בתוך הגרעין.

### דוגמאות ל-FISH:

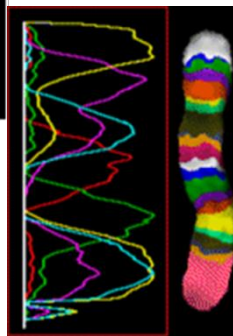
- **STS:** אזור בקצה של כרומוזום X. ניתן לגלות ע"י הסימון שיש למשל deletion באחד משני כרומוזומי X.
- אזורים ששוכפלו-אמפליפיקציות, וגם תוספות של כרומוזומים לכרומוזומים אחרים.
- probe לצנטרומרים.
- probe לטלומרים, לדוגמא: להשוות בין מיקומם באדם ובעכבר.
- זיהוי של כרומוזום שלם.

**יתרון בשיטה:** צביעה בצבעים פלואוסינטיים שונים מאפשרת זיהוי של probe-ים רבים בו-זמנית.



**SKY:** שיטה ובה לכל כרומוזום צבע אחר. ניתן לזהות כך טרנסלוקציות של כרומוזומים.

**M-FISH:** שיטה שעובדת על עיקרון טכנולוגי שונה וגם נותנת צביעה של כרומוזום בצבע שונה.



**M-bands:** בדיקה עוד יותר מתקדמת אבל מאוד יקרה: חותכים בלייזר חתיכות של כרומוזום- כל בנד לחוד מסומן בצבע אחר.

### מתי כדאי לעשות בדיקה כרומוזומלית:

- כאשר חושדים בסינדרום גנטי שיכול להיגרם מקריוטיפ לא מאוזן, למשל: FFT (התינוק לא גדל טוב), פנים בעלות צורה מוזרה, כאשר לא ברורה הזוהות המינית.
- הריונות שמסתיימים במוות תוך-רחמי, כנראה נובע מחוסר איזון כרומוזומלי.
- בעיות פוריות, למשל: נשים שאין להן מחזור.
- היסטוריה משפחתית של בעיות כרומוזומליות.
- סרטן: בדיקה כרומוזומלית יכולה לספק דיאגנוזה לגבי התקדמות המחלה.
- נשים שנכנסות להריון בגיל מבוגר, כדאי לעשות את הבידקה כי יש להן סיכון גבוה יותר להריונות עם חוסר איזון כרומוזומלי.

### סרטן וציטוגנטיקה:

**HSRs:** אזורים בעלי הומוגניות בצביעה. ניתן כך לזהות אמפליפיקציה של אונקוגנים.

**Double minutes:** מחוץ לכרומוזום ישנם הרבה עותקים ב-DNA מעגלי, מאזור קטן בכרומוזום המכיל אונקוגן. לקטעים אלה אין צנטרומר או טלומר- הם לא יציבים וכשהתא מתחלק הם לא נחלקים חצי-חצי בין תאי הבת.

**טרנסלוקציה של Bcr/Abl:** קטע מכרומוזום 9 נדבק ל-22 וכתוצאה מכך האונקוגן עובר סמוך לאזור בגנום שבו יש פרומטר מאוד פעיל.

**CGH-Comparative Genome Hybridization:** מסמנים DNA רגיל ו-DNA מגידול, כל אחד מהם צובעים בצבע אחר: ירוק ואדום. כאשר ישנה אותה כמות- מקבלים צבע צהוב. כאשר יש יותר מאחד מהם, מקבלים יותר ירוק או יותר אדום (סוג הצביעה נקרא: DAPI).

## ציטוגנטיקה קלינית

### הפרעה במספר הכרומוזומים:

**Aneuploidy:** מספר כרומוזומים שאיננו כפולה של המספר ההפלואידי- $n$ , כלומר שאיננו  $2n$ .

**טריפלואידיה:**  $3n$ .

**טטראפלואידיה:**  $4n$ .

**מונוסומיה:** עותק אחד בלבד של כרומוזום מסוים.

**טריסומיה:** שלשה עותקים של כרומוזום מסוים.

**טריסומיה 21:** ההפרעה הכרומוזומלית הנפוצה ביותר. זו היא הטריזומיה החיונית היחידה מבין הטריזומיות של האוטוזומים.

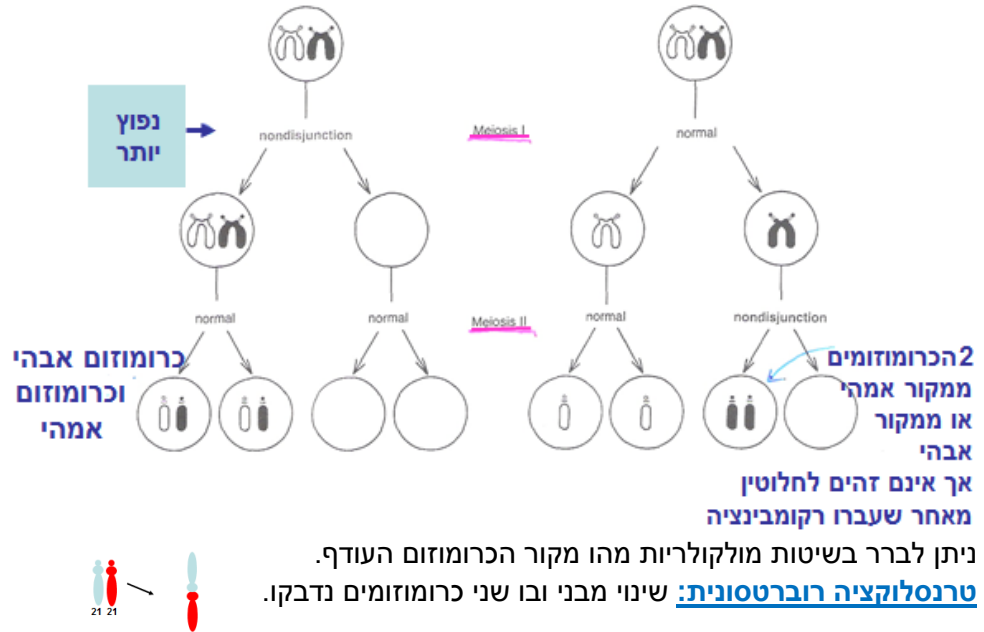
**טריזומיה 13 ו-18:** לעיתים נולדים תינוקות חיים, אך משך חייהם קצר. תסמונות מאוד קשות.

### Non-disjunction:

הסיבה הנפוצה ביותר לקבלת טריזומיה:

1. שני הכרומוזומים מגיעים לאותם שני תאי בת (כרומטידה אחת לכל תא).

2. שתי כרומטידות אחיות לא נפרדו- בתא בת אחד יש 2 כרומטידות כמעט זהות (רקומבינציה).



### עודפים בכרומוזום 21:

#### תסמונת דאון:

טריסומיה 21. הסיבה הגנטית השכיחה ביותר לפיגור שכלי. רוב העוברים (75%) מופלים ספונטנית. 1%-מוזאיקות, פנוטיפ פחות חמור. הסיבה היא בדרך-כלל Non-disjunction אך זה יכול להיגרם גם מטרינסלוקציה רוברטסונית. הסיכון לכך עולה בעיקר בנשים מעל גיל 35.

#### היפוטוניה:

- **תווי פנים אופייניים:** עיניים מלוכסנות, פה קטן, לשון בולטת, גשר אף שטוח, צוואר קצר, עודף עור בצוואר, אוזניים נמוכות.
- כפות ידיים קצרות, Simian crease, רווח בכפות הרגליים בין הבוהן ושאר האצבעות.
- פיגור שכלי.
- מחלת לב מולדת

- סיכוי גבוה לפתח לוקמיה, פי 20-18 יותר לעומת אוכלוסיה נורמלית (יש להם חלק עודף של כרומוזום 21 ושם כנראה יש אונקוגן).
- אופי נוח.
- תוחלת חיים: מחצית מגיעים לגיל 50 ורק שביעית לגיל 68.
- כולם סובלים מסניליות מוקדמת דמויית מחלת אלצהיימר (על כרומוזום 21 יש גן שידוע שהוא מעורב באלצהיימר).

### מדוע כרומוזום עודף אחד גורם לפנוטיפ כה אבנורמלי?

בכרומוזום 21 יש מעט גנים- אחרת הטריזומיה לא הייתה חיונית. לרבים מהגנים יהיה ביטוי 150% מהנורמלי ולעיתים ה-dosage חשוב מאוד. לעיתים יש טריזומיה חלקית של כרומוזום 21. ע"פ הפנוטיפ של פרטים אלה ניתן ללמוד על הקשר בין אזורים מסויימים בכרומוזום ומרכיבים מהפנוטיפ. בעיקר הפסים הבהירים (איפה שיש הרבה גנים) טריזומיה בהם גורמת לפנוטיפ לא תקין.

### כרומוזומי המין וקביעת המין:

יחסית להפרעות של אוטוזומים- הפנוטיפ קל יותר.

#### תסמונת קליינפלט (XXY):

1/2 מהמקרים- טעות במיזוג I באב.

1/3 מהמקרים- טעות במיזוג I באם.

1/6 מהמקרים- טעות במיזוג II או במיזוג פוסט-זיגוטי.

הפנוטיפ: פרטים גבוהים ורזים, חוסר התפתחות מינית- אשכים קטנים, סימני מין משניים לא מפותחים, לרוב אינם פוריים. לחלקם הפרעות למידה. 15% מהפרטים הם מוזאיקות. בעלי גופי בר. רוב תאי המין שלהם תקינים (כנראה שיש סלקציה נגד התאים שלא תקינים).

#### תסמונת 47,XXY:

טעות במיזוג II אצל האב.

הפנוטיפ: אין פנוטיפ אבנורמלי ברור. אינטליגנציה נורמלית, סיכוי מוגבר לביות התנהגות, גבוהים מעל לממוצע, פוריים. אין עליה בסיכויים לילד עם בעיה כרומוזומלית. גברים רבים עוברים את כל חייהם עם שני Y ובכלל לא מודעים לכך. בעבר טענו כי גברים אלה הם יותר אלימים.

#### טריזומיה X:

הטעויות כמעט תמיד במיזוג באדם, בדרך-כלל במיזוג I.

הפנוטיפ: גבוהות מהרגיל, ירידה ב-IQ, בעיות למידה. שני כרומוזומי X מושתקים ומשוכפלים מאוחר.

#### תסמונת טרנר (X0):

לעומת שאר הסינדרומים- סינדרום זה ניתן לזיהוי מייד עם הלידה.

1-2% מההריונות נושאים פגם זה, אך 99% מהם מופלים ספונטנית.

כמה קרויטיפים אפשריים: 50%: X,45. 15% מוזאיקות- 45,X/46,XX.

היתר הינם: 46,X,Xp, 46,X,Xq, 46,X,i(Xq), 46,X,i(Xq), (חסרים זרוע p או q של אחד ה-X).

הפנוטיפ: קומה נמוכה, חוסר התפתחות הגונדות, תווי פנים אופייניים, Webbed neck- צוואר רחב יותר כתוצאה מ-cystic hygroma בזמן עוברי- את זה ניתן לבדוק בעובר ב"בדיקה שקיפות עורפית", קו שיער אחורי נמוך, חזה רחב, עליה בתדירות הפרעות כליתיות וקרדיו-וסקולריות, אינטליגנציה נורמלית או מעל הממוצע.

מסקנה: אי-אפשר להסתדר עם כרומוזום X יחיד. ב-Y ישנם גנים הומולוגיים ל-X הנחוצים לגוף בשני עותקים. האזור שמקביל לאזור הפסאודואוטוזומלי ב-Y לא עובר השתקה בכרומוזום X הלא פעיל וכתוצאה מכך יש גם לנקבות וגם לזכרים שני עותקים פעיליות מגנים באזור זה.

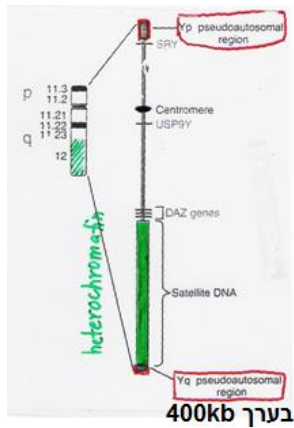
הערה: האזור הפסאודואוטוזומלי מכיל 12 גנים. חלה בו רקומבינציה בתדירות רבה.

תסמונת טרנר למעשה נגרמת מ-Haploinsufficiency.

**Deletions באזור הפסאודואוטוזמלי גורם לגובה נמוך:**

**SHOX:** דוגמא לגן הנחוץ בשני עותקים, כנראה אחראי לקומה הנמוכה בתסמונת טרנר. הצליחו לזהות אזור המצוי ממש בקצה של כרומוזומי X ו-Y בגודל 700kb. האזור מופה על סמך 50 הפרעות כרומוזומליות באיזור Xp22. לאחר-מכן הוכן cosmic contig והאזור הקריטי צומצם ל-170kb. ואז נעשה חיפוש גנים באזור זה ו-3 clones חיוביים מספריית cDNA מופו לקוסמיד 34F5. כולם לק מגן שנקרא: SHOX- Short Strature Homeobox- containing gene.

**כרומוזום Y:**



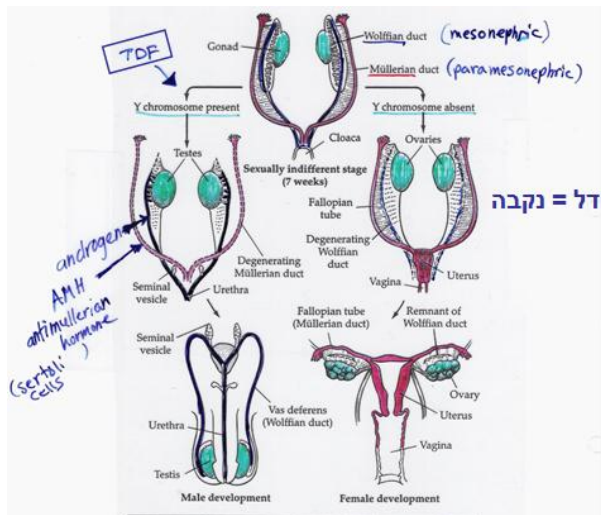
recombines  
Non-recombining Y (NRY)  
95% of the chromosome  
recombines

ב-1959 הסתבר שבעלי קרוטיפ X,45 הינן נשים ו-47XXY הינם גברים. כלומר: פרט הינו נקבה בגלל חוסר ה-Y ולא בגלל מנה כפולה של X. ב-95% מהכרומוזום לא קורית רקומבינציה. האם מלבד הגנים לקביעת המין יש עוד גנים על כרומוזום Y? היום ידוע כי יש כ-50 גנים או משפחות גנים על Y:

- גנים באזורים פסאודואוטוזומלים (בקצוות).
- גנים שממוקמים ב-NRY ויש להם הומולוג על כרומוזום X.
- משפחות גנים ייחודיים לכרומוזום Y.

הגנים ההומולוגיים ל-X: הגנים על שני הכרומוזומים מקודדים לחלבונים מאוד דומים. כל אחד מהם מופיע בעותק יחיד על גבי הכרומוזום, ויש להם פעמים רבות פונקציות של house-keeping. גנים ייחודיים ל-Y: מבטאים כמעט אך ורק באשכים, מופיעים בעותקים רבים על Y, רבים מהם מקודדים לחלבונים בקרה אשר קושרים DNA או RNA.

**כיצד נקבע המין? מה עושה תוצר הגן שעל-פני כרומוזום Y?**



ברירת מחדל = נקבה

תוצר הגן הקובע זכריות נקרא - TDF - **testis determining factor**.

הימצאות ה-TDF הכרחית כדי שהאשכים יתחילו להיווצר וזה חיוני ליצירת הורמונים זכריים כמו טסטוסטרון.

הגן: SRY- Aex-determining region Y gene.

החלבון מכיל אזור עם המולוגיה ל-HMG box (אזור קושר DNA), זהו DNA binding motif שמעורב בבקרת שעתוק.

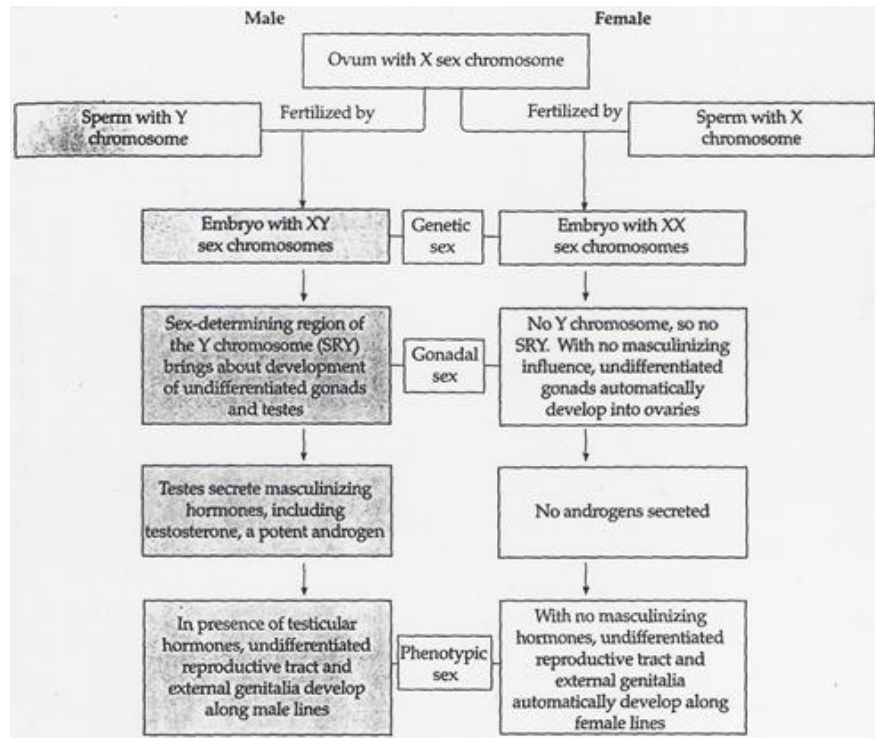
**כרומוזום Y ופוריות:**

10-15% מהזוגות סובלים מבעיית פוריות. בערך ב-50% מהמקרים הבעיה היא בגבר: **azospermia**: חוסר זרע.

**oligospermia**: מיעוט זרע.

**AZF-azoospermia factor**, הגן או הגנים שחשובים להתפתחות תאי הנבט הזכריים. חיפשו את האזורים בכרומוזום Y שהלכו לאיבוד. נמצאו 3 אזורים. החסרים נוצרים כמעט תמיד de-novo. קשה מאוד להגדיר בדיוק את אזורי החסר בגלל ריבוי הרצפים החוזרים באזורים אלה. מבין הגנים הממוקמים באזור שיכול להיכלל בחסר, הגן DAZ הוא הקנדידט העיקרי לבעיות פוריות. לא ברור מתי בתהליך יצירת תאי הזרע נוצרים החסרים.

**שלוש רמות לקביעת מין: מין גנטי, מין גונדי ומין פנוטיפי:**



**כרומוזום X:**

בתאים סומטיים של נקבות יונקים אחד מכרומוזומי X פעיל והשני מושקע, והבחירה היא אקראית. כרומוזום X המושקע יכול להיות ממוצא אבאי או אימהי. ההשתקה מתרחשת מוקדת בהתפתחות, לאחר 4-5 חלוקות מיטוטיות. ההשתקה קבועה- כל צאצאי אותו התא מראים אותה תבנית השתקה. ההשתקה האקראית של אחד מכרומוזומי X הינה האחראית ל-dosage compensation.

**אילו גנים אינם מושקעים ב-X הבלתי פעיל?**

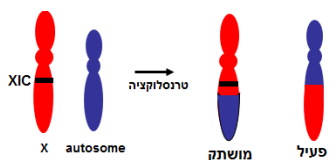
הגנים באזור הפסאודו-אוטוזומלי וגם גנים שאינם באזור זה אבל יש להם הומולוג על כרומוזום Y.

**יוצאי-דופן לתיאורית ההשתקה:**

- ביונקי-כיס רק כרומוזום X האבאי עובר השתקה (זו מעין החתמה גנומית).
- ביונקי שליה- ברקמות החוץ עובריות- רק כרומוזום X האבאי מושקע וכאמור בשאר העובר ההשתקה אקראית.

הערה: העובדה שההשתקה אקראית מגנה מפני מוטציות לתאליות ומזיקות על-גבי כרומוזום ה-X. ישנה התקדמות אבלוציונית בכך שההשתקה היא אקראית.

**הבסיס המולקולרי להשתקה:**



**XIC- X inactivation center:** מרכז השתקה, אזור הדרוש בציס כדי שתתרחש ההשתקה. למשל: אם קורית טרנסלוקציה מאזנת בין X ואוטוזום, רק אחד תוצרי הטרנסלוקציה יכול את ה-XIC ולכן רק אחד יוכל לעבור השתקה. זוהי הוכחה לדרישה בציס של רצף מסויים.

ההשתקה של כרומוזום X דורשת הימצאות של לפחות 2 אזורי XIC.

מנגנון הספירה "דואג" לכך שיהיה X אחד פעיל עבור 2 סטים של אוטוזומים. למשל: בנקבה שיש לה טריזומיה של X, שני X-ים שלה מושקעים.

### **XIST:**

גן שמופה לאזור הקריטי המינימלי של ה-XIC. הוא אינו מקודד לחלבון אלא רק ל-RNA. התעתיק נמצא רק בגרעין ונוצר אך ורק מה-X המושתק. ה-RNA של XIST "עוטף" את הכרומוזום. XIST מתחיל להתבטא לפני תחילת ההשתקה (בעובר).

### **הוכחות ישירות למעורבות XIST בהשתקת כרומוזום X:**

**תאי Embryonic Stem cells – ES:** תאים מולטיפוטנטיים. מקבלים לשלב העוברי שבו עדיין לא חלה השתקה של כרומוזום X. ניתן להשרות עליהם התמיינות ואז בתאי ES נקביים אחד מכרומוזומי X עובר השתקה.

**ניסוי-1:** הריסת הפרומוטור והאקסון הראשון מאחד האללים של XIST בתאי ES נקביים **התוצאה:** לאחר התמיינות נמצא שה-X בעל האלל הדפויק איננו יכול לעבור השתקה. נוצרו שני סוגי תאים - תאים עם X אחד פעיל, כאשר המושתק הוא בכלל האלל התקין ותאים עם שני X פעילים - ה-X שנבחר לעבור השתקה הוא זה עם האלל הפגום. **מסקנה:** עדיין יש יכולת בחירה ויכולת ספירה. שתי יכולות אלה בוודאי אינן קשורות למקטע ה-DNA הספציפי שהוסר מתאים אלה. אך לאחר הבחירה והספירה התא לא "מוודא" שההשתקה אכן קרתה.

**ניסוי-2:** לתאי ES זכריים הוכנס YAC בגודל של 450kb שהכיל את הגן XIST. התוצאה: מקטע זה היה מספיק בכדי להשרות השתקה. הייתה **ספירה** - הרצף הזה נספר כאילו הינו כרומוזום X שלם. הייתה **בחירה** - לפעמים ה-YAC הושתק ולפעמים הכרומוזום X. היה תהליך של התפשטות ההשתקה - גן סמוך ליד XIST על-גבי ה-YAC עבר השתקה באותם תאים בהם הטרנסגן נבחר להיות מושתק.

**עכברים טרנסגניים:** הוכנס קוסמיד (הרבה יותר קצר מ-YAC, 50kb בלבד) עם רצף XIST לעכברים טרנסגניים זכריים. רצף קצר זה עצמו הספיק לקבלת השתקה.

### **ממצאים נוספים התומכים במעורבות XIST בהשתקה:**

- XIST מהכרומוזום האימהי איננו מסוגל להתבטא ברקמות חוץ-עובריות. מתאים לכך שרק ה-X האבהי מוקת ברקמות חוץ-עובריות.
- העותק האימהי מתחיל להתבטא רק בשלב הבלסטוציסט.
- בעוברי עכברים בהם 2 כרומוזומי X באים מהאב- XIST מתבטא כבר בשלב של שני תאים בעובר ומשני הכרומוזומים.



## אבחון טרום לידתי וסקרי אוכלוסין

### בדיקה ישירה- מקור הדוגמאות הנבדקות:

בדיקה עם PCR של תאים ממקור: דם, שטיפת פה או buccal scraps, בדיקת סיסי שלייה- תא או שניים שבודדו מעובר בן 8 תאים, שערות, זרע- בדיקות פליליות, דוגמאות פתולוגיות מארכיון- לבדיקת אנשים שמתו, Guthrie cards- מקור ל-DNA מילד שנפטר.

### המולקולה הנבדקת:

- DNA- בדרך-כלל.
- RNA- במצבים שבהם צריך למצוא מוטציות לא ידועות ב-cDNA.
- חסרונות- קושי לעבוד עם RNA, חוסר יציבות בגלל המוטציה (מנגנון ה-RNA decay).
- חלבון- לכל חלבון צריך לפתח בדיקה ספציפית- חיסרון!

### חיפוש מוטציות ידועות מראש:

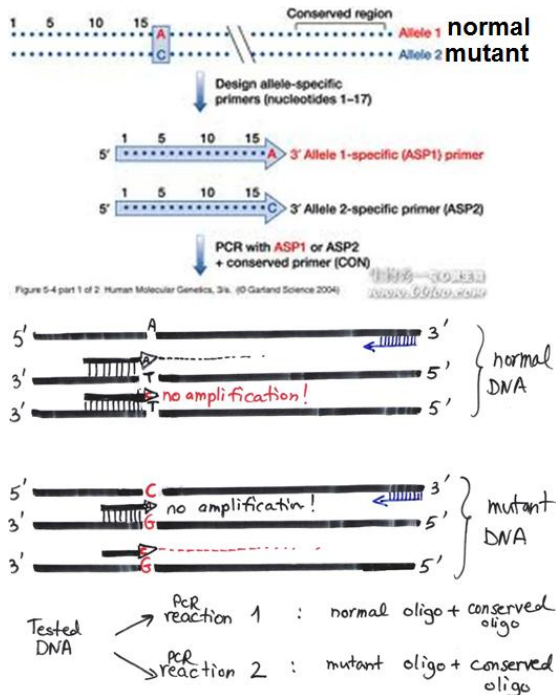
מחלות עם מוטציה אחת: אנמיה חרמשית, אקונדרופלסיה, כרומוזום X שביר.  
מחלות עם מעט מוטציות: טאי-זקס, ציסטיק-פיברוזיס.

### שיטות מולקולריות:

בדיקת קיום אתרי ריסטריקציה:  
 דוגמא: פקטור 8, אנמיה חרמשית.

התהליך: הפקת DNA, PCR, חיתוך תוצר ה-PCR עם אנזימי ריסטריקציה, הרצה בג'ל אגרוז, קיום או חוסר ריסטריקציה מעיד על קיומה של מוטציה.

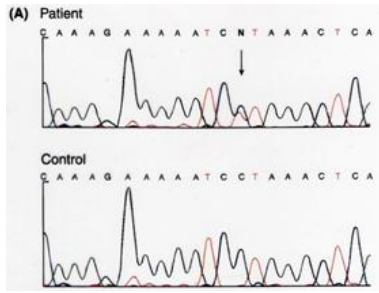
### :ARMS- Amplification Refractory Mutation System



שיטה שבה עושים PCR ללא קשר לאנזימי ריסטריקציה. משתמשים בשיטה זאת לבדיקת מוטציה מסוימת. מתאים גם למוטציות נקודתיות וגם ל-deletions קצרים.  
 מתכננים פריימרים שמתאימים למצב הנורמלי ולמוטציה הספציפית ובודקים באיזה מהמקרים נעשה שכפול של ה-DNA.  
 אפשר ככה לגלות חולים שהם compound heterozygote: בעל שתי מוטציות באותו הגן.

### :HRM Assay- High Resolution Melt Assay

שיטה נוספת לזיהוי מוטציות ידועות. עובד טוב כאשר ה-DNA חתוך לפרגמנטים קצרים. הפריימרים מתוכננים להגביר פרגמנטים בגודל: 70-80bp. זה נעשה עם מכשיר real-time PCR- מכשיר שקורא פלוריסנציה של מולקולה שיוודעת להתקשר ל-DNA דו-גדילי. המכשיר יכול למדוד גם טמפ' דנטורציה של ה-DNA, כאשר קשר GC בודד יכול להשפיע עליה בחצי מעלה. המכשיר מודד את הזמן שלוקח למולקולה לעבור דנטורציה.



### Sequencing

מבצעים PCR במכשיר שיכול לקרוא מולקולה פלוריסנטית שיכולה להיקשר לדו-גדיל- החומר הפלוריסנטי עובר אינטרקציה ל-DNA והמכשיר קורא את מידת הפלוריסנציה. לאחר מספר מחזורי הגברה יש עלייה בפלוריסנציה. אם יש מוטציה טמפ' הדנטורציה של ה-DNA הדו-גדילי תהיה שונה מזו של ה-DNA הנורמלי, אפילו בחצי מעלה.

### Southern blot

בשימוש בעיקר לבדיקת הרחבה של microsatellites.

## חיפוש מוטציה לא ידועה בגן נתון:

**קביעת הרצף:** בדרך-כלל נעשה על ה-DNA הגנומי. מצריך תכנון פריימרים לכל או כמעט לכל האקסונים של הגן. במקרים מסויימים כשניתן לעשות RT-PCR לגן הרלוונטי מדם או עור- אפשר לקבוע רצף מתוצר cDNA.

**Gene chip arrays:** ניתן להכין chip שמכוון למחלה מסויימת- מכיל כל-מיני אוליגונוקליאוטידים שעוברים היברידיזציה לרצפים מוטנטיים מסויימים.

### שיטות אבחון במחלות עם gene rearrangements (מוטציות גדולות):

**הדוגמא הקלאסית:** DMD- Duchenne Muscular Dystrophy, גן ענק (למעלה מ-2mb). 60-65% מהחולים הינם בעלי חסר של אקסון אחד או יותר. יש אקסונים שחסרים לעיתים קרובות יותר. ישנה בדיקה במגלה 98% מהחוסרים- Multiple PCR reactions. בנוסף ניתן לאבחן ע"י: FISH, בדיקת סמניפ פולימורפיים, gene tracking.

### Gene tracking- מעקב אחר גן מוטנט בתוך המשפחה:

מבחינה היסטורית- זוהי השיטה הראשונה לאבחון גנטי. לא צריך להכיר את המוטנטי במחלה, צריך רק סמניפ פולימורפיים שבתאחיזה לגן. 3 שלבים עיקריים:

1. להבדיל בין שני הכרומוזומים בהורה הרלוונטי של הנועץ, כלומר: למצוא סימן שבתאחיזה לגן שעבורו ההורה הטרוזיגוטי.
2. לקבוע פאזה, כלומר: למצוא איזה אלל של הסמן הפולימורפי נמצא ליד העותק המוטנטי של הגן.
3. לבדוק איזה משני הכרומוזומים של ההורה קיבל הנועץ.

### הדרישות המוקדמות לביצוע התהליך:

1. המחלה צריכה להיות ממופה לאזור כרומוזומלי מסויים כך שידועים סמנים פולימורפיים שבתאחיזה גבוהה לגן.
  2. מבנה השושלת והחומר האפשרי לבדיקה צריכים לאפשר קביעת פאזה.
- בעית הרקומבינציה: אם הסמן ממש בתוך הגן- אין בעיה. אם הסמן איננו בתוך הגן- ככל שהינו רחוק יותר יש סיכוי גבוה יותר לרקומבינציה בינו לבין הגן למחלה. דבר זה ישפיע על אמינות הניתוח.

### מצבים בהם לא ניתן לערוך gene tracking:

1. אין DNA מאחד מבני המשפחה הקרטיים, למשל: במחלה אוטוזומלית רצסיבית.
2. הסמנים אינם אינפורמטיביים.
3. אי-אפשר לקבוע נשאות/חוסר נשאות למחלה.

### Population screening:

קריטריונים לביצוע סקירת אוכלוסייה:

1. **המחלה** - צריכה להופיע באוכלוסייה בתדירות גבוהה, ובעלת אפקט חמור על הבריאות.
2. **תוצאה חיובית תביא לתועלת** באחת הצורות הבאות:
  1. ניתן לטפל במחלה או למנוע את הופעת הפנוטיפ (לדוגמא: PKU).
  2. ידיעת הנשאות תמנע הולדת ילד חולה (לדוגמא: CF).
  3. מניעת סבל נוראי מחוסר ידיעה (לדוגמא: הנטינגטון).
  4. מניעת נישואים בין שני בני זוג נשאים שלא ירצו להפסיק הריון.
3. **עקרונות מוסריים** - תוכנית הסריקה צריכה להיות מקובלת מבחינה אתית.
  1. הבדיקה צריכה להיות נגישה לכולם.
  2. התוכנית תריכה לכבד את הפרטיות של הנבדק.
  3. אסור להפעיל לחיצים כלשהם על אנשים שנמצאים חיוביים, לדוגמא: חברת ביטוח לא יכולה לנסות להשפיע על זוג נשאים לקבל ייעוץ טרום לידתי או להפסיק הריון.
  4. המידע צריך להיות סודי. ביטוח רפואי וביטוח חיים לא "מענישים" ע"פ מידע גנטי.
4. **הבדיקה** - צריכה להיות לא חודרנית, קלה לביצוע, מדוייקת ואמינה.
 

**ספציפיות:** להוריד לרמות נמוכות מאוד מצבים של false positive - בבדיקות דיאגנוסטיקה של DNA יש מעט false positive לעומת בדיקות ביוכימיות.

**רגישות:** זיהוי אחוז ניכר מהנשאים, תלוי במידה רבה ב-allelic heterogeneity, דבר זה קובע גם אם מעשי לבדוק פרט לגבי מחלה מסויימת.

### ארגון תוכנית הסריקה:

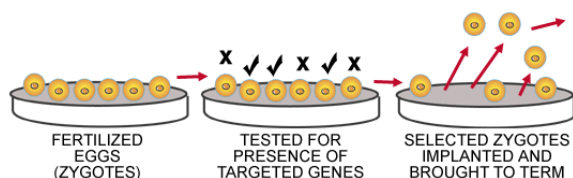
- סקירת יילודים (ב-PKU למי שיש תוצאה מעל לסף, עורכים בדיקה מדוייקת יותר).
  - סקירה טרום-לידתית (prenatal screening).
  - cvs
  - מי שפיר
  - אבחון טרום השרשתי (PCR or FISH).
- דוגמא להצלחת תוכנית סריקה: בקפריסין תדירות לידה של חולי  $\beta$ -thalassaemia הייתה 1:250. תוכנית סריקה לגילוי נשאים הורידה את תדירות הלידה של הפרעה זו ל-95% תוך 10 שנים.

### PGD- preimplantation Genetic Diagnosis - אבחון טרום השרשתי:

- PGD פותח כדי לפתור בעיה של בדיקות גנטיות לעוברים בשלב מאוחר יותר בהריון. CVS - שבוע 12 להריון, בדיקת מי שפיר - שבוע 16 להריון. בשני המקרים הללו אם מתגלה בעיה גנטית צריך לבצע הפסקת הריון. הפסקת הריון: יכולה לגרום לבעית מורלית/דתית וסיבוכים רפואיים.

### הזוגות שמתאימים ל-PGD:

- כאלה שחוו הפסקות הריון לאחר אבחון טרום לידתי שנערך במהלך ההריון.
- כאלה שמתנגדים מבחינה מורלית/דתית להפסקת הריון.
- פרטים הנושאים הפרעות כרומוזומליות שגורמות לאי-פריון או להפלות חוזרות.



**התהליך:** מוציאים ביצית מהאם המיועדת, מבצעים הפריית מבחנה ומחכים. לאחר שאיבת הביציות מהשחלות ניתן להזריק תא זרע אחד לתוך ביצית. אחר-כך מסתכלים על העוברים שגודלו בצלחת ובודקים הימצאות מוטציות מסויימות.

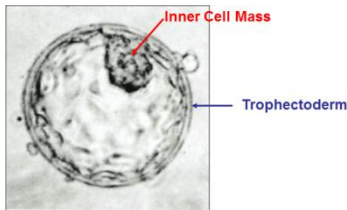
**מקורות הביופסיה ל-PGD:**



1. **גופיף הקוטב - Polar body:** הביציות מהשחלות הינן בעלות גופיף קוטב אחד (אחרי חלוקה מיוטית) כשהביצית חורגת מהשחלה, אחד מתאי הבת הופך לגופיף הקוטב) ניתן להפריד אותו מביצה לא מופרית ולבדוק אותה בשיטות שונות. הוא אינו חיוני לעובר. יתרון: לא נוגעים בעובר.

**חסרונות:** בודקים רק את החומר האימהי. לפעמים גופיף הקוטב עובר דגרדציה. לפעמים יש חוסר התאמה בין גופיף הקוטב והגנום של הביצית.

2. **תא אחד מעובר בן 6-8 תאים:** מתבצע כ-3 ימים לאחר ההפרייה. זאת שיטת הביופסיה הנהוגה ברוב המעבדות- קודחים חור ב-zona pellucida ושואבים תא בודד מתוך קבוצת התאים. יתרון: בודקים גם גנום אימהי וגם גנום אבהי. כנראה שזה לא משפיע על התפתחות העובר. חיסרון: מוריד ממספר התאים, מעט חומר לאבחנה.

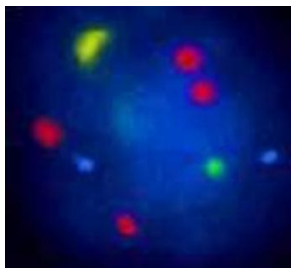


3. **ביופסיה מהטרופקטודרם של הבלסטוציסט:** מעט מאוד תאים מגיעים לשלב הזה בתנאי מעבדה. בדרך-כלל משתילים ברחם עוברים לפני השלב ההתפתחותי הזה משום שזה פשוט יותר. יתרון: הרבה תאים

**חסרונות:** רקמה חוץ-עוברית- לא תמיד משקפת את המצב בעובר. מעט עוברים מגיעים לשלב הזה במעבדה (53%). קשה להפריד בין התאים.

**טכניקות ל-PGD:**

**FISH:** להפרעות כרומוזומליות ולקביעת המין של העובר.

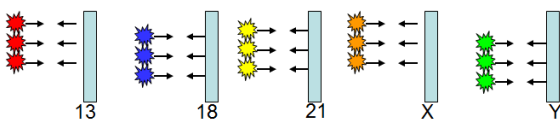


Red – 13+18  
Blue – 21  
Green – X  
Yellow - Y

- מדביקים את התא למתקן.
- לא צריכים כרומוזומים במטאפזה.
- אפשר לבדוק עד 5 סמנים: 13, 18, 21, X, Y.
- זה מכסה עד 95% מהבעיות הכרומוזומליות.
- **בעיה:** חפיפה של נקודות
- ניתן גם לאבחן טרנסלוקציות- צריך לדעת מראש איזו לחפש לפי הבעיה אצל ההורים, ולפתח גלאים מתאימים.

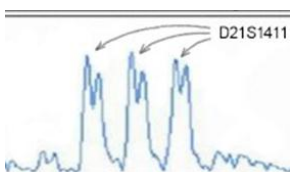
**QF-PCR (quantitative-flourescent-PCR):** וריאציה של PCR שיחליף את ה-FISH לקביעת

אנאפלואידיות.



**הרעיון:** לתכנן ל-5 הכרומוזומים הרלוונטיים כמה זוגות פריימרים לאזורי STRs (אזורים פולימורפיים- במצב תקין אין יותר משני אללים לכל מרקר פולימורפי) כל כרומוזום יהיה מסומן בקצה אחד הפריימרים בצבע מייצג.

תוצרי ה-PCR מורצים במכשיר sequencing שנותן peak לכל תוצר PCR. אם לעובר יש אללים שונים



ב-STR מקבלים peaks במקומות שונים. נעזרים בצבע כדי לדעת על איזה כרומוזום מסתכלים. במקרה של טריזומיה יכולים להופיע 3 peaks שונים עבור ה-STRs של הכרומוזום הטריזומי. לפעמים יש טריזומיה אבל לא מופיעים 3 סיגנלים בגלל:

- אותו אלל משני ההורים.
  - הומוזיגוטיות אצל ההורה עם ה-non disjunction.
  - non-disjunction בחלוקה המיוטית השנייה.
- לכן בודקים מספר מרקרים לכל כרומוזום.

### בעיות טכניות עם PCR לתא בודד:

- קשה לקבל תוצר מתא אחד בלבד.
- סיכון של זיהום- ICSI מבטיח שלא יהיו תאי זרע נוספים בסביבה (זיהום אבהי). הורדת כל התאים העוטפים את הביצית מבטיח שלא יהיה זיהום אימהי.
- לפעמים מוכנסים לריאקציה גם פריימרים למרקרים פולימורפיים כדי לוודא שתוצר ה-PCR הוא מהתא העוברי ולא מתא של אחד ההורים.
- Allele Drop Out (ADO): לפעמים יש אמפליפיקציה מועדפת של אלל אחד על-פני השני. זאת בעיה במיוחד במקרים של PGD לאבחון הפרעות דומיננטיות.

### בעיות קיימות ב-PGD:

- כנראה שהביופסיה קצת מורידה מאחוזי ההצלחה של ה-IVF אך היא איננה פוגית בהתפתחות העובר. עד כה נולדו כמליון ילדים בשיטה זאת.
- יש עדיין 4% טעויות באבחון (לכן מומלצת עוד בדיקה בזמן ההריון).
- ריבוי של הריונות מרובי עוברים.
- בעיה אתית של עליה של בחירת מין העובר מסיבות חברתיות ולא רפואיות.

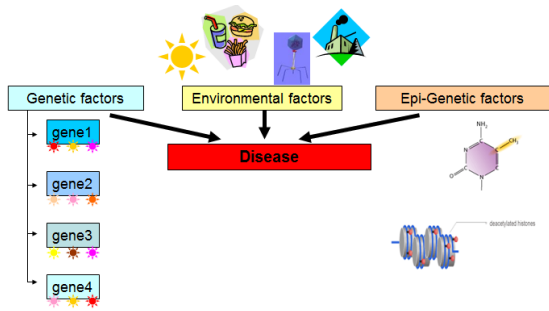
### דוגמאות לבעיות אתיות העולות עם PGD:

- קביעת מין העובר מסיבות לא רפואיות.
- Saviour siblings: הולדת ילד כ"חלקי חילוף" לילד אחר.
- Late onset disorders: מחלות שמופיעות בגיל מאוחר, האם זה אתי לעשות סלקציה נגד עובר שבעתיד הרחוק בחייו יהיה חולה? מה אם תימצא תרופה עד אז?
- בריאות הילד וכשירות ההורים.
- עלות לעומת יעילות של הטיפול.

### דוגמאות:

- זוגות אקונדרופלסיה מבקשים הריונות רק של ילדים עם אקונדרופלסיה. זוגות חרשים- מבקשים ללדת רק ילדים חרשים.
- האם מותר למנוע הורות מהורים שלא מסוגלים לגדל את הילד?
- בחירת עובר עם HLA מתאים שישמש תורם מח עצם לילד אחר במשפחה.

## ירושה מולטיפקטוראלית

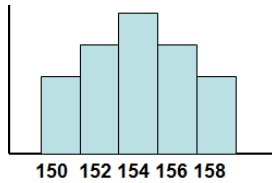


לכל בנאדם יש SNPs שונים בכל אחד מהגנים וגם כל אחד מהם יכול לתרום בצורה שונה. אנשים עם אותו הפנוטיפ יכולים להיות בעלי גנוטיפ שונה ותחת השפעות סביבתיות שונות.

### תכונות כמותיות בעלות שונות רציפה:

דוגמאות: IQ, גובה, לחץ-דם, רמת כולסטרול ועוד.

אתרים גנטיים שונים תורמים בצורה יסיפה (אדטיבית). האתרים השונים לא בהכרח תורמים באותה המידה. הגנוטיפ והסביבה עוברים אינטראקציה כשהתוצאה היא הפנוטיפ. מתקבלים פנוטיפים שמפוזרים בצורה של עקומת גאוס.

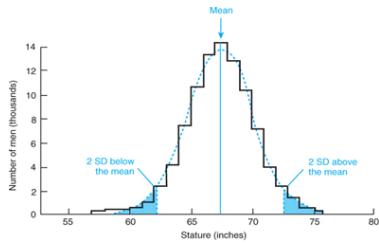


**דוגמא- כיצד מתקבלת התפלגות כזאת?** נניח שהגובה מושפע רק משני

גנים שבכל אחד מהם אלל דומיננטי ואלל רצסיבי. הדומיננטי מוסיף 2 ס"מ לגובה הסופי והרצסיבי לא מוסיף בכלל. בדרך-כלל יש יותר משני אתרים המשפיעים על התכונה וכך מתקבלת התפלגות נורמלית.

כל תכונה פיסיוולוגית שניתנת למדידה היא פנוטיפ כמותי עם ממוצע (mean) ועם שונות (variance).

**Total phenotype variance:** השונות של התכונה במדידה באוכלוסיה נקראת:



הפרטים בעלי הפנוטיפ ה"אבנורמלי" הם אלה שערך התכונה אצלם נופל באזור של שתי סטיות תקן מעל או מתחת לממוצע של האוכלוסיה.

### תפקיד התורשה בתכונות כמותיות:

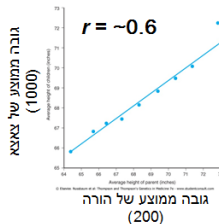
אפשר למדוד את המתאם של ערכי תכונות פסיוולוגיות בין קרובי משפחה כדי לקבל הערכה למידה שבה תורשתיות משפיעה על ערך התכונה.

האם ערכים של תכונה מסוימת דומים יותר בין קרובי משפחה לעומת שאר האוכלוסייה?

$r$ -co-efficient of correlation, ערך סטטיסטי שמודד את המתאם (correlation).

$r=1$ -מתאם חיובי מושלם,  $r=0$ - חוסר מתאם,  $r=-1$ - מתאם שלילי מושלם. המתאם צריך להיות גבוה בין שני קרובי משפחה אם הגורמים לפנוטיפ הם גנטיים.

**דוגמא- גובה:**  $r=0.6$ , מתאם חיובי אך לא מושלם.



צריך לזכור שקרובי משפחה בדרך-כלל גרים בסביבה דומה. על-כן המתאם בין קרובי משפחה בתכונה כמותית נובע גם ממרכיבים תורשתיים וגם ממרכיבים סביבתיים (לכן קשה לנתק את הגנטיקה מהסביבה).

### Nature or nurture

**Heritability ( $h^2$ ):** המרכיב מהשונות הפנוטיפית של תכונה הנגרם משונות גנטית, כלומר, הערכה של המידה שבה אללים שונים מלוקוסים שונים אחראים על השונות באוכלוסיה, של תכונה כמותית.

$G$ - התרומה של פקטורים גנטיים אדטיביים עם שונות  $G$ .  
 $B$ - התרומה של הסביבה בתוך משפחה עם שונות  $B$ .  
 $E$ - תרומה של פקטורים סביבתיים רנדומאליים עם שונות  $E$ .

אם הגנים אינם תורמים כלל לשונות של התכונה:  $h^2=0$ .

אם הגנים אחראים לכל השונות של התכונה:  $h^2=1$ .

**איך מעריכים תורשתיות?** ע"י מדידות של ערך התכונה אצל קרובים מדרגות קרבה שונות וע"י השוואה בין תאומים מונו-זיגוטיים ותאומים די-זיגוטיים.

**Twin studies:**

השוואה בין תאומים זהים MZ לתאומים לא זהים DZ מפרידה בין השפעת הסביבה והשפעת הגנים.  
**תאומים MZ:** מקורם בהפריה אחת. זהות של 100% בגנים.  
**תאומים DZ:** שני ארועי הפריה. כמו כל זוג אחאים, יש להם 50% זהות בחומר הגנטי.

משווים בין השונות במדידת ערכי התכונה בהרבה זוגות תאומים MZ לבין הערכים של הרבה זוגות תאומים DZ.  

$$h^2 = \frac{\text{Variance in DZ pairs} - \text{Variance in MZ pairs}}{\text{Variance in DZ pairs}}$$

אם כל השונות של התכונה היא כתוצאה מהשפעת הסביבה אז Variance in DZ = Variance in MZ  
 אז:  $h^2=0$ .

אם כל השונות של התכונה היא כתוצאה מגורמים גנטיים אז Variance in MZ = 0 ואז:  $h^2=1$ .

**קביעת הזיגוטיות של תאומים:**

חשוב להשתלט איברים. ניתן לקבוע באופן חלקי בלבד על-פי השלייה והקרומים העובריים.  
 בעבר זיגוטיות נקבעה לפי סוג הדם שלא תמיד אפשר קביעה חד-משמעית, אך יכול לשלול תאומות MZ. כיום ניתן לקבוע חד-משמעית ע"י בדיקת מרקרים פולימורפיים ב-DNA.

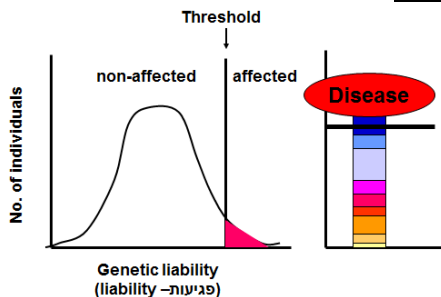
**ככל שיהיו יותר פרטים זהים גנטית- יהיה קל יותר לקבוע תורשתיות:**

הריונות רבי-עוברים בבני-אדם: כמעט 100% מהמקרים- הפריה של ביציות נפרדות. מקרים נדירים של פיצול עוברים. ישנם יונקים שבהם הריון כזה הוא הכלל- חלק מהצאצאים זהים גנטית.  
 חקר תאומים שהופרדו בלידתם: השוואת תאומים MZ שהופרדו בינקותם לעומת תאומים MZ שגדלו ביחד, נותן מידע רב לגבי מידת התורשתיות של תכונות כמותיות. ההבדלים בין שני סוגי זוגות התאומים הללו יתנו מידע לגבי השפעות סביבתיות על התכונה הנבדקת. זאת בהנחה שזוג תאומים שגדל באותה משפחה נחשף לתנאים סביבתיים זהים. הנחות אלה בדרך-כלל די נכונות לגבי תכונות כמו גובה או משקל אך הרבה פחות נכונות לגבי תכונות כמו- אופי ו-IQ.

**Multifactorial Threshold traits (תכונות לא רציפות):**

תכונות בהן התורשה היא MF אך במקום שונות רציפה יש גבול חד-משמעי בין פנוטיפ נורמאלי ואבנורמאלי. אלה פגמים בודדים ולא חלק מתסמונת.  
 מדובר בעיקר בתכונות מולדות כגון: מומים בלב, Neural tube defects, שריר בכניסה לקביה שלא נסגר כמו שצריך, clubfoot (רגל עקומה), פרק הירך שלא יושב כמו שצריך, שפה שסועה.  
 הפגמים המולדים מופיעים בתדירות של 1/1000.  
 הם מופיעים כפגם בודד ולא במסגרת תסמונת.  
 ההורשה איננה מנדלית.

**המודל המקובל להסבר הורשה במקרים אלה- "תיאוריית הסף":**



לכל אחד באוכלוסייה יש מספר שונה של אללים התורמים לבעיה מסוימת וניתן לחשב את ההסתברות לפנוטיפ. לחלק המאוקלוסייה יש מעט אללים ולרוב האוכלוסייה יש מספר אללים בינוני. למעטים יש הרבה אללים. ישנה נקודת סף שהחל ממנה הפנוטיפ מתבטא.  
 מודל הסף מבוסס על אנליזות סטטיסטיות במשפחות חולים. המושג- genetic liability הוא מאוד מעורפל.

**כללים בהורשת תכונות MF עם סף:**

1. למרות שהתכונה "עוברת" במשפחות- אין הורשה מנדלית ברורה.
2. הסיכון לקרובי משפחה מדרגה I: בערך השורש הריבועי של הסיכון לכלל האוכלוסייה. ככל שהתכונה נדירה יותר, כך הסיכון היחסי של קרובים מדרגה ראשונה גבוה יותר.

3. הסיכון נמוך יותר בצורה חדה לקרובי משפחה מדרגה II לעומת דרגה I. אחר-כך הסיכון יורד בצורה פחות חדה עבור קרובים מדרגה III והלאה. זה קשר למספר הגנים המשותפים.  
**שונה מאוד מהורשה אוטוזמאלית רצסיבית שבה רק לאחאים יש סיכון מוגבר.**
4. הסיכון החוזר גבוה יותר כאשר יותר מבין משפחה אחד חולה- הפגיעות במשפחה גבוהה.  
**שונה מאוד מהורשה מנדלית- הסיכון לילד הבא איננו משתנה על-פי מספר הצאצאים החולים.**
5. ככל שהפגם חמור יותר- הסיכון למקרה נוסף במשפחה גבוה יותר.
6. אם תכונה מסויימת MF נפוצה יותר במין מסויים- הסיכוי למקרה נוסף בין קרובי המשפחה גבוה יותר אם החולה הוא מהמין **הפחות** פגיע (זה אומר שישנם יותר גנים התורמים למחלה בתוך המשפחה, כי הסף עבור המין הפחות פגיע הוא גבוה יותר).

### חקר תאומים בתכונות מולטיפקטוראליות עם סף:

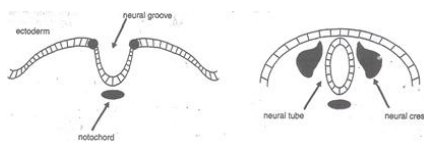
- Concordance:** מתאר שני קרובי משפחה שיש להם את אותה תכונה מולטיפקטוראלית עם סף. ניתן לבחון זוגות של תאומים MZ ו-DZ ולראות בכמה מקרים יש Concordance- התאמה. ככל שה-Concordance גבוה יותר- יש עדות חזקה יותר למעורבות תורשתית בתכונה או במחלה.
  - Concordant:** שני התאומים מראים אות אותו הפנוטיפ.
  - Disconcordant:** רק לאחד מבין השניים יש את הפנוטיפ.
- כאשר תכונה נקבעת רק ע"י גורמים גנטיים אז ה-Concordance בתאומים MZ הוא 1 ובתאומים DZ הוא 0.5 (יש להם בממוצע 50% דמיון בחומר הגנטי). בתכונות או במחלות עם הורשה מנדלית, ערכי ה-Concordance בתאומים MZ קרובים ל-1 (או 100%).
- ככל שערכי ה-Concordance שונים יותר בין MZ ו-DZ יש לסביבה פחות השפעה ולמרכיב הגנטי השפעה רבה יותר.

### מגבלות בקביעת תורשתיות ע"י Concordance בתאומים:

- יש הבליים גנטיים בין תאומים זהים- באימונוגלובינים ברצפטורים של תאי T.
- יש הבדלי ביטוי גנים בתאומים MZ של גנים על כרומוזום X בגלל הבדלים בדגם ההשתקה.
- יש הבדלים אפיגנטיים שנוצרים במהלך ההתפתחות.
- הסביבה לא זהה לחלוטין אפילו שהתאומים גדלים באותו הבית, בעיקר לאחר שהתאומים עוזבים את הבית.
- גם הסביבה הרחמית לא תמיד זהה. אספקת הדם לשלייה לא תמיד זהה לשני התאומים.
- התכונה שמודדים לא תמיד תלויה באותם גורמים גנטיים. לכן ייתכנו תכונות שאצל חלק מהתאומים נקבעות רק ע"י גנים ואצל אחרים לא. הערך של ההתאמה יושפע מכך.
- תאומים MZ הם תמיד מאותו המין, בעוד שתאומים DZ לאו דווקא.

### Neural tube defects:

הפרעות ביצירת צינור העצבים. ידוע אחד מהגורמים הסביבתיים התורם להפרעה. זוהי הפרעה יחסית נפוצה- בשלב יחסית מוקדם של ההתפתחות העוברית יש שקיעה פנימה וסגירה של הצינור.



### דרגות חומרה באי-סגירת צינור העצבים:

- אין סגירה בכלל- העובר מת.
- החלק הקדמי לא נסגר- anencephaly- חסרים חלקים מהמוח הקדמי וכתוצאה מכך העובר מת.
- חלק אמצעי לא נסגר- חסר ה-midbrain- הפרעות נירולוגיות חמורות.
- ההפרעה נפוצה ביותר- אי סגירת צינור העצבים באזור המותניים (lumbar region). הפרעה זו גם יכולה להיות בדרגות חומרה שונות.



**סיבות ל-NTD:**

- חלק מסינדרום.
- כתוצאה ממוטציה בגנים בודדים.
- הורשה MF.

סיכוי למקרה נוסף	קרוב מדרגה I
3.2%	קרוב מדרגה II
0.5%	קרוב מדרגה III
0.17%	

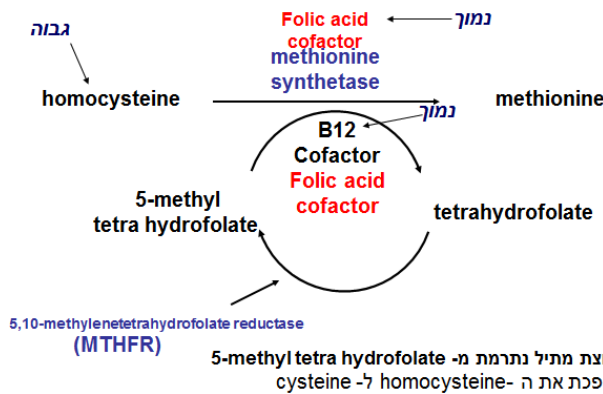
במשפחה עם ילד אחד עם NTD, הסיכוי לילד נוסף פגוע עולה: הערה: מקרב מקרי ה-NTD הקשים, 2/3 הן נקבות.

**אבחון טרום-לידתי:**

- מומים קשים נראים בקלות באולטרא-סאונד.
- מומים קלים קשים יותר לאיתור.
- חלבון  $\alpha$ -feto protein בסרום האימהי או במי-שפיר כנראה בגלל דליפה.
  - בבדיקת  $\alpha$ -feto protein בסרום האימהי ניתן לאתר 60% מהמקרים.
  - בבדיקת  $\alpha$ -feto protein במי השפיר ניתן לאתר 90% מהמקרים.
  - כשהמום סגור אין עליה ב- $\alpha$ FP.

**ההשפעה הסביבתית על התפתחות NTDs:**

נמצאה שכיחות שונה של NTD במקומות שונים בעולם. מחקרים הראו כי יש קורלציה בין רמות נמוכות של חומצה פולית בדם בזמן ההריון ועליה בסיכון ל-NTD (פחות מ- $200\mu\text{g/L}$ ). במקביל נמצא שיש מקרים שלאמהות לילדים עם NTD יש רמות גבוהות של homocysteine בדם.



חוסר ב-B12 גם מהווה גורם סיכון ל-NTD. המסקנה: אולי יש פגם מטבולי בהפיכת homocysteine למתיונין. יש שני קופקטורים במסלול: B12 וחומצה פולית. בגלל שלאמהות יש מחסור בהם, יכול להיות שהן לא יוצרות מספיק מתיונין.

**עוד סיבות לעליה בשכיחות ל-NTD:**

מחקרים נוספים הראו כי לנשים שילדו ילדים עם NTD היו רמות גבוהות של הומוציסטאין בזמן ההריון שלא ניתן היה להסבירן ע"י חוסר ב-B12 וחומצה פולית.

**ואריינט גנטי של האנזים: MTHFR.**

כאמור האנזים הזה אחראי על מחזור של 5-methyl tetra hydrofolate שתורם את קבוצת המתיל להומוציסטאין והופך אותו למתיונין. ישנה מוטציה missense בגן ל-MTHFR שהופכת את האנזים לפחות יציב. כתוצאה מכך יש ירידה במיחזור של tetrahydrofolate שפוגעת במתילציה של הומוציסטאין.

אימהות לילדים עם NTD הן בעלות סיכוי כפול לעומת קבוצת הביקורת להיות הומוזיגוטיות לאלל שמקודד לאנזים הבלתי יציב. ישנן אימהות לילדים עם NTD שאינן נושאות אללים אילו- כלומר ישנם גורמים נוספים.

**מחקר גדול שנערך בשנות ה-80:**

נערך מחקר ובו נשים שבעבר ילדו ילד עם NTD נטלו ויטמינים וחומצה פולית. ב-1991 נפסק הניסוי: נשים שנטלו חומצה פולית ילדו הרבה פחות ילדים עם NTD. ולכן יצאה המלצה לכל הנשים בהריון: 0.4 mg/day של חומצה פולית לנשים שמנסות להרות. ו-4 mg/day לנשים עם עבר של NTD במשפחה.

**לפי מודל זה:** חלק גדול ממקרי ה-NTD נגרם בגלל פגם בגן אחד וכדי שהפגם יתבטא צריך פקטור סביבתי נוסף- רמות נמוכות של חומצה פולית בדיאטה. לרוב הנשים עם פעילות אנזימטית נמוכה יש מספיק קו-פקטורים מדיאטה טובה.

### מחלות מולטיפקטוריאליות הנפוצות בבוגר:

אצל חולים בחלות MF נפוצות המופיעות מאוחר יותר בחיים- המאמץ של הרופאים הוא לשנות את הסביבה כדי להפחית מהסיפטומים.

### דוגמא- מחלת הסכרת:

נקבעת ע"י רמה לא תקינה של סוכר בדם. רק האנשים שמעבר לסף מסויים יראו סיפטומים של המחלה. ישנן שתי מחלות סכרת שונות:

#### Insulin dependent diabetes mellitus (type I) IDDM

נגרם כתוצאה מהרס התאים היוצרים אינסולין. כנראה ההרס של תאי  $\beta$  הוא אוטו-אימוני. החולים חייבים לקבל אינסולין בצורה חיצונית. הופעת המחלה- גיל 12 בממוצע. סיבות סביבתיות: מחלה ויראלית, דיאטה?

#### Non insulin dependent diabetes mellitus (type II) NIDDM

הפרעה הטרוגנית שקשורה לעודף משקל. קשה יותר לטיפול, אך במקרים רבים המחלה פחות קשה. 9 מתוך 10 מקרי סכרת הינם NIDDM.

שתי המחלות שונות זו מזו ב: גיל ההופעה, MZ twin concordance, אסוציאציה עם אללים מסויימים באתר ה-MHC (Major Histocompatibility Complex).

#### סכרת ותורשתיות:

- שתי המחלות מופיעות במשפחות- אך בדרך-כלל אין באותה משפחה את שני הסוגים.
- שתי מחלות גנטיות שונות.
- מתוך 30-40% התרומה הגנטית- 40% קשור לאללים של ה-MHC.

#### MHC & IDDM

95% מחולי IDDM הינם הטרוזיגוטיים ל-HLA-DR3 או HLA-DR4 (class II MHC). אתר אחר חשוב ב-MHC -DQB1: Asp בעמדה 57 "מגן" מפני IDDM. 90% מחולי IDDM הינם הומוזיגוטיים להיעדר Asp בעמדה 57.

אבל: גם שני אחראים הנושאים את אותו הפלוטיפ של MHC class II, המתאם ביניהם הוא רק 17% ולא 40% כמו אצל תאומי MZ. **לכן חייבים להיות עוד גנים שגם מעלים את היסכון להתפתחות של**

**IDDM.** מתוך גנים רבים שמשפיעים כנראה על היסכון  
VNTR in the promotor of the insulin gene  
SNP in the CTLA4 gene – immune regulatory gene  
SNP in the PTPN22 gene – protein phosphatase  
ל-IDDM זהו 3:

רוב הגורמים הגנטיים לא ידועים. כמובן שיש גם הרבה גורמים סביבתיים, אחרת המתאם בין תאומי MZ היה 100% ולא 40%.

### כיצד לזהות גנים המעורבים בתכונות מולטיפקטוריאליות?

קביעת lod score במקרה של תכונה מנדלית הינה פאראמטרית: האנליזה מתבצעת על בסיס מודל גנטי: סוג ההורשה, חדירות וכו'. במקרה של תכונה מולטיפקטוריאלית האנזליה הינה non-parametric, כלומר, לא מחליטים מראש על מודל גנטי מסויים.

#### Shared segment analysis in families

**העיקרון:** חיפוש אללים או חלקי כרומוזומים שהם זהים בין פרטים בעלי התכונה המסויימת.

- אוספים הרבה משפחות עם שניים או יותר אחאים בעלי התכונה המסויימת.
- מחפשים אזורים כרומוזומליים משותפים בתדיקות מעל לתדירות אקראית מצופה
- בודקים מספר רב של מקרים: multipoint analysis.

**הבעיות:** מקבלים אזורים מאוד גדולים שקשה לדלות מהם את הגן הרלוונטי. אם הגן המסויים איננו הכרחי או מספיק לקבלת התכונה- הוא לא יהיה משותף לכל זוגות האחים.

**:Association studies and linkage disequilibrium**

**העיקרון:** לרוב החולים באותה אוכלוסייה יש common ancestor מלפני דורות רבים.

• לוקחים קבוצה גדולה של אנזים ומחפשים את המרקר הגנטי שמשותף לכולם.

**ההנחה:** יהיה LD (association caused by linkage disequilibrium) בין אלל של מרקר ספציפי בגנום לבין האתר ה-causative בגן כלשהו. לרוב החולים יהיה את האלל הספציפי הזה.

**:תכנון המחקר:**

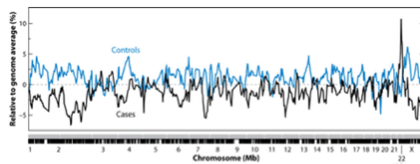
- גודל הקבוצה חשוב מאוד בכדי להגיע למסקנה סטטיסטית מהימנה.
- בחירת קבוצת הביקורת מכרעת- צריך קבוצת ביקורת מאוד טובה.
- בחירת המרקרים- הסוג המועדף הוא SNPs כי אפשר למדוד אותם להרבה אנשים בו-זמנית והם עוברים פחות מוטציות מדור לדור. ככל שהמחלה עתיקה יותר בהיסטוריה האנושית- צריך מרקרים בצפיפות רבה ביותר בכדי לא לפספס את האזור שב-LD (ככל שהמחלה יותר עתיקה, החתיכה המשותפת בין האנשים היא מאוד קטנה כי היו הרבה אירועים במהלך האבולוציה ששינו את האזור).
- בחירת האוכלוסייה- באוכלוסייה מבודדת יהיו יותר LD.

**:Admixture mapping**

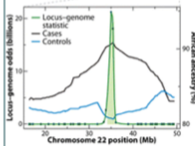
שיטה נוספת לזיהוי אתרים גנטיים לתכונות מולטיפקטוריאליות: שתי אוכלוסיות מאוד שונות שהתערבבו לפני זמן קצר. מחפשים אתרים של מרקרים שיש הבדל גדול בתדירות של אללים בין שתי האוכלוסיות (AIMs) ancestry-informative markers.

**דוגמא:** בשחורים אמריקאים יש תדירות גבוהה מאוד של כשל כלייתי לעומת האוכלוסייה הלבנה.

הגן הרלוונטי באזור- ApoL1. אלל מסויים מקנה עמידות לפרזיט שגורם למחלת השינה (ולכן הייתה סלקציה לטובתו באפריקה) אך אותו אלל קשור בצורה לא ברורה לעליה בסיכוי למחלת כליות.



Admixture mapping genome scan for combined kidney diseases focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) and HIV-associated nephropathy (HIVAN)



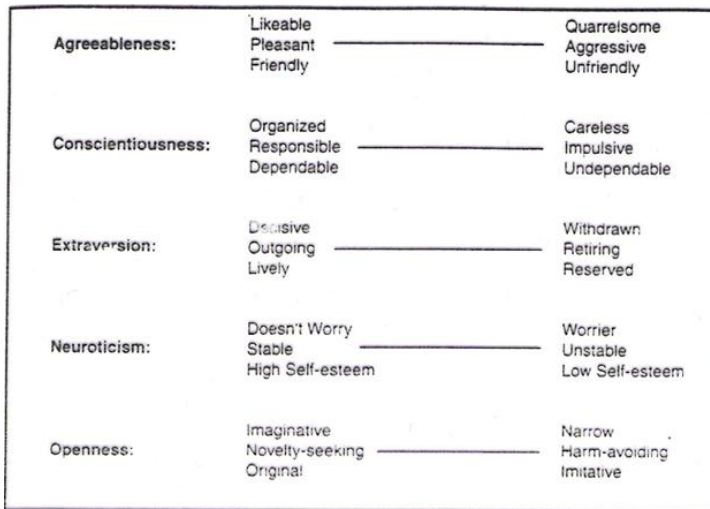
## גנים והתנהגות

הוכחות ביולוגיות לכך שגנים קובעים במידת-מה תכונות התנהגותיות בבע"ח:

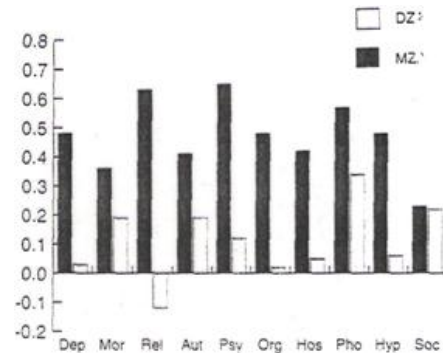
- ניתן ע"י הכלאות מכוונות לעשות סלקציה לבע"ח בלי תכונות אופי שונות.
- בכלבים- לזנים שונים תכונות מודגשות שונות: נאמנות, תוקפנות, אומץ ואחרות. תכונות האופי עוברות מדור לדור.
- נסויים עם עכברים כבר ה-1934 הראו כי ניתן לקבל זנים סקרנים, פחדנים וכו'.

בעייתיות רבה בבדיקת התנהגות:

איך מכמתים תכונות אופי? מה הטנדרטים להתהגות נורמאלית ואבנורמלית?



יש 5 צירים של התנהגות, תכונות אופי:



- Dep – depression
- Mor – Morale
- Rel – religion
- Aut – Authority
- Psy – psychoticism
- Org – organic symptoms
- Hos – hostility
- Pho – phobias
- Hyp – hypomania
- Soc – social adjustment

Figure 1.1 Most human personalities can be described by estimating positions along each of the above five "axes."

בתאומים DZ, בנטיה לדת ה-Concordance יחסית נמוך. יש מחקרים שמראים שהיכולת להאמין יש בה גורמים בנטיים וזו לא רק השפעה של הסביבה.

מסקנה: בממוצע 50% מהשונות באוכלוסייה בתכונות התנהגות נקבעת מסיבות גנטיות ו-50% מסיבות סביבתיות.

### גן אחד לתכונה- גנים רבים לתכונה:

התנהגות=פנוטיפ מאוד מרוכב. קרוב לוודאי שלא גן בודד אחראי על תכונת אופי מסוימת. ההתפלגות של השונות בתכונות אופי היא בצורת פעמום. מי נמצא בקצוות?

### גן בודד כאשר הוא מוטנטי יכול להשפיע על התנהגות:

**Lesch-Nyhan Syndrome**- חוסר תפקוד כלייתי, תנועות ספסטיות, פיגור שכלי.

הגן המוטנטי: HPRT-Hypoxantine-guanine phosphor-ribosyl transferase. ממוקם על כרומוזום X. תדירות המחלה: 1/10,000 זכרים.

### איך מחפשים גנים להתנהגות?

בגלל המורכבות לא ניתן לעשות ניסויי תאחיזה רגילים. קשה מאוד למדוד את התכונות. הסביבה מאוד משפיעה על הפנוטיפ. צריכים לחפש מוטנטים בבני-אדם הגורמים להפרעות התנהגות.

### מוטציות בגן ל-Monoamine Oxidase A:

- הנשים נורמליות.
- הזכרים החולים סבלו מפיגור קל ובעיות התנהגות- התנהגות תוקפנית במיוחד.
- ההתנהגות התוקפנית משתנה בין הפרטים, ובפרט מסויים- בזמנים שונים.
- הורשה ברורה בתאחיזה לכרומוזום X-21-11.Xp

**הגנים:** MAOA, MAOB- מעורבים במטבוליזם של נורו-טרנסמיטורים. הגנים הללו נמצאים באזור בכרומוזום הקשור לקידוד נורוטרנסמיטורים במוח. הגנים מתבטאים גם בתאי עור וכך יכלו לבדוק את רמת ביטויים. לאנשים אלה לא הייתה פעילות MAOA וזה היה קשור באופן ישיר להתנהגות האלימה. **מוטציה בגן אחד גורמת לפנוטיפ מאוד קיצוני.**

כאשר מעכבים את MAOA באנשים זקנים הם דווקא הופכים להיות אפאתיים, ולא תוקפניים. זה כנראה קשור לכך שיש הבדל בהאם המוח מתפתח במהלך הגדילה עם או בלי MAOA. ייתכן שהשונות הנורמאלית באוכלוסיה (לגבי תוקפנות) קשורה לוואריציות בתוך הגן.

### מוטציות בגן FOXP2 והיכולת לדבר ולהבין שפה:

ישנם ילדים בעלי מנת משכל תקין שאינם מסוגלים לדבר ולהבין שפה. ההפרעה לא קשורה לאוטיזם, חרשות והפרעות מוטוריות: "specific language impairment". הפרעות שפה כאלו מופיעות לעיתים במשפחות. יש יותר Concordance בין תאומים MZ מאשר DZ.

ב-1998 הצליחות למקם ע"י תאחיזה את הגן הקשור לפנוטיפ לכרומוזום 7 (אזור SPCH1)- מצאו פרט שהייתה לו שבירה בתוך כרומוזום 7 באזור הגן- וכך מצאו את הגן. החלבון כנראה חשוב בהתפתחות המוח ליצירת הקשרים שמבססים את התפתחות השפה והדיבור- הגן מתבטא בצורה חזקה במוח עובר.

המחלה דומיננטית: דרושות שתי מנות של החלבון לצורך התפתחות תקינה.

### מה קורה כשמשוים גן זה לגן של שימפנזה?

יש שני שינויים בחומצות אמינו בין השימפנזה והאדם. ייתכן מאוד שהן משעותיות לגבי ההבדלים בכושר השפה בין קופים לבין בני-אדם.

### זיהוי גנים שמעורבים בפנוטיפים התנהגותיים לא בולטים:

בעיות: 60% מהגנים מתבטאים בלשב מסויים במוח, ולכן יש להם פוטנציאל להשפיע על תכונות התנהגות.

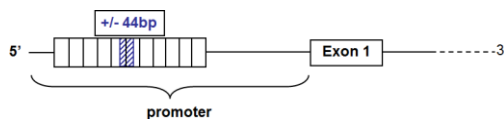
**גנים שנבדקים כקנדידטים:** גנים שמקודדים לחלבונים שקשורים למטבוליזם של נורוטרנסמיטורים. כל הנורוטרנסמיטורים ממלאים תפקיד כלשהו בהתנהגות, אלה שיותר מקושרים להתנהגות הם: סרוטונין, דופמין ונוראפינפרין.

### מטבוליזם של סרוטונין:

סרוטונין מעורב במצבי-רוח, דיכאון, אימפולסיביות, התמכרות, דחף מיני ועוד. לסרוטונין טרנספורטר אחד והרבה רצפטורים.

**Candidate allele approach:** לא צריך למצוא משפחות עם תכונה שעוברת בתורשה אלא- בודקים באוכלוסיה גדולה (ללא קרובי משפחה) אם יש אסוציאציה בין אללים מסויים לבין התכונה.

**מצאו:** ליד הטרנספורטר של הסרוטונין בתוך הפרומוטור יש רצף חוזר באורך שונה, ויש קשר בין מידת השעתוק של הגן והאורך של הרצף החוזר.



ואז בדקו את הפנוטיפ ומצאו קשר לתכונות הנורוטיות.

מדובר בפרומוטור לגן ל- serotonin transporter (5' HTT).

**במחקר תאומים:** 40-60% תרומה גנטית לשונות

בנורוטיות, המנעות ממצבי סכנה, מתח ועוד.

**עכברי k/o לגן:** פנוטיפ די תקין, קצת עליה בנורוטיות.

**תרופות שמדכאות את הטרנספורטר:** מורידות חרדה.

### עוד תכונות התנהגות שבאסוציאציה ל-HTT-5':

- Harm avoidance.
- Seasonality.
- Agreeableness (not in Israeli population).
- Smoking: alleles s- more smoking.
- דחף מיני- אלל s דחף מיני גבוה יותר, אלל l דחף מיני נמוך יותר.

### דופמין:

מעורב בקבלת תחושת הנאה וסיפוק לאחר ביצוע התנהגויות שונות החיוניות להישרדות (אכילה, שתיה, הזדווגות). ישנם אללים שונים של גנים הקשורים למטבולים של דופמין- האם הם יתרמו לשונות הנורמלית באוכלוסיה בתכונות התנהגותיות?

### דופמין ואימפולסיביות:

דופמין תורם לתחושה הטובה המורגשת לאחר סיום פעילות אימפולסיבית. הבסיס להתמכרות לקוקאין, אלכוהול, הרואין, 'פאין וניקוטין הוא העלאת רמת הדופמין המוח בעקבות צריכת הסם.

### פולימורפיזם ברצפטור לדופמין- D4 ותכונות התנהגות:

פולימורפיזם ברצפטור D4 נמצא באסוציאציה לתכונה של novelty seeking (יצר הרפתקנות). חולי פרקינסון עם רמת דופמין נמוכה, מקבלים ציון נמוך בתכונה זאת. במצב ביטוי גבוה של הרצפטור יש אסוציאציה לתכונות כמו: הרפתקנות, סקרנות, אימפולסיביות, התלהבות.

### אלכוהוליזם ותורשה:

רק בסוף המאה ה-20 התקבל הרעיון שהתמכרות לאלכוהול היא מחלה עם תרומה גנטית. בעיה: כיצד מגדירים אלכוהוליזם? ישנם שני סוגים: **Type I:** באנשים מבוגרים יותר. מתחיל כתוצאה מאירוע טראומטי או מתח, התדרדרות מהירה להתמכרות.

**Type II:** מתחיל בגיל ההתבגרות, ההתמכרות לוקחת זמן רב, מלווה בבעיות התנהגותיות אחרות.

### אלכוהוליזם במשפחות- גנטיקה או הסביבה?

מחקרי תאומים: ילדים מאומצים שהוריהם הביולוגיים אלכוהוליסטים, הינם בעלי סיכוי גבוה להתמכר לאלכוהול גם כשהמשפחה המאמצת אינה מונה פרטים המכורים לאלכוהול. בתאומים MZ יותר מתאם לגורמים גנטיים מאשר תאומים DZ. **Type I:** מעט תרומה גנטית- לא יותר מ-30%. **Type II:** 90% תרומה גנטית, כמעט כולם זכרים.

### רצפטור D2 לדופמין:

נבדקו דוגמאות DNA מ-70 גופות של גברים, 35 מהם שתיינים. 69% מהאלכוהוליסטים- בעלי אלל A1. ורק 20% מהלא-אלכוהוליסטים, בעלי אלל A1. לא מצאו שינוי כלשהו ברצף ה-DNA שמסביר את האסוציאציה.

### Alcohol dehydrogenase

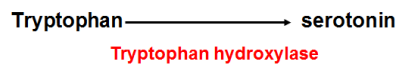
גן אחד שבוודאות משפיע על התמכרות לאלכוהול. מפרק אלכוהול בכבד. אלל אחד של הגן מאוד נפוץ באוכלוסייה אסייתית מקודד לאנזים בעל פעילות נמוכה. התגובה לאלכוהול אצל הומוזיגוטיים אלל זה בעקבות שתיית אלכוהול: בחילה, סומק ועוד. התוצאה: לרבים מאוכלוסיה זו יש יחס שלילי כלפי שתיית אלכוהול.

זהו גורם גנטי לתדירות יחסית נמוכה של אלכוהוליזם בקרב אוכלוסיות אסייתיות מסויימות.

### אלכוהוליזם וסרוטונין:

עכברי k/o לרצפטור 5HT1 $\beta$  לסרוטונין:

- בעלי רמות נמוכות של סרוטונין.
- שותים פי-2 יותר אלכוהול לעומת עכברי wt.
- מעדיפים שתיית מים + אלכוהול מאשר סתם מים.
- דרושה שתיית אלכוהול ברמה גבוהה יותר בכדי שהתנהגותם תושפע.



### תוקפנות:

MAOA מוטציית null: **Tryptophan hydroxylase**  
קיימים שני אללים באדם: L-60%, U-40%.  
זכרים בעלי גנוטיפ L/L הינם תוקפנים יותר לעומת בעלי גנוטיפ U/U או U/L. בנשים אין השפעה.

### דיכאון:

יש בסיס ביולוגי לדיכאון: תרופות שחוסמות טרנספורטר של סרוטונין (לדוגמא- פרוזק) עוזרות כנגד דיכאון. רמות סרוטונין ודופמין נמוכות במצבי דיכאון.

### חיפוש גנים למניה-דיפרסיה:

Unipolar- רק דיכאון: נשים חולות יותר (2:1). הופעה בעשור רביעי וחמישי. אובדן משקל, הפרעות שינה, ליקויים בריכוז, חרדה, חוסר עניין בסביבה, irritability.  
Bipolar- דיכאון ומניה: 1% מאוכלוסיית ארה"ב, מופיע בעשור שני ושלישי. גברים ונשים חולים במידה שווה. בתקופת המניה: היפראקטיביות, זירוז תהליכי חשיבה, טווח ריכוז וענין נמוכים, יצירתיות, תחושת כוח.

### הבסיס הביולוגי למניה-דיפרסיה ודאי:

ניתן לטיפול בתרופות, בשלב הדיכאון בעיקר. המחזוריות של המחלה הבי-פולארית מנותקת מתנאים סביבתיים ברורים.

**אמיש:** באמיש יש תיעוד מאוד מסודר והם מתחננים רק בתוך הקהילה. צורת החיים שלהם מאוד דתית ואחידה. לכן כאשר הופיעו באוכלוסייה זו חולים במניה-דיפרסיה זה נראה כמו מקום טוב להתחיל לחפש את הבסיס הגנטי למחלה.

נעשו מחקרי תאחיזה על משפחה גדולה עם חולים במחלה הביפולרית. נמצאה תאחיזה לאזור מסויים בכרומוזום 11. ה-LOD score היה 3. אבל עד היום לא גילו משהו חד-משמעי באסוציאציה לדיכאון ומניה-דיפרסיה.

### העדפה מינית:

מידת התורשתיות של נטיה מינית:

זכרים- 31-74%.

בנקבות- 24-76%.

קיימים הבליים אנטומיים בין מוחות של הטרוסקסואליים והומוסקסואליים בכמה מבנים במוח. ישנה השפעה הרומונלית על ההתמיינות המינית של המוח.

לכן נבדק הגן של הרצפטור לאנדרוגן בשיטת ה-candidate allele.

ב-1993 יצא מאמר שטען שבכרומוזום X יש אזור שהוא באסוציאציה עם הומוסקסואליות:

התאחיזה החזקה ביותר נמצאה ליד סמן DXS52 בנשים אין הבדל באזור זה בין אחיות לסביות והטרוסקסואליות.

### אם אכן יש באזור זה גן המשפיע על הנטייה המינית:

▪ זהו לא הגורם היחיד הקובע נטייה מינית.

▪ לא משפיע על נשים.

▪ לא הכרחי או מספיק לקבוע נטייה הומוסקסואלית.

### אם קיים גן על כרומוזום X החשוב לקביעת העדפה מינית, כיצד הוא נשמר במהלך האבולוציה?

▪ האלל עובר דרך נשים.

▪ ייתכנו מוטציות חדשות.

## הזדקנות ומחלת אלצהיימר

ככל שתוחלת החיים עולה- מתגלות יותר מחלות "חדשות". מחלת אלצהיימר היא הצורה הנפוצה ביותר של דמנציה שמתרחשת לאחר גיל 40. **דמנציה:** התדרדרות הדרגתית בפונקציות שכליות, בזיכרון ובמיומנויות אינטלקטואליות נרכשות. מחלת אלצהיימר תוארה לראשונה ב-1907. היא פוגעת ב-1.4% מהפרטים במדינות מפותחות. היא אחראית ל-100,000 מקרי מוות בשנה בארה"ב.

המחלה פוגעת באזורים מסויימים במוח, בעיקר באזורים שאחראים על הזיכרון. פוגעת בעיקר באמיגדלה ובהיפוקמפוס.

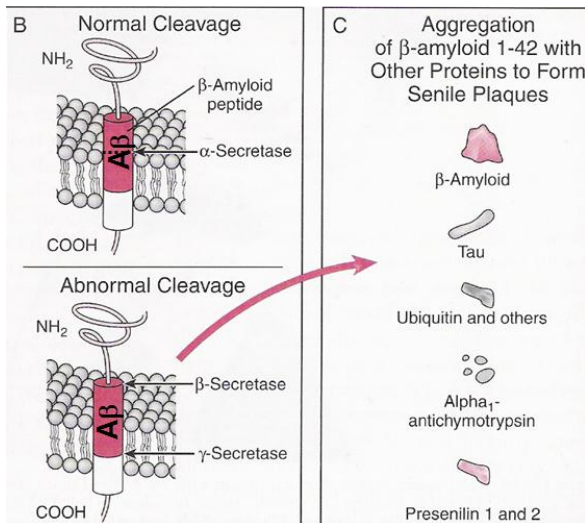
**הפתולוגיה העיקרית במחלת אלצהיימר:** שקיעה של שני חלבונים פיברילריים (סיביים) במוח: **פפטיד  $A\beta$** : שוקע מחוץ לתאים בצורת פלאקים (senile plaques) ביחד עם חלבונים נוספים (בעיקר ApoE).  
חלבון Tau: שוקע בתוך התא ויוצר Neurofibrillary tangles.

### פפטיד $A\beta$ ( $\beta$ -amyloid peptide):

מקור הפפטיד בחלבון פריקורסור הנקרא: Amyloid precursor protein ( $\beta$ APP).  $\beta$ APP הוא חלבון שחוצה את הממברנה של התא פעם אחת. הפונקציה הנורמלית של  $\beta$ APP אינה ידועה. ייתכן והוא מגן על תאי המוח מפציעה. החלבון נמצא באנדוזומים, ליזוזומים, ER וגולג'י. מקור הבעיה- יצירת הפפטיד  $A\beta$ .

באופן תקין  $\alpha$ -secretase מבקע את החלבון ומונע קבלת  $A\beta$ .

### עיבוד לא תקין של $\beta$ -APP:



- ביקוע של  $\beta$ APP ע"י  $\beta$ -secretase בקצה ה-N וע"י  $\gamma$ -secretase בקצה ה-C.
- נוצרים מספר פפטידים באורך 39-43 חומצות אמינות ( $A\beta_{39-43}$ ).
- $A\beta_{42}$  הינו הרעיל יותר לתאי העצב כיוון שהוא שוקע הכי הרבה. יצירה בעודף שלו היא אירוע פתוגני מרכזי במחלה.

### חלבון Tau:

- חלבון שקשור ל-microtubules בתא.
- מתבטא ברמות גבוהות בנוירונים של המוח.
- הוא חשוב ליצירה והיציבות של microtubules.
- פונקציות אלה פחות פעילות כאשר החלבון מזורחן.
- צורות מזורחנות ביתר של החלבון Tau מהוות את הבסיס לקשרים הניורופיברילריים התוך-תאיים כאשר הם שוקעים בתא.

### הגנטיקה של מחלת אלצהיימר:

הוצעו גורמי סיכון רבים למחלה. ביניהם:

- גורמים סביבתיים- טראומת ראש, עישון וחשיפה למתכות כבדות.
- גורמים סוציאליים- דיכאון ורמת השכלה (אם נשארים פעילים שכלית- יורד הסיכוי למחלה).
- גורמים ביולוגיים- גיל מתקדם, היפר-טירואידיזם, גיל אמהות מאוחר.
- היסטוריה משפחתית- של מחלת אלצהיימר, תסמונת דאון ומחלת פרקינסון.



רק בשנים האחרונות ישנן הוכחות למעורבות גנטית באתיולוגיה. מה התרומה הגנטית למחלה אם מוצאים כל-כך הרבה גורמים שעלולים להשפיע על הופעת המחלה?

רמזים למידת התרומה הגנטית למחלות AD ניתן לקבל ע"י התסכלות בסיכון של קרובי משפחה של חולי ADS לחלות אף הם. צריך לזכור שקשה לחשב את הסיכון בגלל גיל הופעה מאוחר.

- הסיכון לקרובי משפחה מדרגה ראשונה הוא 24-50% עד גיל 90.
- בתאומים MZ ערכי ה-Concordance הם 40-50%.
- בתאומים DZ ערכי ה-Concordance הם 10-50%.

לאחר בדיקת המשפחות בהן יש חולים במחלה הגיעו למסקנה שיש שתי צורות הורשה למחלה:

הורשה אוטוזמלית דומיננטית      הורשה מולטיפקטוראלית



### הורשה אוטוזמלית דומיננטית:

**βAPP**: ייצור מוגבר של  $A\beta_{42}$  גורם להופעת המחלה. המועמד הראשון וההגיוני ביותר היה הגן ל-βAPP. הרציונל: מוטציות בגן יגרמו ליצירת  $A\beta_{42}$  בכמות מוגברת. **תמיכה**: בחולי תסמונת-דאון מופיעה המחלה בגיל 40 ולהם 3 עותקים של כרומוזום 21 שבו הגן. נמצאו כמה משפחות עם הורשה אוטוזמלית דומיננטית עם תאחיזה לכרומוזום 21. חלקם נמצאו בתאחיזה לאזור של הגן APP וחלקם לא. נמצאו כ-15 מוטציות שונות במשפחות אלה. המוטציות גורמות ליצירה מוגברת של  $A\beta$  ובעיקר של  $A\beta_{42}$ . חלק ניכר מהמוטציות קרובות לאתר הביקוע של  $\gamma$ -secretase. **PSEN1**: נמצאו משפחות עם תאחיזה ל-14q24. הגן באזור שובט ונקרא: PSEN1. המחלה מופיעה בגילאים 28-62 ובמוצע בשנות ה-40. החדירות מאוד גבוהה. החלבון מתבטא בתאי המוח אך תפקידו איננו ברור. ייתכן ב- trafficking של APP. נמצאו עד כה כ-130 מוטציות בגן. המוטציות מעלות את ייצור  $A\beta_{42}$ . המוטציות דומיננטיות כנראה בגלל gain of function. **PSEN2**: חיפוש במאגרי המידע גילה גן עם הומומולוגיה גבוהה ל-PSEN1. גן זה מופה לזרוע הארוכה של כרומוזום 1. מספר משפחות עם מחלת אלצהיימר עם הופעה מוקדמת מופו לאזור זה. במשפחות אלה התגלו מוטציות בגן PSEN2. נמצאו רק כ-6 מוטציות בגן. החולים מפתחים את המחלה בגיל מאוחר יותר לעומת חולי PSEN1 והמחלה מתקדמת לאט יותר. יש מספר מועט של נשאים שאינם מפתחים את המחלה.

### מה הקשר בין PSEN1 & PSEN2, βAPP?

ה-presenilins (תוצרי PSEN) נחוצים ליצירת  $A\beta$  מ-βAPP. תוצר הגן PSEN1 כנראה מבצע את פעילות ה- $\gamma$ -secretase ביחד עם חלבונים נוספים. פעילותו של  $\beta$ -secretase נעשית ע"י חלבון הקרוי: BACE1 ולא נמצא עד כה קשר ברור בין מוטציות בגן זה לבין הופעת המחלה.

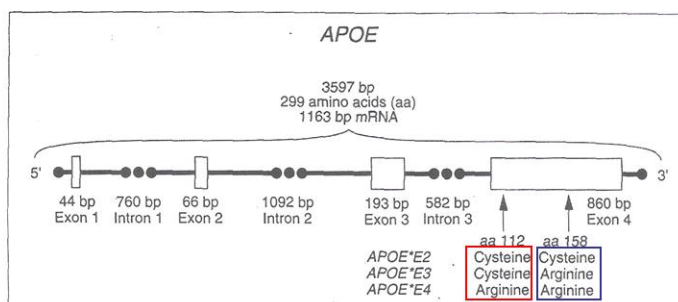
### הורשה מולטיפקטוראלית של מחלת אלצהיימר:

- רוב החולים (90%) מפתחים את המחלה בגיל מבוגר יותר וההורשה איננה מנדלית.
- הגן היחיד שנמצא עד כה שתורם להופעת המחלה בסוג ההורשה זה הינו **APOE**.
- הגן זוהה על-סמך תאחיזה במשפחות עם הופעה מאוחרת של המחלה (1991).

#### Apolipoprotein E

- APOE נמצא במוח, נוזל השדרה ובזרם הדם.
- APOE מקודד ל-lipoprotein.
- אחראי על טרנספורט ומטבוליזם של כולסטרול.
- ידוע כגורם סיכון במחלות לב.
- נמצא בפלאקים הסניליים בחולי AD ובנוזל השדרה נמצא קשור לפפטיד  $A\beta$ .
- ישנן 3 צורות של APOE: E2, E3, E4.
- באוכלוסייה לבנה נמצא קשר חזק מאוד בין אלל E4 לבין AD משפחתי עם הופעה מאוחרת, וכן למקרים ספורדיים.
- שני אללים של E4 מעלים את הסיכון לעומת אלל אחד של E4. אלל אחד- פי 3, שני אללים- פי 10.
- לעומת-זאת אלל E2 מקנה הגנה מסוימת מפני AD.
- אלל E4 איננו דומיננטי.
- רק מחצית מהנשאים לאלל זה מפתחים את המחלה.
- כנראה שיש אינטרקציה בין תוצר האלל לבין הפקטורים בסביבה שמשפיעים על הופעת הפנוטיפ.
- לא ברור המנגנון דרכו E4 משפיע על הופעת המחלה.

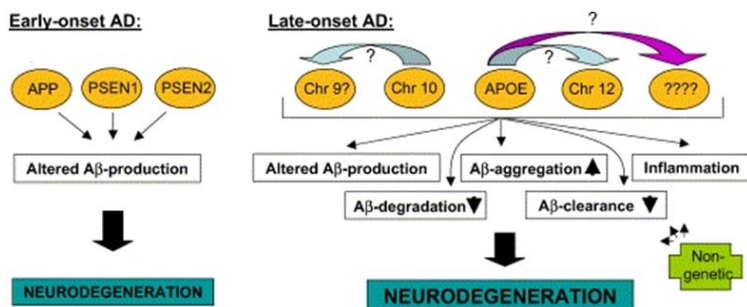
6% – APOE – E2  
78% – APOE – E3  
16% – APOE – E4



ישנם עוד גנים רבים שלא זוהו שמשפיעים על הופעת המחלה, הן עם הופעה מוקדמת והן עם ההופעה המאוחרת.

### סיכום- הקטגוריות של פונקציות אליהם שייכים הגנים המועמדים להשפעה על הופעת המחלה:

- גנים שישפיעו על יצירת  $A\beta$ .
- גנים שישפיעו על אגרגציה של  $A\beta$ .
- גנים שישפיעו על פירוק של  $A\beta$ .
- גנים שישפיעו על פינוי של  $A\beta$ .
- גנים שישפיעו על דלקת.



## טיפול במחלות גנטיות

### מחלות גנטיות מסובכות:

- תרומה של גורמים גנטיים וסביבתיים.
- האתילוגיה (הסיבות למחלה) בדרך-כלל כמעט ולא מובנות.
- הטיפול הוא בדרך-כלל לא "גנטי" בגישה שלו.

### הטיפול:

1. אם מזהים גורם סביבתי- שינוי הסביבה כדי למזער את ההשפעה הגנטית של המחלה.
2. ניתוח: תיקון מומים בלב, שפה שסועה וכו'.
3. Replacement therapy: השלמה של אנזים שחסר, לדוגמא: אינסולין לחולי סכרת.

### הפרעות של גן יחיד:

- ב-50% מהמחלות הגן שגורם למחלה לא זוהה.
- גם כאשר הגן כן ידוע, לפעמים המנגנון של הפתולוגיה לא ידוע.
- הנזק בחלק מהמקרים מופיע כבר בשלב העוברי ואינו ניתן לתיקון.

### הטרוגניות באלים:

אללים מוטנטיים שונים ניתנים לטיפול בדרכים שונות, כלומר, לא תמיד חולים באותה המחלה יקבלו את אותו הטיפול.

- כאשר ישנה פעילות אנזימטית נמוכה: מגבירים את היציבת של החלבון הקיים.
- כאשר אין כלל פעילות אנזימטית: מחליפים את החלבון איכשהו.
- כאשר המוטציה בעקבות stop codon: read-through therapy, גורמים לכך שבתהליך התרגום יהיה דילוג על ה-stop codon.

מסקנה: הטיפול מותאם לסוג המוטציה ולא לסוג המחלה.

## אסטרטגיות הטיפול תלויות ברמה שבה מתערבים:

### Mutant gene (טיפול ברמת הגן):

- שינוי הגנוטיפ הסומטי: (א) gene therapy - מוציאים את הגן, מתקנים ומחזירים. (ב) השתלה.
- שינוי התנהגות הגן בטיפול תרופתי: התרופה תגרום לגן להתנהג "יותר יפה"

### Mutant mRNA (טיפול ברמת התעתיק):

- RNA interference: צורת טיפול שגורמת לדגרדציה של התעתיק המוטנטי.

### Mutant protein (טיפול ברמת החלבון):

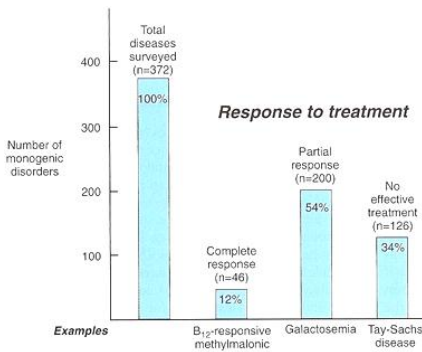
- Protein replacement: נתינת החלבון החסר ממקור חיצוני.
- הגברת פעילות של חלבון שלא עובד מספיק טוב.

### טיפול ברמה המטבולית:

- דיאטה מסויימת שאוסרת מטבוליטים מסויימים (כמו פניאלאנין ב-PKU).
- נתינת תרופות שמשפיעות על המטבוליזם.

### ברמת הפנוטיפ הקליני:

- התערבות רפואית: עירוי, ניתוח לתיקון פגם מולד.
- טיפול ברמה המשפחתית:
- ייעוץ גנטי.



- סריקה אחר נשאים.
- דיאגנוזה של סיפטומים אופייניים למחלה.

## טיפול מולקולרי במחלות גנטיות:

### טיפול ברמת החלבון:

- הגברת פעילות של חלבון שלא עובד מספיק טוב: לפעמים אפילו עליה מועטה ברמת פעילות החלבון יכולה לשפר את הפנוטיפ של המחלה. יש מוטציות שבהן פעילות החלבון יכולה להשתפר ע"י נתינת קופקטורים המשפרים את הפעילות.
- עוזרים לחלבון מוטנטי להתקפל כמו שצריך: לעיתים החלבון המוטנטי לא מתקפל כמו שצריך ולכן נשאר תקוע ב-ER ועובר דגרדציה. Curcumin מעכב את משאבת הקלציום ב-ER ובכך פוגע בקישור החלבון המוטנטי ע"י צ'פרון התלוי בקלציום (וכך החלבון לא נתקע ב-ER).
- דילוג על stop codons מוטנטיים: 11% מהמוטציות הן nonsense. אנטיביוטיקת Aminoglycoside מעודדת את קומפלקס התרגום לא להכניס חומצת אמינו לתוך האזור שבו יש את ה-stop codon. אבל מדובר בחומרים רעילים ולכן מנסים למצוא חומרים פחות רעילים שיגרמו לאותו האפקט.
- החלפת חלבון חוץ-תאי: הוספת החלבון החסר לדם. זה יעיל אך גם לכך יש בעיות: קשה להכין כמויות גדולות, זמן מחצית החיים של חלבון הוא שעות ספורות, סיכון בזיהום של החלבון עם וירוסים ודברים אחרים.
- החלפה חוץ-תאית של חלבון פנים-תאי: ניתן לטיפול ע"י gene therapy, השתלה של מוח עצם מתורם זהה ב-HLA, השתלה פנימה של האנזים התקין.
- החלפת חלבון פנים-תאי ע"י cell targeting: חלק מהחלבונים מתפקדים רק בתוך התא ולכן החלבון שמוחלף צריך להיות מוכוון לתא ספציפי. לצורך הכוונת החלבון למאקרופאג' עושים שינויים בחלבון

### טיפול ברמת הביטוי:

- העלאת רמת הביטוי: מהעותק התקין או מהעותק הפגום- אם המוטציה היא חוסר בביטוי.
- הגברת ביטוי מלוקוס אחר בגנום: גורמים לביטוי של חלבון שיכול לפצות על החלבון המוטנטי.
- דוגמא: נתינת decitabine שגורם להפחת מתילציה בפרומוטור של  $\gamma$ -globin המקודד להמוגלובין העוברי HbF. זה גורם להעלאת רמת החלבון  $\alpha_2\gamma_2$ .
- הפחתת הביטוי של תוצר אלל מוטנטי: RNAi- דגרדציה של תעתיקים ספציפיים משמשת לפגיעה בתעתיקי האללים המוטנטיים, ללא פגיעה בתעתיקים המגיעים מהאלל הנורמאלי.

### שינוי הגנום הסומטי:

- השתלת איברים: לקיחת איברים מתורמים בעלי גנוטיפ wt. שתי סיבות מרכזיות להשתלה:
  - (a) איבר בגוף מייצר תוצר מוטנטי אשר פוגע ברקמות אחרות בגוף (למשל: כבד).
  - (b) החלפה של איבר אשר נפגע כתוצאה ממחלה גנטית
 הערה: יש כמה מחלות מטבוליות בכבד שזה הפיתרון היחיד עבורן.
- השתלת תאי גזע:
  - (a) תאי גזע עובריים: באופן תיאורטי ניתן לעשות מתאי גזע עובריים כל תא שהוא, אך צריך לגלות איך בדיוק לגרום להתמיינות הזאת.
  - (b) תאי מח העצם: גורם לפגיעות ע"י מערכת החיסון.
  - (c) תאי גזע מדם טבורי: לא מפעילים את המערכת החיסונית וטובים לכולם, לא רק לאדם ממנו הם נלקחו. יש יתרון על-פני תאים ממח העצם.

### בעיה עם השתלות:

- תמותה משמעותית כתוצאה מהשתלות איברים.
- תחלואה עקב דלקת כתוצאה מתקיפת המערכת החיסונית.

- ישנו מלאי מוגבל של איברים להשתלה.

בעתיד: קומבינציה של תאי גזע ו-gene therapy: שימוש בתאי גזע של החולה עצמו שיגודלו in-vitro, יתקנו ע"י gene therapy ויוחזרו לגופו של החולה.

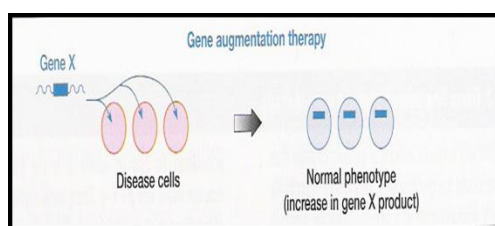
### Gene therapy:

מודיפיקציה מכוונת של תאי החולה גדי לרפא באופן גנטי. אין עדיין הוכחה כי הטיפול הזה יעיל באופן תמידי, אבל ישנן הצלחות מוכחות לטווח הקצר.

- תרפיה של תאי נבט (germ line): מודיפיקציה של גמטות, זיגוטה או עובר בשלבים ראשוניים. זה אסור במדינות רבות מסיבות אתיות.
- תרפיה של תאים סומטיים: תיקון תאים ספציפיים אצל החולה

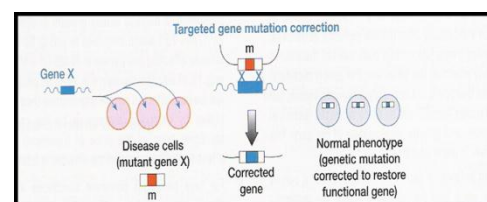
### שיטות שונות ל-Gene therapy:

#### Gene supplementation:



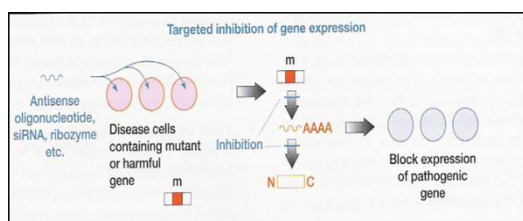
סיפוק תוצר תקין של גן פגוע. נועד לטיפול במקרי loss-of-function (למשל: ציסטיק פיברוזיס). לא מתאים למקרים שבהם כבר נגרם נזק בלתי הפיך כתוצאה מהמוטציה (למשל: נזק במהלך ההתפתחות העוברית).

#### Gene replacement:



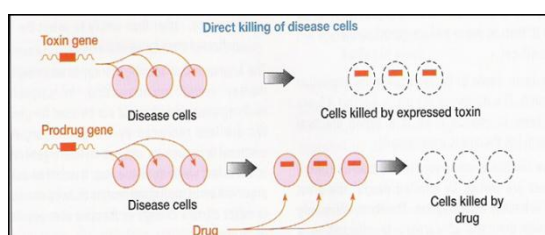
החלפת הגן המוטנטי בעותק תקין, או תיקון המוטציה in-situ (ברמת ה-DNA). זה מתאים למקרים של gain-of-function שבהם החלבון המוטנטי עושה משהו שגורם לנזקים.

#### עיכוב מכון של ביטוי הגן:



בעיקר מתאים למצב של מחלה מדבקת, כאשר מכוונים לפונקציונאליות החיונית לפתוגן. יכול לשמש גם להשתקת אונקוגנים בסרטן, או להשתקת פעולות לא רצויות של מערכת החיסון. ייתכן שניתן לשימוש להשתקת מוטצית gain-of-function במחלה מורשת גנטית.

#### הריגה מכוונת של תאים ספציפיים:



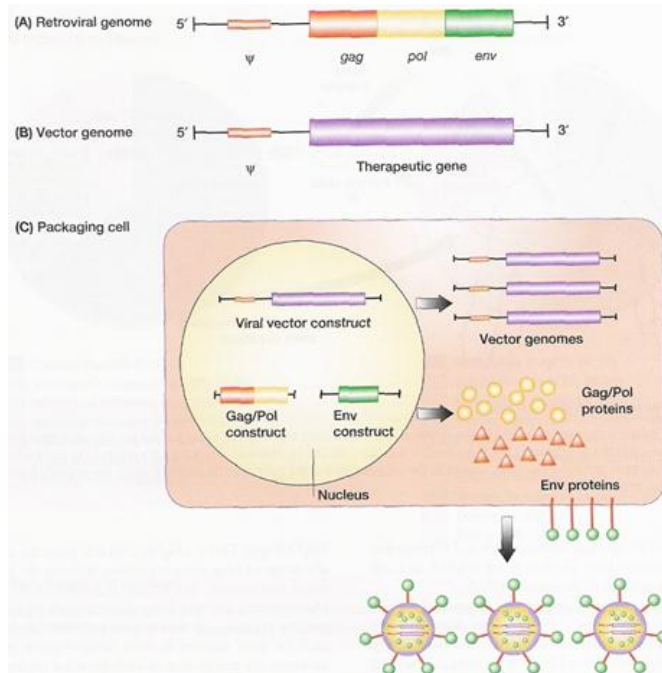
הורגים את התאים שהם המקור לבעיה, למשל: בסרטן. ניתן לביצוע למשל ע"י הכנסת גן לתא שייבטא חלבון שהוא רעיל לתא.

#### שיטות להכנסה וביטוי של גן בתא ספציפי:

- (a) גנים יכולים להיות מוכנסים לתאי החולה במעבדה או בתוך הגוף. אם זה אפשרי לגדל את התאים שאליהם רוצים להכניס את הגן, הגן מוכנס: ex-vivo. השיטה ישימה עבור תאים הנגישים להסרה. החדרת גנים in-vivo נעשית רק כאשר האופציה הראשונה אינה אפשרית.
- (b) קונסטרקטים שמתוכננים לבצע אינטגרציה לתוך הגנום או להישאר כאפיזומים. כדי להשיג ביטוי גנים לטווח ארוך, רצוי שהגנום המהונדס ייכנס לגנום של החולה, ורצוי בתא גזע. זה יבטיח כי הגן החדש ישרוד במהלך השכפולים של התא. אבל יש לכך מספר בעיות:
- a. לסביבה הכרומוזומאלית המקומית יכולות להיות השפעות בלתי ניתנות לחיזוי על רמת הביטוי.

b. נקודת ההכנסה יכולה להיות באמצע הרצף של גן חיוני- מה שיוביל לפגיעה בו.  
 c. הכנסה של קונסטרוקט שמתבטא באופן מוגבר יכולה להפעיל אונקוגן סמוך.  
 לכן מבחינה בטיחותית- נוטים להחדיר DNA בצורה אפיזומלית- ללא אינטגרציה לגנום. אבל אז יהיה צורך לחזור על הטיפול שוב ושוב (כי הקונסטרוקט יאבד בחלוקות התא). אין בעיה בטיפולים קצרי טווח כמו טיפול בסרטן- לא נחוץ ביטוי ארוך טווח.  
 (c) שימוש בוירוסים כווקטורים להחדרת גנים: השיטה הנפוצה ביותר להחדרת גנים. משמש רק עבור תאים שמתחלקים, כי רק בזמן המיטוזה יש לוירוס גישה אל הכרומוזומים.  
 a. רטרווירוסים: הוירוס נכנס לציטופלסמה, נעשית סינתזה של cDNA מהגנום. ה-cDNA עובר אינטגרציה לכרומוזומים של התא המארח במיקום רנדומאלי. יכול לשמש לטיפול בסרטן: למשל במוח רק תאים סרטניים מתחלקים ולכן ניתן להדביק אותם באופן סלקטיבי.

בעיה: הרטרווירוסים יכולים להדביק תאים נוספים.



פיתרון: בניית קונסטרוקט "בטוח"- משאירים רק את ה-psi החיוני לעטיפת הוירוס במעטפת החלבנית ואחריו שמם את הגן שרוצים להחדיר. את 3 הגנים הנוספים מספקים לתא ע"י packaging cell. לאחר ההחדרה לגנום אין אפשרות לייצר וירוסים נוספים כי נכנס לגנום רק המקטע הסגול ללא 3 הגנים החיוניים.

(d) ווקטורים לא ויראליים: שיטות אלה בטוחות אך שיעור ההצלחה בהחדרת הגנים הוא נמוך יותר, ותקופת הביטוי של הגן היא קצרה.  
 a. ליפוזומים: ווסיקולות סינתטיות שנוצרות באופן ספונטני כאשר מערבים ליפידים ספציפיים בתמיסה מימית. יכולים להעביר DNA לתוך תאים ע"י אנדוציטוזה. נעשה שימוש נרחב בליפוזומים קטיוניים. ה-DNA לא עובר אינטגרציה לתוך הכרומוזומים.  
 b. שיטות נוספות: הזרקה ישירה ע"י: particle bombardment, אנדוציטוזה מכוונת של רצפטורים.

### שיטות לתיקון או עיכוב גן פתוגני בתא/רקמה:

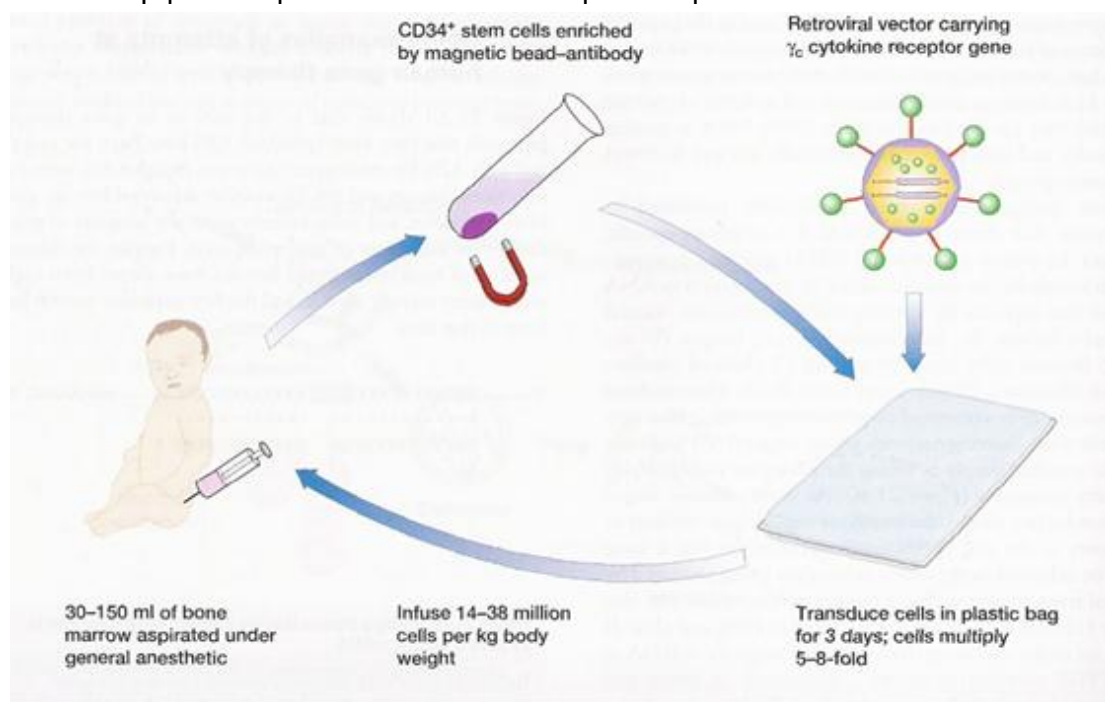
ישנן מספר שיטות, אף-אחת מהן עדיין לא הוכחה כאפקטיבית.

- תיקון האלל המוטנטי ע"י רקומבינציה הומולוגית: בשמר רקומבינציה הומולוגית עובדת בצורה יעילה. בתאי יונקים זה יותר קשה להשיג רקומבינציה שתהיה יעילה.
- מניעת תרגום ע"י antisense-RNA: ה-antisense עובר אליו היברידיזציה וזה גורם לדגרדציה שלו ע"י מנגונים בתא שמפרקים dsRNA. זה מאוד קשה טכנית כי קשה לחזות את התנהגות ה-antisense.

- הריסה או תיקון סלקטיבי של ה-mRNA ע"י ריבוזימים: חלק ממולקולות ה-RNA מתפקדות כאנזימים: ribozymes. חלק מהריבוזימים מפרקים רצפי RNA באופן ספציפי. ניתן לתכנן זאת כך שיפורקו תעתיקים של גם מוטנטי דומיננטי בעוד שתעתיקים תקינים לא ייפגעו. שיטה זו עדיין בפיתוח ולא נעשה בה שימוש, מלבד בניסויים.
- עיכוב מכון של אלל מוטנטי ע"י RNAi

**הצלחה הראשונה בריפוי גנים: ריפוי SCID, הנמצא בתאחיזה ל-X:**

המחלה נגרמת כתוצאה מגן מוטנטי על X המקודד לחלבון החשוב לייצור T cells ו-B cells למערכת החיסונית. זוהי מחלה ממש קטלנית. נעשה ניסוי: הוציאו מח עצם והכניסו פנימה עותק נורמלי של הגן בעזרת רטרו-וירוסים. 9 מבין 11 הילדים בניסוי התחילו לייצר את החלבון התקין ונרפאו מהמחלה. כעבור שנה: שניים מהילדים פיתחו לוקמיה. המקום אליו נכנס הוירוס מאוד קרוב לאונקוגן: LMO2.



**Figure 21.11: Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency disease (X-SCID).**  
 This is the first clear success of gene therapy. Of 11 boys aged 1–11 months treated at the Necker-Enfants Malades Hospital, Paris, nine were cured. See Hacein-Bey-Abini *et al.* (2002). Two of the nine unfortunately later developed a form of leukemia, almost certainly as a result of activation of the *LMO2* oncogene by nearby insertion of the retroviral vector.

**ריפוי גנים וסרטן:**

- הכנסת גן כדי להחזיר את הפונקציונאליות של tumor suppressor.
- השתקה של אונקוגנים.
- שינוי תאים סרטניים והפיכתם לפגיעים יותר ע"י מערכת החיסון.
- מניפולציות גנטיות לאקטיבציה של אפופטוזיס בתאים סרטניים.

**ריפוי גנים in-vivo לסרטן במוח:**

ניתן באופן גנטי לשנות את התאים הסרטניים כך שהם יהפכו מולקולה לא רעילה למולקולה שהיא כן רעילה, שתגרום להריגתם:

- מכניסים לתוך הגידול רטרו-וירוס המבטא את הגן טימידין-קינאז של ההרפס
- הרטרו-וירוס ידביק רק את התאים הסרטניים כי רק הם מתחלקים.
- נותנים חומר לא רעיל: gcv שלא מוכר ע"י הטימידין-קינאז האנושי, אך כן מוכר ע"י הטימידין-קינאז בתאים הסרטניים- והופך לחומר רעיל שהורג אותם.

