

וירולוגיה מולקולארית חלק א'

ב – 1915 Twort עבד עם *Micrococcus* שגדל במושבות שאינן שקופות בדרך כלל, כשהוא ראה מושבות שקופות הוא קרא להם Glassy ובהם התגלה כי מתו התאים, כאשר הוא נגע במושבה שקופה ולאחר מכן במושבה רגילה הוא ראה שגם בה מתים התאים. כתוצאה מסדרת ניסויים הוא הגיע למסקנה כי מדובר בוירוסים שתוקפים את החיידקים. בשנת 1917 גילה את הנושא מחדש החוקר D'Herelle שאף הציע שימוש בוירוסים אלו לשם חיסול חיידקים, חוקר זה גם נתן להם את השם בקטריופאג' (אוכל חיידקים).

החיידק K12 הוא סוג של *E. Coli* שבודד ב – 1920 בקליפורניה ובו משתמשים בעיקר לניסויים אל אף שאינו הזן הטיפוסי של *E. Coli*.

הדרך הפשוטה והנפוצה ביותר לספור וירוסים היא Plaque Assay בו משתמשים בצלחת פטרי עם מזון ואגר, פאג'ים וחיידקים, כעבור כ – 6 עד 8 שעות ניתן לראות מרבד של חיידקים עם חורים שקופים שהם תוצאה של הוירוסים. כדי לדעת כמה וירוסים יש במבחנה מוהלים אותה ל – $10^{-1} * 10^{-2} * 10^{-2}$ ואז במידה ויש X מושבות אז היו במקור $X * 10^5$ וירוסים במבחנה. אנו שואפים שהיו בין 50 ל – 700 פלאקים בצלחת, מספרים אלו נקבעו כיוון שמעל 50 זה בשביל השונות ומתחת ל – 700 כדי שלא היו צפופים מידי ומחוברים.

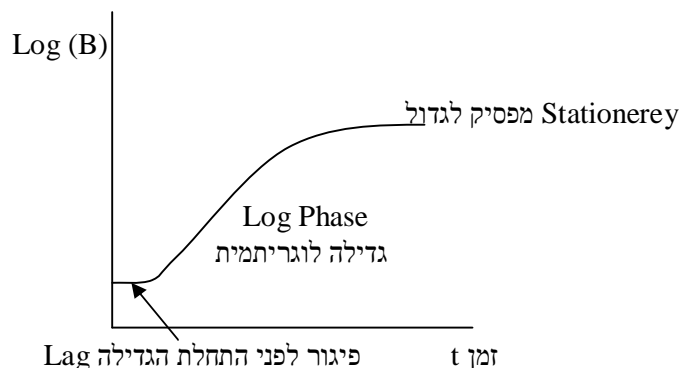
את הפאג'ים ניתן לראות במיקרוסקופ אלקטרוני אך גם במיקרוסקופ אור מיוחד בו האור מגיע מהצד והיכן שמצוי פאג' יש החזרת אור לכיוון העינית.



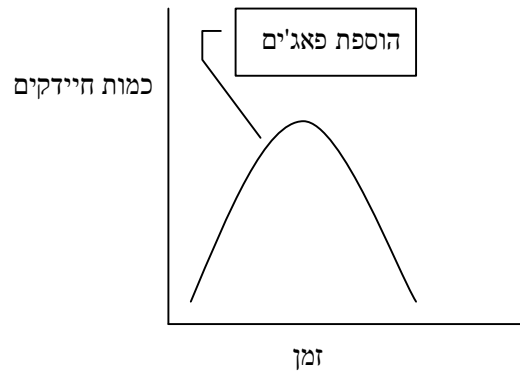
כאשר מדברים על חיידקים ופאג'ים יש מספר מוסגים נפוצים, הראשון הוא Efficiency Of Plating (EOP) שזה מספר הפאג'ים (ϕ) לחלקיק, אנו רוצים שגודל זה ישאף ל – 1. מוסג נוסף הוא Multiplicity Of Infection (MOI) שזה היחס בין מספר הפאג'ים (ϕ) לחיידקים (B) כלומר ϕ/B . מוסג שלישי הוא Plaque Forming Units (PFU) שזה כמה חלקיקים יש.

יש סוגים רבים של פאג'ים, בניהם יש כאלו שהם בעלי DNA שיכול להיות חד סיבי או דו סיבי ויש כאלו עם RNA שגם הוא יכול להיות דו או חד סיבי. בפאג'ים בעלי ה – DNA החד סיבי ניתן להשתמש לשיבוטים כווקטור חד סיבי ולקביעת רצף DNA. בפאג' T4 אין את הבסיס C – DNA אלה בסיס דומה אך מכיל גלוקוז ובכך נמנעת התקיפה באנזימי רסטריקציה מהחיידק כיוון שאין את אתר הקשירה של האנזים.

חיידק שגדל מתחלק ונותן שתי תאי בת וכך אלה:

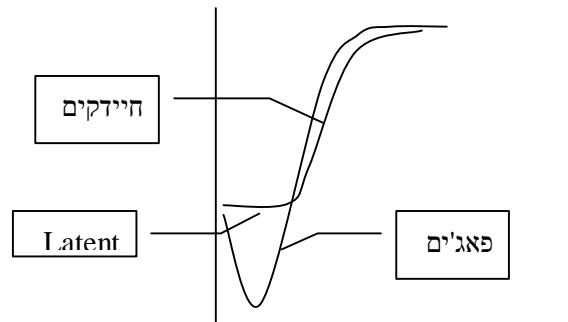


כשאנו מגדלים חיידקים הם גדלים בגידול ממוצע של 100 מה שניקרא Average Burst Size, כלומר על כל חיידק במקור יש לנו בסופו של דבר 100 צאצאים. כמות החיידקים גדלה במהירות אך כמות הפאג'ים גדלה במהירות רבה יותר ולכן אם נכניס לתמיסת חיידקים מתרבים פאג'ים הם ישמידו את החיידקים יותר מהר משהם נוצרים עד שכל החיידקים ימותו.



כשאנו מסתכלים על Sophistication אנו נוטים לחשוב את עצמנו כיצורים המתוחכמים ביותר אך בהשוואה קצרה עם חיידקי E. Coli אנו רואים כי יש כ-10 מיליארד חיידקים על כל אדם, אנו קיימים רק 70 עד 100 אלף שנה הם קיימים $150 \cdot 10^{16}$ שנה זמן דור שלנו הוא 25 שנים ובהם יש כ-1000 דורות בשנה, ופרט נוסף הוא שלנו יש 30 עד 100 אלף גנים ול- E. Coli יש רק 4000. אך כאן לא נגמרת ההשוואה קיים עוד קריטריון אחד והוא סלקציה באדם 100000 איש מולידים 200000 מהם מתים 40000 בסלקציה ו-60000 מגורמים לא תלויים כגון מחלות, חוסר מזון, תאונות וכו' כך ששורדים 100000. לעומת זאת בחיידק E. Coli כל מוטנט ואף הקל ביותר נותן צאצא שלא ישרוד בסלקציה. מהשוואה זו ניתן לראות כי הסלקציה בחיידקים היא ברמת תחכום גבוהה יותר מאשר באדם.

כדי לראות מה קורה בחיידק אנו גורמים לפיצוץ לפני שהפאג'ים הורגים אותו, את זה עושים על ידי CHCl_3 (כלורופורם) הממיס את ממבראנות החיידק ואינו פוגע בפאג'ים כיוון שהם עשויים מחלבון וחומר גנטי אך ללא ממבראנה. כאשר נעשה זאת ונעקוב אחרי הפאג'ים והחיידקים מקבל את הגרף הבא:



לניסוי כזה קוראים Premature Lysis. ולתמיסה המכילה רק פאג'ים וחלקי תאים קוראים ליזאט Lysate.

יש מספר שלבים שכל פאג' עובר לשם תקיפה ופיצוץ של החיידק, השלב הראשון הוא Adsorption שזה שלב בו הפאג' מאתר את החיידק וניצמד אליו, השלב השני הוא Injection שזה החדרת החומר הגנטי לחיידק, השלב הבא הוא Replication שזה שיכפול המידע הגנטי של הפאג' תוך כדי יצירת חלבונים על ידי מנגנוני החיידק ובסוף השלב האחרון ליזיס.

ה - Poisson Distribution של החיידקים על ידי הפאג'ים ניתן לחישוב על ידי הנוסחה: $P_r = \frac{n^r}{r!} e^{-n}$

כך ש- P_t זה הפרקציות המודבקות, r זה מספר התוצרים במבחנה מסוימת ו- n מספר ממוצע של מודבקים. דוגמאות מחושבות ראה בדפים שחולקו.

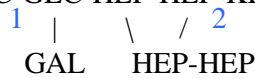
כששני גופים נוגעים אחד בשני אז מתקיים $\frac{dP}{dt} = k * n * p$ כך ניתן לדעת כמה זמן ייקח עד מגע בין שני חלקיקים, לדוגמה כשיש 10^8 חיידקים ו- $k=0.5*10^{-7}$ והספיחה היא של 99% אז:

$$\text{Log}(P/P_0) = -(1/2.3)*k*n*t \Rightarrow \log(1/100) = -2 = -(1/2.3)*0.5*10^{-7}*10^8*t$$

$$t=0.92\text{min}=55\text{sec}$$

שלב ה- Adsorption הוא על ידי קשירת הפאג' לרצפטור על פני החיידק, זיהוי זה הוא ספציפי ובמקרה של E. Coli והפאג' T4 ההכרה היא ל- Lipopolysaccharide. בתגובה לזה החיידקים משנים את הרצפטורים כלי שלא יתאימו לפאג' אך גם הפאג'ים משתנים כדי להכיר את החלבון החדש.

מבנה ה- Lipopolysaccharide הוא GLCNAC-GLC-GLC-GLC-HEP-HEP-KDO-Lipid A



HEP = Heptose ; GLC = Glucose ; GAL = Galactose ;

GLCNAC = N Acetyl Glucosamine ; KDO = Keto Deoxy Octanoate


מוטנט באזור המסומן ב- 1 רגיש עדיין ל- T4, כלומר T4 יכול לפגוע בחיידק זה, בעוד שהמוטנט המסומן ב- 2 אמיד בפני התקפת הפאג' T4, משני מוטציות אלו ניתן ללמוד כי הפאג' ניקשר לחלק שבניהם. הקשירה לסוכר זה היא קשירה ראשונית וניתנת לפרוק בטלטול אך הקשירה השניונית היא לחלבון Lam C והיא בלתי הפיכה.

יש שתי דרכים להכנת פאג'ים במעבדה, האחת היא Liquid Lysate שזו תערובת של פאג'ים עם מרכיבי תאים שהתפוצצו, כדי ליצור את הליזאט אנו מגדלים חיידקים במצע מזון (Luria Broth) כשיש 10^8 חיידקים למיליליטר מכניסים 10^6 פאג'ים ותוך זמן קצר של כ- 30 דקות יש פי 2 חיידקים אך אין שינוי במספר הפאג'ים, לאחר שעה יש כבר $4*10^8$ חיידקים ו- 10^8 פאג'ים, לאחר 90 דקות יש $6*10^8$ חיידקים (לא $8*10^8$ כיוון שיש - 60 דקות מוך ה- $4*10^8$ חיידקים 10^8 מודבקים כך שנשארים $3*10^8$ חיידקים בלבד) ועדיין 10^8 פאג'ים, כעבור 120 דקות יש כבר $1.2*10^9$ חיידקים ו- 10^{10} פאג'ים, כך כל החיידקים מודבקים וכעבור 180 דקות כולם עוברים פיצוץ ומתקבל הליזאט. את החיידקים שנשארו בעקבות מוטנטים או מזל הורגים עם CHCl_3 שכפי שאמרנו כודם גורם לליזיס.

שיטה שנייה היא Plate Lysate שהיא פועלת על אותו עיקרון אך ההבדל הוא שכאן סמים חיידקים על צלחת פטרי ומוסיפים מאט פאג'ים, כתוצאה מכך מתקבל משטח של חיידקים ובו פלאקים שמספרם וגודלם הולך וגדל עד שכל הצלחת עוברת לשליטת הפאג'ים, כלומר שכל החיידקים מושמדים.

הפאג' מורכב מראש Head או Capsid שלאחריו יש צווארון Collar וזיפים Whiskers, לאחר מכן יש את הזנב Sheath ואחריו הבסיס Base Plate שממנו יוצאים סיבים שהם Tail Fibers.

כשיש פלאק אין הדבר מחייב שהסיבה היא פאג' יתכן כי הפלאק נובע ממוטציה בחיידק שגורמת למוות או מרכיב בסביבה שמונע את גדילת התא כמו אנלוג לחומצה אמינית שגורם לכך שהחיידק לא יצור את החומצה כיוון שהוא חושב שהיא קיימת אבל האנלוג לא ניתן לשימוש ביצירת החלבון וכך התא מת, אפשרות נוספת היא אנטיויטיקה שמעכבת את התפתחות החיידק, בנוסף קיימים גם חומרים כמו Colicin (הורגי E. Coli) שהם חומרים בעלי מישקל של בערך 30KD. חומרים אלו מיוצרים על ידי גנים של חיידקים שונים בכדי להרוג את המתחרים, אך לא חיידקים מאותה משפחה שלהם יש את החיסון לחומרים אלו. מספיקה מולקולה אחת של חומר כזה בכדי להרוג חיידק. ה- Colicin הוא חלבון הוא מחזיר את הממבראנה וגורם להפסקת סינתזת ה- DNA אך חלבון זה לא משכפל את עצמו כמו פאג'ים.

חומר נוסף הנותן פאג'ים כמו הוא החיידק Bdellovibrio (בתרגום חופשי עלוקה בעלת צורה ) חיידק זה הוא אוכל חיידקים אחרים במנגנון שונה מפאג'ים כיוון שהוא חיידק הוא ניצמד לחיידק אחר

ומפרק אותו לצורך מזון, חיידקים אלו תוקפים מגוון רב של חיידקים על ידי חירור הממבראנה של החיידק הפונדקאי המסת כל המרכיבים שלו לצורך מזון ושיכול עצמי ל – 5 עד 6 צאצאים ואז הם מפרקים את דופן התא ויוצאים לחפש חיידקים אחרים. בניגוד לפאג' חיידק זה לא זקוק לחיידק הפונדקאי לשם הכפלתו אלא לשם מזון בלבד. הבדל נוסף בין הפאג'ים לחיידקים אלו הוא שהפאג'ים יהרגו את כל החיידקים בתרבות תוך שעות ספורות בעוד שהחיידקים אלו יעשו זאת במספר ימים. הבדל נוסף הוא שהפאג'ים זקוקים לחיידקים הפונדקאים בחיים כדי לנצל את המנגנונים שלהם בעוד שהחיידקים יכולים להשתמש גם בחיידקים מתים כמזון.

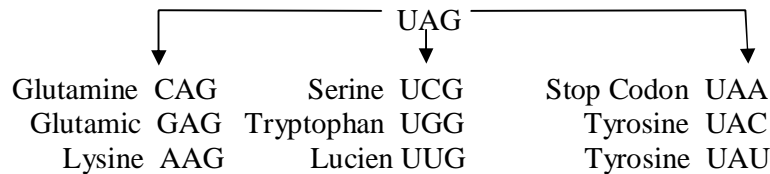
מסוגי הפאג'ים יש שני קבוצות קבוצה אחת היא של פאג'ים אלימים Virulent כמו T4 שגורמים לליזיס בחיידק וממשיכים לחיידק הבא, קבוצה שנייה היא פאג'ים מתונים Temperate כמו λ , הפאג'ים המתונים גורמים לליזיס ב – 70 עד 80 אחוז מהמקרים אך בשאר המקרים הגנום של הפאג' ניכנס לגנום החיידקי ומוכפל יחד עם החלפת ה – DNA של החיידק למסלול זה קוראים מסלול Lysogeny ובמקרה זה מקבלים פלאקים שבמרכזם יש תאים שגדלים במסלול ליוזגני.

מוטציות Mutations.

כשעובדים עם חיידקים מחפשים מוטנטים על ידי חיפוש מושבות שנראות שונה כמו פלאקים עכורים, שוליים חדים או לא וכו', למוטציות מסוגים אלו קוראים Morphology. סוג נוסף של מוטציות הוא רגישות לטמפרטורה Temperature Sensitive, יש מוטנטים גם בצופן הגנטי שם לכל חומצה אמינית יש קוד של 3 בסיסים, מיתוך 64 הקודונים האפשריים 3 קודונים לא נותנים חומצה אמינית ואלו הם קודוני העצירה שהם UAA, UAG, UGA.

ל – UAG יש פאג' שניקרא UAG Amber, שם זה הוא על שם Bernstein שבגרמנית זה אמבר. הפאג' לקודון UAA ניקרא UAA Ochre ולקודון UGA קוראים UGA (Opal). רוב הגנים נגמרים בקודון העצירה UAA והכי מאט הם הגנים שנגמרים ב – UAG.

אם יש מוטציה מסוג אמבר באמצע הגן מתקבל קודון עצירה UAG וכך אנו לא מקבלים חלבון פעיל אלא רק פרגמנט. במצב זה התא לא יכול לגדול אלא עם כן הוא Sup^+ כלומר בעל סופרסור Suppressor. סופרסור הוא בעצם tRNA של חומצה אמינית שמכיר את הקודון של העצירה שבמקרה זה הוא UAG וספ חומצה אמינית במקומו. במקרה של UAG יש 9 קודונים אפשריים שאחד מהם הוא של קודון עצירה ולכן יש רק 8 סופרסורים אפשריים שנותנים 7 חומצות אמינו שונות:

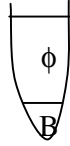


כיוון שמוטציית אמבר היא עכב שינוי בבסיס אחד אז אחת מ 7 חומצות אמינו אלו היא החומצה בחלבון המקורי כך שהסיכוי לקבל את החלבון המקורי או חלבון בו יש חומצה אמינית אחרת אך מספיק קרובה כדי לקבל חלבון פעיל היא סבירה. צריך לזכור שאם הפגיעה באזור קריטי יתכן שרק עם נחזור לצורה המקורית נקבל חלבון פעיל אך תמיד קיימת האפשרות לקבלת חלבון שפעיל בצורה טובה יותר. כדי שהסופרסורים לא יפריעו לסיום סינתזת החלבון יש מספר קודוני עצירה בסוף מסוגים שונים.

הסופרסיה אפשרית בתנאי של – tRNA יש יותר מגן אחד שיוצר אותו, מכיוון שלרוב חומצות יש יותר מ – tRNA אחד שקושר אותם אז שינוי באחד מהם לשם יצירת הסופרסור לא יפגע בתא אך במקרים כמו טריפטופן יש רק גן אחד ליצור ה – tRNA שלו ולכן לא ניתן לבצע סופרסיה טבעית כי עם גן זה ישונה אז לא היה ניתן לקבל חלבונים עם טריפטופן (מלבד בקודוני האמבר), כיום ניתן בשיטות של הנדסה גנטית להוסיף עוד גן של טריפטופן ואז הסופרסיה הזו אפשרית.

אולטרה צנטריפוגה Ultracentrifuge.

בליטר חיידקים המודבק בפאג'ים מקבלים 10^{10} למיליליטר לכומר סה"כ 10^{13} פאג'ים כדי לבודד את הפאג'ים אנו נעשה צנטריפוגה ב – 10000 סיבובים לדקה כך נפתרים מהחיידקים ונשארת תמיסת פאג'ים בחלק העליון.

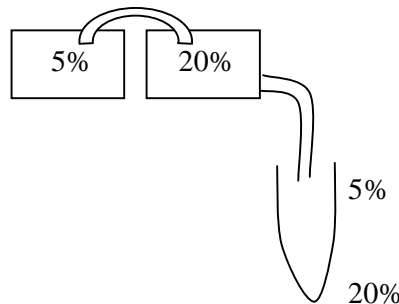


לאחר מכן לתמיסת הפאג'ים מוסיפים DNase ו RNase כדי להיפטר מה DNA – RNA החיידקיים שנשארו בתמיסה, את הפאג'ים משקעים Precipitation בנוכחות NaCl ופוליאיתילן גליקול, לאחר מכן משתמשים שוב בצנטריפוגה במהירות 10000 סל"ד (rpm) וכך הם מרוכזים. בכדי לנקות את הפאג' טוטלית אנו משתמשים באולטרה צנטריפוגה שהיא במהירות גבוהה מאוד. את כוחות ה g – הפועלים בצנטריפוגה ניתן לחשב על ידי הנוסחה $g=1.12n^2r*10^{-5}$ כך ש n – זה מספר הסיבובים לדקה ו r – הוא רדיוס הרוטור. כדי לקבל הפרדה טובה צריך לדעת מה הצפיפות של כל מרכיב בתמיסה לדוגמה חלבון זה 1.3-1.4 גרם למיליליטר DNA זה בערך 1.7 ופאג'ים זה בערך 1.5 גרם למיליליטר.

כיוון שהפאג' הוא תערובת צפיפותו שונה, אנו מכינים תמיסה של Cesium Chloride ומסרכזים במהירות גבוהה מה שגורם ליוני ה Cs^+ לנסות להגיע לקרקעית נגד הדיפוזיה ולאחר כמה שעות מקבלים מפל ריכוזים כך שאמצע המבחנה זה הריכוז של 1.5 בו מצויים הפאג'ים, מתחתם יש ריכוז גבוהה יותר ומעליהם נמוך יותר, מכאן נישאר רק לרוקן את המבחנה ולאסוף את הפרקציות הרצויות.

לאחר בידוד הפאג'ים ניתן להוציא מהם את ה DNA – וזאת על ידי הרס החלבון המרכיב את ראש הפאג'. הדרך הנפוצה לעשות זאת היא על ידי Phenol שמפרק את הקפסיד ומשחרר את ה DNA או על ידי שימוש ב – SDS שגורם לדינטורציה.

דרך נוספת לניקוי הפאג'ים היא על ידי מפל צפיפות של סוכרוז. בשיטה זו לוקחים שתי כוסות של סוכרוז האחת בריכוז 20% והשנייה בריכוז של 5% ובניהם גשר המאפשר מעבר:



לאחר מכן מריצים את התוצרים וכל אחד מגיע למקום שונה.

נוטכנולוגיה ביולוגית Biological Nanotechnology.

בשנים 1950 עד 1960 גולו מסלולים ביוכימיים כמו יצירת חומצות אמינו וכו'. הדבר החל כשהשתמשו במוטנטים שלא יכלו לסנתז משהוא במסלול וכך בדקו במוטנטים שונים מה נוצר והצטבר ומאיזה חומר ניתן לקבל את התוצר הסופי עד שנופה כל המסלול. בשנים אלו החלו גם לבדוק אנזימים שונים ותנאי פעולתם וגם זמן פעולתם.

משנות ה-60 החלה תקופה יותר של ביולוגיה מולקולארית כלומר: גנים, ביטוי, mRNA, אופרונים והקוד הגנטי. בשנות ה-80 החלה המהפכה של ההנדסה הגנטית שהתפתחה מפאג'ים וחיידקים בשנים אלו התפתח גם ה- DNA Sequencing, זיהוי הגנים והגנומים השלמים שבעכבותיהם באה השוואה בין גנומים של אורגניזמים שונים. בשנים אלו נחקרו גם מסלולים של התפתחות Developmental Pathways.

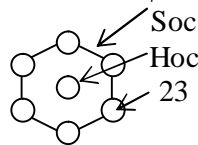
בעתיד הקרוב יתחיל נושא הננוביולוגיה וההכרה בין חלבונים ברמה של איך מתבצעת ההכרה וכך היה ניתן לבנות חלבונים שלו קיימים בטבע וליצור מחשבים ביולוגיים.

כשבודדו ב- T₄ מוטנט בגן 23, שזה הגן ליצירת החלבון הראשי בפאג', ומוטנט בגן 6, שזה הגן ליצירת חלבון שחשוב לזנב של הפאג'. שני המוטציות היו מוטציות מסוג אמבר, כלומר לא יכלו לגדול ללא סופרטור. כשערבבו אותם התקבלו פאג'ים שלמים עקב קומפלימנטציה, במילים אחרות המוטנט 23 סינתז את הגן של 6 ומוטנט 6 סינתז את הגן של 23. הפאג'ים שהתקבלו הם מסוג 6 כיוון שמוטנט זה יכול לסנתז את הראש של הפאג'. את זה ניתן לבדוק על ידי הכלאה של התוצרים עם המקור וליראות כי בהכלאה בינם לבין מוטנטים 6 לא מתקבלים תוצרים בעוד שעם מוטנטים 23 מתקבלים שוב תוצרים.

אנו רואים כי צורת הפאג' היא Icosahedrons שזה מבנה יציב שאורכו 100nm הוא מורכב ממספר חלבונים שהעיקרי זה 23 ובפינות יש חלבון מספר 24, בנוסף יש חלבונים נוספים Soc ו- Hoc שהם חלבוני קישוט Decoration Proteins, חלבונים אלו לא חיוניים לגידול של הפאג' והוא יכול לחיות בלעדיהם, חלבונים אלו מצורפים לאחר שהפאג' גמור והם נותנים לו יציבות ועמידות גבוהה יותר לטמפרטורה ולריכוזים שונים של מלח.

בתוך הראש של הפאג' יש DNA וגם חלבונים IP:I,II,III חלבון ALT וגם פפטידים. החלבונים IP:I,II,III קשורים ל- DNA ו- ALT קריטי לביטוי מספר חלבונים של T₄ שבו יש RNA זו סיבי (dsRNA), הקריטיות נובעת מזה שהחידק לא מקיר את מיבנה זה של חומצות גרעין ובלי מרכיב זה לא תהיה התאמה. יש פאג'ים שמביאים איתם פולימראזות ויש כאלו שיודעים לנצל את הפולימראזות בתא. הפאג' T₇ מכיל רצפים שמסונתזים על ידי ה- RNA פולימראזות של החידק ואחד הגנים הראשונים שמבוטאים בפאג' זה הוא פולימראז מיוחד לפאג'. כל החלבונים שנמצאים בראש הפאג' נכנסים לשם בתהליך הרכבת הפאג' יחד עם הגנום שלו. כשלוקחים פאג' המסומן ב- ³²S ו- ³²P (גופרית בחלבון ופוספט ב- DNA) אנו רואים כי ב- 80% מהמקרים ניכנס ה- DNA לחידק וב- 5 עד 10 אחוז ניכנס החלבון, בהתחלה חשבו כי תוצאה זו היא ארטיפקט אך התגלה כי זה החלבון הארוז בראש של הפאג'.

יש עוד שני חלבונים הקשורים ביצירת הראש והם gp22 ו- gp69 (gp – gene protein) חלבונים אלו משמשים כפיגומים ועליהם ניבנה הראש ואז הם מפורקים. מבנה הראש הוא:



בטבע בדרך כלל המצב הוא של 6 מסביב ואחד באמצע או 12 מסביב ו- 3 באמצע. בפינות יש את חלבון 24 כך שבכל פינה יש 5 צדדים הבאים ביחד, ועל ידי הכרות בין חלבונים הים ושונים מגיעים לקונפורמציה הנכונה. ה- DNA ניכנס לראש דרך פורטל ודרכו הוא גם יוצא לתוך החידק. הפורטל ניראה כך:

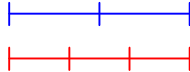


בפאג' T₄ החור התחתון הוא כ- 3 עד 4 ננומטר בעוד שקוטר ה- DNA הוא 1.8nm

יש שני מסלולים ליצירת פאג' האחד הוא כולל ראש לחוד וזנב לחוד ורק בסוף מחברים בניהם, מסלול שני הוא יצירת הזנב לאחר שהראש גמור. בנית הראש מתחילה מפורטל ופיגומים שעליהם ניבנה הראש ואז מפורקים הפיגומים ונארז ה-DNA ואז הראש מוכן. ה-DNA הנכנס מסתדר בכפולים או בצורה ספיראלית, אריזה זו אריזה זו מתבצעת על ידי חלבונים הנמצאים בראש של הפאג'.

גודל הראש נקבע על ידי Size Determination וכך גם נקבע גודל הזנב. הקביעה מתבצעת במספר דרכים, הדרך הראשונה היא Ruler, Template או Scaffold, בפאג' T₄ הפיגומים הם אלו שקובעים את הגודל, ב-M13 הגודל נקבע על ידי סרגל שהוא DNA וסביבו יש חלבונים והאורך נקבע לפי ה-DNA המשמש כסרגל ולכן הפאג' הזה מאורך. גם ב-λ יש את המצב של הסרגל. בפאג' P22 הראש נעשה על ידי מבנה סגור הנותן את המבנה לבניית הראש, כלומר הוא משמש כתבנית.

הדרך השנייה היא Vernier בה יש שתי מולקולות בגודל שונה וממשיכים לבנות אד ששניהם מגיעים לאותו אורך, כלומר:



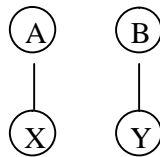
הדרך השלישית היא Cumulated Strain בה נוצר מתח מצטבר עד היצירה והסידור של המבנה כך שהמתח גורם ליצירת הקונפורמציה הסגורה.

בכדי לחקור את קביעת הגודל חיפשו מוטנטים של T₄ בעלי מוטציות (לא אמבר) שבהם יש שינו במבנה הראש והם מצאו שניים שהם Giant בעלי ראש גדול והשני הוא Petite שהם בעלי ראש קטן, הם מצאו גם מוטנט נוסף שהיה בעל יכולת ליצור את הפינות ללא חלבון 24 והוא ניקרא Don't Need 24. הפגיעה בכל אחד מהמקרים הייתה באותו אזור של הגן של 155bp שזה < 10% מהחלבון.

שאנו בונים פאג' אנו צריכים מספר דברים, דבר ראשון אנו צריכים שליטה על התהליך שלא יתחיל שלב חדש לפני שהקודם הסתיים, דבר זה ימנע Dead Ends וגם Steric Exclusion שזה מצב של חלבון שניכנס לא מסודר ומונע כניסה של חלבון נכון. דבר שני זה Allows Subassemblies to be Built הרעיון כאן הוא לצמצם טעויות.

נוטכנולוגיה ביולוגית – הכרה בין חלבונים.

2 Hybrid System – מערכת בשמרים ובחיידקים – אפשר לזהות חלבונים שמכירים זה את זה. Phage display – דרך אחרת לזיהוי חלבונים שמכירים זה את זה. ניתן לקחת חלבונים שמכירים זה את זה דרך A – B ולהשתמש ב-A – B כדי קשור כל 2 מולקולות ביולוגיות שהן:

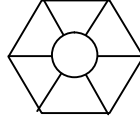


$$\begin{array}{ccccccc}
 & & & & 8 & & 8 \\
 & & & & 7 & & 7 \\
 10+10 & \rightarrow & 2*10+7 & \rightarrow & 10+8 & \rightarrow & 10+6+6 & \rightarrow & 10 \\
 \text{Nucleating} & & 10 & & 10 & & 10 & & \\
 & & & & & & 6 & & \\
 & & & & & & 6 & &
 \end{array}$$

יש יוצאים מן הכלל, כמו חלבון 11, שיכול להצטרף בכל שלב. אך כל היתר באו לפי סדר מתאים לאחר שחלבון מתאים הצטרף וחל שינוי קונפורמטיבי שאפשר את הקישור שלו. ניתן לבדוק In-Vivo עם

חלבונים נקיים, האם הם מצטרפים לקומפלקס או לא. Sequential Construction – מונע טעויות בהרכבה. לדוגמה: 6 לא יצטרף עד ש – 5 לא יצטרף וכו'.

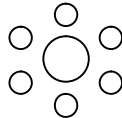
יש 2 מסלולים שונים ל – 2 מרכיבי הזנב: plug – 1 wedge ו plug – 6 wedges אחד מרכיבים base-plate:



ברגע שה – base-plate מוכן, חלבון 19 יוצר את ה – tube וסביב זה עוד שכבה של 18 למתן הזנב. לזה מצטרפים עוד חלבונים כולל חוטי הזנב. הצירוף של האלמנטים השונים תלוי בשינויים קונפורמטיביים. אם לוקחים 19 נקי, הוא לא מרכיב שום מבנה. אך אם נוציא 19 מה – tube, הוא ירכיב מחדש tube בעצמו, ללא שום עזרה.

DNA Packing – מולקולות ה – DNA מאד ארוכות, כדי להכניס מולקולה כזו לראש הפאג' צריך מנגנון סליל או מקופל . הסידור של ה – DNA חשוב גם להדבקת החיידק. ללא סידור מיוחד ההדבקה לא הייתה מוצלחת.

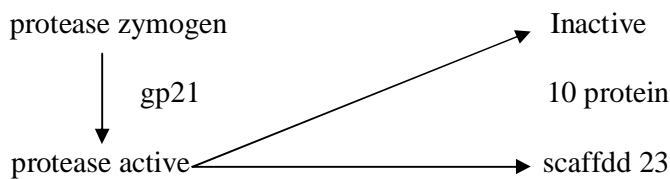
Scaffolding (פיגומים) – בלעדיהם ניתן לקבל ראש עם זוויות לא נכונות, ואז הפאג' לא יהיה פעיל. על הפיגומים הראש נבנה נכון. מהפילמנטים נוצרים מבנים עיגוליים סוגרים: 1 + 6 או 3 + 12 (למבנים סגורים)



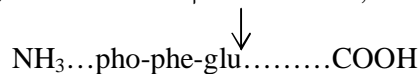
עבור מבנה פתוח (עם חלל במרכז) ניתן לשנות את מספר הפילמנטים כתלות בזוויות החיבור בין העיגולים

ב – T₄ יש חלבוני hoc, soc - Strengthening. הם מעניקים עמידות נגד pH, חום וחוזק יוני בתמיסה. הם נקראים גם חלבוני קישוט.

חלבון מס' 21 (gp 21) לא נמצא בתוך החלקיק, אך הוא חשוב. בתחילה הוא לא פעיל. לא ידוע מה "מדליק" אותו, אבל הוא משתנה לחלבון פעיל. כצעד ראשון הוא חותך את עצמו.



הפרוטאז הזה מתקיף לפחות 10 חלבונים של החלקיק, כולל הפיגומים וגם חלבונים כמו החלבון הראשי בקפסיד – 23. הוא מוריד ממנו 65 חומצות אמינו למתן חלבון 23 הסופי. זה הופך את המסלול ללא רוורזיבלי כלומר זה מונע שתהליך זה, שהיה בש"מ, ילך אחורה. בסיום הוא חותך את עצמו ועושה השמדה עצמית, Self Destruction, וזה על ידי חיתוך באתר מסוים בו: (ליד ח. גלוטמית).



Pho היא חומצה אמינית hydrophobic כמו פנול אלנין, טריפטופן, לאוצין וואלין.

הסיבות לחיתוך הם:
1. הופך מסלול לאי רוורזיבלי.

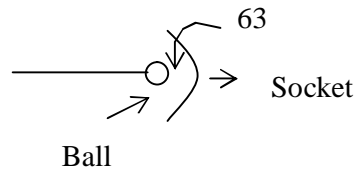
2. על ידי החיתוך החלבון שנחתך משתנה ויתכן שזה מאפשר המשך המסלול למשל מנגנון של Sequential.

Changes → Farther Assembly

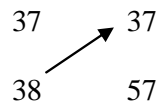
3. כדי להוריד חלבון שאיננו רצוי יותר כמו הפיגומים, כאשר הקפסיד כבר בנוי: Remove Same Protein.

4. Assembly JIG מכוון מקל או משהו אחר למקום הרצוי. אי אפשר להוסיף חוטי זנב עד שהראש לא קשור לזנב. החוטים נתפסים על ידי Whiskers זה מגביל את הרוטציה שלהם ואז ניתן להכניס את החוט על הזנב. חוטי הזנב לא מסתובבים חופשיים, אלא נתפסים על ידי Whiskers שמכניסים אותם לזנב.

יש חלבונים נוספים מעורבים, שלא מופיעים בחלקיק הבוגר, הם לא חלק מההרכב סופי: למשל, חלבון 63 מרכז קישור חוטי הזנב פי 5. בלעדיו זה יהיה הרבה יותר איטי, דבר שיגרם לכך שיוצרו פחות פאג'ים בוגרים לפני פיצוץ החיידק. הוא דרוש, כדי שה Socket יהיה פתוח יותר עד שחוט הזנב נכנס. זהו אנזים, שמקטלז ריאקציה לא קוולנטית של הרכבה.



gp37 – חלק מחוט הזנב בנוי מ- 2 דימרים, ויש עוד 2 חלבונים שעוזרים לו. גם הם אינם חלק מהחלקיק.



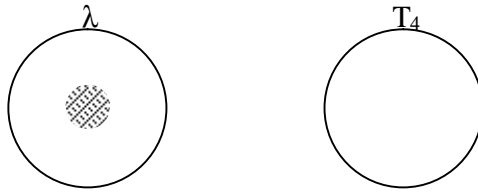
Length Determination – דרכים להגביל פולימר, למשל, tube שעליו בנוי הפולימר. כשמגיעים לסוף, חלבון זה מפסיק. לא ברור, מהו חלבון שמשמש כ- Tape Measure. ב- λ חלבון H הוא ה- Tape Measure. איך מוכיחים את זה? ישנו גן H רוצים לקצר אותו, אבל in frame כלומר לעשות חסר, כך שלא תשתנה מסגרת הקריאה. נקבל חלבון פעיל אך יותר קצר. כשעושים זאת מקבלים חלבון יותר קצר, לפי המידה שקיצרנו. ב- T_4 יש חלבון 29, שחשוד כ- tape measure, כי הוא בדיוק באותו אורך של tube ו- sheet, אבל עדיין לא הוכיחו זאת. Tape Measure – החלבונים הללו מודדים אורך פולימר ומפסיקים כשמגיעים לאורך הרצוי

בניין הפילוס – pillus:

ב- E. Coli כמו כל גרם שלילי, יש 2 ממברנות (פנימית וחיצונית) וצריך שאפרון שמעביר חלבונים אלו מבפנים דרך פריפלזם, כדי שיגיעו ל- Outer Membrane יש חלבון C שהוא "סדרן", המפקח על בניית הממבראנה, שמתחילה עם חלבון G ADHESIN אחריו F שהו ה- Connector שקושר את G ל- E. אחר כך יש מס' F. זה קצה ה- pillus. כשהוא מגיע לאורך הנכון, יש חלבון שמפסיק את האורך והוא החלבון K והוא גם Connector לחלבון A – חלבון ראשי של pillus. אחר כך יש בניה של pillus ויש שימוש בחלבון H כדי לגמור את המבנה – כדי שלא ימשיך לאורך בלתי מוגבל.

וירוס - λ

זהו פאג' ליזוגני (temperate) מתון, לא הורג את כל החיידקים שהודבקו בו. 90% עוברים ליזיס ואילו 10% לא. עם נסתכל על פלאק של λ , נראה שיש תאים באמצע הפלאק.



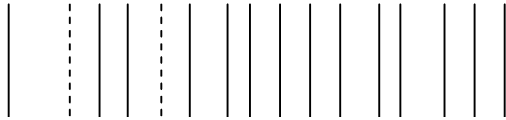
אם ניקח תאים אלו, הם לא כמו הזן המקורי. יש להם תכונות שלא היו בתאים המקוריים. הפאג' λ לא גדל עליהם ולא אומרים שהם עמידים ל-λ אלא מחוסנים ל-λ (immune) אם ניקח חיידקים אלו באופן נקי, נראה שבתרבית יש כמה פאג'ים חופשיים.

cells → produce low level of phage

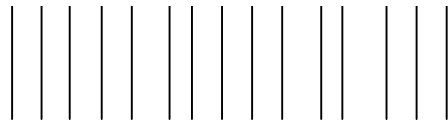
גם אם נחיל מתא אחד כשהוא גדל, הוא משחרר כמה λ. אם נקריין במעט U.V. כל התרבית עוברת לזיס ומשחררת הרבה פאג'ים. יש פאג'ים של U.V. – אין השפעה עליהם כמו T₂. במקרה של λ U.V. כן מעורר אותו. זהו מעין פאג' לטנטי שעובר עירור. λ משחרר כמויות נמוכות של λ לתוך התרבית, בערך 10³/ml וכאשר U.V. גורם לליזיס, משחררים 10¹⁰/ml.

חיידקים שיש בתוכם λ נקראים Lysogenic Bacteria, וכאשר החיידק מתחלק, גם הפאג' מתחלק. הוא פסיבי, כלומר הוא יותר כמו טפיל שלא הורג את הפונדקאי. אורך ה-DNA שלו הוא 48.502bp, הוא דו סיבי, חוץ מהקצוות שלו שהם חד סיביים. הקצוות הם קומפלמנטריים זה לזה והם מכילים חפיפה של 12 בסיסים. ברובם אלה G ו-C, במקום לעשות חלק חד סיבי ארוך יותר. כשה-DNA נכנס לתא, הוא מתעגל באופן ספונטאני. λ שחתכו אותו עם BgTEII נותן פרגמנטים כמו סולם:

התמונה שמתקבלת בפועל:

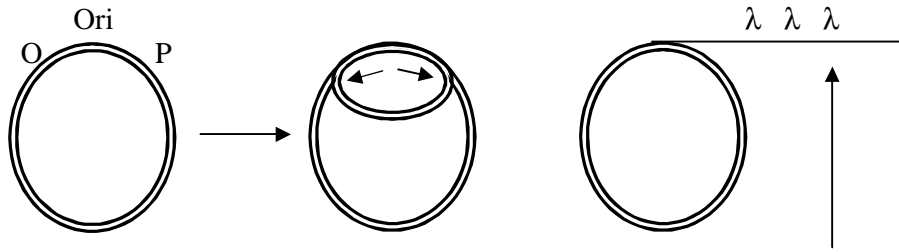


התמונה שמצפים לקבל בהרצה:



כשמרציים הרבה פעמים רואים שחסרים 2 פסים לעומת זאת מופיע פרגמנט נוסף של 14kb שהיא שני הקצוות שמתחברים בטמפרטורת החדר. לאחר שה-DNA של הפאג' מתעגל בתוך התא, יש סגירה של ה-nicks ע"י הליגאז. ל-E. Coli יש ליגאז והוא סוגר את ה-nicks. מדוע משתמשים בליגאז של T₄ ושל E. Coli בהנדסה גנטית? התשובה היא שהם עושים ריאקציות שונות: ליגאז של E. Coli עובד רק על Sticky Ends, ואילו ליגאז של T₄ עובד גם על קצוות Blunt, וניתן לחבר בו קצוות שאין להם חפיפה.

לאחר סגירת ה-DNA יש רפליקציה ויש 2 גנים שדרושים לרפליקציה: O ו-P שמשמש כ-Ori שזה Origin Of Replication. הרצף הזה יושב בתוך גן O בעצמו. כך, ישנו רצף O – 2 חלבונים שעושים רפליקציה, וכן חלבונים נוספים שהחיידק מספק.



theta θ

הסיב השני מושלם בסנתוז

Replication: סינתזה של חוטים חדשים ב-2 כיוונים. שמסיים יש 2 עיגולים.

בשלב מאוחר יותר משתנה צורת הרפליקציה והפאג' משתמש ב- Rolling Circle, יוצא DNA ליניארי, ארוך, שמכיל מספר פעמים גנים של λ . הוא חותך את ה- DNA למתן האורך הדרוש – כל פעם מספק λ אחד. הרצף שהוא חותך למתן קצוות חד סיביים הוא:

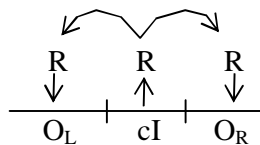


האתר שמהווה הכרה לחיתוך נקרא COS – Cohesive Site. הרצף הארוך נחתך על פעם למתן גנום אחד שלם והנו נכנס לפאג' כשהוא ליניארי. Rolling Circle – חוט חד סיבי יוצא ואחר כך חוט שני מושלם בסנתוז.

חיידק שיש בתוכו פאג' λ מחוסן מ- λ אחרים. הוא מייצר קצת פאג', אחת ל- 10^6 – λ הופך לליטי וחיידק כזה מתפוצץ. איך λ יכול להיות יציב בתוך החיידק? ראינו כבר שהוא יכול לעשות רפליקציה לעצמו בלי קשר ל- Ori של החיידק ועם אנזימים של עצמו. לפעמים יש פלאק של λ שהוא צולל Clear Plaque. אם עושים טיפול עם חומר מוטגני, השיעור של פלאקים אלו עולה. הפאג' לא יכול להיכנס באופן יציב לחיידק כלומר להיות ליזוגני.

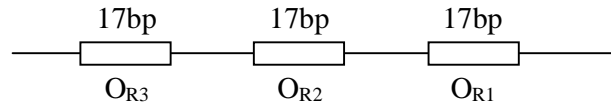
Repressor (Clear number I) cI מייצר

מכל חיידק שמתפוצץ יוצאים כ- 100 עד 200 צאצאים. נשאר דור אחר (דור עם החיידק). קצת קרינת U.V. תהפוך את המעגל לליטי. הוא נכנס לכרומוזום ומייצר R – רפרסור. הפאג' λ מדכא את הגנים של עצמו כדי שלא יהיה מסלול ליטי. פאג' נוסף מזריק DNA לחיידק שהוא ליזוגני, אבל הרפרסור משתק אותו וזו הסיבה לכך שהחיידק מחוסן. הרפרסיה היא רק נגד פאג'ים מאותו זן. cI (Clear number I) מייצר את ה- Repressor ו- Cro מייצר את האנטי רפרסור. אם החלבון Cro "מנצח" אז אין cI והפאג' ליטי אם החלבון cI "מנצח" אז הפאג' ליזוגני.



הרפרסור הוא חלבון שמונע ביטוי של גנים מסוימים. הרפרסורים סוגרים 2 אופרטורים, וכך את כל הגנים של ה- λ למעט cI, זה פותר את בעיית הרפליקציה. בלי O – P אין רפליקציה עצמית, יש רק רפליקציה עם גנום החיידק. הפאג' λ הופך לאלמנט פסיבי, כלומר לחלק מהכרומוזום ועובר איתו רפליקציה. הרפרסור לא מתפקד נגד פאג'ים שאינם λ , כיוון שיש להם רצפים אחרים של אופרטור למשל, כדי שהפאג' $\phi 80$ שהוא מהמשפחה של λ יצליח לגדול בחיידק כזה צריך שלפחות הקטע של O_{R2} cI O_{R1} ב- λ היה שונה בין הפאג'ים (ב- $\phi 80$ הקטע הוא O_{R-BC} cI O_{R-BC}). הרפרסור של λ סוגר את Cro ואת יתר הגנים ו- cI מתבטא, ובמצב הפוך (מעגל ליטי) cI לא מתבטא, ואין רפרסור. זהו ה-

Switch וב 90% ה-Cro "מנצה" ועושה רפרסיה ל-cI (כלומר אנטי רפרסיה) ואז כל הגנים פתוחים. ישנם 3 אופרטורים כל אחד בעל 17 בסיסים:



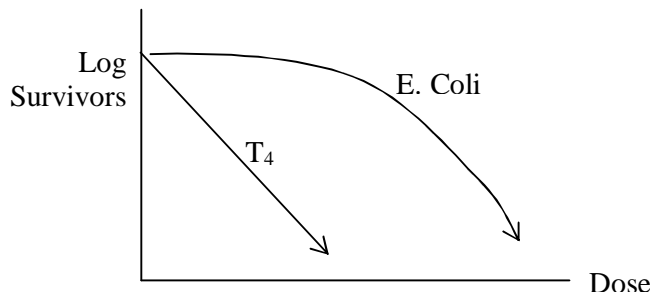
2 פרומוטורים ו-2 גנים ש"נאבקים" זה בזה. אם cI מנצה, הוא סוגר את OR1, ואז אין שעתוק. אם Cro מנצה, הוא סוגר את OR3, אז קיים שעתוק של Cro, הוא עובד ב-trans. יש אלמנטים שעובדים ב-cis על אותו חוט של DNA ולא על DNA-ים אחרים, כמו הפרומוטור ואופרטור. ה-trans עובד גם על DNA אחר כמו פאג' אחר שמנסה לתקוף מנוטרל על ידי רפרסור שנוצר מ-cI של הפאג' שכבר חדר.

בניסוי עשו 2 הכלאות בחיידקים:

1. בין זכר ליזוגני ל- λ לנקבה (זן מקבל) שהוא גם ליזוגני שום דבר לא קרה, ה- λ לא השתחרר. יש רפרסור בזן המקבל.
2. כשבזן המקבל אין רפרסור (לא ליזוגני) ה-DNA עובר בקוניוגציה, ואילו החלבונים (וגם הרפרסור) לא עוברים מחיידק זכר לחיידק המקבל. הפאג' עובר לתא שאין לו רפרסור, והופך לליטי. יודעים, שבקוניוגציה לא עוברים חלבונים, וזה עובד ב-trans.

הרפרסור יושב ב-OR1 וב-OR2 ואילו ב-OR3 יש RNA פולימראז. מדוע זקוקים לרפרסור גם ב-OR2? אנו יודעים שאם R (רפרסור) לא יושב על OR2, אין סנתוז של רפרסור. אם היה רק רפרסור ב-OR1, הוא היה משתיק שעתוק של Cro אך לא היה מסנתז רפרסור. הרפרסור על OR2 מושך לסנתוז של רפרסור נוסף. בתא אחד יש בערך 200 R/cell. הרפרסור יכול לסגור גם את OR3 באופן חלש יותר, כשיש יותר מדי רפרסור הוא סוגר את עצמו. כשיש מעט מידי הוא פתוח. זה ניקרא Auto Regulation כלומר, חלבון שקובע את רמתו על ידי רפרסיה עצמית. (כנ"ל גם רפרסור של טריפטופן).

אם יש קרינת U.V., נגרם נזק ל-DNA. החלבון Rec A הופך לפרוטאז פעיל. הוא חותך רפרסור של λ וגורם לאינאקטיבציה של הרפרסור. רפרסורים שהיו על ה-DNA יורדים ממנו וגם נחתכים. כשאין יותר רפרסיה, יש ייצור של Cro, שמשתיק ייצור של cI, ונגרם מסלול ליטי. החלבון Lex A הוא רפרסור של כל מני גנים שמתקנים נזקי U.V. או חומרים מוטגנים. יש גם כאן Auto-Regulation כלומר, הוא מווסת את הרמה של עצמו. Rec A חותך את Lex A, ואז כל הגנים הללו מתבטאים.



E. coli – יש lag גדול עד שהתאים מתחילים למות.
T4 – מת לוגריתמית מהרגע הראשון.

ל-E. coli יש מנגנון תיקון, שמתקן חלק מהנזק. כשהוא גדל יש לו 2-8 כרומוזומים. בזמן שהוא גדל, אותו כרומוזום נמצא בשכפול ולכן אם פוגעים באחד, השאר תקינים ולא נגרם מוות.

ב-cI צריך להיות אתרי חיתוך ל-Rec A, בדומה ל-Lex A. ניתן להוריד את האתר. אם נותנים מעט U.V. ליצור וגורמים למוטציה התהליכים שמתרחשים הם:

E. Coli \longrightarrow Nothing
 E. Coli (λ) \longrightarrow lysis

ניתן למצוא חיידקים שנשארו בחיים, לחלק מהם אתר שמוזהה ע"י Rec A וכך Rec A לא עובד על cI יותר. cI ind⁻ Inducible Minus. החלבון מגיב ל - U.V. הופך לפעיל (לפרוטאז) ומפעיל סדרה של גנים כמו Lex A, שמטרתם לתקן נזק ב - DNA. הפאג' λ השתמש בכך. הפאג' λ שיש לו רפרסור הופך להיות פעיל בחשיפה ל - U.V. ומפוצץ את החיידק.

הגן Lex A עושה רפרסיה לעצמו וגם מבקר על סדרה של גנים בחיידק, שתפקידם תיקון חלקי של נזקי U.V. החלבון Rec A חותך את Lex A שהיה רפרסור ואז כל הגנים שהוא היה הרפרסור שלהם מופעלים ומתקנים את נזקי ה - U.V. ב - DNA (הנזקים הם בדרך כלל דימרים של בסיסים ו - Cross Linking). הפאג' λ עבר אבולוציה כך ש - Rec A חותך גם את הרפרסור שלו. וכדי לשרוד שהחיידק נחשף לקרינת U.V. הוא עובר למסלול ליטי והורג את התאים כדי לצאת החוצה מהם ואז הפאג' יוכל להדביק תאים אחרים ללא נזק שלהם.

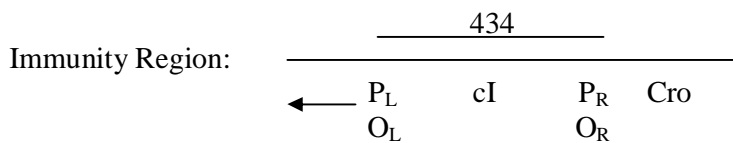
המוטציה ברפרסור זו מוטציה ind⁻ שבה משתנה הרצף GAG ל - רצף AAG שינוי בודד זה מספיק לכך שהרפרסור לא יחתך ע"י Rec A. סוג שני של מוטציה היא ש - λ לא מסוגל לחיות על חיידקים ליוזוגניים ל - λ , כי יש בהם הרבה רפרסור אולם בכל זאת יש מעט שחיים. על אף הרפרסיה. כדי לקבל אותם, יש לעשות ל - λ טיפול במוטגן, שהורג 99.9% מהם ואז מקבלים כ - $1/10^{10}$ פאג'ים שגדלים. לפאג'ים שהרפרסור לא משפיע עליהם קוראים להם λ vir (וירולנטי). הם נדירים מאד, כי יש בהם די מוטציות: שינויים באופרטורים, ש - λ רפרסור לא קושר אותם, וה - λ עמיד לרפרסור של עצמו.

λ vir $\hat{=}$ Inactive Operators

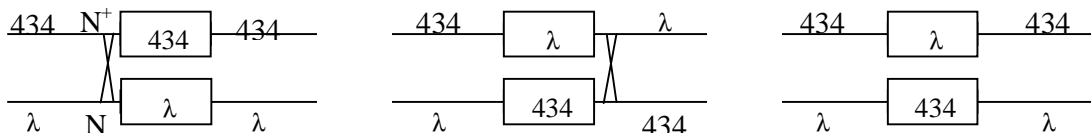
אפשר לקבל מומנטים כאלו (λ vir) בהרבה פאג'ים ליוזוגניים. המומנטים הופכים לליטיים (עמידים לרפרסור).

פאג'ים היברידיים.

הפאג' λ הוא חלק ממשפחה גדולה של פאג'ים, הנקראים Lambdoid. יש להם כמעט אותם גנים, אותו מנגנון בקרה ואותו מיקום גנים ברצף DNA שונה. אחד מהם הוא 434. הפאג' 434 גדל על ליוזוגניים של λ ולא על הליזוגניים של עצמו. הפאג' λ גדל על ליוזוגניים של 434 ולא על של עצמו.



הרפרסור של 434 שונה מזה של λ , וכן Cro שונה. האזור הזה ב - 434 נקרא Immunity Region. אי אפשר להחליף אותו, והוא ספציפי לפאג'. בניסוי עושים הכלאות בין λ ל - 434 במטרה לעשות היברידי שבו האזור באמצע הוא של 434, וכל השאר הוא של λ .



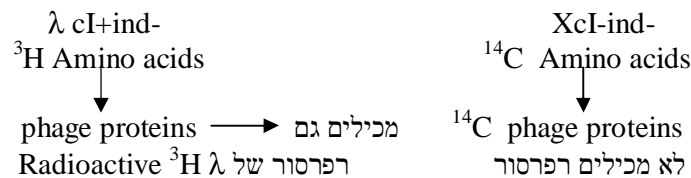
הגן שמייד אחר P_L באזור immunity הוא N⁺. בודדו מוטציות אמבר ב - 434. כששמים את 2 פאג'ים הללו באותו חיידק רוב הצאצאים יהיו λ או 434, אך מחפשים את הרקומביננטים. (בין האזור N לבין ה - Immunity Region) ומה יגדל על מה?

	חיידק רגיל	מכיל λ	Sup^-	Sup^+	Sup^+	Sup^+
	Sup^- K12	Sup^- K12(λ)	Sup^- K12(434)	Sup^+ K12	Sup^+ K12(λ)	Sup^+ K12(434)
הורה λ	+	-	+	+	-	+
צאצא 434	+	+	-	+	+	-
הורה 434 אמבר	-	-	-	+	+	-
צאצא היברידי	+	+	-	+	+	-

בפאג' ההיברידי החליפו את הזרוע השמאלית ב- DNA של λ אין רפליקציה כלומר, לא גדול. כאשר החליפו גם את הזרוע הימנית, הכניסו מוטציית P^- אמבר גם אין רפליקציה (אין גדילה). פאג' היברידי זה נקרא 434 : λ כל ה- DNA הוא של λ , ורק אזור ה- Immunity עם פרומוטורים, אופרטורים ו- Cro הוא מ- 434 (λimm^{434}).

1. בידוד הרפרסור של λ

לוקחים חיידק וחופשים ל- U.V. במנות יתר. כל ה- DNA של קשור ב- Cross Linking והוא לא מסוגל לייצור חלבונים חדשים והפאג' יכול להתרבות בו. הדביקו את התא ב- 2 סוגי λ האחד הוא $\lambda cI^+ ind^-$ והשני הוא $\lambda cI^- ind^-$ ה- ind^- עמיד ל- Rec A וה- cI^- לא מייצר רפרסור. משתמשים בחומצות אמינו מסומנות רדיואקטיבית ב- 3H . החלבונים שהיו מסומנים יהיו חלבונים שהפאג' מיוצר, כי החיידק כבר לא מסוגל לייצור חלבונים.



כל חלבוני λ יהיו מסומנים. שברו את התאים, הוציאו את החלבונים וערבבו. רק הרפרסור מסומן ב- 3H בלבד. בכל שאר החלבונים יחס הרדיואקטיביות של ^{14}C ושל 3H הוא שווה, חוץ מהרפרסור (בו יש רק 3H) על ידי השוואה ברדיואקטיביות ניתן לבדוד אותו ולהוכיח שהוא הרפרסור. הרפרסור קושר DNA ספציפית בגרדיאנט סוכרוז חלבונים ו- DNA נפרדים (DNA מהר, חלבונים לאט). בניסוי לקחו:

λ DNA radioactive repressor נקשר נוצר קומפלקס DNA + רפרסור	λimm^{434} repressor לא נקשר אין יצירת קומפלקס
---	--

אם הרפרסור קושר λ DNA, מצפים שהוא ייצור קומפלקס. לאחר הרצה בגרדיאנט, רואים את רדיואקטיביות הרפרסור, שהלך עם ה- DNA λ , וכן מעט רפרסור חופשי שלא קושר λimm^{434} . λ vir הוא כמו λimm^{434} - הרפרסור לא נקשר אליו.

אנליזה קינטית של קישור הרפרסור.

מערבבים את ה- DNA עם החלבון שרוצים לבדוק האם הוא קושר חלבון. מריצים בג'ל מול DNA חופשי. עם ה- DNA + חלבון רץ לאט יותר, החלבון קשור ל- DNA. דרך אחרת היא Filter Binding נייר סינון מניטרולולו - DNA עובר אותו ואילו החלבון לא עובר ונדבק אליו. השתמשו בו קשרו DNA מסומן רדיואקטיבית ^{32}P . מערבבים עם החלבון (הרפרסור). אם החלבון קושר DNA הוא לא יעבור את הפילטר. אפשר לבדוק את ה- DNA המסומן האם הוא עובר או לא. אפשר לשחק עם ריכוז הרפרסור ולספור את הרדיואקטיביות.

יש דרך לאנליזת הקשר בין הרפרסור לאופרטור. לוקחים קטע מ- DNA האופרטור O_{R1} מסומן רדיואקטיבית שמים ריכוזים שונים של רפרסור, ובודקים כמה הוא נקשר ל- DNA. יש עקומה סיגמואידלית, כמו בהמוגלובין או באופרון lac לאחר אינדוקציה עם IPTG. הסיבה היא שבריכוזים נמוכים של רפרסור כמעט אין קישור היא, שהרפרסור חייב להיות דימר כדי לקשור DNA, והמונומר הוא כמעט לא קושר. תחום השינוי הוא מאד קטן. אם רוצים לדעת עד כמה הקישור חזק וכמה זמן הרפרסור נשאר על ה- DNA, עושים את הניסוי הבא: לוקחים DNA מסומן ורפרסור ^{32}P -DNA ו- Repressor ונותנים להם להיקשר. אז שמים DNA לא מסומן בעודף (DNA Unlabeled Excess) ובודקים כמה רפרסור עדיין נשאר קשור. אם הוא נופל בגלל עודף DNA לא מסומן אז הוא ייקשר אליו ולא נראה אותו. ניתן לראות שהדיסוציאציה ב- $37^{\circ}C$ היא כמה שניות עד שהרפרסור עוזב את ה- DNA ונלכד על ידי ה- DNA הלא מסומן (אותו רצף) בטמפרטורה יותר נמוכה הזמן הוא דקות עד שעות כלומר, הקישור הוא מאד חזק.

Order of addition

שמם DNA מסומן ורפרסור ואז מהולים. הרפרסור לא בריכוז גבוה. נותנים להם להיקשר ועושים מיהול לאותו ריכוז DNA. הרפרסור כל הזמן קשור. הרפרסור הוא בדימרים, לכן קושר חזק. בניסוי שני מוהלים את הרפרסור ושמם DNA. הוא קושר את ה- DNA לאט. הרפרסור מהול הוא מצוי בעיקר במונומרים ולכן קושר לאט. זו הוכחה נוספת לכך, שהרפרסור פעיל בדימרים.

איך מוכיחים שמדובר בדימר:

$$K_1 = 2 * 10^{-8}$$

$$K_1 = 3 * 10^{-9}$$

אפשר להוכיח באנליזה, שבדימרים K_1 גדול יותר. בעקומת Scatchard שיפוע הקו הוא 2, בגלל שהרפרסור פעיל בדימר. הרפרסור בנוי מ- 236 חומצות אמינו. חומצות אמינו 1-92 זה הקטע ה- N טרמינלי שקושר DNA. חומצות אמינו 132-236 זה הדומיין ה- C טרמינלי שעושה דימריזציה. הדימריזציה תלויה בריכוז הרפרסור. הרוב הגדול של מולקולות הרפרסור בתא ליזוגני הם דימרים, המונומרים בודדים. קטע N קושר את האופרטור ויושב ב- Major Groove של ה- DNA. בניגוד לכך ה- Cro הוא בעל 66 חומצות אמינו. אין לו 2 דומיינים נפרדים הוא יכול להיות דימר, שקושר DNA כמו הרפרסור, ב- Major Groove על האופרטור.

כאשר הרפרסור יושב ב- O_{R1} , הוא סוגר את הפרומוטור P_R החזק. אם יש רק רפרסור אחד על ה- DNA עם P_R וגם P_{RM} לא היו עובדים. אם הרפרסור היה קשור ל- O_{R3} , הוא היה סוגר את P_{RM} , אך P_R הוא חופשי לתעתוק. אם הרפרסור היה קשור רק ל- O_{R2} , הייתה מניעת התבטאות של P_R , אך הוא היה מביא RNA פולימראז לסנתוז של cI כך שיש סינתזה של הרפרסור ואין סינתזה של Cro. בתא רגיל ליזוגני ביותר מ- 90% מולקולות DNA הרפרסור יושב על O_{R1} , O_{R2} משתק את הגנים ומייצר רפרסור וב- 10% הוא יושב על שלושת האופרטורים ועושה רפרסיה עצמית (סוגר גם O_{R3} וסנתוז של עצמו). ריכוז הרפרסור עולה ככל שהרפרסור מתיישב על האופרטורים. תחילה הוא קושר O_{R1} מייד אחר כך בקואופרטיביות מושך עוד רפרסור ל- O_{R2} . ל- O_{R3} דרוש ריכוז גדול של רפרסור.

דימרים של Cro יכולים להקשר לכל האופרטורים. הסדר הוא O_{R3} (סוגר את הרפרסור בלי לסגור את עצמו), אחר כך O_{R1} ו- O_{R2} ללא קואופרטיביות, ובריכוז הכי גבוה הוא סוגר את כולם (וגם את עצמו). אין כאן קואופרטיביות. מולקולת ה- Cro ב- O_{R3} לא מושכת מולקולה שנייה. וזה רנדומאלי אם המולקולה הבאה תקשר ל- O_{R1} או ל- O_{R2} .

λ משתמש בקואופרטיביות בין O_{R1} ו- O_{R2} בקישור הרפרסור. בעקומת אחוז הרפרסיה כנגד ריכוז הרפרסור יש סיגמואידליות בתחום מאד קטן. אם מהולים רפרסור פי 5 כבר יש אינדיקציה. ירידה קלה ברמות הרפרסור גורמת לאינדיקציה. עקומה ליניארית (מספר שבה יש רק אופרטור אחד ולא 3) היא מאד איטית. ה- DNA הוא סימטרי. אם נהפוך אותו ב- 180° אז יהיה אותו רצף. האופרטורים הם

סימטריים וזאת כי דימרים נקשרים אליהם. אופרטור הכי חזק הוא O_{LI} אחרי O_{RI} והכי חלש קושר O_{R3} . ששת רצפי האופרטורים המזוהים על ידי λ רפרסור ו- Cro הם סימטריים והומולוגיים הם שונים זה מזה בבסיסים בוודדים ברצף.

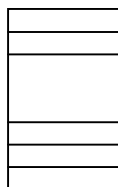
ל- λ רפרסור יש 5 הליקסים בקצה ה- N טרמינל שקושר DNA. כל זוג של 2 ו- 3 יושב בצד אחד של האופרטור בתור ה- Major Groove, כל אחד קושר חצי. הליקס 1 קושר גם את ה- DNA על ידי קישור למספר פוספטים על ה- DNA. הליקסים 4 ו- 5 לא חשובים לקישור עצמו. ל- Cro יש 3 הליקסים 2 ו- 3 יושבים ב- Major Groove. הליקס 1 יותר קצר מזה של הרפרסור (cI). שינויים בחומצת אמינו אחת משנים את הזיקה שלו לאופרטורים שונים לעומת הרפרסור.

ניסוי Foot-Printing.

ניסוי זה בודק אלו בסיסים קשורים לחומצות אמינו. לוקחים DNA (אופרטור) ומסמנים אותו בקצה אחד ב- ^{32}P . למעשה, מתחילים מ- DNA יותר ארוך שמסומן ב- 2 הקצוות. DNA נורמאלי מכיל פוספטים רגילים בקצוות 5'. כדי לסמן צריך להוסיף פוספט רגיל עם אלקליין פוספטאז. לוקחים ^{32}P -ATP עם Polynucleotide Kinase שעושה פוספורילציה. אז מנצלים את חיתוך באחד הקצוות ומקבלים DNA קצת יותר קצר מסומן בקצה אחד. מטפלים באנזים DNase שמפרק DNA. משתמשים בו בריכוז מאד נמוך ולזמן מאד קצר, כדי שיחתוך בממוצע כל מולקולה פעם אחת. מריצים על Sequencing ג'ל גדול אחד (מפרידים באוריאדה). נקבל סולם כתלות במקום החיתוך, זו הביקורת. לוקחים את DNA עם רפרסור. שסוגר חלקית את הקטע ומונע מהאנזים החותך להגיע לכל בסיס. במקום לקבל סולם יש 2 אזורים שלא קיבלנו שום פסים. הם מוגנים על ידי הרפרסור. אלו הבסיסים שאליהם הוא קשור.



ביקורת

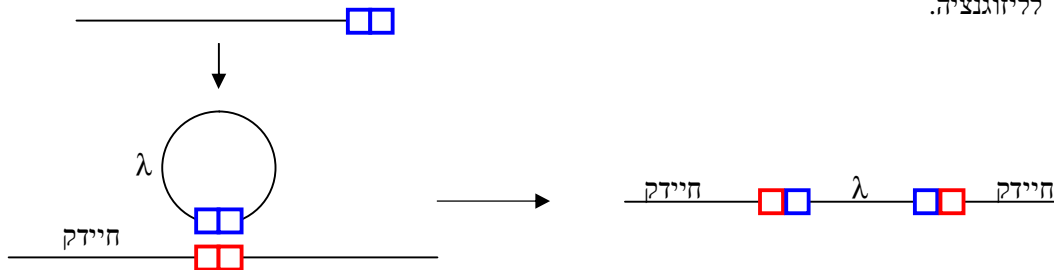


DNA פרומוטור + רפרסור

לפעמים רואים פס חזק מהרגיל (Enhanced) זה אומר שהקישור פתח את האתר לחיתוך זה יכול להיות מוטציות באופרטורים.

הבקרה של λ .

הפאג' יכול להיות ליטי, או לעבור אינטגרציה ולתת מצב ליוזגני, שבו DNA של λ יושב בכרומוזום החיידק. הוא יכול להיות חלק פסיבי מהגנים דור אחרי דור. במצב זה יש מעט פרומוטורים שהם פעילים. אחד הפרומוטורים שעובד הוא פרומוטור חלש P_{int} , שהתוצר שלו הוא אינטגראז שזה אנזים החשוב לליזוגנציה.



פרומוטור נוסף חלש מקודד לגן P_{sieB} . תפקידו למנוע הדבקה נוספת בפאג' λ . לא ברור כמה הוא פעיל ביניהם יש 3 גנים: אחד מהם הוא הרפרסור, המשתיק את הגנים הוירולנטיים, וכן 2 גנים נוספים שהם

Rex A ו-Rex B. החיידק מסוג K הוא ליזוגני ל- λ , ושני תוצרי הגנים הללו לא נותנים למוטנט של rIII לגדול עליו. λ מגן על החיידק שהוא ליזוגני. גנים אלה משבשים את הגידול של פאג'ים לא קרובים עליו.

2 פרומוטורים חשובים: P_R מייצר RNA קצר (165bp). זהו פרומוטור מאד חזק והוא חשוב מאד בליטייות. פרומוטור נוסף הוא הפרומוטור לגן bor אך הוא לא כל כך חשוב ב- λ .

החיידק E. Coli K₁₂ הוא החיידק הרגיל. חיידקים פאתוגניים - E. Coli O157 גורמים לסימפטומים חמורים ולמוות. ניתן להידיבק בהם ממאכלי בשר. יש להם גנים פאתוגניים. שניים מהם הם טוקסינים חזקים. הם יושבים על פאג'ים, (לא בחיידק), שהם קרובים ל- λ . פאג'ים לא ליזוגניים לא יהיו פתוגניים. לזן חיידקים זה יש גנים אחרים גם בכרומוזום שלו וגם בפלסמיד, שגורמים לו להיות פתוגניים. הגן bor הוא גן כזה הוא מתגבר על אפקט הסרום בדם. כל הפרומוטורים הללו הם לא בשליטת הרפרסור, חוץ מהפרומוטור של הרפרסור עצמו.

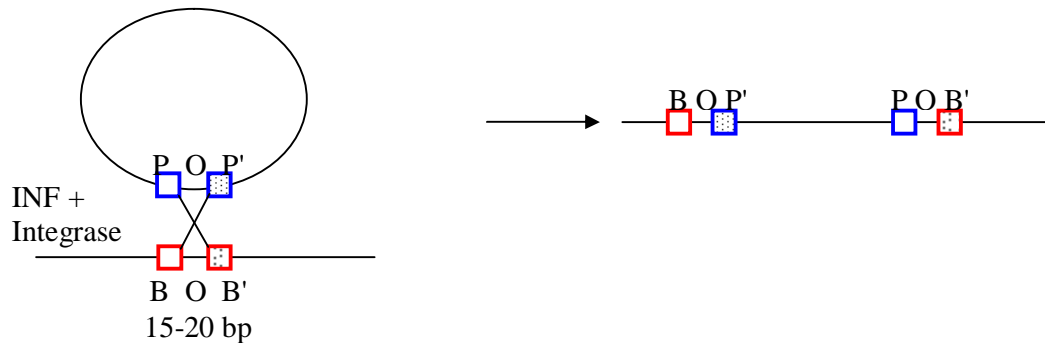
.Operon P_L

רוב הגנים של ה-P_L הם non essential כלומר, לא חיוניים לפאג' חוץ מאחד שהוא essential. כנראה כל הגנים הללו הם כן חשובים בטבע. הגן הראשון באופרון הוא N בלעדיו הפאג' לא עושה פלאקים ולכן הוא חיוני. אחריו יש גן git (sieB) בכיוון הפוך. הוא קונסטיטוטיבי בליזוגן. יש גם גן (Alleviates) rAL (Restriction) תפקידו למתן את הרסטריקציה של החיידקים. הגן עושה מתילציה, שמקנה הגנה כלשהי בפני חיידקים אחרים ממה שהפאג' גדל בהם. בגלל אנוימי הרסטריקציה בחיידקים יעילות הגידול של הפאג'ים בחיידקים אחרים היא נמוכה. ל-B יש מערכת רסטריקציה אחרת מאשר K. ל-C אין מערכת רסטריקציה וישם אין גם מתילציה. אנוים מתילציה מעלה במאת את ההישרדות של הפאג'ים ב-K.

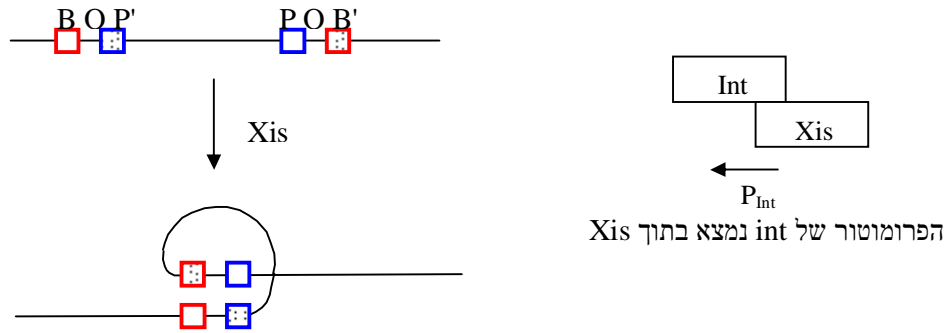
הגן Single Stranded DNA Binding Protein או בקיצור ssb מייצר חלבון שמתקשר ל-DNA חד סיבי. כמעט לכל הפרוקריוטים יש גן כזה. גם ל- λ יש אותו, וזו דופליקציה של פעילות (כי הוא קיים גם בחיידק). אחר כך יש גן cIII וגן kill שהורג E. Coli אחרי הפעלתו אך לא יודעים בדיוק כיצד. שלושה גנים נוספים הם \rightarrow EXO GAM BET (הסדר בכיוון החץ). GAM מנטרל מערכת Rec B, לא ידוע למה. בלי GAM הפאג' גם גדל.

אינטגרציה.

בתוך הפאג' יש רצף לאינטגרציה והוא ניקרא 'POP'. בחיידק יש אתר קטן שבו נכנס λ והוא ניקרא 'BOB'. זוהי לא ריקומבינציה כללית, אלא בנקודה ספציפית. במילים אחרות זה Site Specific Recombination. יש ל- λ אנוים שניקרא אינטגראז, שעושה ריקומבינציה רק ברצפים אלה. יש חלבון נוסף שהוא פקטור שבא מהפונדקאי ועוזר להכניס את ה-DNA λ לכרומוזום וזהו IHF. לאתר החיבור קוראים גם ATT שזה Attachment Site.



כדי לצאת מגנום החיידק, צריך לבצע Cross Over הפוך. לשם כך יש צורך בחלבון נוסף, שמכיר באופן ספציפי אתרים שונים. שלושת החלבונים מוציאים את ה- λ . החלבונים הללו נמצאים בתאחיזה אחד לשני.

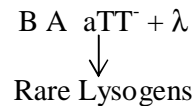


יש חיתוך באותם אתרים בחיידקים ובפאג' יש Cross Over וכניסה לכרומוזום או יציאה.

ניסוי: לוקחים מקטע DNA שכולל את ה- POP' ומסמנים את הקצוות. מורידים את הפוספטים, מפעילים פולי-נוקליאוטיד קינאז ומסמנים את הקצוות עם $^{32}P\gamma$ -ATP. חותכים את הקצה, כדי שיהיה רק קטע אחד מסומן. שמו את ה- DNA וקשרו עליו אינטגראז ועשו Sequencing. רואים פערים שאין פרגמנטים בתוך הג'ל. על ה- DNA עשו טיפול ב- Neocarzinostatin וכן את אותו הטיפול. ב- DNA שעליו קשור אינטגראז החומר הכימי חותך את ה- DNA. כך מקבלים סולם של פרגמנטים. רואים תבנית של פערים באינטגראז ואז יודעים איפה הוא קושר את ה- DNA. את אותו הניסוי עשו עם DNase.

לעיתים ביציאה של ה- λ יש טעות (פעם במיליון). לעתים מקבלים λ שסוּחב גנים של GAL ולעתים λ bio. פאג' כזה יגרום טרנסדוקציה רק של הגנים הצמודים וזה ניקרא Specialized Transduction. הפאג' הזה יגרום טרנסדוקציה ל- GAL^+ והוא גם פאג' דפקטיבי Dgal Defective λ . כי חסרים לו גנים של הזנה אשר אותם הוא מפסיד בריקומבינציה וביציאה. פאג' λ bio גם מפסיד גנים, אך הם לא חיוניים. λ P-bio יכול לגדול ולעשות פלאק.

אם מורידים את האתר ל- λ בתוך הכרומוזום ומדביקים את החיידק ב- λ . בכל זאת יש ליזוגניים מאד נדירים

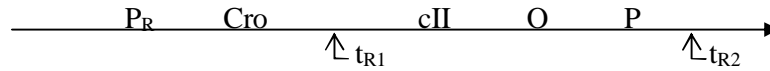


מסתבר, שבחיידק יש אתרים משניים בתוך גנים, שבהם λ בדרך כלל לא משתמש. הם דומים לאתר הרגיל לכניסה λ בחלק מהרצף. רוב הפאג'ים האחרים, לא λ משתמשים בגנים ל- tRNA או בגנים סטרוקטוראליים כדי להכניס את עצמם בחיידק. בפאג' הרצף משלים את רצף הגן ולכן הוא לא פוגע בגן שבו הוא נכנס ולא גורם לנזק λ לא עושה זאת.

EXO הוא נוקלאז, BET לא ידוע עדיין ו- GAM מנטרל מערכת Rec B. שלושתם נותנים ריקומבינציה כללית לפאג'. מדוע, אם לחיידק יש מערכת כזו? זו דופליקציה של פונקציה. כשיש מצב של $Rec A^+$ יש ריקומבינציה, ושיש $Rec A^-$ אין ריקומבינציה בחיידק. כאשר גם לחיידק וגם לפאג' אין ריקומבינציה אז אין גידול. באותו אופן יש גן E_{A22} שהוא משתיק כמה גנים של החיידק, כמו למשל β -Gal. כל הגנים חוץ מ- N הם משותקים. אם עושים אינדוקציה, נוצר טרנסקריפט של P_L , נפסק בטרמינטור חזק t_{L1} כל מה שנוצר הוא רק הגן N. כשיש N יש תעתוק בלא התחשבות בטרמינטורים בכלל. הוא גורם לתעתוק רציף של האופרון יש בקרה לפי זמנים.

אופרון P_R

כשעושים אינדוקציה, מקבלים בעיקר גן אחד – Cro. זהו אנטי-רפרסור שמונע רפרסיה אחרת וגורם לפאג' להיות ליטי. התעתוק נעצר ב – 50% מהמקרים ב – t_{R1}.

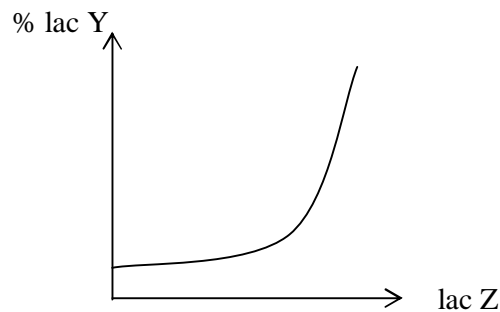


יש 2 גנים שמעובים ברפליקציה של λ והם O – 1 ו P. ב – O יש Ori, ליצור הרבה מאד עותקים של עצמו בדרך למסלול ליטי. ה – Cro סוגר את הרפרסור ומכוון למצב הליטי, כשיש N, לטרנסקריפט זה כבר אין טרמינציה ואז מקבלים הרבה O – 1 ו P וכן גן Q וגנים נוספים. הגן ren חשוב אולי לכניסת λ לחיידק אחר עם פאג' אחר ועוזר להתגבר על Rec כלומר, N עובד גם ב – cis וגם ב – trans על האופרון השני.

.Polarity

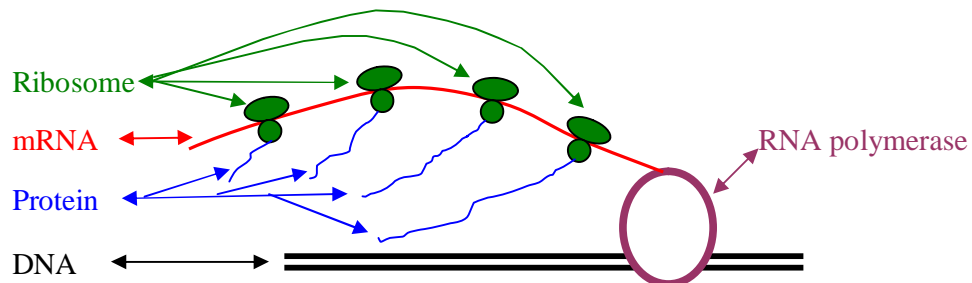
אם מסתכלים על הפעילות של כל אנזים רואים כי ב – W.T. כולם עובדים ב – 100%. אם עושים מוטציה ב – A שהחליפה חומצת אמינו והורידה את פעילות האנזים רואים כי יתר האנזימים לא מושפעים. אם במקום זה עושים מוטציית Nonsense יש מוטציה ב – A שהשפיעה כך שכל הגנים האחרים באופרון לא מתבטאים כלומר יש השבתה של כל הגנים במורד הזרם. זוהי פולאריות. מוטציית Nonsense היא פולארית אך לא כל מוטציה כזו גורמת לאותו חוזק.

כשבדקו זאת בגן lac Z ראו כשעושים הרבה מוטצייות Nonsense בגן lac Z אז למוטצייות בתחילת הגן יש פולאריות חזקה, בעוד שלמוטצייות בסוף הגן כמעט אין פולאריות.



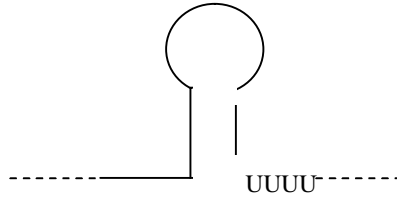
ב – Missense יש החלפה של חומצות אמינו, אך ב – Nonsense הריבזום נתקע ואז רוב הגנים הבאים לא עוברים תרגום, כי הם נמצאים על אותו ה – RNA בחיידקים.

בחיידקים השיעתוק והתרגום מתרחשים בו זמנית.



קיימים שני מודלים לתופעת הפולאריות המודל הראשון במקרה של מוטציית Nonsense – mRNA לא מוגן על ידי הריבוזומים, שנתקעים ב – Nonsense, ולכן עובר פירוק על ידי RNase מהר מאד. לכן יש ירידה חזקה בגנים במורד הזרם. ב – RNA יש רצפים של RBS (אתרים לקישור ריבוזומים). ככל שהמוטציה קרובה יותר ל – RBS (לגן הבא) היא פחות פולארית מודל זה הוכח כלא נכון.

המודל השני הוא שהריבוזום נתקע ב – Nonsense ואז במקום שהפולימראז ימשיך עד סוף האופרון, יש טרמינציה לא טבעית, כלומר טרמינציה שלא בסוף האופרון. יש חלבון שנקרא RHO שנקשר ל – RNA ערום ומתגלש עליו עד שהוא מגיע לפולימראז ומשחרר אותו. ב – RHO הפולאריות החזקה יורדת. מודל זה הוא כנראה המודל הנכון. בחיידקים יש טרמינציה על ידי RHO. יש טרמינציה (טבעית) משני סוגים בחיידקים הראשון הוא RHO Dependent שעליהם RHO משפיע. הסוג השני הוא RHO Independent ועליהם RHO לא משפיע. דוגמה לטרמינטור שלא צריך RHO היא לולאה עם רצף UUUU בסופה.



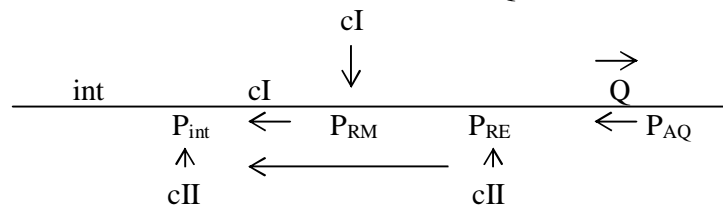
התפקיד של N.

תפקיד הגן N הוא לבטל כל מני טרמינטורים, גם אלה שמושפעים מ – RHO וגם אלה שלא. הוא מבטל גם טרמינטורים שנוצרים כתוצאה ממוטציות וטרמינטורים שמקורם לא ב – λ. הגן N עובר באתרים ספציפיים ל – λ (לא באופרונים פולאריים של החיידק). הוא משתמש באתר N Utilization או בקיצור nut שם הוא נקשר ל – RNA פולימראז ומבטל לו את ההכרה לסמני stop. בתוך ה – RNA יש רצפי nut. יש עוד כמה חלבונים שגם מתקשרים באותו אתר. הם נקראים Host Factors וגילו עד היום 5 כאלה. הם פקטורים שבאופן טבעי משתתפים בטרמינציה טבעית וכאן הם מגויסים לעשות בדיוק ההפך כלומר, להפסיק טרמינציה על ידי N עם קישור בפולימראז.

.Temporal Regulation

כאן יש בקרה לפי זמנים Temporal Regulation. בשלב ראשון יש יצירה בעיקר של Cro ושל N אז יש יותר רפליקציה וכל הגנים המוקדמים ובסוף מקבלים Q. בשלב הבא P_R עובר טרמינציה בלי לסנתז אפילו גן אחד. בנוכחות Q יש אנטי-טרמינציה והטרמינטור לא מוכר יותר ואז מקבלים את כל יותר הגנים של הפאג' שבונים אותו וגורמים לליזיס של החיידק. גנים אלה מיוצרים אחרי הרפליקציה, כדי שתהיה אריזה יעילה. לגנים בסוף הטרנסקריפט הארוך לוקח יותר זמן להתבטא, וזה גם טוב בבקרה.

Q גם עובד על אתר ספציפי שנקרא QUT. זהו רצף ב – DNA אליו מתקשר Q וגם משנה את ה – RNA פולימראז. בבקרה של זה משתתפים שני חלבונים חשובים הראשון זה cIII שגורם לייצוב של cII (cIII Stabilizes cII). השני הוא cII שגורם לאקטיבציה של Certain Promotor. ללא cIII אז cII יעבור פירוק על ידי פרוטאזות. ה – cII גורם לאקטיבציה של 3 פרומוטורים הראשון הוא אנזים שמכניס את DNA λ לפרומוזום (אינטגרזא). השני הוא P_{RE} שמייצר את cI (הרפרסור הראשוני). הפרומוטור השלישי מונע ייצור של Q. כל הפרומוטורים הלל חשובים לליזוגניזציה.



וירולוגיה מולקולארית חלק ב'

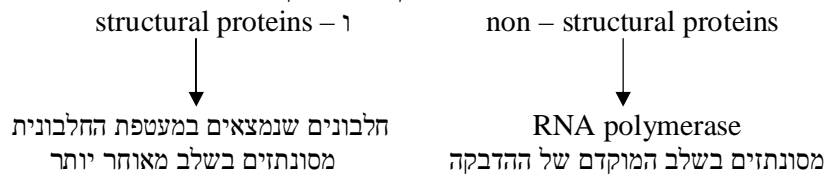
וירוסים אנימליים

הקדמה.

נגיפים (וירוסים) מיקרואורגניזמים הקטנים ביותר שמסוגלים להתרבות. הם מתרבים אך ורק בתאים חיים (פרזיטים). יש פרזיטים תוך תאים שאינם נגיפים. הם יצורים קטנים מאד. הם מכילים את כל המנגנון המטבולי או את רובו שנחוץ לריבוי (ריבוזומים וכו'). יש להם אלמנטים של תא חי. לעומת זאת, נגיפים מחוץ לתאים הם חלקיקים ומתפרקים כשהם חודרים לתאים. הם לא מכילים אותם אלמנטים. יש הרבה נגיפים אנימליים שמכילים RNA כחומר גנטי. ה – DNA או RNA שלהם מוכנס לתאים, ואז מסונתזים חלבונים שהאינפורמציה שלהם נמצאת בגנום הנגיף, ומערכת המטבוליזם והרפליקציה של התא משועבדים לנגיף.

לנגיפים יש מצב חוץ תאי ותוך תאי. במצב חוץ תאי הם לא מסוגלים להתרבות, והם נקראים virions – חלקיקים. כשהם חודרים לתא, ה – DNA מוזרק, וכל החלבונים נשארים בחוץ – בפאג'ים. נגיפים אנימליים יכולים להדור גם שלמים ולהתפרק בפנים. במצב התוך תאי והויריונים הם HIV. viruses. במצב התוך תאי הוא DNA שמחובר ל – DNA הכרומוזומלי ולא משועתק, מצב אינטגרציה. החלקיקים בנויים לכך שהחומר הגנטי יוחדר לתאים, שמחוץ לתאים הם יהיו מוגנים על ידי מעטפת חלבונית (לעיתים גם שומניים, עם אנזימים ואף היסטונים). אם יש אנזימים בויריונים, הם בדרך כלל לא פעילים.

במצב התוך תאי חומצת הגרעין מתועתקת לחלבונים. לעיתים הוא אף לא מגיעה לגרעין, וההדבקה נעשית בציטופלזמה. החלבונים המסונתזים מגנום הוירוס מחולקים ל – 2 קבוצות:



מחלות שנגרמות על ידי נגיפים:

אפילו במומיות מלפני אלפי שנים מצאו סימן לאבעבועות שחורות. כך גם בימי הביניים חיסון – אף בתקופות מאד מוקדמות (מאות 17 – 18) ניסו להזריק דם של חולים לבריאים. בחלק מהמקרים זה חיסון. הראשון שעשה זאת בצורה מבוקרת ומוצלחת היה ג'נר במאה ה – 19, בזמן מחלת אבעבועות שחורות. הוא שם לב שלפרות יש מחלה דומה, הוא חשב שיש גורם מדבק בפרות, שגורם להדבקה קלה של הרפתניות שלא היו חולות וחסין אותן.

פסטר עשה חיסון נגד כלבת (1870), כלבת היא וירוס העובר מנשיכת כלבים או זאבים. פסטר גידל את הוירוס בסוס, קיבל חיסון והזריק לחולים את דם הסוסים. הדבר היה בשימוש עד לאחרונה. החוקר קופרובסקי רצה לנסות חיסון חדש לכלבת. מגדלים את הוירוס בתרביות רקמה במקום לסוסים, ומזריקים לחולים. הדבר נמצא בשימוש כעת.

ראו, שהנגיפים שונים בחיידקים בניסוי פילטרציה בסוף המאה ה – 19. העבירו דרך פילטרים את הדם או את אקסטרקט הצמחים. החיידקים לא עברו, ומה שעבר נקרא גרם מדבק. לא ידעו שהוא מדביק בצורה אחרת מחיידקים. החיידקים בדרך כלל מפרישים טוכסינים בקוף. החוקר סטנלי ב – 1935 עשה את הניסוי הראשון בוירוס הוא גיבש את הוירוס TMV שמדביק צמחים כמו טבק. הוא הראה שזה חלבון, ולא תא חי.

לתאי הצמחים יש דפנות, והוירוסים בדרך כלל מותאמים מבחינת מנגנון ההדבקה לתאים. הוירוסים נכנסים לתאי הצמחים מפציעות שעושים חרקים וכו'.

במקביל נעשתה עבודה בבקטריופאג'ים, כי חשבו כי הם יביאו תועלת ברפואה. על נגיפים אנימליים עבדו אנשים אחרים בהקשר רפואי. גילו שאלה חלקיקים יותר קטנים מחיידקים בניסוי פילטרציה ובבעלי החיים.

רוב מחלות ילדים נגרמות על ידי נגיפים: אדמת, צהבת, חזרת וכן מחלות בעוברים, שפעת, דלקת קרום המוח, כלבת. יש גם וירוסים שגורמים לסרטן.

ב – 1908 ראוס חקר לויקמיה וסרקומה בתרנגולות. הוא עשה ניסוי פילטרציה של דם, וראה שהגורם המדבר שגורם ללויקמיה עובד דרך פילטרים והוא לא חיידק. ב – 1911 הוא גילה את הוירוס שגורם לסרקומה. הסרטן הזה מועבר בהדבקה על ידי הוירוס. (זה לא המצב לגבי המחלה בבני אדם).

שיטות למחקר בנגיפים.

יש הבדל בין מחקר הויריונים למחקר הוירוסים. בויריונים חוקרים בעיקר את המבנה אפשר לראות חלקיקי נגיף במיקרוסקופ אלקטרוני. תחום הגדלים של $200\text{\AA} - 2000\text{\AA}$. מחקר החלקיקים נעשה בשיטות של מחקר חלבונים כגון קריסטלוגרפיה וצנטריפוגציה. קל במיוחד לנקות חלקיקי נגיף, כי הם גדולים יותר מאלמנטים תוך תאיים אחרים. מחקר הנגיפים תרם למחקרים ביולוגיים אחרים. מחקר במצב תוך תאי נעשה בשיטות של ביולוגיה מולקולארית וביולוגיה של התא. הוירוסים תרמו לתגליות כמו Gene Splicing.

מבנה של נגיפים.

בהתייחסות בעיקר לוירוסים אנימליים. לכאורה יש הרבה אפשרויות למבנה, אך מערכות המבנים האופייניים לנגיפים הוא קטן. יכול להיות אותו מבנה לפאג' ולוירוס שמדביק צמחים, כי המבנים המוצלחים נשמרו באבולוציה. אפשר לחלק את המבנים למספר קטגוריות. בנגיפים אנימליים יש 2 סוגי נגיפים. Simple Viruses ו- Complex Viruses (או Naked ו- Enveloped). ה- Simple מכילים חומת גרעין, שעטופה במעטפת חלבונית אחת. ב- Complex בנוסף לחומצת גרעין ומעטפה יש מעטפות נוספות. המעטפות הנוספות הן חיצוניות ונקראות Envelopes. הקפסיד הוא המעטפה הפנימית החלבונית (ב- Simple יש רק קפסיד). יש 2 צורות עיקריות בלבד ב- Simple 1. סימטריה הליקלית 2. סימטריה היקוסהידרלית. בוירוסים מורכבים יש Nucleo-capsid העטופה במעטפת חיצונית. דוגמות ל- Naked היקוסהידרלי הם וירוס פוליו, וירוס הנזלת, וירוס מחלת הפה והטלפיים. דוגמה ל- Naked הליקלי היא TMV. וירוס ההרפס הוא דוגמה ל- Enveloped היקוסהידרלי ווירוס השפעת הוא דוגמה ל- Enveloped הליקלי.

Simple Viruses – קפסידים בעלי סימטריה הליקלית והיקוסהידרלית.

מדברים על מחקר הויריונים. מחקר המבנה נעשה בשיטת ביוכימיה (חקר חלבונים במעטפת), במיקרוסקופ אלקטרוני וב- X-ray crystallography. המבנה ההליקלי – כמו TMV (Tobacco Mosaic Virus). הוא נראה כרווד Rod עם חלקיקים Capsomers שהם היחידות הבודדות המסודרות במבנה סימטרי ב- TMV כל קפסומר הוא מולקולת חלבון של $2,000,000\text{d}$. יש רק סוג חלבון מבני אחד. תת היחידות מסודרות בצורה הליקלית. ה- RNA מסודר בצורה הליקלית (חד סיבי) בתוך המבנה. אורך החלקיק הוא כ- 3000\AA ורוחבו 150\AA .

הסימטריה ההליקלית שלו היא מושלמת. כל תת יחידה חלבונית נמצא באותו מצב כמו כל תת יחידה אחרת מבחינת הקשרים לתת היחידות הסמוכות. הקשרים הם לא קוולנטיים אלא קשרי מימן וקשרים הידרופוביים. הסימטריה אינה מושלמת לחלוטין. כל תת יחידה קשורה ל- 3 נוקליאוטידים ב- RNA, ולכן הסימטריה מבחינת הקישור ל- RNA, שהרצף שלו משתנה, אינה מושלמת לגמרי. (סימטריה

הליקלית לא מושלמת היא שיש הבדלים קטנים בין תת היחידות מבחינת הקשרים הכימיים סביבה. כאשר יש הבדלים וזוויות שונות בן החלבונים, אז המבנה הוא לא מוט ישיר. זה מה שקיים ברוב הוירוסים המורכבים, שמכילים נוקלאו-קפסיד הליקלי.)

זה שיש סימטריה נובע מטעמי חיסכון. באבולוציה התפתחו מבנים אלה, כי הם חסכוניים ביותר מבחינת הוירוסים (הם לא מקודדים להרבה גנים). כאשר יש רק סוג אחד של חלבון מעטפת, המבנה הטוב ביותר למעטפת הוא מבנה סימטרי מתת היחידות הזהות. (אם יש תת יחידות שאינן זהות, עדיין יכולה להיות סימטריה מושלמת בתנאי שיש חזרות זהות.)

סימטריה היקוסהידרלית.

אבולוציה של הוירוסים התפתחה במקביל להתפתחות התאים. יש רק 2 צורות סימטריה, כלומר, אלה הצורות היעילות ביותר. רוב העבודה על וירוסים נעשה בשיטה של Negative Staining על ידי תרכובת אורניום. הוא צובע את כל הסביבה, ועל רקע זה החלבונים נראים באופן ברור. רואים עליהם את הקפסומרים. לצורת הסימטריה של הויריונים הגיעו בקריסטלוגרפיה על ידי X-ray. ראו שלוירוסים מסוימים יש מעטפת עם סימטריה היקוסהידרלית.

יש מספר קטן של צורות סימטריה. הגוף הפשוט ביותר עם סימטריה היקוסהידרלית הוא Icosahedron. זה מבנה גיאומטרי בעל 20 פנים, שהם משולשים שווים צלעות. זה מבנה סגור (עשרים = icos). מה שמאפיין סימטריה היקוסהידרלית זה צירי סבוב מסוגים מסוימים. צירי סימטריה סיבובית – למלבן יש ציר סימטריה סיבובית של 2 לריבוע של 4, למשולש שווה צלעות של 3. להיקוסהידרון יש צירי סימטריה של 3 (משולשים) ויש 20 כאלה, וכן צירי סימטריה של 5 כל קדקוד הוא ציר סימטריה של 5 (12 קודקודים) וצירי סימטריה של 2 במפגש בין 2 משולשים.

כל הגופים בעלי סימטריה היקוסהידרלית מוגדרים על ידי צירי הסימטריה הסיבובית הללו. כל הגופים הללו נקראים Icosadeltahedra, ההיקוסהידרון הוא מקרה פרטי. מספר גופים כאלה הוא רב מאד, והוא מבוסס על סדרה של מספרים מסוימים מספרים אלה נקראים מספרי טריאנגולציה Triangulation. לכל Icosadeltahedra יש להם מספר טריאנגולציה משלו.

לחלקיקי הוירוסים גם יכולה להיות סימטריה היקוסהידרלית, למרוח שאינם בנויים ממשולשים. מס' טריאנגולציה 1 אז זה 20 משולשים. לוירוסים כאלה יש 60 תת יחידות (20 X 3). כדי שלגוף תהיה סימטריה היקוסהידרלית, הוא לא חייב להיות בנוי ממשולשים שווים צלעות. עדיין יש להם צירי סיבוב של 2, 3 ו- 5. לחלקיקים יש 3 תת יחידות לכל "משולש" במבנה.

כאשר מס' הטריאנגולציה הוא 3 אז זה 60 משולשים, 180 תת יחידות. בקריסטלוגרפיה אפשר היה לראות, שיש לקפסידים סימטריה היקוסהידרלית, לדעת את מס' תתי היחידות ואת מספרי הטריאנגולציה. בטבע הסימטריה היא לא בהכרח מושלמת.

ב – SV40 מצאו שיש לו מס' תת יחידות שונה ממה שהיה צפוי לפי מספר הטריאנגולציה שלו. יש כאלה, שבהם הסימטריה היא כן מושלמת. הראו, שהקפסומרים הם בעצם לא תת יחידות, אלא מקבץ של תת יחידות. זהו מבנה של 5 או 6 תת יחידות. זהו המצב בוירוסים עם סימטריה היקוסהידרלית. (בוירוסים מסוימים יש סטייה מהסימטריה ההיקוסהידרלית מבחינת מס' תתי היחידות).

איך נוצרים המבנים הללו?

סימטריה היקוסהידרלית יכולה להישמר גם אם תת היחידות הן חלבונים שונים. כל אחד מ- 6 תת היחידות הקטנות יכול להיות חלבון שונה. בפאג'ים היצירה של המבנים הללו אפשרית לביצוע במבחנה. החלקיק הראשון שעשו לו זאת היה TMV. אפשר לקחת חלקיקים ולגרום לדינאמיקה של חלבונים, להפריד את תת היחידות ואת ה-RNA מחלבון, ולעשות רקונסטרוקציה של וירוס שלם בתנאים מתאימים.

אפשר לעשות זאת גם בפאג'ים של λ . בוירוסים בעלי סימטריה היקוסהידרלית לא הצליחו לעשות זאת. הדבר חשוב לצורכי רפואה וכו'. תהליך יצירת TMV מתת יחידות נעשה ללא תיווך של פקטורים נוספים כלומר, Self Assembly. אין צורך באנזימים וב – Template. חלבוני ה – TMV מסתדרים בצורה זו, כי זו הצורה עם האנרגיה החופשית הכי נמוכה. כך גם לגבי חלקיקים יותר מסובכים. (בכך הדבר דומה לקיפול של חלבונים מסוימים). ב – Sub Assembly יש Template מסוים להגעה למבנה, כמו בסינתזה של חלבונים על גבי הריבוזומים. איך הדבר מתרחש בתאים? בתאים יש שאפרונים. אולי בגלל זה וירוסים היקוסהידרליים לא יכולים להיבנות במבחנה. אפשר להשתמש בוירוסים להנדסה גנטית, כי יש להם מנגנונים יעילים של חדירה לתאים.

הוירוסים המורכבים.

וירוס עם מעטפת פנימית הליקלית, כמו בוירוס השפעת מכיל RNA חד סיבי, שעטוף במעטפת חלבונים עם מבנה הליקלי לא מושלם. המעטפת החיצונית, כלומר ה – Envelope, מקורה בממבראנה של התא. בזמן ההבשלה של הוירוס הנוקלאו-קפסיד מתעטף בממבראנה של התא, ונוצר חלקיק עגול. בממבראנת התא יש חלבונים ורצפטורים. לפני ההליך ההבשלה הם מוחלפים בחלבונים מסוימים של הוירוס. כך נוצר וירוס שמכיל שומנים. לווירוס HIV יש מבנה כזה, הוא מכיל ממבראנה של לפידים. יש ממיסים של לפידים, כמו פנול או כלורופורם, ובעזרתם אפשר לחטא נגד הוירוסים הללו.

יש וירוסים עם מספר מעטפות, שמקורן לא ממבראנת התא, כמו וירוס אבעבועות שחורות. יש וירוסים, שה – Envelope שלהם מקורו ממבראנת הגרעין, כמו הרפס. אולם כולם מכילים נוקלאו-קפסיד. הם לא מסוגלים להדביק רק עם נוקלאו-קפסיד, כי מנגנון ההדבקה שלהם תלוי בחלבונים שנמצאים במעטפת החיצונית. לקפסיד יש סימטריה הליקלית או היקוסהידרלית. בוירוסים עם סימטריה היקוסהידרלית כל 3 תת יחידות הן משולש אחד.

מודל ההדבקה של תאים על ידי נגיפים.

המצב של Infection מוגדר כמצב שבו הנגיף חודר לתאים, מתרבה ומשחרר נגיפים חדשים, כלומר האינפקציה היא כל התהליך. מחלה שנגרמת על ידי נגיף מתחילה כאשר הנגיף מסיים הדבקה של תא אחד לפחות. אז משתחררים הרבה חלקיקי נגיף, ויש סיכוי גבוה להתפשטות אם ההדבקה לא הושלמה, המחזור לא נגמר, לא נגרמת מחלה. פאג'ים הם גם נגיפים, וגם בהם יש אינפקציה. מודל ההדבקה הוא תיאורטי אך מאד יעיל. ההדבקה מתחוללת כאשר מערבבים נגיפים הנמצאים בדרך כלל בספנציה עם תאים. התאים הם הרבה יותר גדולים מהנגיפים, וההנחה היא שהם נייחים. ורק הנגיפים נעים בתמיסה, באופן רנדומאלי.

קימת הנחת יסוד שכל התאים זהים מבחינת יכולתם להידבק. וכל הנגיפים זהים ביכולתם להדביק. ההנחה הזו לא לגמרי נכונה. אוכלוסיות, של חיידקים למשל, הן לא סינכרוניות, ונמצאות בשלבים שונים במחזור התא, ורק גם בתאים אנימליים בתרבית רקמה. לא בטוח, שיכולתם להידבק זהה בכל השלבים. גם הנגיפים הם לא בהכרח אוכלוסיה אחידה. אוכלוסיית נגיפים יש נגיפים שהם פגומים בחלקם, כלומר מוטנטים בחומצת גרעין ובחלבונים.

בהנחה זו אפשר להראות, שההדבקה מתחוללת על פי נוסחת פואסון (התפלגות פואסונית):

$$P(K) = \frac{e^{-m} * m^K}{K!}$$

$P(K)$ = פרקציה של התאים שמודבקים על ידי K נגיפים. (הסיכוי שתא אחד מסוים באוכלוסיה להיות מודבק – הסתברות).
Multiplicity Of Infection – m.o.i = m זהו מספר ממוצע.

$$m = a * \frac{N}{C}$$

N = ריכוז חלקיקי הנגיף (הויריונים).

C = ריכוז התאים.

a = הסיכוי של הנגיף לסיים מחזור הדבקה.

N/C = מספר חלקיקי הנגיף פר תא בתמיסה.

לגבי a אפילו אם הנגיפים כולם בעלי כושר הדבקה דומה, עדיין יש אפשרות, שנגיף לא יסיים את מחזור ההדבקה הוא צריך להיספח לתאים, לחדור, ולבצע תהליכים ביוכימיים, כלומר לעבור הרבה שלבים שבהם יתכן Abortion שזה מצב שבו הנגיף "נתקע" בשלב מסוים בהדבקה. בוירוסים אנימליים a הוא מקסימום 1 ובפאג'ים הסיכוי (a) הוא 1. ב- T_4 המצב הוא כזה, שאם מתרחשת הדבקה, יש סיום של המחזור. המצב שונה בנגיפים אנימליים שם a הרבה יותר קטן מ- 1. אם מבצעים plaque assay ומקבלים ריכוז חלקיקי הדבקה, למספר הפלאקים יותר קטן ממספר החלקיקים, a יכול להיות מאית או אף אלפית ולכך יש חשיבות גדולה.

ההסתברות $P(K)$ כך שאם לוקחים אוכלוסיה של תאים ואכלוסיה של נגיפים ומערבבים מתחוללת הדבקה לא כל התאים מודבקים על ידי מספר דומה של חלקיקים. יש באוכלוסיה תאים שמודבקים על ידי 0 נגיפים, על ידי 1 או 2 נגיפים. אם 5 תאים מתוך 100 מודבקים על ידי 3 נגיפים, אז $P(K)$ יהיה הפרקציה של התאים שהודבקו על ידי $K = 3$ נגיפים. הסכום הכולל של כל ה- $P(K)$ בתמיסה שווה כמובן ל- 1 (הסתברות והתפלגות).

$$\sum_{K=0}^{\infty} P(K) = 1$$

אפשר להסתכל על המודל כעל המסת חלקיקים בממס. יש תנועה רנדומאלית של החלקיקים והסיכוי לריכוז מסוים של חלקיקים ביחידת נפח נמדד על פי התפלגות פואסונית. כאשר יש נגיפים ותאים, הנגיפים הם כמו מולקולות בתמיסה, והתאים ניחים ביחס אליהם. מה שקובע את ההדבקה, זה כמה נגיפים יהיו ביחידת נפח. אם יודעים את m , אפשר לחשב את $P(K)$ לכל K . כך ש- K נע מ- 0 – ממספרים שלמים עד אינסוף. אם יודעים את $P(K)$ עבור K מסוים, אפשר לחשב את m .

Plaque Assay בנגיפים אנימליים.

מערבבים פאג'ים עם חיידקים באגר רך, נותנים להם לעבור ספיחה בספנציה ושופכים לצלחת. אחרי 12-24 שעות רואים אזורים בהירים בצלחת בכל מקום כזה נפל תא שהודבק הוא שחרר אוכלוסיה של פאג'ים, שלא הייתה אפשרות לעבור דיפוזיה באגר, והם הדביקו את התאים שמסביב. הפלאק הוא תוצאה של תא מודבק אחד (לאו דווקא על ידי נגיף אחד). מספר הפלאקים הוא מספר התאים שהודבקו על ידי הפאג'ים בספנציה. תא שלא הסתיים בו מחזור הדבקה לא ייתן פלאק. הפלאק הוא תוצאה של מספר מחזורי הדבקה.

בתאים אנימליים בתרבית רקמה העיקרון הוא זהה. מגדלים תאים בתרביות רקמה. בדרך כלל אלה תאים שגדלים על קרקעיות של צלחות מיוחדות, מצופות פולימר. התאים מתחלקים בצלחות והמדיום נמצא מעליהם. מוציאים את המדיום ומוסיפים ספנציה של הנגיפים בנפח קטן על מנת שהספיחה תקרה מהר בדיפוזיה. רוצים שההדבקה תהיה כמה שיותר סינכרונית. זמן הספיחה הוא קצר יחסית כשעה. הנגיפים נספחים. יש ספיחה לתאים מסוימים במרבד. אחר כך מוסיפים מדיום עם אגר. האגר גורם לכך, שהנגיפים לא יכולים לזוז. כך מקבעים את המצב אז הנגיפים החופשיים כבר לא יכולים להדביק בזמן הנתון.

הפלאק מבטא תא מודבק אחד. במחזור שלם משתחררים כ- 10,000 עד 100,000 נגיפים מתא אחד. רק במקום של שחרור הנגיפים הם יכולים להדביק את התאים בסביבה, באגר. אז נוצר פלאק. מחכים

כ - 10 ימים ואז מוסיפים אגר עם צבע, שיכול לחדור לתאים חיים בלבד (Phenol Red) אזור הפלאק אינו נצבע. ההבדל בין תאים אנימליים לחיידקים הוא, שה- a בתאים אנימליים קטן מאד מ- 1. ריכוז החלקיקים ידוע, ואפשר לדעת את ריכוזם ההתחלתי בתמיסה. אם היו $10^7/\text{ml}$ נגיפים שנתנו פלאקים. אולם רואים במיקרוסקופ אלקטרוני ובתמיסה היו $10^{10}/\text{ml}$ חלקיקים, כלומר $a \ll 1$, כי רק חלק קטן מהחלקיקים הדביקו תאים.

בספירת המוקדים סופרים פלאקים שמייצגים תא אחד שנדבק זה נותן את מספר הנגיפים על פי נוסחת פואסון. בפאג'ים מקבלים את N מה - Plaque Assay. במקרה של נגיפים אנימליים מקבלים את $a \cdot N$ בספירת הפלאקים. ה- Plaque Assay הוא מקרה פרטי של נוסחת פואסון, כי - m.o.i הוא נמוך מאד. הוא פרופורציונאלי למספר הנגיפים לתא (בפאג'ים זהו מספר נגיפים לתא, בחיידקים יש מספר גדול של תאים ומספר קטן של נגיפים). הנוסחה נכונה לכל m, אבל ב- Plaque Assay ה- m הוא מאד קטן.

המצב נכון לגבי כל ניסוי:

$$P(0) = \frac{e^{-m} * m^0}{0!} = e^{-m}$$

(מספר התאים שלא עברו הדבקה)

לפי טיילר:

$$e^{-m} = 1 - m + \frac{m^2}{2!} - \dots$$

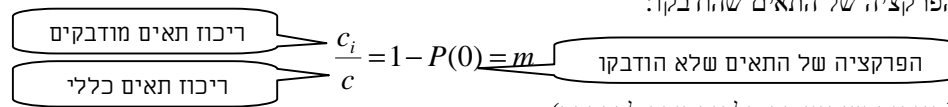
ב - Plaque Assay $m < 10^{-5}$ אז רוב המספרים בטור זניחים במצב זה:

$$P(0) = 1 - m$$

(מקרה פרטי כאשר m קטן מאד)

מודדים את מספר התאים המודבקים:

הפרקציה של התאים שהודבקו:



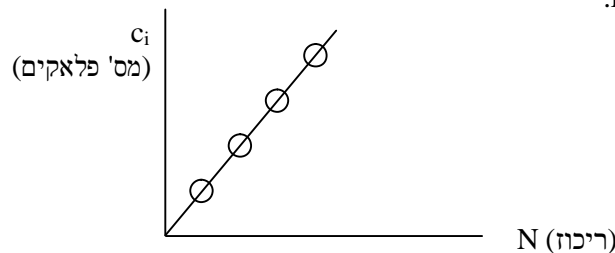
(מניחים שנחוץ רק חלקיק אחד להדבקה)

מספר התאים המודבקים (מה שמודדים ב- Plaque Assay):

$$\frac{c_i}{c} = a * \frac{N}{c} \Rightarrow c_i = a * N$$

N = ריכוז חלקיקי הנגיף (בפאג'ים $a=1$, לכן מספר התאים שהודבקו שווה למספר הנגיפים).

מה שמודדים ב- Plaque Assay:



בפאג'ים וכן בנגיפים אנימליים מקבלים קו ישר, מה שמראה, שההנחות שעשינו מתאימות. העובדה שמקבלים קו ישר מוכיחה, שנחוץ רק חלקיק אחד להדבקה (One hit). כל זאת נובע מנוסחת פואסון. (היא שימושית גם בניסויים בטוכסינים). אמנם כל תא יכול להיות מודבק על ידי יותר מנגיף אחד, אבל אחד מספיק להדבקה. בקומפלימנטציה היה צריך יותר מחלקיק אחד, ושם לא מקבלים קו ישר. אם נחוץ יותר מחלקיק אחד להדבקה (מינימום 2) הפרקציה של התאים הייתה:

$$\frac{c_i}{c} = 1 - p(0) - p(1)$$

והתוצאה הסופית הייתה:

$$c_i = \frac{a^2 * N^2}{c}$$

במקרה כזה בספירת פלאקים מקבלים פרבולת בעקומת הספירה ולא קו ישר. ה – a מבטא את היחס בין מספר החלקיקים שגרמו לפלאקים למספר החלקיקים הכולל. זהו הסיכוי שהנגיף יסיים הדבקה.

למעשה בנגיפים אנימליים כמעט ולא עושים Plaque Assay לספירת נגיפים. זהו תהליך קשה וארוך, עם סכנת זיהומים. (כמעט ואין תרופות נגד וירוסים). בבדיקות איידס, למשל, עושים בדיקות PCR קוונטטיבי. במחלה לא חייבים לדעת מספר אבסולוטי של חלקיקים, אלא מספר יחסי. במקרה של פוליו אכן אפשר לדעת מספר חלקיקים. סופרים פלאקים בהנחה ש – a קבוע באוכלוסיות פוליו, ומוצאים מספר יחסי של מספר מסוים של פלאקים עבור ml. לכן בבדיקות אלה a*N מספק, ולא מוצאים את N. מספרים יחסיים כאלה לא מודדים בדרך כלל ב – Plaque Assay, אלא בשיטות של E.P.M, כלומר . End Point Method

.End Point Method

משתמשים בזה כאשר לא ניתן לעשות Plaque Assay למשל איידס, או וירוסים שלא גדלים בתרביות רקמה, אלא רק בחיות. לכן אפשר לעבוד עם עכברים. לוקחים סדרות של עכברים ומכנינים סדרה של מיהולים של הוירוס:

ריכוז וירוס מס עכבר	0 ביקורת	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
1	○	●	●	○	○	●	○
2	○	●	○	●	●	○	○
3	○	●	●	○	●	○	○
4	○	●	●	●	○	○	○
.
.
.
n	○	●	●	●	○	○	○

מכל מיהול לוקחים נפח קבוע ומזריקים לעכבר. כעבור שבוע סופרים כמה עכברים מתים, או חולים בסרטן אם בודקים וירוס שגורם לסרטן. ב – C כולם חיים. במיהול הקטן (ריכוז גבוה) כולם מתים במיהול הגדול כולם חיים. בטווחים האמצעיים מקבלים חלק מתים וחלק חיים. גם משתמשים בנוסחת פואסון:

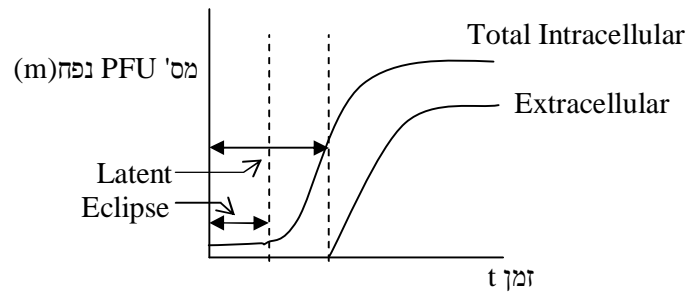
$$P(r) = \frac{e^{-m} * m^r}{r!}$$

Infections Units = r (גודל משתנה).

m = מספר Infections Units. אפשר לחשב אותו מהנוסחה אפשר לחשב כמה I.U. היו בהתחלה פר ml. זה לא שווה בהכרח למספר החלקיקים. אם מקבלים קו ישר של I.U. כנגד המיהול, סימן שמספיק רק I.U. אחד להדבקה.

אפשר להשתמש גם בצלחות Eliza עם תרביות רקמה בכל בארית. שמים בכל בארית מיהול אחר ורואים, האם התאים בתרבית נהרסו. זו גם שיטת End Point (לעומת הבאריות בהן התאים לא נהרסו). מספר I.U. פרופורציונאלי למספר החלקיקים. ישנן גם שיטות אימונולוגיות לספירת חלקיקים, ושיטת PCR אשר משתמשים בה כדי לספור HIV שנמצא בצורת ה – DNA שלו ולא בצורת הויריון. מודדים I.U. שפרופורציונאלי למספר העותקים של DNA הוירוס מתוך כלל DNA של התא המודבק.

.One Step Growth Curve



ניסוי זה בוצע על ידי Delbrück. מדביקים ב- m.o.i גבוה יחסית, בניגוד ל- Plaque Assay כ- 10 חלקיקים פר תא, במבחנה (השתמשו בפאג' T₄). רוצים שתהיה הדבקה סינכרונית של מקסימום תאים, שכל השלבים של ההדבקה יתרחשו באוכלוסיה בו זמנית. תאים של מודבקים בתנאים אלה לא מהווים אוכלוסיה סינכרונית.

לוקחים דגימות מתוך הסספקציה בזמנים שונים. מודדים את מספר החלקיקים כפונקציה של הזמן. הספירה נעשית בכל דרך שהיא, גם בספירת פלאקים. Particle Forming Units = PFU (מספר פלאקים). מקבלים עקומה אפשר לעשות כך אפיון מהיר של וירוסים. העיקרון הזה גם תקף בוירוסים אנימליים. אפשר להפריד בין התאים לבין הסספנציה. הפאג' T₄ הורג את התאים וכך גם נגיף הפוליו. אם בזמנים שונים יש תאים שעדיין לא נהרסו, אפשר להפריד אותם מהסספנציה של הנגיפים. מודדים כמה נגיפים יש במדיום (שהשתחררו) וכמה יש בתוך התאים (על ידי שבירת תאים ו- Plaque Assay).

יש תקופה של כ- 12 שעות (ב- T₄ חצי שעה), הסך הכל (מספר PFU בסספנציה ובתאים) שזה נותן עקומה אחת, ועקומה אחרת לנגיפים שמחוץ לתאים, במדיום. יש lag, כי הוירוסים מתרבים בתאים על ידי סינתזה והרכבה. חלקיקים חדשים נוצרים לפני שהתאים נהרסים, ואז משתחררים למדיום. לכן יש הפרש זמנים בין מזידת נגיפים במדיום לבין הנגיפים שצריכים להשתחרר מהתאים. בתקופת Eclipse אין חלקיקים שלמים בכלל. (ניסוי זה אפשר להגדיר פרמטרים שונים לכל וירוס).

בתקופה הלטנטית אין חלקיקים מחוץ לתאים. ה- lag מראה, שההתקפה היא לא לגמרי סינכרונית, כי אחרת היינו מקבלים קו מאונך. אך היא סינכרונית מספיק כדי להגדיר פרמטרים ולבצע ניסויים ביוכימיים. בעזרת ניסוי זה אפשר לבצע ניסויים שבהם מתברר מה קורה בכל שלב בהדבקה של הוירוס, וללמוד על מחזור התרבות הוירוס, מה שלא ניתן לעשות באוכלוסיות לא סינכרוניות.

בתאים מוציאים בצלחות דגימות בזמנים שונים, ובודקים את מספר החלקיקים בנפח מסוים, לאחר מכן מודדים מספר פרופורציונאלי לו בזמנים שונים של הדבקה. עושים ניסוי בוירוס אנימלי שההדבקה שלו לוקחת שעות. בתחילה יש ירידה כי כאשר מערבבים וירוסים עם תאים אז מפסיקים להיות חלקיקים חופשיים אפקטיביים. כעבור 10 שעות מתחילה עליה במספר.

10 שעות אלו הם ה- Eclipse Period שזו התקופה שבה אין ויריונים בתוך או מחוץ לתאים. יש רק רקע ורק ויריונים שנדבקו לתאים ונשארו שלמים. רק אז יש Output של ויריונים שלמים חדשים. תוך כמה שעות מגיעים לפלטו (בפאג'ים זה לוקח כשעה). הפלטו (רוויה) נותן מספר מסוים של הנגיפים פר תא - Yield. אפשר לספור גם את מספר הנגיפים מחוץ לתאים במדיום שבצלחת. יש Latent Period שבה ההבדל בזמנים נובע מזה שעוד לפני שהנגיפים החדשים משתחררים יש נגיפים שלמים בתוך התאים ולוקח זמן עד שהתא נהרס והם יוצאים. מדד זה נותן את הזמן בין ההדבקה בוירוס להתפרצות המחלה הנגרמת והוא מוגדר גם כתקופת דגירה. זמן זה תלוי ב- Latent Period. אפשר לקבוע את תקופת הדגירה רק בשיטה זו. צורת ההדבקה הסינכרונית עזרה ללמוד, מה קורה בתאים כשהוירוס מתרבה. מתי מתחילה הרפליקציה, RNA מוקדם, RNA מאוחר וכו'. אפשר לקחת דגימות בשלבים שונים של ההדבקה ולעשות אנליזה ביוכימית. יש הבדל בצורת העקומות בין הוירוסים השונים. בפוליו יש Latent Period של כמה שעות, בהרפס כ- 5 שעות, וקציניה - כמה שעות וכו'.

מחזור ההתרבות של וירוסים אנימליים.

בתקופת Latent מתרחשים כל התהליכים, שכתוצאה מהם משתחררים מתא וירוסים חדש. והם:

1. ספיחה Attachment וירוסים נספחים לממבראת התא, לרצפטורים ספציפיים.
2. חדירה של חלקיקים שלמים או של הקפסיד הפנימי בוירוסים מורכבים.
3. הורדת מעטפת uncoating משתחררת חומצת גרעין, פירוק בוירוס עצמו.
4. רפליקציה של חומצת גרעין.
5. טרנסקריפציה של גנים הוירוס מתבנית של חומצת הגרעין.
6. תרגום של החלבונים, סינתזה.
7. הרכבה – Assembly, יצירת הויריונים.
8. שחרור של הוירוס – Release.

אם יש הדבקה של הוירוס במחלות, הוא מגיע בדרכי הנשימה לרקמות הריריות ומדביק תאים מסוימים. המחלה מתרחשת רק אחרי הדבקה ושחרור הוירוסים (עד כ – 10000 פר תא). הסימפטומים מתגלים רק כאשר יש ריכוז גבוה של ויריונים (תא מודבק אחד – אין השלכות רפואיות עדיין).

האירועים שקורים בזמן הדבקה התאים:

1. שלב הספיחה adsorption זה קורה בגוף או בתרבויות רקמה. חלקיקי וירוס צריכים להיספח לתאים. הספיחה לא דורשת אנרגיה, אך היא מאד ספציפית. חלקיקי הוירוס נספחים לרצפטורים. הוירוס הוא פרזיט. וירוסים שונים משתמשים ברצפטורים שונים קיימים. זו ספיחה ספציפית בין החלבונים במעטפת הוירוס – Anti-receptors לרצפטורים שנמצאים על התא, ומשמשים באופן נורמאלי לקשירה למשל של Growth Factors.

יש אותה מידה של ספציפיות למשל, HIV נקשר לרצפטור CD₄ שהוא מולקולה דמוית אימונוגלובולין, הנמצא בתאי T helpers. הוירוס לא מסוגל להדביק תאים שאין להם CD₄. התגלה, שיש גם חלבונים נוספים נחוצים לספיחה כמו Chemokine Receptor - β . פיקורנווירוסים צריכים VCAM₁ (Vascular Cell Adhesion Molecule) בתאים אנדותליים. זה הרצפטור שאחראי לכך שתאים מסוגלים להיספח למדיה מוצקים. זוהי מולקולה דמוית אימונוגלובולין. וירוסים שגורמים לנזלת נספחים ל – VCAM₁ יש רצפטורים בתאים שנמצאים בתאי רירית האף, ולכן נגרמת הנזלת.

נוכחות של רצפטורים ספציפיים קובעת במידה רבה, האם התאים יידבקו וגם אילו תאים יידבקו. פוליו גם שייך למשפחה זו. הוא מדביק תאים במעיים, וגורם למחלה קלה. לרוב בכך נגמרת פעולת הוירוס והמחלה. אך במקרים אחרים הוירוסים משתחררים במעיים מגיעים לחוט השדרה, מדביקים תאי מערכת עצבים מרכזית וגורמים לשיתוק. המחלה תלויה בספיחה לרצפטורים ספציפיים בתאים. נוכחות רצפטורים ספציפיים בתאים מסוימים תקבע את אופי המחלה. הדבר תלוי, היכן הוירוס ידביק. אילו תאים, וזה תלוי בנוכחות הרצפטור הספציפי בתאים. הספיחה היא בדרך כלל רוורסיבילית כלומר הוירוס יכול להשתחרר בחזרה ולא להדור לתא.

2. חדירה – Penetration שלב זה הכרחי להתפתחות המחלה. שלב זה דורש אנרגיה שבדרך כלל היא מ – ATP. החדירה מתחוללת במספר צורות תלוי בסוג הוירוס – מורכב או פשוט. הוירוסים משתמשים באלמנטים של התא לחדירה, המסלולים הקיימים בתאים.

בשלב הספיחה צריכה להיות הכרה בין רצפטורים לחלבונים בקפסיד. בפיקורנווירוסים יש קפסיד אחד עם מבנה היקוסהידרלי (וירוסים פשוטים) למשל, Rhinovirus שהוא אחד הוירוסים שגורם לנזלת (סירוטיפיים – וירוסים שונים, הגורמים לאותה מחלה. מכירים אותם בעזרת נוגדנים. לכולם יש אותו מבנה). יש 3 חלבונים, שונים שיוצרים את מבנה המשולש בקפסיד. באמצע יש Canyon שהוא חריץ עמוק. הספיחה לרצפטור מתרחשת בו.

הרצפטור לרינווירוס הוא ICAM₁. הספיחה נעשית באמצעות ההכרה ל – Canyon שנמצא בכל אחד מההקסומרים של הוירוס החריץ לא מאפשר לנוגדים להגיע אליו, ורק הם לא יכולים למנוע את ספיחת הוירוס. לוירוס זה אין חלבונים מיוחדים, שמהווים את מנגנון הספיחה, רק מבנה היקוסהידרלי שחוזר על עצמו.

וירוס השפעת הוא וירוס מורכב, עם מעטפת חיצונית שמקורה ממבראנת התא. החלבונים במעטפת זו הם חלבוני הוירוס, שמקודדים בו. 2 חלבונים מיוחדים בוירוס הם המגלוטינין וניוראמידאז שנמצאים ב – Envelope. הוירוס נספח באמצעות אותם חלבונים ספציפיים, שכולטים מהמעטפת (בניגוד לרינווירוס). המגלוטינין הוא טרימר, ולניוראמידאז יש 4 תת יחידות זהות. המגלוטינין הוא האנטי-רצפטור העיקרי, שמכיר באופן ספציפי את הרצפטור. חלבון זה הוא גליקופרוטאין, כמו גם הרצפטור עצמו (חלבון שמכיל קבוצת סוכריות).

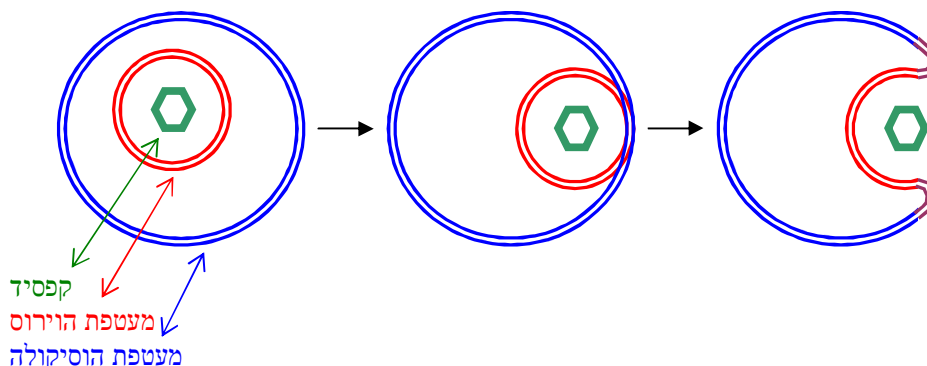
הרצפטור של השפעת הם לא החלבונים עצמם, אלו חומצה סיאלית Sialic Acid שהיא סוכר. החומצה הסיאלית היא אחד המרכיבים העיקריים של שרשראות הסוכרים של גליקופרוטאינים בממבראנת התא. הוירוס מזהה את החומצה הסיאלית על גבי החלבונים השונים על פני התא. החומצה הסיאלית נמצאת בהרבה חלבונים ממבראנליים שונים, לכן הוירוס לא נקשר לחלבון מסוים. אלא להרבה סוגי חלבונים, לכן הוא נספח לסוגים שונים של התאים. ניוראמידאז הוא אנזים שמפרק את החומצה הסיאלית, ויכול לשחרר את הוירוס הנספח בצורה אקטיבית. (לחלבוני הקשירה בוירוס קוראים גם Spikes כי הם בולטים). רק לוירוס האינפלואנזה יש פחות ספציפיות בספיחה לתאים.

ההמגלוטינין גורם ל – Fusion בין ממבראנות, כך גם ל – Fusion בין התאים. ספציפיות הספיחה קובעת את ספקטרום ההדבקה למשל, HIV מדביק רק תאי T helper וזה מחסל את המערכת החיסונית התאית שאחראית לחיסון נגד חיידקים ווירוסים. על שלב החדירה ידוע פחות. הוירוסים משתמשים במנגנונים התאים של טרנספורט של חלבונים. יש כמה צורות ידועות של חדירה:

1. הקומפלקס של רצפטור + וירוס חודר לתא. אז הוירוס חודר בשלמותו לתאים זו לא צורה נפוצה.

2. אנדוציטוזה. בממבראנת התא יש אזורי Coated Pits, שאחראים על החדרת החלבונים בתא ב – Coated Vesicles לתוכן נכנסים הרבה וירוסים פשוטים. הוירוסים יכולים גם להיכנס וגם לצאת בשלמותם באקסוציטוזה. בניגוד ל – T₄ בחיידקים, שמחדיר DNA, הוירוסים חודרים שלמים בתא. צורה זו היא יותר נפוצה הרבה וירוסים שונים חודרים בצורה זו. יצירת הוסיקולות דורשת בדרך כלל אנרגיה ATP.

3. איחוי ממבראנות – Membrane Fusion. חדירה של וירוסים מורכבים, כמו שפעת או HIV יש ספיחה לרצפטור ואנדוציטוזה לוסיקולה (בשפעת) שמכילה ממבראנה. חלקיקי הוירוס השלמים נמצאים בוסיקולה עם ממבראנה משלה. הם משתחררים ממנה באמצעות Membrane Fusion בדומה לחלבונים שיוצאים בדרך זו. החלבונים בוירוס יכולים לגרום ל – Fusion של ממבראנת הוירוס לממבראנת הוסיקולה, וכך הוירוס משתחרר לציטופלזמה. מה שיוצא זה הקפסיד הפנימי שבתוך ה – Envelope.



ה-Fusion יכול לקרות או בממבראנה החיצונית, אז מוכנס ה-Core והקפסיד הפנימי, או שהוירוס כולו חודר בוסיקולה, וה-Fusion קורה עם ממבראנת הוסיקולה. בכל מקרה הקפסיד יחד עם ה-Core מגיע לציטופלזמה של התא. למשל, וירוס פשוט כמו פוליו, נקשר לרצפטורים נכנס ל-Coated Pits, ומשם ה-RNA שלו משתחרר לציטופלזמה. בוירוסים מורכבים יש ממבראנה חיצונית שהיא מעטפת וחלבונים בה מזהים את הרצפטור. בדרך כלל יש Fusion בין הממבראנות (מזורז בעזרת חלבון ויראלי, כמו בשפעת).

נדלג על שלבים 3 עד 6 בהדבקת התאים שהם שלבי הרפליקציה והתרגום ונעבור לשלבים 7 עד 8 שהם שלבי הסיום של הרכבה, יצירת הויריונים ושחרור של הוירוס.

סיום תהליך יצירת הוירוסים Maturation.

לאחר שנוצרים כל מרכיבי הוירוס, צריכים להיווצר חלקיקים שלמים ולהשתחרר מהתאים. דוגמא: נגיף מורכב, כמו שפעת בתהליך Maturation הוא צריך להשתחרר. הוא יכול להרוס את התא. יש ביטוי של גנים, שמקודדים על ידי הוירוס, ונוצרים חלבונים. חלקם מהווים את הקפסיד הפנימי, וחלקם יגיעו ל-Envelope.

יש חלבונים Matrix Proteins שנקשרים לאזורים ספציפיים בממבראנת התא. כשהם נקשרים הקפסיד שהוירוס שנוצר באותו זמן, מזהה את אותם האזורים בממבראנה. אז יש תהליך הפוך ל-Fusion. כמו כן, יש גם המגלוטינין ונויראמידאז (בשפעת), שמחליפים חלבונים בממבראנה. כל החלבונים הללו מקודדים על ידי הוירוס. החלבונים הנוספים בדרך כלל נכנסים לממבראנה אחרי חלבוני מטריקס (לעתים אין חלבוני מטריקס וחלבוני הוירוס פשוט מחליפים חלבונים קיימים בממבראנה). כך נוצרים וירוסים מורכבים, כאשר המעטפת שלהם מקורה בממבראנת התא אך יש בה חלבונים ויראליים שהחליפו חלבונים אחרים בממבראנה. חומצת הגרעין מתחברת לחלבונים הפנימיים שבונים את הקפסיד. ה-Core של הגרעין + הקפסיד נכנסים לתוך המעטפת הנוצרת, וכך נוצר וירוס שלם.

יש וירוסים ממשפחת HIV וגורמים לסרטן, שמשתחררים בצורה זו מבלי להרוס את התא. הממבראנה מתאחה, והתא ממשיך לייצר וירוסים. בניגוד לכך וירוס הפוליו משתחרר לאחר הריסת התאים.

קלסיפיקציה של הוירוסים.

הקלסיפיקציה המודרנית נעשית על פי חומצות הגרעין ועל פי צורת ההתרכבות שלהם. יש וירוסים שמכילים Double Strand DNA (dsDNA Viruses). אלה משפחות שונות של וירוסים. יש וירוסים שמכילים Single Strand DNA (ssDNA Viruses), וכן פאג'ים כאלה. יש ss+RNA Viruses, יש ss-RNA Viruses וגם dsRNA Viruses. למעשה, חומצת הגרעין קובעת איך יתרבה הוירוס. בוירוסים אנימליים יש וריאציה גדולה של צורות התרכבות, בהתאם לחומצות הגרעין.

וירוסים מסוג ss+RNA כוללים את המשפחות Picornaviruses, Poliovirus, Rhinoviruses, Foot & Mouth Disease ועוד. אלה וירוסים פשוטים עם מבנה היקוסהידרלי. RNA הוא RNA שיש לו אותה אוריינטציה כמו ל-mRNA. DNA עובר שעתוק ל-RNA. הסיב המקודד ל-RNA (קומפלמנטרי לו) הוא -, הסיב שיש לו אותו רצף כמו ל-RNA הוא +. Antisense RNA הוא -. ל-mRNA יש אותו סדר כמו ל-DNA+. לוירוסים שהחומר הגנטי שלהם הוא ssRNA יכולה להיות אוריינטציה שונה. +RNA יכול לשמש כ-mRNA אך הוא לא בהכרח יעשה זאת.

בפוליו ה-RNA + משמש בעצמו כ-mRNA בהדבקה, ומתורגם וישר לחלבון אחד ארוך. כך גם בוירוסים אחרים שהוזכרו בקבוצה הוא לא צריך להגיע לגרעין. RNA נקרא +Sense RNA. בוירוסים אלה השלב הבא אחרי החדירה הוא כניסת ה-RNA והחיבור שלו לריבוזומים בציטופלזמה. אז יש תרגום בתאים האאוקריוטים. לאחר ההדבקה אחרי פוליו מופיעים פוליוזומים ארוכים, כי החלבון המקודד מה-RNA שלו ארוך מחלבונים רגילים בתא. יש תרגום של חלבון ארוך אחד Poly-Protein. הוא נחתך בסדרה של תהליכים ספציפיים על ידי פפטידאזות. כך שלכול חיתוך יש תפקיד. פוליו צריך באופן

ספציפי חלבונים מבניים של הקפסיד, אך גם חלבון שנחוץ לרפליקציה, וחלבונים אלו הם גם תוצרי החיתוך של הפולי-פרוטאין. זהו RNA Replicase.

כדי שיווצרו הרבה חלקיקי פוליו, צריך הרבה חתיכות +RNA חד סיבי. איך נוצר +RNA מעוד +RNA? התשובה לכך היא שיש גם -RNA בתאי פוליו. האנזים RNA Replicase, המקודד על ידי הנגיף, מסנתז קודם -RNA – מה +RNA – הקיימים, הקומפלמנטרי (5' β 3') יש אזור קצר שתמיד שקשור ל – Template.

בוירוסים מסוג ss-RNA ה – -RNA – שלהם צריך להיות מתועתק כדי לשמש mRNA.

אסטרטגית הריבוי של הוירוסים.

בריבוי הוירוסים משתמשים במערכת המטבולית של התא. השימוש נעשה בחומצת הגרעין על הוירוס כאינפורמציה לריבוי, אך המנגנונים המטבוליים הם של התא. וירוסים שונים מקודדים לרפליקאז, אך לא למנגנונים אחרים (ריבוזומים למשל), אבל יש וירוסים שמקודדים לדי הרבה אנזימים שדרושים לריבוי שלהם. ולכן משתמשים פחות במערכת התא.

לדוגמא, וירוס הפוליו והוירוסים האחרים בקבוצת הפיקורנה וירוסים. הוא +RNA, הוא בעצמו משמש כ – mRNA כשהוא חודר לתאים. ה – mRNA מתורגם בציטופלזמה באמצעות מספר התא לפולי-פרוטאין, שמבוקע על ידי פרוטאזות לחלבונים קטנים יותר בצורה מבוקרת. יש גם Alternative Cleavage אך אין כאן תהליכי Splicing. וירוס זה (וכול הקבוצה) לא חודר לגרעין, וכל תהליכי הריבוי שלו מתרחשים אך ורק בציטופלזמה. לכן הוא לא צריך מנגנונים שמתרחשים בגרעין (כמו Splicing). הפרוטאזות הראשונות שמבצעות את הביקוע הן תאיות. בויריון עצמו אין פרוטאזות. אחד מהחלבונים שנוצרים כתוצאה מהביקוע הוא האנזים Replicase. חלבוני הוירוס צריכים להתבטא וכן חומצת הגרעין שלו צריכה להתרבות כדי ליצור הרבה ויריונים חדשים.

ההתרבות הזו מתרחשת בציטופלזמה. בתאים אין אנזים שמשכפל RNA חד סיבי. צריכים להיות מסונתזים הרבה +RNA. הרפליקאז מתעתק את הסיב המשלים לסיב הויראלי כלומר -RNA. הדבר נעשה באופן סימולטאני על ידי כמה רפליקאזות. מתחיל שעתוק של הסיב הקומפלמנטרי בתהליך דומה, שבו מסונתז RNA מ – DNA. ה – RNA משמש כ – Template. יש סינתזה של RNA 3' β 5' (כמו ב – Leading Strand של Replication Fork). ברפליקציה של DNA כשמתועתק RNA נוצר Transcription Bubble של כ- 9 נוקליאוטידים, והוא זז בסיב.

בסינתזה משתתפים כמה רפליקאזות בו זמנית ולכן התעתוק של RNA מ – RNA הוא יעיל. השלב הבא מה – -RNA יסונתז שוב +RNA בכיוון 3' β 5'. מסונתזים הרבה -RNA ומהם הרבה +RNA, על ידי אותו האנזים במקרה זה, כנראה. חלק מהחלבונים של הפוליו הם חלבונים מבניים – VP₂, VP₁ ו – VP₃ שיוצרים את הקפסיד היקוסהידרלי של הוירוס הפשוט הזה. יש לפחות חלבון אחד מקודד שהוא לא סטרוקטוראלי והוא הרפליקאז.

וירוסים מסוג +Sense RNA.

+Sense RNA וירוסים דומים לפוליו יש בהם גם וירוסים, שבהם ה – RNA שלהם לא משמש כ – mRNA. יש וירוסים – Hepatovirus, כמו הפטיטיס A, שהוא הצהבת. זהו וירוס לא מסוכן כי הוא וירוס של RNA והוא לא נשאר בתאים, וכשהוא יוצא, נשארים מחוסנים. הוא תוקף תאי כבד. הוא וירוס פשוט היקוסהידרלי. הוא גם שייך למשפחת פיקורנה וירוסים.

וירוסים מסוג +ssRNA.

+ ssRNA וירוסים הם בעלי גנום בויריונים של מולקולה אחת של +RNA. צורת ההתרבות שלהם יותר מסובכת. + זה אומר Positive Sense. דוגמא לכך הוא טוגה וירוסים.

הוירוס ממשפחה זו הוא אדמת – Rubella. ה-RNA שלו לא מתורגם כולו אלא רק בחלקו, כשהוא חודר לתא מתורגם חלק' 5' שלו. נוצר פולי-פרוטאין, שכולל רק חלק מהאינפורמציה של הוירוס. הוא מבוקע על ידי פרוטאזות, ונוצרים חלבונים קטנים יותר. הם לא חלבונים מבניים. אחד מהם הוא הרפליקאז. הוא משמש לסינתזה של ה-RNA. הוא משמש לסינתזה של +RNA שמכיל גם את האינפורמציה שעדיין לא תורגמה מה-3'. מחלק זה מתורגמים חלבונים מוקדמים, ואחר כך חלבונים מאוחרים. מנגנון זה אופייני למרבית הוירוסים.

מסונתז רק חלק מה-RNA ל-mRNA המוקדם, כי יש בו Stop codons באמצע, או מבנים שניוניים שלא מאפשרים תרגום הלאה. הסינתזה של +RNA שכולל את האינפורמציה של החלק שלא תורגם תלויה בסינתזה של -RNA שכולל את כל האינפורמציה של ה-RNA של הוירוס.

טוגה וירוסים הם מורכבים, ויש להם גם מעטפת חיצונית. הקטלוג לפי צורת הריבוי לא משקף את מבנה הוירוס או את הפונדקאים שלו. את המשפחות מאגדים לפי מאפיינים אחרים (לפי מבנה) אך הם גורמים למחלות שונות. דוגמא נוספת ל-RNA + היא וירוס האבולה.

וירוסים מסוג ssRNA-.

זו קבוצה גדולה שיש בה תת קבוצות לדוגמא האינפלואנזה (שפעת), שיש בו כמה מולקולות RNA. לווירוסים אחרים בקבוצה זו יש מולקולה בודדת של -RNA בגנום והיא לא יכולה לשמש כ-mRNA. היא משמשת כ-Template ליצירת +RNA. השלב הראשון בריבוי הוירוס לאחר חדירה חומצת הגרעין לתא חייב להיות סינתזה של +RNA שישמש כ-mRNA. התאים לא מכילים אנזימים שיכולים לעשות את התעתוק הזה. הוויריונים עצמם מכילים גם אנזימים בניהם טרנסקריפטאז, שמתעתק DNA מ-RNA. האנזים הזה מסונתז במחזור ההדבקה הקודם ונארז בקפסיד הוירוס. כך הוא נמצא בוויריונים. Input RNA הוא תעתוק ראשוני שממנו מסונתז +RNA. הוא יכול לשמש כ-mRNA וגם כ-Template לסינתזה של עותקים רבים של -RNA ששכנסים לווירוסים החדשים שנוצרים. הוא נארז בוויריונים יחד עם הטרנסקריפטאז, שמסונתז מחדש מה-mRNA הויראלי. יש פחות mRNA בתאים. מהכיון של 5' יש אזור המקודד לחלבונים לא מבניים, בניהם הטרנסקריפטאז. מהכיון של ה-3' מקודדים חלבונים מבניים. יש הרבה מאד mRNA שלהם, כי הם יוצרים הרבה חלבונים של וירוס. ברמה זו יש בקרה (הגנום הוא "-") לכן הקצוות הם הפוכים). זה אופייני כמעט לכל הווירוסים חוץ מפיקורנה וירוסים.

דוגמאות ל-Sense RNA- וירוסים: Paramyxoviridae שהוא משפחה של וירוסים שכוללת וירוס של חצבת – Measles. וירוסים מוחלשים על ידי מוטנטים יכולים להתרבות בתאים מבלי לגרום למחלה, אבל הוא גורם לחיסון. הוא גורם ליצירת נוגדנים ולריבוי תאי T אחרים. כך יש מניעה של הדבקה נוספת של הוירוס האלים אחר כך. משתמשים בהם לחיסון כנגד מחלות ויראליות. נותנים כמויות קטנות מהם וחיסונים אלה מוצלחים. יש מקרים מאד נדירים שנוצרים רברטנטים (לוירוסים אלימים). לפאראמוקסיווירידה יש מולקולה אחת של -RNA והם וירוסים מורכבים. יש בהם גם וירוס חזרת Mumps. מחלה זו יכולה לגרום לעקרות, כי היא פוגעת בתאי המין הגבריים בילדים לעתים.

משפחה אחרת היא Orthomyxoviridae שזו קבוצת וירוס השפעת. יש זנים שונים של אינפלואנזה, ולכן החיסון הוא בעייתי. לוורוס זה יש כ-9 עד 10 מולקולות שונות של -RNA בכל ויריון, שמכילות אינפורמציה לחלבון אחד כל גן בשפעת מקודד על ידי מולקולה אחת של -RNA. ההליך הריבוי של הוירוס כולל טרנסקריפטאז, שנמצא בוויריון בקפסיד הפנימי. הוא קשור ל-RNA והתעתוק מתחיל מיד לאחר חדירת הוירוס לתא על ידי יצירת mRNA. המעטפת של הוירוס מכילה חלבונים שמקודדים על ידי הוירוס (המגלוטינין ונויראמידאז).

בזמן שנוצר הקפסיד צריך להיות מנגנון שיבטיח, שכל קפסיד יקבל את ההרכב הנכון של מולקולות ה-RNA אחת מכל סוג. במספר מוגבל ובכמות מתאימה, כדי שהוירוס יהיה אפקטיבי. מנגנון אחר צריך להבדיל גם בין +RNA ו-RNA- כדי להכניסם לקפסיד מנגנונים אלה לא ידועים.

הסוגים העיקריים של השפעת: A, B – 1 – C בדרך כלל עושים חיסון נגד כמה וריאנטים. אבל יש עוד וריאנטים והשתנות מהירה של הוירוסים. האנטיגנים משתנים מהר, בעיקר המגלוטינין ונויראמידאז. שדרושים גם לספיחה הם משתנים כתוצאה ממוטציות נקודתיות. וכתוצאה מ – Assortment (הפרדה בלתי תלויה). כאשר יש מוטנטים בשפעת, בגלל שיש כמה מולקולות עם ריקומבינציה, אך זה מקרה נדיר כאשר 2 וירוסים מדביקים את אותו התא. יש שכפול של מולקולות RNA. אם יש 10 מולקולות כאלה שונות, בכל חלקיק יכולה להיות קומבינציה שונה של המולקולות מבחינת האללים. אם יש רק מולקולה RNA אחת רק ריקומבינציה יכולה להביא לקומבינציה שונה. לכן באינפלואנזה יש הרבה יותר שינויים גנטיים מאשר בוירוסים עם מולקולת RNA אחת. בניגוד לכך השינויים בוירוס האיידס נובעים מחוסר Proof Reading של ה – (Rivers Transcriptase). השינויים הללו מביאים לבעיות בחיסון נגד אותם הוירוסים. עוד דוגמא ל – senseRNA – היא וירוס Rhabdovirus שהוא וירוס הכלבת. יש לו צורה של כדור והוא וירוס מורכב.

וירוסים מסוג dsRNA.

יש להם גם +RNA וגם –RNA – יש להם פיגמנטציה של ה – RNA, כמו בשפעת. הקבוצה המפורסמת ביותר מסוג זה היא Reoviruses. יש כמה מולקולות של dsRNA יש סינתזה של mRNA וחלבונים מוקדמים, ו – mRNA וחלבונים מאוחרים. אחד הסיבים משמש כ – Template וממנו מסונתז mRNA בכמה שלבים. אין אנזים בתא שמסוגל לעשות זאת ולכן בויריונים יש את האנזים טרנסקריפטאז. וירוסים אלה מדביקים אדם, וגורמם למחלות קלות בדרכי הנשימה.

וירוסים מסוג dsDNA.

dsDNA וירוסים למשל משפחת Herpes Viruses זו תת קבוצה שמכילה גם וירוס הרפס וגם וירוסים אחרים בעלי חשיבות גדולה ברפואה. יש להם גנום ליניארי בניגוד לוירוסים אחרים שלהם יש גנום מעגלי. הם וירוסים גדולים (גדול כמו T₄, יותר גדול מפאג' λ).

הוירוס Herpes simplex גורם למחלת ההרפס. יש 2 סוגים A – 1 – B. זו מחלת מין ידועה (A) וגם מחלת שפתיים ועיניים זהו וירוס מורכב. יש לו קפסיד פנימי היקוסהידרלי ומעטפת חיצונית שמקורה בממבראת הגרעין (לא התא). כשהוא נוצר בתאים ה – Assembly שלו מתרחש בגרעין והוא מתעטף בממבראנה שלו. הוא הורס את התאים כשהוא יוצא. הוא מקודד ל – DNA פולימראז משלו, וכן לאנזימים נוספים.

מנגנון בקרת התעוק של RNA מגנום ההרפס הוא כך שבויריונים יש פקטור חלבוני, שהוא פקטור תעוק ספציפי לפרומוטורים של ההרפס – α -genes. הוא נקרא α -TIF. חלק גדול מהוירוסים שמכילים DNA מגיעים לגרעין, כי הם משתמשים בתהליכי הגרעין (כמו Splicing). ה – α -genes מגנום הוירוס מגיע לגרעין ומזורז על ידי α -TIF, יחד עם פקטורי תעוק אחרים. גם כאן יש Enhancers. הם מקודדים לגנים Early–Early, בתקופה המוקדמת של ההדבקה. בניהם יש DNA פולימראז ויראלי, שנחוץ לשכפול. אחד או יותר מהם גם משמשים כפקטורי תעוק ל – β -genes-Intermediates. חלק מהם הם פקטורי תעוק שגורם לתעוק של γ -genes. מחלק מהם מסונתזים חלבונים, שמהווים רפרסורים ל – α -genes. חלק מ – α -genes הם רפרסורים של α -genes כלומר יש מצב של אוטורגולציה. יש קומבינציה רחבה של פקטורי התעוק בזמן ריבוי הוירוס. אוטורגולציה של α -genes דרושה כאשר מסונתזת כמות גדולה מהם. ה – γ -genes הם חלבונים מבניים בעיקר וכשהם מסונתזים כבר לא צריך α -genes, לכן מדכאים γ -genes מדכאים α -genes.

הוירוס משתמש בחלק ממערכת ה – Splicing של התא ליצירת mRNA שלו. ה – α -TIF נמצא כבר בויריונים כי הוא דרוש לתעוק ראשוני. הרפליקציה היא של DNA ליניארי. לוירוס יש DNA פולימראז ייחודי, והוא מהווה מטרה לתרופות נגד וירוס ההרפס. תרופות אלה הן מעכבים ספציפיים שלו. ה – DNA פולימראז ויראלי דרוש לרפליקציה כי חלבוני התא לא מסוגלים לבצע רפליקציה של DNA

ליניארי. הוא מסונתז בשלבים מוקדמים של ההדבקה. DNA הוירוס מקודד לכמה אנזימים כמו פרימאז, ssBP אולי הליקאז, אך לא למרכיבי ריבוזומים וכו'.

במשפחת וירוסי ההרפס יש גם וריסלה (אבעבועות רוח), Cytomegalovirus שהוא וירוס גדול בעל חשיבות גדולה ברפואה. הוא יכול להדביק גם תאי עצבים, וגורם בעיות בשלב העוברי המוקדם. בניגוד לאדמת, שגם פוגעת בעובר, אין לו סימפטומים ברורים. יש השערה שהוא גורם לא רק פיגור שכלי, אלא גם לפיגורים קלים יותר. אפשר לזהות הדבקה על ידי בדיקת דם אימונולוגית או ניתן לראות אם יש נוגדנים נגד הוירוס, וכן על ידי PCR.

בשלב הראשון מסונתזים נוגדני IgM, ואחר כך IgG. נוגדני ה-IgM הם גדולים ומזהים אותם באלקטרופורזה. בעזרתם מזהים שהייתה הדבקה בזמן ההיריון. זהו הזמן המסוכן ביותר להדבקה. נוגדני ה-IgG מראים על הדבקה מוקדמת. לא מחסנים בהרפס שלם מוחלש, כי הוא יכול להישאר בגוף בצורה לטנטית. ולפרוץ מפעם לפעם בניגוד לפוליו. יש חיסון נגד הפטיטיס B, שנעשה באמצעות הנדסה גנטית. המערכת החיסונית מגנה על הגוף מפני וירוסים. לעתים מדכאים אותם בכוונה. בתרופות נגד איידס, סרטן ובהשתלות יש סיכוי למות ממחלות ויראליות מסוכנות, כמו Cytomegalovirus.

וירוסים אנימליים שונים בחומר הגנטי שלהם מהתאים, כי בתאים RNA משמש להעברת מידע לחלבונים ולא כחומר גנטי, ואילו בוירוסים מסוימים הוא משמש כגנום. ה-dsDNA וירוסים דומים יותר לתאים, כי החומר הגנטי שלהם הוא DNA. חד מהם, וירוס הרפס מתרבה בגרעין, שם מתרחשים רוב שלבי ההתרבות שלהם. השלב שלא מתרחש בגרעין הוא סינתזה של חלבונים, כי הריבוזומים נמצאים בציטופלזמה. DNA של וירוסים כאלה מגיע לגרעין לאחר ההדבקה, עובר שם טרנסקריפציה, תעתוק ל-RNA, ואז Splicing באמצעות אנזימי התאים ונוצר mRNA שעובר טרנספורט דרך ממברנת הגרעין לציטופלזמה ומתורגם שם. חלבוני הוירוס צריכים לחזור לגרעין, כי ה-Assembly של הוירוס מתרחש בגרעין.

במקרה של RNA וירוסים אז אין להם פאזה גרעינית (לא מגיעים לגרעין). כמו כן, יש קבוצת dsDNA שלא מגיעים לגרעין כמו Pox Viruses (וירוסים של אבעבועות) והם מתרבים בציטופלזמה בלבד. הם גדולים מאד, ויש להם כמה מעטפות. יש להם הרבה מאד גנים יחסית לוירוס כלומר, כושר קידוד גדול, וחלק מהם דרושים לתהליכי התרבות בציטופלזמה. וירוס וקציניה מקודד לפולימראז שלו, שדרוש לרפליקציה של ה-DNA הויראלי בציטופלזמה. אך רוב ה-DNA וירוסים עוברים פאזה גרעינית ויש להם שימוש באנזימים של התא שנמצאים בגרעין. ב-DNA וירוסים יש 2 קבוצות Pox והשאר שמתרבים בגרעין.

יש מידת שוני גדולה בוירוסים אלה, והיא תלויה במספר הגנים שיש בהם. וירוסים שיש להם מעט גנים משתמשים יותר באנזימים תאיים. וירוסים שיש להם יותר גנים מקודדים ליותר חלבונים הדרושים לתהליכי התרבות ושכפול שלהם, ולכן משתמשים פחות בחלבוני התא.

קבוצת ה-PaPoCVa Viruses היא קבוצת וירוסים המכילים Coiled dsDNA, מעגלי, בויריון, כמו בוירוס של פוליומה או SV40. בויריונים מולקולת DNA המעגלית קשורה להיסטונים תאיים ומארגנת בנוקלאוזומים. אלה וירוסים פשוטים עם קפסיד היקסידרלי. הוירוס לא מכיל גנים להיסטונים, ומקורם בתא. וירוסים אלה חודרים דרך ממברנת התא, המיני כרומוזום מגיע לגרעין ושם מתועתק על ידי RNA פולימראז תאי. יש לו 4-5 גנים. ה-RNA עובר Splicing ומתקבל mRNA שעובר לציטופלזמה. שם יש תרגום של חלבונים שחוזרים לגרעין ויש שם תהליכי הרכבה לוירוסים, אלא יש מספר מינימאלי של גנים, ולכן הם משתמשים לרוב באנזימים תאיים.

יש להם חלבון אחד - Large T Antigen שמשמש להכרת אתר ori ויראלי. וגם משמש כהליקאז. החלבון T Antigen גורם לטרנספורמציה של תאים סרטניים ברקמה. יש וירוסים בקבוצה זו שחשודים שיכולים לגרום לסרטן בבני אדם. אל הם Papilloma Viruses, שיש להם מולקולת DNA מעגלית יותר גדולה כ-7000bp. יש להם חשיבות רפואית הם גורמים למחלת מין, זנים מסוימים של וירוס זה כנראה הם פקטורים שגורמים לסרטן צוואר הרחם Cervical Carcinoma אך הם לא הגורם היחיד

לסרטן זה סרטן נגרם על ידי מספר גורמים וזהו תהליך רב שלבי. יש קשר סיבתי בין הדבקה על ידי סוג מסוים של הוירוס לסרטן צוואר הרחם וירוסים אלה יכולים לעבור במגע מיני. יש 2 וירוסים בפילומה האחד הוא HPV16 והשני הוא HPV18 שיכולים לגרום לסרטן זה.

וירוסים מסוג ssDNA.

וירוסים אלה מכילים DNA חד סיבתי כחומר גנטי. הוירוסים הידועים בקבוצה זו הם Parvoviridae הם קטנים, יש להם DNA של כ- 4000bp עד 5000bp. בקבוצה זו יש 2 סוגים עיקריים: Autonomous ו- Non Autonomous. הראשונים חודרים לתאים ואינם תלויים בהדבקה בוירוס נוסף, בניגוד לאחרים, שתלויים בכך שאותו התא שהם חודרים אליו יודבק על ידי אדנו-וירוס או הרפס. לבד הם לא יכולים להשלים את מחזור ההדבקה. המפורסם בניהם הוא AV שהוא Adeno-Associated Virus שזוקק לאדנו-וירוס כדי לסיים את מחזור ההדבקה. חלק מהוירוסים שלו מכילים ssDNA+ וחלק ssDNA-. השכפול שלו תלוי במנגנון הרפליקציה התאי והוא מקודד לכמה חלבונים. הוא משמש גם כווקטור לריפוי גנטי Gene Therapy. העיקרון להחדיר גן נורמאלי לתאים שיש בהם גן פגום. הדרך להחדיר DNA לתאים ולגנום היא בעזרת וירוסים או ההדבקה היא יעילה. לוירוסים אלה יש DNA חד סיבתי ליניארי גם וירוסים Autonomous יכולים לשמש כווקטורים.

וירוסים מסוג DNA השייכים לקבוצת Hepadnavirus.

זוהי קבוצה נפרדת וירוסים אלה מכילים DNA מעגלי, שלא מושלם כלומר, סיב אחד שלם וסיב משלים חלקי. זו קבוצה חשובה אליה שייך הפטיטיס B זהו וירוס קטן בעל DNA של 3.5kb שמכל מספר קטן של גנים. לא ניתן לגדל אותו בתרביות רקמה ולחקור בצורה יסודית. זה הוירוס שגורם למחלה קשה, שגורמת להרס הכבד. וירוסים אלה מדביקים את תאי הכבד. הוא נפוץ בעיקר בדרום מזרח אסיה. בארצות עם היגיינה ירודה הוא מועבר על ידי קבלת דם נגוע ובהריון לעובר. זה נפוץ בסין שם משתמשים במחטים לרפואה טבעית (והם לא סטריליים). לרוב מחלימים מהמחלה, כי הכבד עובר רגנרציה מנזקים. יש מספר קטן של מקרים, שבהם המחלה אלימה, ונגרם מוות.

בערך כ- 10% מהחולים עוברים הדבקה לטנטית Latent Infection. הוירוס נשאר בגוף בצורה כלשהי (כנראה בצורת חלקיקים בריכוז נמוך) והאדם ממשיך לשאת את גורם המחלה. היא יכולה להתפרץ לעתים. הפטיטיס B היא אחד הדוגמאות גם לוירוסים הגורמים לסרטן. תדירות מקרי סרטן הכבד באותם ארצות מאד גבוהה (שם גם נפוץ הוירוס). הסיכוי שלחולי סרטן אלה היה גם הפטיטיס B גבוה מאד. לאדם שחלה בהפטיטיס B יש סיכוי גבוה פי 100 לחלות בסרטן הכבד. מאשר לאדם שלא היה חולה. בכל זאת מספר חולי הפטיטיס B גדול בהרבה ממספר חולי הסרטן באוכלוסייה. כלומר, הוירוסים שגורמים לסרטן בבני אדם גורמים לו באחוז קטן מכלל בני האדם שמדביקים מהם. אפשר לחסן נגד וירוס זה ובכך להקטין את תדירות מקרי סרטן הכבד, ואכן כך נעשה. תרכיב חיסון זה נעשה בשיטות של הנדסה גנטית. הכניסו DNA שמקודד לחלבון ממעטפת הוירוס לתאי שמרים, והזריקו לתינוקות, שפיתחו נגדו נוגדנים.

יש סוגים אחרים להפטיטיס כמו A, ששיך לפיקורנה וירוסים, ולא גורם לסרטן, ו- C ששיך גם הוא למשפחה אחרת שהם וירוסים ממשפחות אחרות.

מנגנון ההתרבות של Hepadnavirus הוא כזה שה DNA שלהם בשלב ראשון של הדבקה עובר תיקון והשלמה ונוצר DNA מעגלי שלם שהוא Super Coiled (בתהליך משתתף ליגאז). ממנו יש תעתוק והוא מקודד גם ל- Reverse Transcriptase. בתהליך הריבוי יש שלב של תעתוק לאחור. ה- DNA מתועקל ל- RNA והוא מתועקל שוב ל- DNA. לא ידוע מדוע.

בויריון יש אנזימים שאחראים לתיקון ה- DNA. אחר כך יש שלב של mRNA ו- Splicing, תרגום לחלבונים, שמשמשים לפונקציות שונות. ה- DNA מתועקל ל- RNA שלם, שממנו מסונתז DNA על ידי RT. הדבר נעשה בגרעין (חוץ מסינתזת החלבונים). ה- DNA הלא שלם נארז בויריונים עם כמה אנזימים.

רטרווירוסים Retroviruses.

בוירוסים אלה יש תעתוק לאחור. וירוסים אלה גם גורמים לסרטן, כמו לוקמיה וסרקומה. וירוס האיידס שייך לקבוצה זו. מצאו וירוסים כאלה בעופות, עכברים, קופים וכן וירוס אחד שגורם לסוג מסוים של לוקמיה באדם והוא ניקרא HIV. כל הרטרווירוסים מכילים +RNA אך ממוינים כקבוצה נפרדת, כי יש להם שלבים ייחודיים, כמו תעתוק לאחור ויצירת DNA. הויריונים הם מורכבים ומכילים קפסיד ומעטפת שמקורה בממברנת התא. הם מכילים 2 מולקולות זהות של אותו RNA. (כמו 2 כרומוזומים הומולוגיים). ה-RNA הוא 35S (קבוע הסגמנטציה 35). מולקולות ה-RNA הללו אחוזות בניהן בקצה 5' באמצעות מבנים לא שגרתיים של DNA (ולא בקשרי ווטסון – קריק), אלא באמצעות קשרי מימן ייחודיים (הם שקועים בצנטריפוגה ב-70S).

הוירוס נספח באמצעות אנטי-רצפטורים ספציפיים במעטפת וחודר פנימה. הקפסיד הפנימי יוצא לציטופלזמה. ה-RNA של הויריון לא משמש כ-mRNA, למרות שהוא +, התהליך הראשון לאחר חדירת הקפסיד הוא שעתוק לאחור של DNA מ-RNA באמצעות RT שנמצא בויריון. (בתאום יש RT שהוא טלומראז, אך הוירוס לא משתמש בו). הפריימר ל-RT הוא tRNA הויראלי של ליזין. (RT התגלה בוירוסים אלה). לכל וירוס יש RT אופייני הסיב השני מסונתז על ידי אותו RT. נוצר dsDNA ליניארי שנסגר. ה-DNA המעגלי מגיע לגרעין שם הוא עובר אינטגרציה לגנום התא. הם לא מסוגלים להתרבות ללא שלב האינטגרציה (בניגוד לפאג' λ). זוהי לא אינטגרציה ספציפית ובניגוד ל- λ , שם יש אתר חיבור בתא ואתר חיבור ב-DNA הוירוס. מבחינת ה-DNA הויראלי הוא נכנס תמיד באותה אוריינטציה, אך לא לאותו מקום בגנום. יש הרבה אפשרויות לכניסתו. זהו חלק הכרחי ממחזור הריבוי של הוירוס. לאחר מכן DNA ויראלי הוא חלק מהגנום ועובר טרנסקריפציה באמצעות RNA פולימראז II התאי. נוצרים mRNA שמקודדים לחלבונים (בציטופלזמה).

השלב הראשון של ה-Assembly (יצירת הויריונים) מתרחש בציטופלזמה. הויריון מתעטף בממברנה התאית. השלב האחרון מתרחש בממברנה הציטופלזמית. חלק מהחלבונים מגיעים לממברנה. חלק גדול מהרטרווירוסים גורמים לסרטן בחיות. במקרה כזה הם לא הורסים את התאים, כי סרטן נגרם על ידי חלוקה בלתי מבוקרת של התאים. ה-DNA הויראלי בגנום מכיל אונקוגנים שהם גנים שגורמים לסרטן. יש וירוסים דפקטיביים, שלא יכולים להמשיך במחזור הריבוי לאחר אינטגרציה וגורמים לסרטן. יש וירוסים כאלה שגם לא הורסים את התאים כשהם יוצאים ולאחר היציאה שלהם יכול להיות איחוי של הממברנה התאית. תאים אלה כל הזמן ממשכים לייצר וירוסים. וירוס ה-HIV כן הורס את התאים שהוא מדביק. מחזור הריבוי שלו מסתיים בהרס תאים. הוא מדביק תאי T helpers והם נהרסים. זה גורם להרס המנגנון החיסוני. בניגוד לכך רטרווירוסים אחרים, בייחוד אלה שגורמים לסרטן, לא הורסים את התאים.

עבדו עם 2 סוגי ויריונים – רגילים ודפקטיביים, שלא עברו את מחזור הריבוי. בדקו אותם במיקרוסקופ אלקטרוני וזה הוביל לגילוי האונקוגנים. יש וירוסים שמכילים רצף מסוים ששונה בוירוסים אחרים. למשל, בוירוס ראוס סרקומה יש 2 סוגים: אחד שמכיל DNA שונה, נוסף שהיה "תקוע" באחד הגנים. ה-DNA הנוסף הזה מקורו בתא. הוא לא זהה לגמרי ל-DNA המקביל שנמצא בתא, אך דומה לו מאד והוא נקרא SRC. התברר, שקיים בתא גן נורמאלי שמקודד ל-SRC, שיש לו תפקיד נורמאלי במטבוליזם, ואילו הוירוס מכיל אנלוג שלי-SRC ויראלי. הסתבר, שהוירוסים שגורמים לסרטן מכילים את ה-SRC והם דפקטיביים כלומר, לא מסוגלים להתרבות. בוירוסים נורמאליים אין SRC והם לא גורמים לסרטן ומסוגלים להתרבות וגם עוזרים לוירוס הדפקטיבי להתרבות.

הוירוס רכש את SRC בשלב כלשהו באבולוציה. בחלק מהמקרים החלבון שמקודד על ידי הגן שבווירוס גורם לסרטן (בניגוד לחלבון התאי הנורמאלי). דוגמא: Ras הגן ras בוירוס הוא אונקוגן פעיל, ואילו ras נורמאלי פעיל בתאים במעבר סיגנלים. כך גילו שורה של אונקוגנים, כמו MIB, MIC, LBL ועוד. כלומר, הוירוסים נושאים מוטנטים של גנים תאיים, שהם אונקוגנים ובהכנסתם לתא גורמים לסרטן. לכל הוירוסים הללו יש 3 גנים עיקריים. בכיוון 3' → 5' יש גן gag, גן pol וגן env בקצוות יש רצפים נוספים, שלא מקודדים. כשיש את כולם והם שלמים הוירוסים נורמאליים. $5' \rightarrow \text{gag pol env} \rightarrow 3'$ כשבאחד מהם נכנס אונקוגן, הם לא אינפקטיביים יותר (כלומר הם דפקטיביים) אך הם גורמים לסרטן.

כל הגנים משועתקים יחד. הגן pol מקודד לפולימראז שהוא RT מאותו פולי-פרוטאין נחתך חלבון שהוא אינטגראז (אנזים ספציפי שגורם לאינטגרציה בתאים) וכן חלבון RNase H. אנזים זה מפרק RNA רק כאשר הוא נמצא בהיבריד עם DNA, ולא מפרק RNA חופשי. הוא נחוץ להתרבות הוירוס. כולם מקודדים מ – pol. מ – env מקודדים חלבוני הממבראנה, ומ – gag מקודדים חלבונים של הקפסיד הפנימי.

הקוקטיל שניתן לחולי איידס הוא מספר תרופות שמעכבות את ריבוי HIV מכיל נוקליאוטידים מסוג di-deoxy שמעכבים את RT, שבהם יש H במקום OH גם ב – 3' אז הסינתזה נעצרת. כיום הקוקטייל מכיל תרופות נגד פרוטאזות. הפולי-פרוטאינים שנוצרים מבוקעים על ידי פרוטאזות ספציפיות, שגם מקודדות על ידי HIV וגם הם מעכבות על ידי התרופות.

בנוסף ל – Oncoviruses יש גם Lentiviruses, הלנטייווירוסים כוללים HIV והאונקווירוסים גורמים לסרטן. המבנה הבסיסי הוא שהגנום הוא RNA. בשני הצדדים של 2 מולקולות ה – RNA הויראלי יש אזורים של R (Repeat) הזהים ב – 3' ו – 5'. אזורים אלו הם של כמה עשרות בסיסים אחר כך יש אזור של U₅ בקצה 5' ו – U₃ בקצה 3'. באמצע יש גנים pol, gag, env במסגרת הקריאה הפתוחה. ה – env נותן את חלבוני המעטפת שמחליפים את חלבוני ממבראנת התא לפני שהוירוס מתעטף בה. יש כמה חלבונים כאלה. ה – gag נותן את חלבוני הקפסיד הפנימי.

אחד השלבים הראשוניים בהדבקה הוא שיעתוק של DNA זו סיבי ליניארי שהופך למעגלי, מ – RNA על ידי האנזים RT. נוצרות ב – DNA 2 חזרות זהות בקצוות הן נקראות Long Terminal Repeat או בקיצור LTR (ב – RNA יש חזרות R קצרות יחסית). כשה – DNA עובר אינטגרציה לכרומוזום באתרים רבים ה – LTR מופיעים משני צדדיו. כל אחד מהם מכיל בהתחלה U₃ אחר כך R ואחר כך U₅.

ה – DNA חודר לגרעין ועובר אינטגרציה עם LTR 2 בקצוות. בשלב זה התא מתייחס אליו כאל קבוצה של גנים ויש תעתוק מהפרומוטור שנמצא ב – LTR ונוצר טרנסקריפט אחד. בקצה 3' בסוף ה – LTR יש אתר פוליאדינלציה שזה רצף הדרוש להוספת קצה פולי A בקצה 3' של ה – mRNA. ה – RNA שנוצר עובר גם Splicing במנגנונים התאים, ונוצרים חלבונים, שהם פולי-פרוטאינים. הם מבוקעים על ידי פרוטאזות ספציפיות, שאחת מהן משמשת כמטרה לתרופה כנגד איידס. עוד תרופות לאיידס מעכבות את ה – RT הויראלי (הן לא סלקטיביות לגמרי).

האנזים RT קשור ל – RNA בויריון ומשפועל כאשר הויריון נכנס לתא. ב – Core שנכנס לתא מתרחש השעתוק ל – DNA. ה – Core הוא החלק מוירוסים מורכבים, שלא מכיל את המעטפת החיצונית כלומר, הקפסיד + הגנום. הקפסיד לא מתפרק לגמרי. רק מה – DNA שעבר אינטגרציה מתועתק RNA. ב – LTR נמצא פרומוטור וגם אינהנסר (מגבר). לשם התעתוק מתחברים פקטורי תעתוק תאים ויש תעתוק על ידי RNA פולימראז II.

תהליך ה – Maturation הוא תהליך שבו חלבוני env מגיעים לממבראנה, נוצר Core שמתעטף בה. יש וירוסים שהורסים את התאים כמו HIV I,II (תאי T מסוגים מסוימים). אונקווירוסים בחלקם לא הורסים את התאים אלא הם ממשיכים לייצר וירוסים כך שהממבראנה של התא מתחברת מחדש לאחר ההנצה. יש אנלוגיה מסוימת בין זה ל – λ. ההבדל הוא שתהליך האינטגרציה הוא חלק מהמהלך הרגיל של אינטגרציה של הוירוס (אין ליטי לעומת ליזוגני). אם אפשר לעכב את האינטגרציה הוירוס לא יתרבה כי זה שלב הכרחי.

.Reverse Transcription

נוצר DNA זו סיבי מ – RNA חד סיבי בריאקציה המזורזת על ידי RT. ב – RNA יש רצף PBS (Primer Binding Site) הוא נמצא Down Stream ל – U₅. ה – RT דורש פריימר (יש ל – RT מבנה דומה ל – DNA פולימראזות). הפריימר במקרה של הוירוסים הוא tRNA של התא. הפריימר,

שבחלקו קומפלמנטרי, נקשר ל – PBS. בוירוסים שונים יש שימוש ב – tRNA ספציפי אחר. הפריימר מוארך מקצה 3' שלו על ידי RT. התחלת התעתוק היא ב – PBS שנמצא קרוב לקצה 5' של ה – RNA, וכך התעתוק מסיע לסוף. זה נקרא Strong Stop DNA (יוצר פס חזק בג'ל).

בשלב הבא יש אנזים RNase H שמקודד על ידי pol. (לא חלק מפולי-פפטיד הוא נוצר ב – Splicing שונה). הוא נמצא בקומפלס עם RT. ה – RNase H מפרק באופן ספציפי RNA שנמצא בהיבריד עם DNA. הוא מפרק את ה – RNA ונשאר DNA חד סיבי. יש שימוש ב – R. בשלב הבא יש אזור של DNA חדש שמכיל את R שקומפלמנטרי ל – R שב – RNA. אז הוא קופץ לקצה 3' של ה – RNA, שבו יש R זהה, ועובר היברידיזציה איתו זהו Jump אך למעשה יש קומפלס תלת ממדי של RNA, לכן המרחקים בניהם קצרים (הדבר יכול להתחולל גם בין 2 מולקולות ה – RNA). רק ה – DNA עם הפריימר עובר לקצה 3' ועובר הארכה עד לקצה 5' של ה – RNA הויראלי. אז RNase H מפרק כמעט את כל ה – RNA. ל – DNA שנוצר יש אזור שלא היה קודם ב – RNA והוא U₅ שנמצא עכשיו גם בקצה 3'.

אז יש סינתזה של הסיב השני של ה – DNA בכיוון 3' → 5'. מה – RNA נשאר חלק שמשמש כפריימר לסינתזה זו. אחר כך שוב יש פירוק על ידי RNase H של שאריות RNA. לאחר מכן יש Jump שני לקצה השני ו – RT מאריך 3' → 5' ומשלים את שני הסיבים. נוצר DNA דו סיבי שלם, שמכיל בגלל מנגנון ה – Jump גם רצפים שלא היו ב – RNA והם רצפי LTR בשני הקצוות. המבנה שלו זהה בשני הצדדים U₃-R-U₅.

ה – DNA עובר אינטגרציה עם LTR. משני הצדדים יש פרומוטור ואינהנסר (מגבר) ואתר פוליאדנילציה ב – LTR. ב – mRNA כבר לא מופיע U₃ מצד אחד ו – U₅ מצד שני. יש ביקוע של קצה 3' ב – mRNA לפני שנוסף פולי A בחיתוך ספציפי. מבנה ה – LTR כולל אזור אינהנסר בתוך U₃, אזור של CAT ו – TATA Box גם ב – U₃, אתר פוליאדנילציה ב – R. יש גם Inverted Repeat שנוצר כתוצאה מתהליך האינטגרציה משני הצדדים של ה – LTR.

האינטגרציה ב – λ היא באתר Attachment בפאג' ואתר הומולוגי ב – E. Coli והאנזים אינטגראז מבצע חיתוך וחיבור מחדש. במקרה של הרטרווירוסים ה – DNA צריך לעבור אינטגרציה רק באותה אוריינטציה כשהוא שלם כי אחר כך הוא צריך לעבור שעתוק וליצור RNA ויראלי שלם. לכן יש ספציפיות. האינטגראז מקודד על ידי pol הויראלי ומבצע אינטגרציה ספציפית. כתוצאה ממנה יש שינויים בקצוות – IR קצרים ה – DNA הויראלי ו – DR ב – DNA הכרומוזומלי. האינטגראז דואג לאוריינטציה נכונה ולשלמות ה – DNA בין שני ה – LTR.

האינטגרציה מתרחשת בהרבה אתרים שונים. יש ספציפיות מסוימת אך לא כמו ב – λ. ב – λ יש אפשרות להוצאה מדויקת Exision. הדבר לא קיים ברטרווירוסים כי משועתק RNA שנכנס לויריונים החדשים. כלומר, כאן יש ספציפיות ברמה של ה – DNA הויראלי וספציפיות חלקית בלבד ברמת ה – DNA התאי. חקר הוירוסים הללו היה חשוב למחקר של סרטן.

מנגנונים של סרטן.

האונקוויירוסים גורמים לסרטן. בחיות (תרנגולת) התגלה וירוס כזה, כן בעכברים ובקופים. יש גם וירוס שגורם לסרטן בבני אדם והוא HTLV. הוא גורם לסוג מסוים של לויקמיה שעובר בוירוס. הדבר נדיר ורוב סוגי הסרטן לא נגרמים כתוצאה מהדבקה בגורם אינפקטיבי. תקופת האינקובציה של HTLV יכולה לקחת 30 שנה.

בעבודה עם הוירוסים הללו התגלו אונקוגנים. התברר, שחלק מהאונקוויירוסים לא מכילים את המבנה הרגיל של הרטרווירוס האינפקטיבי עם כל האלמנטים הדרושים. יש וירוס MO-MLV וגילו שבאוכלוסיות שהודבקו על ידי הוירוסים היו הטרוגניות וחלק הכילו בויריונים RNA נורמאלי, וחלק הכילו RNA שהיו בתוכו Insertions של גנים אחרים. גילו אותם על ידי היברידיזציה של RNA ושל cDNA נורמאלי. הם היו Substitution כלומר, החלפות.

אחת מהתוספות היא src, בווירוס RSV (ראוס סרקומה וירוס) שגורם לסרקומות (גידולים מוצקים ברקמות חיבור). הסתבר, שבווירוס RSV הסרקומה נגרמת על ידי הוירוס הדפקטיבי בתערובת, שמכיל את ה - src ולא על ידי הוירוס הנורמאלי. ה - src מקודד לאיזשהו חלבון שגורם לסרטן. הוירוס הדפקטיבי בתא יחד עם הוירוס הנורמאלי שמספק לו את האלמנטים החסרים כמו env שלתוכו src עובר אינטגרציה כלומר, יש קומפלימנטציה בין הוירוס הדפקטיבי לנורמאלי.

הדבר נכון גם ליתר הוירוסים הדומים, שגורמים לסרטן גם הם מקודדים לחלבונים שגורמים לסרטן. הסתבר, שלכל גן כזה בווירוס דפקטיבי יש אנלוג שהוא גן נורמאלי תאי, שמשמש לפונקציות שונות, בעיקר כאלו שבאות לידי ביטוי בהתפתחות העוברית. גנים כאלה נקראים אונקוגנים. כלומר, באיזשהו שלב באבולוציה בריקומבינציה לא מדויקת הוירוס קיבל אזור של DNA תאי עם הגנים הללו (אלה שנמצאים בתא לא זהים להם לחלוטין הם הומולוגיים). הגן בוירוס עבר שינויים והוא אונקוגן.

הדוגמא המפורסמת ביותר היא ras. ה - ras מוטנטי שונה מהנורמאלי כך שה - ras שנמצא בווירוס מופעל גם ללא סטימולציה (גירוי) חיצונית באופן קונסטיטוטיבי. כלומר, ביטוי של אונקוגנים מהוירוסים בתא גורם להתמרה סרטנית, בעוד שהחלבונים שהם תוצרי הגנים ההומולוגיים התאים לא גורמים לסרטן אלא יש להם תפקיד. דוגמאות לאונקוגנים המועברים על ידי וירוסים הם: erbB (טירוזין קינאז), ets (פקטור שעתוק), myc (פקטור שיעתוק) וכו'.

מסתבר, שאונקווירוסים יכולים לגרום לסרטן בחיות גם בדרכים אחרות. כשלב הכרחי בריבוי, הוירוס עובר אינטגרציה לכרומוזום. יש להם פרומוטור חזק מאד + אינהסר ב - LTR. אם הוירוס עובר אינטגרציה מספיק קרוב לאונקוגן תאי, שלא מתבטא, יכול להיות תעתוק שיתחיל בפרומוטור הויראלי וימשיך לביטוי האונקוגן התאי בקצב גבוה. אם הוא מתבטא בזמן ובמקום הלא נכון, הוא יכול לגרום לסרטן. בצורה אחרת האינהסר יכול לפעול על הפרומוטור של הגן הנורמאלי, האונקוגן התאי, וכך הוא יתבטא. זה יכול להתרחש גם ב - Down Stream. כלומר, גידולים רבים נגרמים על ידי אינטגרציה של הוירוס סמוך לאונקוגן. במקרה זה הוירוס עצמו יכול גם לא להכיל אונקוגן. וירוס שעבר אינטגרציה נקרא פרו-וירוס.

האונקוגנים הללו הם דומיננטיים כשהם מתבטאים הם גורמים לסרטן. אם יש אותו אונקוגן בשני הכרומוזומים, הוירוס יכול לעבור אינטגרציה רק בכרומוזום אחד. זה מספיק כדי לגרום לסרטן ומכאן שזה דומיננטי. אולם, התגלו גם גנים רצסיביים, והם נקראים Tumor Suppressors. אלה גנים שמקודדים לחלבונים שיש להם תפקיד שלילי בבקרה במחזור התא כלומר, מעכבים אותו. אם מבטלים את פעילותם אז יכול להיגרם סרטן. הם רצסיביים יש 2 עותקים זהים של אותו TS בשני הכרומוזומים. יש במקרים שבהם הוירוס עובר אינטגרציה לתוך ה - TS וביטל את הביטוי שלו באחד הכרומוזומים. והכרומוזום השני של ה - TS עדיין פעיל לכן לא נוצר סרטן. כלומר, הגן יכול לגרום סרטן, אך הוא רצסיבי. צריך מאורע נוסף, שיגרום לאבדן הפעילות של עותק הגן השני. סוג סרטן כזה עובר בתורשה. במשפחות מסוימות של מצב הטרוזיגוטי (עם מוטציה) ואז יש נטייה גדולה יותר לסרטן וצריך רק עוד מוטציה אחת בגן השני למשל, רטינובלסטומה נגרמת בצורה זו.

בגנום של בני אדם יש הרבה מאד עותקים של DNA, שמקורם בפרו-וירוסים. אפשר לזהות אותם על פי ה - LTR. בשיטות של גנומיקה מנסים לגלות TS חדשים, לוקחים דגימות מגידולים סרטניים בבני אדם ומחפשים ב - DNA רצפים של LTR. מחפשים גם פרו-וירוסים שנמצאים בכמה דגימות באותו גידול. אז מסגרת הקריאה הזו חשודה כ - TS.

HIV + HILV

ה - HIV התגלה על ידי עבודה של וירוסי Tumor RNA. בניגוד לרוב האונקווירוסים הוא גורם להרס תאי T שנחוצים למערכת החיסון. המבנה הבסיסי שלו דומה לזה של HILV. מנגנון הריבוי שלו דומה לזה של הרטרווירוסים חוץ מכמה פרטים. יש לו גנים נוספים חוץ מ - pol, env, rev יש בהם מספר מסגרות קריאה כך שב - Alternative Splicing מופיעים חלבונים נוספים. ב - HIV יש tat ו - rev

(ב – HTLV יש מקבילים) שמשמשים לבקרה של שעתוק ושל תרגום. ה – tat אחראי לרגולציה חיובית של תעתוק כך שהוא מועתק אז יש תעתוק מוגבר מהפרומוטור של הפרו-וירוס. ה – rev בניגוד לכך מעכב טרנסלציה (מבקר התחלת תרגום). בלנטיווירוסים ש – HIV שייך אליהם יש בנוסף גם גנים רגולאטורים שמהווים גם מטרות לריפוי. החלבונים הנוספים הם קטנים יחסית.

.DNA Tumor Viruses

בניהם וירוס ה – SV40 ופוליומה. וירוסים אלה גם גורמים לטרנספורמציה סרטנית אדנווירוסים, ופוליומה הם היו חשובים לחקר הסרטן. פוליומה ופוליומה מכילים DNA מעגלי סגור Super Coiled באסוציאציה עם היסטונים. הם מתרבים בצורה הרגילה של וירוס DNA. התאים בדרך כלל נהרסים. התברר, שוירוסים אלה יכולים גם לגרום לסרטן בחיות על ידי אינטגרציה של DNA הוירוס ל – DNA הכרומוזומלי בהרבה מקומות. האינטגרציה הזו היא לא ספציפית בכלל. אין אינטגראז מקודד בוורוס. האינטגרציה היא לא בצורת ריקומבינציה הומולוגית. בכל התאים שהתמרו על ידי וירוסים אלה האינטגרציה מאפשרת לחלבון מסוים להתבטא בכל התאים.

למשל, אם מדביקים תאים ב – SV40 אם הוא הורס תאים לא נגרם סרטן. אם הוא לא מסיים את המחזור הליטי אלא עובר אינטגרציה, הוא נשאר ב – DNA הגנומי של התא, ולא יוצא. הוא מכיל גן. שנקרא Large T Antigen. בדם של החיות המודבקות ב – SV40, שפיתחו גידול, יש נוגדנים כנגדו. אין הומולוג שלו בתאים והוא אונקוגן זר של וירוס. הוא קושר ומבטל פעילות של שני Tumor Suppressors שהם P53 ו – Rb. הם חשובים בסרטן באדם T Antigen קושר אותם ומבטל את פעילותם. הם צריכים להיות פעילים לבקרה של מחזור התא, במיוחד בהתפתחות עוברית. אם הם לא פועלים נגרם סרטן.

בוירוסים ממשפחת הפפילומה יש וירוסים BPV ו – HPV, שגורמים לסרטן צוואר הרחם. הם מקודדים לחלבונים E₃ ו – E₇ שקושרים P53 ו – Rb וגורמים לסרטן בבני אדם על ידי אינאקטיבציה של שני Tumor Suppressors. ה –

ט.ל.ח.