

# סיכום בביולוגיה מולקולארית ומבוא להנדסה גנטית

## תוכן עניינים:

נושא	עמוד
הנוקליאוטיד	3
RNA	4
הברידיזציה	5
הכפלה	6
טלומראזות, מנגנוני הגהה ותיקון	8
מנגנוני תיקון	10
התבטאות לגנים- תעתוק (אתחול, הארכה, סיום)	12
תרגום (wobble ,tRNA)	13
הריבזום	15
בקרת תעתוק בחיידקים	16
אופרון	17
התבטאות גנים באאוקריוטים (אקסונים splicing CAP)	18
בקרת התבטאות גנים באאוקריוטים	21
שפרונים	23
מבוא להנדסה גנטית, אנזימי הגבלה	24
חיבור דנ"א	25
שיבוט	26
PCR	27

## מבוא

"גן"- רצף דנ"א שמהווה יחידת פעילות או רצף דנ"א שמקודד ל רנ"א או לחלבון  
"הפעלה של גן"- יצירת רנ"א לפי האינפורמציה בדנ"א (שעתוק לרנ"א)

## הנוקלאוטיד

חומצות הגרעין דנ"א ורנ"א הם פולימרים שבנויים ממונומרים. כל מונומר מורכב מנוקלאוטידים. נוקליאוטידים בנויים מסוכר- ריבוז (רנ"א) ודיאוקסיריבוז (דנ"א), קבוצה אחת או יותר של פוספט ובסיס חנקני. הבסיס החנקני בחומצות הגרעין מחולק לפורינים (G A) ופירמידינים (C T U). הבסיס החנקני קשור לסוכר תמיד לפחמן 1' בקשר N' גליקוזידי- קשרק קוולנטי חזק. סוכר+בסיס חנקני="נוקלאוטיד". כאשר מוסיפים פוספט נוצר "נוקלאוטיד". הפוספט קשור לפחמן 5' או 3'. תתכן יותר מקבוצה פוספטית אחת. הקשר הוא אסטרי (קוולנטי) בין הפוספט לפחמן.

הנוקלאוטידים AGCT קשורים בקשר "פוספודיאסטר", החיבור בין קבוצת פוספט בין פחמן 3' ל 5' בנוקלאוטיד שאחריו. כיוון שדרת הנוקלאוטידים תמיד מ' 5' ל 3' (5' בצד שמאל). (N נוקלאוטיד כלשהו).

דנ"א הוא דו גדילי, עם רוחב קבוע של 1.08 ננומטר, כאשר יש התאמה מרחבית בין A ל T (עם 2 קשרי מימן) ו C ל G (עם 3 קשרי מימן).

הסלילים בנויים כבורג ימני.

B דנ"א מבנה רגיל עם major and minor groove עם 10.4 בסיסים בסיבוב שלם. יש אנטראקציה עם הדנ"א לשעתוק דרך השקע הגדול.

"סלילות על super coiling"- המשך הסתלסלות הדנ"א. במולקולות סגורות קיימת סלילות על.

"סלילות על חיובית"- הוספת סיבובים לכיוון הבורג

"סלילות על שלילית"- פתיחה בכיוון הבורג. הורדת סיבובים, זהו המצב השכיח בדנ"א.

בכל מקרה סלילות על דוחסת את המולקולה, אך סלילות על שלילית מקלת על פרימת ההליקס.

"linking number (LK)"- תכונה קבועה של סליל- כמה קשרים פוספודיאסטרם צריך לשבור כדי לפתוח את הסליל לגמרי.

מספר סיבובים בהליקס (TW)

מספר פיתולים של ההליקס סביב עצמו (Wr) הם באים אחד על חשבון השני.

"טופואיזומר"- שוני ב LK, ניתן לעבור מטופואיזומר אחד לשני רק על ידי שבירת קשר פוספודיאסטר.

"פוספואיזומראזות"- אנזים ששובר את הקשרים הפוספודיאסטרם למעבר בין טופואיזומר אחד לאחר.

סוג 1- שבירה ואיחוי לאחד הגדילים שיכול להותיר את הקשרים- relax

סוג 2- שבירה ואחוי בשני הגדילים, דורש ATP, יכול להותיר ולהגדיל פיתולים.

## RNA- Ribonucleic Acid

השוני הגדול בינו לבין דנ"א זה החד סוכר ריבוז ולא דיאוקסי ריבוז. ההבדל גורם לאי יציבות כימית. קשרים פוספודיאסטרים מתפרקים בסביבה בסיסית. (דנ"א בסביבה אלקלית הגדילים נפתחים אך כל גדיל בנפרד לא מתפרק).

הסליל רנ"א לא בצורת בטת אלא בצורת A. הבדל נוסף זה הנוקלאוטיד U במקום T. הרנ"א נוצר מתעתוק של דנ"א והוא חד גדילי. לרנ"א יש מבנה מרחבי.

"Ribozyme" - רנ"א בעל פעילות אנזימטית. הפעילות מתאפשרת בגלל קבוצת ה OH בסוכר.

80% מהרנ"א הוא רנ"א ריבוזומלי r-RNA לכל ריבוזום יש כמה סוכים של r-RNA. כמה אלפי נוקלאוטידים.

15% t-RNA 80 נוקלאוטידים

2%-5% m-RNA אורכו לפי הגן.

יש עוד סוגים של רנ"א קטן של בקרה, תעתוק, הכפלה, תרגום

## תאוריית עולם ה - RNA

יש הסבורים שהרנ"א קדום לדנ"א, הוא גם יכול לאגור מידע וגם לבצע פעולות אנזימטיות, לאחר מכן היתה התמחות של דנ"א ורנ"א בנפרד. דנ"א עדיף לאגירת אינפורמציה כי היא יציבה יותר ודו גדילית וחלבון עדיף לבצע פעילות אנזימטית. הרנ"א נשאר ביניהם.

## היברידיזציה

"Melting" - התכה - הפרדה של מולקולת ח. גרעין.

"Annealing" - חזרה של מולקולת הח. גרעין לאחר התכה. הברידיזציה.

להתכה יש טמפרטורה ו pH אופייני למולקולת ה- Tm. pHm

לעיתים זנים שונים יכולים לעבור הברידיזציה annealing.

ריכוז מלח חד ערכי משפיע על יציבות הדנ"א הדו גדילי. זאת מכיוון שלפוספטים בגדילים יש מטען שלילי (-) וה

Na<sup>+</sup> מייצב את המבנה. נותן מקסימום הברידיזציה.

ניתן לעשות הברידיזציה בתמיסה כאשר אחד קשור למצע בלתי מסיס והשני בתמיסה. המצע יכול להיות סיליקה

או זכוכית בלתי נושאת.

ניסוי- בדיקה אם גן לאינסולין מקוף קיים באופן דומה אצל בני אדם.

1. נקח דנ"א נבדק של האדם, נחתוך אותו ונקשור אותו לממברנה.

2. נסמן את הרצף הבודד של הגן מהקוף ונוסיף גלאי לסמן.

3. אם הרצפים יקשרו הם דומים.

4. מריצים על גיל, מסמנים באתידיום ברומיד,

5. הדגרת הממברנה עם <sup>32</sup>p רדיואקטיבי

6. מסתכלים על פילם רדיואקטיבי.

הברידיזציה לרנ"א- ניסוי שכזה יתן תשובה להאם הגן מתבטא באיזור מסוים. אם גן לאינסולין עובר הברידיזציה עם רנ"א מרקמת כבד אז הוא מיוצר שם. הברידיזציה *in situ*. נותן לשים גלאים שונים עם סימן פלואורוצנטי על כרומוזומים הומולוגיים ולראות את מיקום הגן. Spectral karyotyping (SKY).

### הכפלה Replication

דנ"א נוצר פעם אחת לכל אורך חיי התא. כאשר התא מתחלק, הדנ"א מוכפל באופן מדויק לתא הבת. יש עשרות סוגי חלבונים בתהליך כדי למנוע טעויות. הכפלת דנ"א משמרת למחצה semi conservative. כל גדיל נפתח ומהווה תבנית לגדיל חדש. כל תא בת מקבל גדיל ישן וגדיל חדש. ראקצית נסטוזת הדנ"א יש לפתוח את הגדילים, לשמור עליהם פתוחים, צריך לדעת מאיפה להתחיל לסנטז, איפה להפסיק וכו', נניח שנותר רק לסנטז. הסנטזה נעשית על ידי דנ"א פולימראזות. יש סוגים שונים 1,2,3 לכל אחד תכונות שונות. אך כולן צריכות תבנית "template" ותחל "primer".

לתחל יש סיומת  $OH^3$  אשר יותר קשר פוספודיאסטרי עם נוקלאוטיד בעל 3 פוספטים. שני פוספטים נשברים מהמולקולה- פירופוספט, והוא מתפרק לשני פוספטים ומשתחררת אנרגיה. הראקציה בלתי הפיכה.

### Origin of replication

יש רצף נוקלאוטידים שמזוהה על ידי אנזימים מתאימים. הגדילים נפתחים קצת באתר זה. לשני הכוונים. בכל צד יש מזלג הכפלה. בצד אחד אין בעיה, יש סנטזה מ5' ל3', זהו ה"גדיל המוביל". הגדיל השני מסונטז במקטעים- ה"גדיל המאחר". כל מקטע נקרא "מקטע אוקזקי" Okazaki fragment.

"primase"- אנזים שמייצר את התחל primer, אנזים זה שיק ל RNA פולימראזות. בגדיל המאחר יש תחל בתחילת כל מקטע אוקזקי, התחל באורך של 8-10 נוקלאוטידים. בגדיל המוביל יש תחל אחד.

### סינתזת הגדיל המאחר

דנ"א פולימראז משלים רצף דנ"א מהתחל (שהוא עדין רנ"א) עד למקטע אוקזקי הבא. תחל הרנ"א מפורק על ידי exonuclease, דנ"א פולימראז משלים את הרצף החסר בדנ"א. נוצר רווח שנסגר על ידי ה ligase. בחיידקים יש דנ"א מעגלי עם מוצא הכפלה יחיד. באאוקריוטים יש הרבה מוצאי הכפלה. מכיוון שהגדילים ארוכים יותר וקצב ההכפלה שלהם איטי יותר. "Replicon"- אזור בדנ"א שעובר הכפלה על ידי מוצא הכפלה אחד. באאוקריוטים יש עשרות רפליקונים ובחיידקים יש רפליקון אחד.

## **אתחול ההכפלה initiation**

אתחול ההפלה נעשה במוצא ההכפלה. מוצא ההכפלה מכיל:

רצף הקושר חלבון מאתחל

רצף עשיר ב T A עם פחות קשרי מימן.

"חלבון מאתחל-DnaA" - צבר חלבונים שיוצר דחיסה של דנ"א, בגלל הלחץ האיזור נפתח, דבר זה מתאפשר בסלסול על שלילי שקיים ברב עולם החי.

ב *E. coli*, אנזים Helicase- DnaB פורס את ההליקס כמו טבעת ואנזים נוסף SSB-single strand binding protein שומר על הגדיל פתוח ושומר עליו.

"דנ"א פולימראז 3" - קומפלקס אנזימטי שמסנטז את הגדיל המוביל והמאחר ביחד.

פרוססיביטי processivity כמה נוקליאוטידים מסונתזים עד שהאנזים יפול.

לדנ"א פולימראז 3 יש פרוססיביות טובה, כחצי מליון נוקלאוטידים.

"תת יחידה בטה" - חלבון טבעתי שמחזיק את הדנ"א פולימראז טוב.

"דנ"א פולימראז 1" - ב *E. coli* יש אנזים דנ"א פולימראז 1 שיודע גם לפרק את התחל כמו exonuclease וגם בונה

את הקטע החסר, יש לו פרוססיביות נמוכה כי הוא יוצר מקטעים קצרים.

"primosome" - פרימאז והליקאז ביחד - יוצר תחל ופורס את ההליקס.

"topoisomerase" - מסובב את הגדילים ומשחרר את המתח בהליקס.

"תת יחידה גמה" - מחזיק את שתי הדנ"א פולימראזות כך ששני הגדילים מסונתזים ביחד.

## **הכפלה באאוקריוטיים**

ההכפלה מתבצעת בפאזת S DNA synthesis, "איאוכרומטין" מוכפלים קודם ו"הטרוכרומטין" בסוף (צפופים יותר).

ההבדלים:

הפרימאז נקרא "דנ"א פולימראז אלפה" - תחל משולב ברנ"א ודנ"א.

סנטזת הדנ"א היא על ידי "דנ"א פולימראז בטה" (מזכיר דנ"א פולימראז 3).

## **טלומראזות**

מכיוון שלגדילים באאוקריוטים יש קצוות יש בעיה בגדיל המאחר, נוצר חסר של נוקלאוטידים, כפתרון לכך הטלומראז מייצר בקצוות הכרומוזום איזור דנ"א שנקרא טלומר, אזור ללא גנים, רק דנ"א ברצפים חוזרים. הטלומר מונע גם התחברות שגויה של כרומוזומים. בניית הטלומר נעשית כשהאורגניזמים בשלב הגמטות בתחילת החיים ולאחר מכן הטלומר מתקצר עד שהתא מת.

הטלומראז בנוי משני חלקים. תבנית רנ"א וחלבון שבונה דנ"א מהתבנית הזו. "רברס טרנסקריפטז". התבנית מתחברת לקצה ה OH'3 בגדיל המאחר כך שמעליו מסונטז גדיל דנ"א מ'5 ל'3. ואז מסונטז על הקטע דנ"א החדש מקטע אוקזקי נוסף. זה קורה שוב ושוב עד שאנזימים מפסיקים זאת.

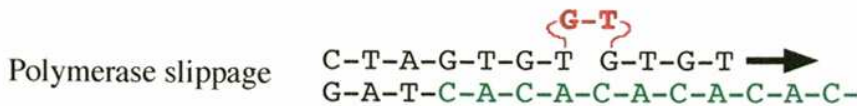
## DNA repair מנגוני הגהה ותיקון

מקורות למוטציה:

טעות בהכפלה, נזקי דנ"א (ספונטני וחיצוני). מוטציות על ידי טרנספוזונים- מעבר דנ"א ממקום למקום (באבולוציה).

אופי המוטציה:

- מוטציה נקודתית- בנוקלאוטיד אחד- 3 סמוכים. לא בהכרח משפיע.
  - מוטציות כרומוזומליות- מוטציה רצינית שדורשת תיקון עם עשרות גנים/ חלבונים.
  - טעות בזמן ההכפלה
- "Transition"- החלפה של בסיס אחד שלא גורם לשינוי בין הפורינים והפירמידינים.  
 "Transversion"- החלפה של בסיס אחד שגורם להחלפה בין פורין ופירמידין.  
 "Polimerase slippage"- ברצפים חוזרים, הנוקלאוטיד יכול להתחבר מוקדם מדי.

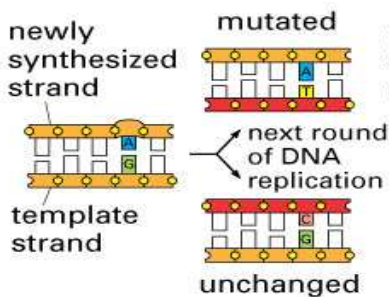


פעילות הגהה proofreading.

מורידים נוקלאוטידים על ידי

אקסונוקלאז 3' ל 5' ולאחר מכן דנ"א פולימראז ממשיך סנטזת דנ"א תקין.

\*יש טאוטומרים נדירים A\* מתאים ל C\* .



NO REPAIR

## Mismatch repair

מתקן קשר שגוי A ו C לדוגמא, חצי מהצאצאים יהיו שגויים

ניתן להבדיל בין הגדיל הישן והחדש ולתקן רק את החדש.

זיהוי הגדיל החדש

\*בחיידקים חסר מתילציה בגדיל החדש, המתילציה מוספת בשלב מאוחר יותר. MutH מזהה את המתילים וחותר

רק את הגדיל החדש. באאוקריוטים יש שיטה אחרת לא של מתילציה, יתכן שפשוט על ידי הבליטה.

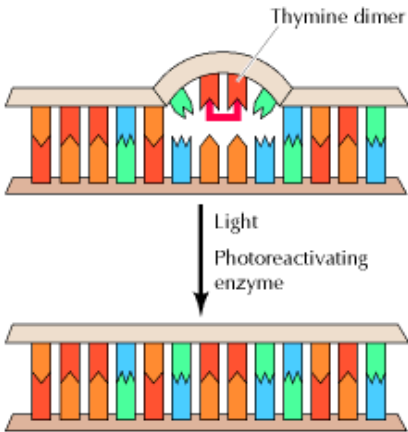
נזקי ספונטניים נפוצים הם דה פורינציה ודה אמינציה.

דה פורינציה- הוצאת פורין שפחות יציב מפירמידין על ידי שבירת קשר N גליקוזידי.

דה אמינציה- הוצאת קבוצת אמין על ידי הדרוליוזה. דבר זה יהפוך C ל U. אם הנזק לא מתוקן חצי מהצאצאים

יקבלו את המוטציה לתמיד.

דימריזציה של פירמידינים - נגרם על ידי קרינת UV. נפוץ ביותר כאשר שני T נקשרים זה לזה בקשר קוולנטי. זה גורם להפסקת ההכפלה.



קרינה מייננת שוברת קשרים פוספודיאסטרים, שבירת הדנ"א.  
 נזקים כימיקליים - אלקילציות, הוספה של אנאלוגים של בסיסים.  
 Base analogs

Intercalating agents - מבנה טבעתי שנכנס בין שלבי ההליקס, וגורם לעוות מבני. כולם "מוטגנים" עם פוטנציאל ל"קרצינוגנים" - (סרטני).

**מנגנוני תיקון**

תיקון ישיר - תיקון ספציפי שמתקן מידית את המוטציה, דה מתלציה כאשר

מתווסף מתיל, פוטואקציבמיה לתיקון דימרים של פירמידינים מUV וכו'.

מנגנוני תיקון כלליים - פתרון של קבוצת נזקים, הורדת קטע בעייתי שלם על כל בעיותיו וסנטוז מחדש של כל האיזור. דנ"א פולימראז 1,2 לקטעים קצרים ודנ"א פולימראז 3 לקטעים ארוכים - פרוססיביות גבוהה יותר.

מנגנוני תיקון BER- Base Excision Repair - זיהוי של בסיס

שאינו AGCT והוצאת הבסיס על ידי "גליקוזילאזות" אשר שוברות קשר N גליקוזידי, (כמו בדה פורינציה), הוצאת הסוכר והפוספט על ידי "אנדונקלאזות", סנטוז על ידי דנ"א פולימראז 1 וסגירה על ידי "ליגאז".

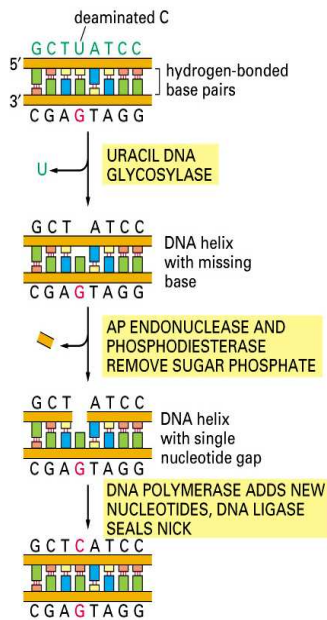


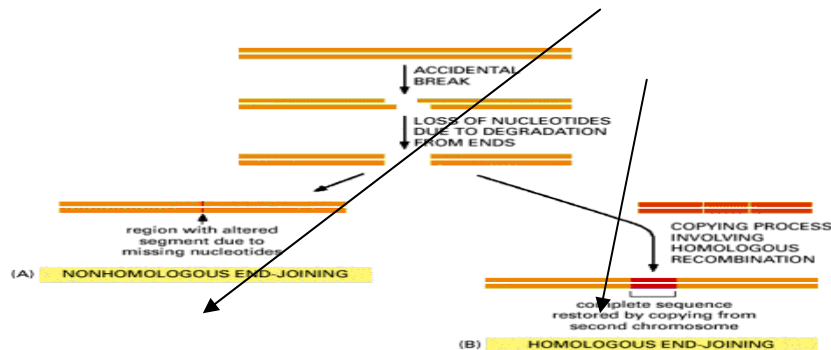
Figure 5-50 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

מנגנוני NER- Nucleotid excision repair - מזהה עיוותים בצורת

ההליקס מתוקנים על ידי הוצאת מקטע שלם ותיקונו. ראשית על ידי "הליקאז" שמפריד בין הגדילים ו"אנדונקלאזות" ששוברות את הדנ"א. יש עיוותים שגורמים לשבירת שני הגדילים על ידי חמצון, קרינה מייננת.

DSB- double strand break - יש תיקון DSB repair על ידי רקומבינציה הומוולוגית ובלתי הומוולוגית.

בבלתי הומוולוגית הגדילים פשוט מתחברים שוב ויש קטע חסר. בהומוולוגים יש השלמה מכרומטידת אחות, זה יותר







		Second letter					
		U	C	A	G		
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G	
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G	Third letter
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G	
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G	

מסגרות

יש שלושה

קריאה.

"transfer RNA "tRNA" - או רנ"א מוביל, מתאים בין חומצת אמינו לקודון. הקודון זה הרצף של הרנ"א והאנטי

קודון זה הרצף ב-tRNA.

ההטענה מתרחשת בציטופלזמה מחוץ לריבוזום.

יש לה נוקלאוטידים שונים קצת.

$tRNA^{Leu}$  - לא טעון

$tRNA^{Leu}$  - טעון.

"Aminoacyl tRNA synthetase" - אנזים שמחבר חומצה אמינית בקצה

הקרבוקסילי שלה לקצה ה' של ה tRNA בקשר עתיר אנרגיה. זה אנזים גדול

וספציפי לכל ח. אמינית ולכל tRNA.

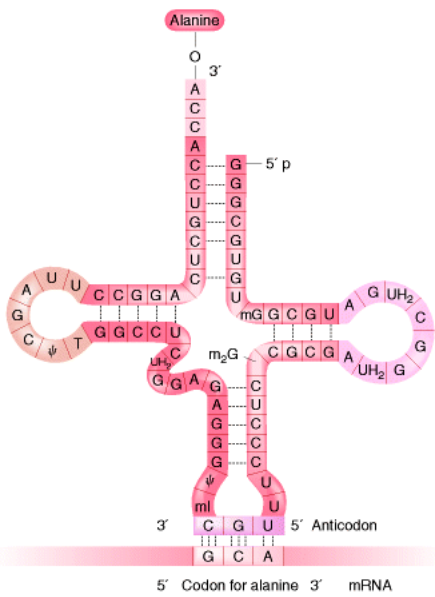
בקוד הגנטי יש 61 קודונים ו 20 ח. אמינו אך יש כ 40 סוגים שונים של tRNA

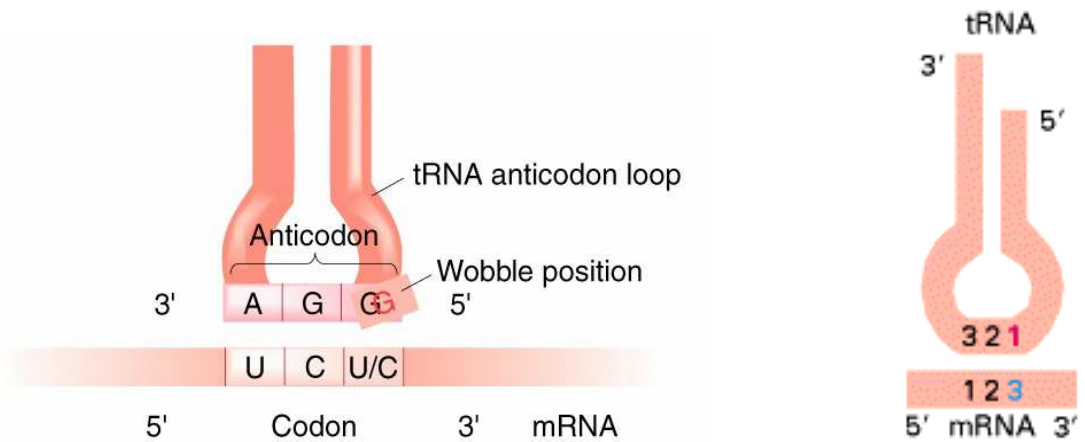
כלומר יש מספר קודונים שמזוהים על ידי אותו tRNA.

Wobble hypothesis - תאוריה זו אומרת שנוקלאוטיד מס 3 בקודון או

נוקלאוטיד מס 1 באנטיקודון יכול לקבל נוקלאוטידים שונים ולשמור על אותה ח.

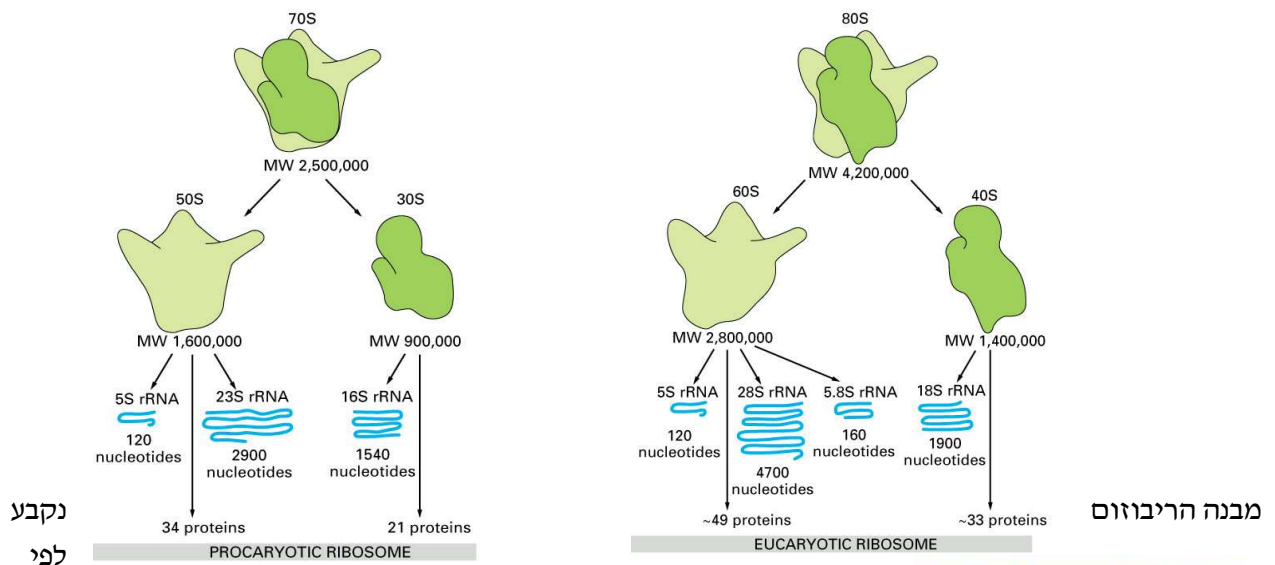
אמינית. יש מספר אפשרויות כאלה.





**הריבוזום**

שיך למשפחת הריבו נוקלאו פרוטאינים. מבצע סנטסת חלבונים, אברון גדול בתא. הריבוזום מורכב משני חלקים קטן וגדול שמורכבים מרנ"א rRNA וחלבונים.

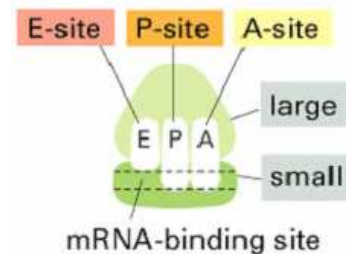


נקבע לפי

מבנה הריבוזום

הרנ"א הריבוזומלי. ישן מספר תעלות E P A, שלבי התרגום הם איתחול, הארכה וסיום.

אתחול- הריבוזום מתיישב על ה mRNA באתר של הקודון הראשון. כאשר התת יחידה הקטנה מתיישבת ראשונה, לאחר מכן ה tRNA מהצד השני ולאחר מכן התת יחידה הגדולה סוגרת את המבנה. הקודון הראשון הוא תמיד מתינון



AUG, יש tRNA מיוחד לאתחול ואחד למתינון בהמשך השרשרת. זיהוי AUG בחיידקים ואוקריוטים שונה. בחיידקים- יש רצף של 10 נוקלאוטידים לפני ה AUG שהתת יחידה הריבוזומלית הקטנה נקשרת אליה. (Shine-Dalgarno)

הארכה - לתעלה A נכנס met tRNA<sup>met</sup> עובר ל P, A נכנס tRNA טעון אחר, נוצר קשר פפטידי עתיר אנרגיה בין המתיונין ב P וח. אמינית ב A, על ידי אנזים peptidyl transferase, הקבוצה הקרבוקסילית משתחררת, ה tRNA משתחרר בתעלה E. כך ממשיכה הסנטזה.

סיום - יש רצף מסוים ברנ"א stop שגורם להקשרות ה- release factor והריבוזום מתפרק לחלקיו.  
"פוליריבוזום"/ "פוליזום" - Polycistronic mRNA רנ"א שמתיישבים עליו מספר ריבוזומים לתרגום.  
הערה: בחיידקים התעתוק והתרגום מתבצעים בו זמנית.

### בקרת תעתוק בחיידקים

הבקרה העיקרית היא על אתחול התעתוק. יש גם בקרות על התרגום, קצב פירוק תוצר, מבנה מרחבי וכו. צורות הסתגלות:

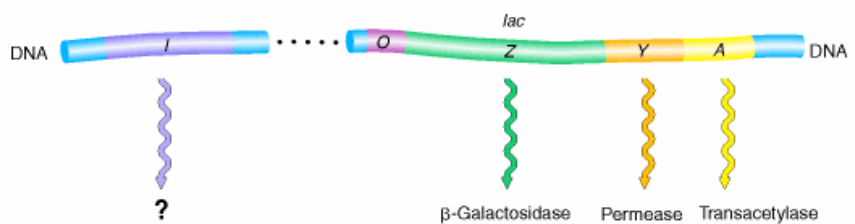
השראה induction - לקטוז הוא משרן, ללא לקטוז לא יוצרו אנזימים לפירוקו הוא אדפטיבי. (בניגוד לקונסטטיטוטיבי שתמיד מיוצר בלי קשר לסביבה כמו ניצול גלוקוז ויצור רנ"א/ דנ"א פולימראז).  
דיכוי repression - אם נוסף טריפטופן הוא ידכא אנזימים שמייצרים טריפטופן הוא "co repressor". מערכת הווסות מורכבת משני חלקים:

א. רצף דנ"א שנמצא סמוך לגן או מבנית או באזור הפרומוטור בחיידקים.

ב. חלבון רגולטורי שנקשר לאותו רצף.

בקרה חיובית - הקשרות חלבון הבקרה לרצף הבקרה גורמת תהפעלת הגן.  
בקרה שלילית - הקשרות חלבון הבקרה לרצף הבקרה גורמת להפסקת ההתבטאות. חלבון הבקרה יכול להיות פעיל או בלתי פעיל ואז הוא לא יכול להקשר לרצף. הוא עובר מהמצב הבתלי פעיל לפעיל לעיתים בהשפעת האפקטור.  
"אפקט אלוסטרי" - מצב בו לחלבון יש שני אתרי הקשרות, גם לאפקטור וגם לדנ"א. הקשרות צד אחד (אפקטור) משפיע על המבנה והאפיניות של הצד השני (דנ"א).

### אופרון



מושג שקיים רק בעולם החיידקים. קבוצת גנים סמוכים זה לזה עם בקרת תעתוק משותפת, מעלה יעילות ומהירות תגובה.

אופרון לקטוז.

### בנוי מהחלקים A Y Z

Z - אחראי על יצור בטה גלקטוזידאז שמפרק את הלקטוז לגלקטוז וגלוקוז.

Y- Lactose permease חלבון ממברנלי שמכניס לקטוז לתא.

A- Trans acetylase לא ברור איך הוא קשור.

I- מקודד לחלבון שפועל כרפרסור, שיקשר לאופרטור וימנע סנטזה.

O- רצף דנ"א שמזוהה על ידי הקומפלקס רפרסור ואופרטור שמונעים פיזית את הרנ"א פולימראז.

(I,O) - אזורי בקרה/ רגולציה, פגיעה בהם תוריד את רמת ההתבטאות אך לא את התפקוד או המבנה.

האופרון מושרה על ידי הלקטוז בבקרה חיובית, הלקטוז הוא האפקטור, כשהוא שם הגן מתבטא.

"catabolite activator protein CAP" - לאופרון הלקטוז יש בקרה שניה חיובית להפעלה של האופרון על ידי

אנזים CAP. הCAP פועל רק שהוא בתצמיד ל cAMP או cyclic AMP (שנוצר מ ATP על ידי אנזים

"Adenylate cyclase"). לכן הרבה גלוקוז בתא יעכב את פעילות ה "Adenylate cyclase".

הרפרסור ללקטוז נמצא תמיד באופן מועט. ה CAP הוא מנגנון שתקף גם לגבי סוכרים אחרים.

### התבטאות גנים באאוקריוטים

לבני אדם יש יותר גנים אבל לא הרבה יותר מצמחים. אורך הגנים לא משפיע אם כי ככל שהוא יותר ארוך הוא מקודד לפחות חלבונים. צפיפות הגנים ביצורים עלאיים קטנה יותר, יש המון רצפי GC "מאובנים" ללא חשיבות עשויות. באאוקריוטים אין אופרונים, כל גן לעצמו, אין חשיבות למיקום הגן יש גנים מפוצלים לכמה כרומוזומים עם בקרה משותפת.

Exons introns - הגן מפוצל לאקסונים ואינטרונים, במRNA הסופי יש רק אקסונים. היברידיזציה של mRNA

עם דנ"א (בשרטוט) מראה כי רק חלקים מסויימים מתאימים אחד לשני.

האינטרון הוא רצף שלא מתבטא.

"Exon shifting" - האקסונים יכולים לזוז ולהכנס למקום אחר,

האינטרונים מורידים את הסיכוי לכניסה של האקסון לתוך אקסון אחר.

לכן האינטרונים גדולים יותר בדרי"כ מהאקסונים.

"Exon shuffling" - החלסת מיקומי האקסונים שאבולציונית גורם לשיפור

החלבונים.

סוגי RNA pol באאוקריוטים.

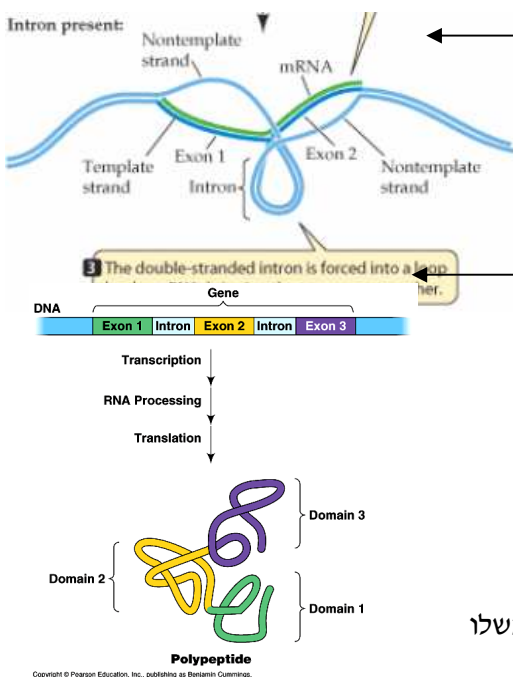
1 RNA pol - תעתוק רנ"א ריבוזומלי.

2 RNA pol - תעתוק כל הגנים מקודדי חלבון + (בקרה)

3 RNA pol - תעתוק tRNA (רנ"א קטנים).

הרנ"א באאוקריוטים הוא תמיד "מונוציסטרוני" כלומר לכל חלבון יש בקרה משלו ותרגום על ידי ריבוזום אחד. בפוליציסטרוני יש בקרה אחת לכמה חלבונים.

יצירת ה- mRNA באאוקריוטים כוללת תעתוק ועיבוד התעתיק הראשוני



- primary RNA transcript
- תהליך עיבוד I : הוספת כיפה CAP
- תהליך עיבוד II : סיום התעתוק-חיתוך והוספת זנב polyA
- תהליך עיבוד III : שיחבור

"Primary transcript" – העתק ראשוני עם ה CAP ב 5' וה poly A ב 3'.  
 ה CAP זה למעשה נוקלאוטיד G הפוך ושלושה פוספטים, חשוב לזיהוי תחילת ה mRNA מגן עליו.  
 ה polyA גם מגן על ה mRNA מתוסף בסוף התעתוק  
 "Splicing" – תהליך שחבור האקסונים על ידי spliceosome וגם  
SnRP- small nuclear Ribonucleo Protein. צבר חלבון ורני"א קטן.

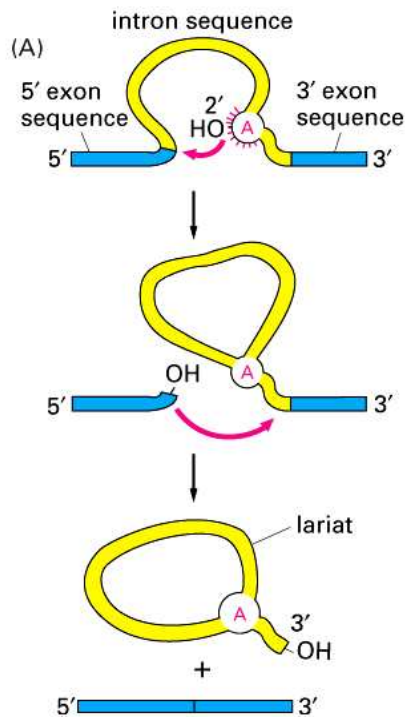
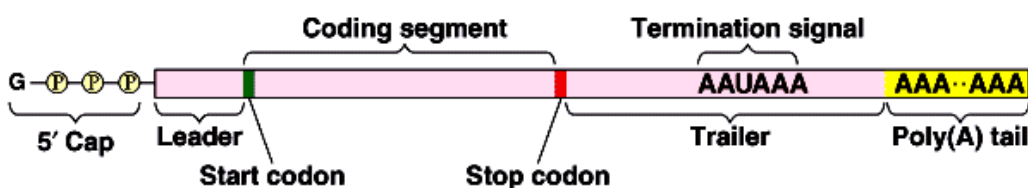


Figure 7-16 Essential Cell Biology, 2/e. © 2004 Garland Science)

כפי שניתן לראות האינטרון יוצא כלולאח.

התחלת התרגום – התת יחידה הקטנה של הריבוזום יחד עם ה  $tRNA^{met}$  גולשים על הרצף ב CAP על שמגיעים  
 לרצף AUG ואז גם התת יחידה הגדולה מתוספת  
mRNA בשל:



סיכום: התבטאות גנים המקודדים לחלבון בפרוקריוטים ואאוקריוטים

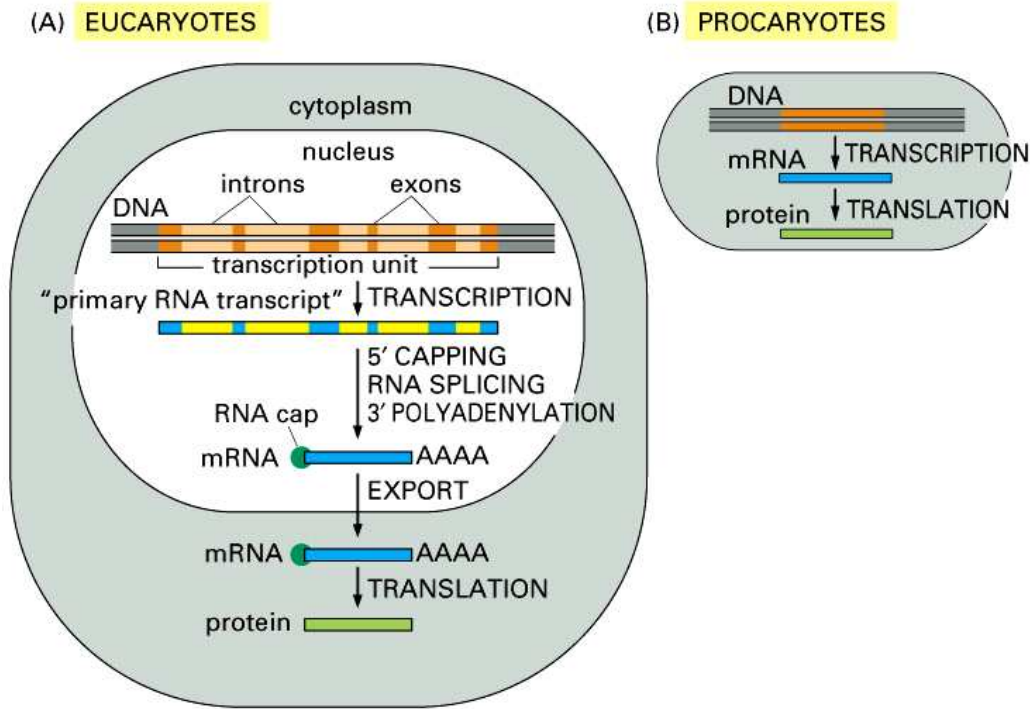


Figure 7-20 Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)

בקרת התבטאות גנים באאוקריוטים.

כל אחד מהשלבים יכול להיות בקרה. כשהחשוב מכולם הוא שלב 1.

אתחול התעתוק

קובע אם הגן מופעל או לא.

בחיידיקים הרנ"א פולימראז נקשר לפרומוטור על הדנ"א עם תת יחדיה סיגמא.

באאוקריוטים הרנ"א פולימראז לא יכול להקשר לפרומוטור, יש חלבונים מקשרים.

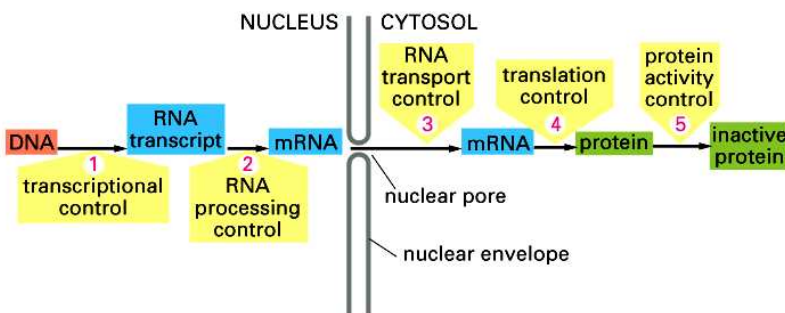
-GTF-General Transcription factor - מכלול חלבוני העזר שמקשרים את הרנ"א פולימראז לפרומוטור, מעבר

לכך יש אקטיבטורים ספציפים לגן.

"Core promoter" - איזור הפרומוטור

שקרוב לנוקלאוטיד +1 שם נקשר הרנ"א

פולימראז 2.



”Enhancer/scilencer”- איזורים רחוקים יותר בpromoters עם בקרה על הגן. את ההפרדה הזו יש רק באאוקריוטים.

בcore promoters יש רצפי הסכמה, הנפוץ מביניהם הוא tata box שגורם לכיפוף אליו מתקשר פקטור הקשרות TBP(tata binding protein).

הרנ”א פולימראז נקשר לקומפלקס הזה על ידי קשרי פוספט, תוך כדי ההקשרות, הפקטורים יורדים והרנ”א פולימרא מתחיל לפעול (בלי הפוספטים).

איך חלבוני בקרה רחוקים משפיעים על הקשרות הרנ”א פולימראז? על ידי קישור לחלבונים נוספים שמשפיעים, על ידי שינוי מבנה מרחבי של הכרומטין שמפריע להקשרות הרנ”א פולימראז. אצטילציה של היסטונים גורמת לפתיחת הכרומטין שגורם לנגישות טובה. ”Insulator” – מבדד את אזור הבקרה של האקטיבטורים/ רפרסורים. ”רמת התבטאות” – סך השפעת האקטיבטורים ורפרסורים.

”הורמונים סטרואידים”- מולקולות קטנות שיכולות לעבור את הממברנה של הגרעין, הם יכולים להקשר לחלבון בקרה בציטופלזמה ולהחדיר אותו לגרעין ולגרום להתבטאות גן. ההורמונים יכולים להעביר סיגנלים לגרעין דרך שרשרת פוספורילציות.

איך חלבוני הבקרה מזהים את הדנ”א?

לחבוי הבקרה יש רצפי ח. אמינו (אצבעות אוו zinc fingers) שנקשרים בקשר מימן חלש לדנ”א בשקע הגדול.

בקה ב RNA processing

לאחר שנוצר רנ”א ראשוני, ניתן לשנות אותו על ידי :

”alternative splicing”- שחבור שונה של האקסונים דבר שנותן מגוון חלבונים מגן אחד. דילוג על אקסונים, נקודת סיום/ התחלה שונות וכו' כל זאת על ידי בקרות שונות.

”RNA editing”- שינוי נוקלאוטיד לאחר שה mRNA סונטז. כך ניתן להפוך קודון ל stop למשל.

”Micro RNA RNAi”- רצפי רנ”א דו גדילי שיוצאים לציטופלזמה ומורידים את רמת התבטאות הגן על ידי עיכול mRNA. וגם יכול להפריע לתרגום. בד”כ קשור לגנים התפתחותיים.

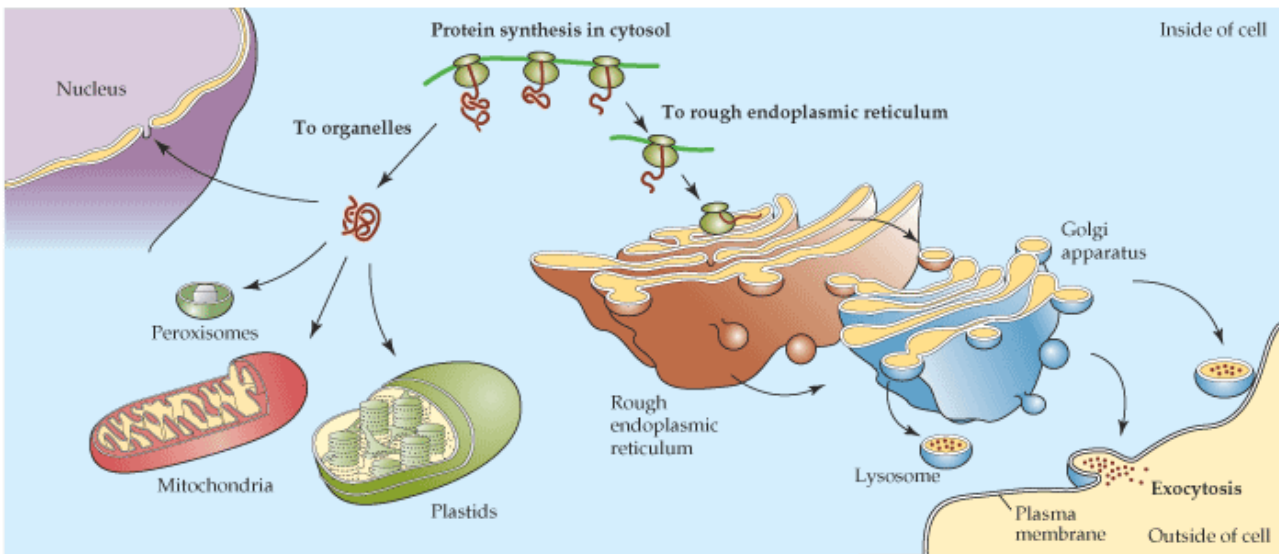
### שינויים לאחר תרגום

אחרי קבלת הפוליפפטיד בציטופלזמה הפפטיד עובר מודיפיקציות.

1. התקפלות למבנה מרחבי- שניוני/ שלישוני
2. חיתוכים פרוטאוליטים
3. קישור לקופקטורים (כמו יונים) להפעלת החלבון.
4. מודיפיקציות קוולנטיות- הוספת קבוצות סוכר, פוספורלציות, שומנים.
5. קישור תת יחידות ליצירת מבנה רבעוני.

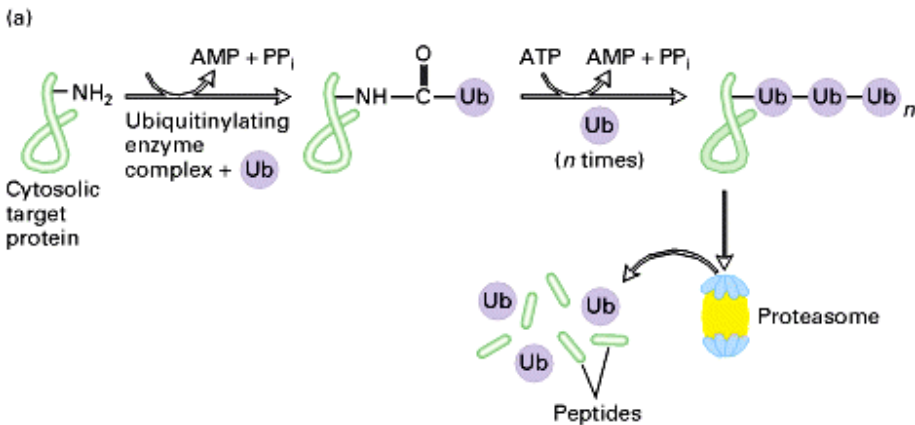


חלבונים שיוצאים מהתא יעברו ב ER ולאחר מכן בגולג'י, יש סיגנל בקצה ה N טרמינלי שמעביר את החלבון לתוך ה ER, שם החלבון עובר קיפולים וחיתוך פרוטאוליטי. חלבונים שנשארים בתא שהולכים לאורגנלות (לגרעין/ מיטוכונדריות...) נוצרים על ידי ריבוזומים חופשיים שמיצרות חלבון חופשי שנשאר בציטוזול ללא סיגנל העברה. "שפרונים chaperons" – מולקולות קטנות ששומרות על הפוליפטיד ישר עד אחרי שכולו סונטז. עוזרים גם להתקלות הפוליפטיד. מזהים קיפול לא נכון ומתקנים. השפרונים נמצאים בציטוזול, ER, אורגנלות.



מסלול פירוק החלבון בתא ubiquitin-proteasome

החלבון מזהה ubiquitin לא תקינים ומביא לפירוקם על ידי ה"פרוטאזום" שמסמן את החלבון.



**מבוא להנדסה גנטית**

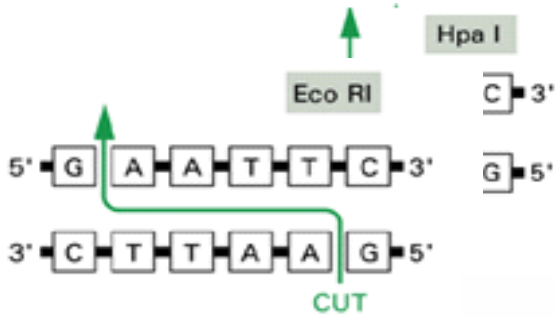
תחום של מניפולציות של דנ"א רקומביננטי, חיבור של קטעי דנ"א. "בע"ח טרנסגני" – בע"ח שהגנים שלו שונו.

אנזימי הגבלה

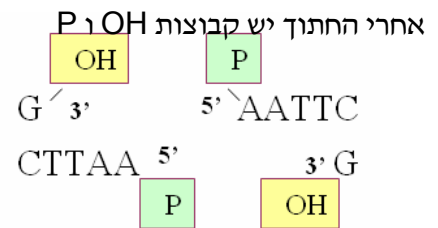
בניגוד ל exonuclease ו DNase1 שחותכים דנ"א במקומות לא ספציפיים, אנזימי הגבלה חותכים תמיד באותו רצף, "אנדונוקלאז ספציפי".



מקורם בחיידקים שונים שמגנים על הדנ"א שלהם על ידי חיתוך דנ"א זר (וירלאי). כי אין לו קבוצות מתיליות.  
 סוג 2 של אנזימי הגבלה- פעילות חיתוך ומתילציה על 2 חלבונים שונים. מכירים "אתרי הגבלה" קצרים ויחודיים.



GAATTC  
 CTTAAG

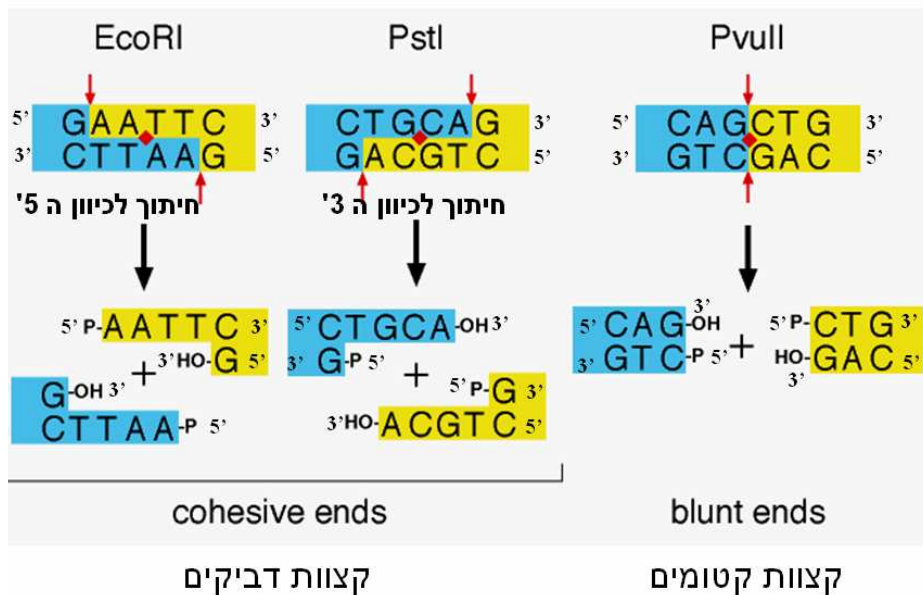


רצף "פלינדרומי" palindrome -  
 רצף זה משני צדדיו, ניתן לקרוא  
 אותו משני הצדדים, והחיתוך שומר

על ציר הסמטריה.

תהליך החיתוך היא הידרוליזה, לאחר מכן ניתן להריץ על גיל יחד עם סטנדרט כדי לדעת את גודל המקטעים. צריך לסמן קצה אחד כדי לראות, ומגיעים ל"מפת הגבלה".

## אנזימי הגבלה restriction enzymes



### חיבור קטעי דנ"א

"דנ"א ליגאז" מחבר בין הרצפים יוצר קשר פוספודיאסטר. הקטעים יכולים להסגר גם אחד עם השני בגלל הפולינדרום. גם קצוות קטומים מתחברים על ידי ליגאז, אבל לאט יותר.  
 ניתן לחבר קצה דביק לחלק על ידי הוספת נוקלאוטידים או החסרה שלהם על ידי DNase.

**"לינקרים linkers"** - רצפים קצרים שאנזימי ההגבלה מכירים כאזורי חיתוך. ניתן להזמין אותם, הם נקשרים אקראית, גם לעצמם.

**"אדפטורים adaptors"** - יש להם קצה דביק אבל עם OH'5 במקום P. צריך להוסיף **"פוספוקינאז"** שמוסיף פוספט ב 5'.

לאחר ששכפלנו את מה שרצינו ניתן להגביר את התוצאות על ידי PCR. הגברה ביולוגית.

**"Homopolymer tailing"** - יצירת קצוות דביקים ע"י הוספת קצוות GGGG ו CCCC.

### **שיבוט**

תהליך של **"הגברה ביולוגית"**. כלומר החדרת מקטע דנ"א לדנ"א של חיידק, או לפלסמיד, או לנגיפים פאגיים. נקבל מושבות של חיידקים עם אותו מקטע.

**מונחים:**

**"פלסמיד"** - מולקולת דנ"א קטנה

**"נשא vector"** - מולקולת דנ"א שמקבלת את ה"מחדר"

**"נשא רקומביננטי"** - מולקולת דנ"א יחד עם המקטע דנ"א

**"מחדר insert"** - המולקולה שנכנסת לתא המאכסן..

**"תא מאכסן"**

**"טרנספורמציה"** - הכנסת פלסמיד לתא המאכסן

**"ליגציה"** - תהליך של חיבור הנשא והמקטע דנ"א.

**"גן בורר 1"** - בורר בין חיידקים שקלטו את הפלסמיד לבין כאלה שלא כך שבלעדיו היא לא גדלה, כי בלעדי הפלסמיד הם לא עמידים לאמפיצלין.

**"גן בורר 2"** - בורר בין חיידקים שקלטו פלסמיד רקומביננטי ופלסמיד שלא קיבל את מקטע הדנ"א. איתו היא לא יכולה להגיב לחומר מסוים ואז יהיה לה צבע אחר, **"פנוטיפ"** שונה. LacZ<sup>+</sup> ו X-gal נותנים צבע כחול, אם המקטע דנ"א יכנס לתוך הגן LacZ הוא יהיה LacZ<sup>-</sup> ואז יהיה צבע לבן. לפלסמיד יש איזורים של רצפי הגבלה שמתאימים לסוגים שונים של אנזימי הגבלה.

### **PCR polymerase chain reaction**

שיטה מבוססת על ראקציה מחזורית של דנ"א פולימראז. יש "הגברה" של קטע נדרש, זו ראקציה אנזימטית. נדרש תחל לאזור הנדרש בשתי צדי הקטע, מצמידים את התחלים primers בטמפ' של 50-60 מעלות צלזיוס. לאחר מספר מחזורים יש עליה אקספוננציאלית של הקטע הרצוי. החום של הפולימריזציה נעשה בטמפ' של 95 מעלות צלזיוס, התהליך לוקח שעותיים, מריצים את המקטע על גיל ומאפיינים את הדנ"א. **אם אין הגברה יתכן ש:**

1. הקטע הוא ארוך מדי והפרוססיביות של הדנ"א פולימראז לא מספיק טוב ואז אין קטע מוגבר.
2. התחלים לא טובים.

3. התנאים לא טובים, טמפ', וכו'

4. לא הוספנו אנזים מסוים.

ניתן גם לשכפל מרנ"א על ידי הוספת רברס טרנסקריפטאז, ממנו נקבל דנ"א ואז זה אותו דבר. לפי התאמה להרצה של קטע ידוע על גיל נדע להתאים בין קטעים שונים. צריך גם להוסיף בקרה שלילית.

