

סיכומים בביולוגיה מולקולרית 2 חלק א'

בקרה גנטית

בקרה גנטית היא הבקרה על ביטוי של גנים כמו כמה עותקים של תוצר הגן היו מסונתזים ליחידת זמן. גן הוא מעקובת (Sequence) של DNA המקודד לתוצר שהוא בעיקר חלבון. יש גנים רבים שמהם מתועתק RNA אך ממנו לא נוצר חלבון. ביצורים יוקריוטים אותם גנים נמצאים בכל התאים בשני עותקים (שני אללים) אך לא כל הגנים מבוטאים בכל התאים רק חלק מהגנים מבוטאים ובתדירות שונה בכל תא.

ההבדלים בין בני אדם הם כ- 1 ל- 1500 בסיסים וזה נותן את המגוון הרב והשוני בין בני האדם.

אורגניזם	E. Coli	צמח Arabidopsis	C.elegans (תולעת)	שמרים	דרוזופילה	אדם
מס' גנים	4,391	25,700	18,266	6,144	13,358	35-40,000

מהשוואה בין המספרים של הגנים ביצורים השונים רואים שהבקרה הגנטית חשובה מאוד להבדל כיוון שהיא מאפשרת קומבינציות שונות של ביטוי.

אופרון, פרומוטור ואופרטור

בניגוד ליצורים יוקריוטיים גנים המקודדים לאנזימים בחידקים למסלול מטבולי מסוים צמודים אחד לשני על ה- DNA ולזה קוראים אופרון Operon. גנים אלו נתונים לבקרה גנטית משותפת והדוגמה בה נעסוק היא מערכת ה- Lactose Operon, במערכת זו יש 3 גנים: Lac Z המקודד ל- β Galactosidase (β Gal) שהוא אנזים המפרק קשר β בדו סוכר לקטוז ומקבלים גלוקוז וגלקטוז. Lac Y הוא חלבון β -Galactosidase שהוא חלבון ספציפי המשמש כנשא (Transporter) של גלוקוז דרך הממברנה. Lac A - 1 הנותן Transacetylase. שלושת גנים אלו נחוצים לאותו מסלול מטבולי.

לפני גנים אלו (באזור 5') יש פרומוטור המסומן ב- P ואופרטור המסומן ב- O ולפניהם את הגן Lac I שגם לו יש פרומוטור, כל המקטע הזה הוא האופרון, שלושת הגנים Lac Z, Lac Y, Lac A - 1 הם גנים מבניים Structural Genes והם Lac I הוא גן רגולטורי Regulatory Gene והוא משמש כמבקר של הביטוי לגנים המבניים שהם אלו הנחוצים למסלול המטבולי.

הביטוי של גנים אלו מתבצע תחת בקרה משותפת בשלב התחלת התעתוק של ה- RNA. ה- RNA שמתועתק מכיל את שלושת הגנים כך ש- mRNA אחד מכיל מידע לתרגום של שלושת החלבונים, ל- mRNA כזה קוראים Polycistronic mRNA. כאשר קצב התעתוק גבוהה שלושת הגנים מתועתקים בקצב גבוה אך הם מתורגמים כל אחד בנפרד, על כל AUG המפריד בין גנים אלו על ה- mRNA יש אלמנטים של תחילת תרגום.

הבקרה לא חייבת להיות של הכל או לא כלום, יכולה להיות בקרה של קצב או בקרה של שלב השיחבור אך הבקרה העיקרית היא בתחילת התעתוק. הדבר נכון גם לבקרות גנטיות אחרות ביצורים פרוקריוטיים ויוקריוטיים. ביצורים יוקריוטיים אין בדרך כלל אופרונים וכל גן הוא ביחידה נפרדת אבל גם שם יש בקרה בתחילת התעתוק. לתהליך התעתוק דרושה אנרגיה ולכן עדיף שתהיה בקרה בהתחלה כדי לחסוך באנרגיה בעת הצורך.

בקרה באמצעות רפרסור ואינדוסר

במצע ללא לקטוז החיידקים גדלים ללא צורך בשימוש ב-Lac Operon ואנו יכולים לראות כי ה-mRNA של אופרון זה כמעט ולא מתועתק (זוהי רמה בזאלית), כשמוסיפים משרן Inducer (לקטוז לדוגמה) יש עליה עצומה בריכוז ה-mRNA ותוך 6 דקות מגיעים למקסימום וכשמוציאים את המשרן אז יורד ריכוז ה-mRNA בקצב מהיר. אנו רואים כי לאחר 2 דקות נוצר האנזים β Gal כלומר ב-2 דקות הראשונות נוצר רק mRNA. הוספת המשרן מהווה סיגנל להתחלת התעתוק לאחר הוצאת המשרן יש ירידה בקצב כי לא נוצר עוד mRNA בקצב מהיר וה-mRNA הקיים מתפרק (הוא בעל זמן מחצית חיים של 3 דקות).

האופרטור והפרומוטור חופפים במידה מסוימת באופרון הלקטוז, האופרטור הוא מעקובת של DNA המהווה מתג אליו ניקשר חלבון בעל 4 תת יחידות הנקרא רפרסור Repressor (דכאן) והוא מפריע לתחילת התעתוק. באופרון הלקטוז הרפרסור הוא תוצר הגן Lac I. זוהי בקרה שלילית כיוון שכאשר החלבון קשור הוא מונע תעתוק בעוד שבבקרה חיובית קשירת החלבון מזרזת תעתוק.

הרפרסור הוא בעל מספר אתרי קישור: אחד לאופרון ואחד למשרן (Inducer) כאשר נקשר המשרן לרפרסור יורדת האפנייות שלו ל-DNA והא מתנתק ממנו מה שמאפשר את התעתוק. השינוי באפנייות נובע משינוי אלוסטרי. מודל זה נקבע על ידי ניסויים גנטיים בלבד ולאחר מכן הוכח על ידי בידוד של אזורים שונים באופרון.

את הניסויים עשו על ידי בידוד מוטציות לפי הפנוטיפ של המוטציה, קיימות מוטציות שונות באופרון הלקטוז הן בגנים המבניים והן באלמנטי הבקרה והם: פגיעה ב-Lac Z או Lac Y נותנת פנוטיפ Lac⁻ שזה אי יכולת לגדול על לקטוז מוטציה Z או Y היא רציסבית (דיפלואיד חלקי), פגיעה בפרומוטור P_{Lac} הפרומוטור לא מסוגל לקשור RNA-Polymrase אין ביטוי זהו מוטנט מסוג Uninducible, פגיעה באופרטור הנותנת O^c היא מוטציה שמונעת הכרות בין האופרטור רפרסור כתוצאה מקבלים ביטוי קונסטיטטיבי וזו מוטציה Cis-Dominant (אלמנט ציס לא פוגע בחלבון רק בקשירה שלו ל-DNA), מוטציה נוספת היא Lac I שבה הרפרסור אינו מכיר את האופרטור התוצאה היא ביטוי קונסטיטטיבי וזו מוטציה רציסבית הפוגעת באלמנט טרנס, מוטציה נוספת היא Lac I^d בה אין פעילות של הרפרסור גם כאן מקבלים ביטוי קונסטיטטיבי אך זו מוטציה דומיננטית עקב Negative Dominant/ Negative Complementation, ועוד מוטציה היא I^s שהיא איבוד אזור קישור לאינדוסר כתוצאה מכך אין העברת האפקט של קישור אינדוסר לאזור קשור ב-DNA מקבלים פנוטיפ Uninduced זוהי מוטציה דומיננטית.

כיום ידוע המבנה המפורט של אופרון זה ומרכיביו השונים וניתן ליצור מוטציות שונות ולבדוק אותם. בגנטיקה ישירה מבודדים מוטנטים ואז מוצאים את הרצפים שגורמים למוטציה זו בעוד שבגנטיקה הפוכה יוצרים מוטנט על ידי שינוי רצף ובודקים מה הוא עושה (כלומר איזה פנוטיפ מתקבל). על ידי בדיקת הרצפים רואים כי המוטציה של Lac I^d היא באזור ה-N טרמינלי בחלבון ומכאן זה האזור הנקשר ל-DNA (DNA Binding Domain) לעומת זאת המוטציה Lac I היא בין חומצה אמינית מספר 220 לחומצה אמינית מספר 300 בחלבון וזהו האזור הנקרא Oligomerization Domain והוא אחראי על קישור בין 4 תת היחידות של החלבון ומוטציה בו מונעת את התחברות תת היחידות ופעילות החלבון, בצורה זו על ידי בידוד מוטציות שונות ובדיקת הרצפים השונים ניתן וגלות Domains בחלבון.

אין זה מספיק לבצע רק סוג אנליזה אחת ולכן בודקים את האזורים הללו גם בשיטות ביוכימיות, אנו רואים כי יש התאמה כמעט מלאה בין האנליזה הגנטית לאנליזה הביוכימית. לאחר מכן בודקים את הרצפים אנו מוצאים Inverted Repits היוצרות פלינדרום לא מושלם, פלינדרום זה בעל חשיבות גבוהה כי הוא יוצר קישור טוב יותר עם הרפרסור כך ששתי תת יחידות של הרפרסור נקשרות כל אחת לחלק אחר של הפלינדרום (כיוון שהפלינדרום לא מושלם הקישור לא זהה בשני הצדדים וסימטרייה זו תואמת את הסימטרייה בחלבון) וכך עולה האפינייות והספציפיות בין הרפרסור לאופרטור.

כאשר החיידקים חיים בקרקע מזון המכילה לקטוז המשרן מוריד את האפיניות של הרפרסור לאופרטור ומתבצע תעתוק מהיר. כדי לקבוע בדיוק באיזה מודל מתרחש תהליך זה, קשירה ישירה של משרן לרפרסור או שיווי משקל, צריך לבצע אנליזה קינטית לבדיקה של זמן התנתקות הרפרסור. לאחר האנליזה התגלה כי ללא משרן לוקח 15 דקות לחצי מהרפרסורים להתנתק וזה זמן רב מדי בהשוואה לחיי חיידק ולכן אין מדובר כאן על שיווי משקל בין הרפרסור המחובר לחופשי, ולכן המודל שהמשרן מסייע לשחרור הוא הנכון.

בעזרת קריסטלוגרפיה ניתן לקבל תמונה של תת היחידה של הרפרסור, בתת יחידה זו ניתן לראות אזור חסר מבנה שהוא נקרא ציר Hinge מצדו האחד יש את ה Domain – שאחראי לקישור ל – DNA והוא נקרא Helix-Turn-Helix הוא בנוי כשני הליכסים הניצבים אחד לשני ונקשרים ב – DNA לאזור החרץ הגדול, זהו קישור ספציפי. מצדו השני של הציר יש שני מבנים גלובולריים הנקראים Core 1 – Core Domain 1 – ולאחריהם יש הליכס ארוך והוא אחראי לאוליגומריזציה כלומר לקישור בין תת היחידות. הליכס זה ניקרא Leucine Zipper כיוון שהוא מכיל חזרות של חומצת האמינו לאוצין במרווחים קבועים כך שתת היחידות יכולות להתחבר על ידי הליכס זה כמו ריץ' רץ'.

לאחר מיפוי הגנום ומציאת הרצף של 3 מיליארד זוגות הבסיסים אז מגיע שלב של Annotation שזה שלב זיהוי פרומוטורים ואתרי שחבור על ידי מציאת קטעים שמורים, זהו שלב קשה כי קיימים שינויים קטנים והחזרות ברצפים אלו לא שלמות, ולאחר מכן מוצאים מסגרות קריאה Open Reading Frames, לפי זה ניתן לראות את רצף חומצות האמינו בחלבון מסוים ולזהות מוטיבים שעל פי הם ניתן לשער את תפקיד החלבון או את דרך פעולתו.

כאשר נקשר המשרן לרפרסור מתרחש שינוי אלוסטרי בחלבון ובאזור אחר של החלבון ניתק ה – DNA, השינוי המרחבי הנגרם הוא ששתי הקבוצות של Helix-Turn-Helix משתי תת יחידות מתרחקות זו מזו ואז הם כבר לא מתאימות בדיוק לאתר הקישור ב – DNA ואז מתבצע הניתוק. ברפרסור יש עוד שתי תת יחידות המסוגלות לקשור DNA ומסתבר כי קיימים עוד שני אופרטורים ללקטוז אופרון אחד Up Stream והשני Down Stream והרפרסור ניקשר גם לאופרטור הראשי וגם לאחד מהאופרטורים הללו אך בקישור חלש יותר, כך נוצר קיפול באופרון ומעין לולאה.

קבוע האסוציאציה בין הרפרסור לאופרטור ניתן על ידי הנוסחה $K = \frac{[RO]}{([R][O])}$, ככל שגודל K גדול יותר אז הקישור חזק יותר כלומר קבוע שיווי המשקל הוא המדד לאפיניות, במקרה של הרפרסור אופרטור $K = 2 \cdot 10^{13}$ שזה קישור חזק מאוד אך חלש מקישור קולנטי כאשר ניקשר משרן לרפרסור יורד K ל – $2 \cdot 10^{10}$ שזה מספיק כדי לגרום לניתוק. הרפרסור יכול להיקשר גם לרצפים אחרים ב – DNA ושם קבוע האסוציאציה הוא $K = 2 \cdot 10^6$ שזה 7 סדרי גודל פחות.

בתאים הרפרסור יכול להיות קשור ל-DNA או לא, לכן ניתן להתייחס לתאים כ- שקים לאכסון רפרסורים וניתן על ידי נפח התא את ריכוז הרפרסורים ועל פיו ניתן לבדוק את יעילות האינדוקציה עם המשרן (אינדיוסר) בריכוזים שונים ומכן לחשב את אחוז הרפרסור הקשור. אנו יכולים לראות כי בתאים אין חוקים מיוחדים וחוקי הטבע והתרמודינמיקה פועלים גם שם.

בחידק ה-E.Coli יש כ- 10 רפרסורים, 1 קשור לאופרטור ו- 9 קשורים ל-DNA אחר, כשיש אינדוקציה בעקבות אינדיוסר מולקולות הרפרסור מתנתקות מהאופרטור ומתיישבות במקום אחר ב-DNA אנו רואים כי כאשר יש אינדיוסר כ- 99% מהאופרטורים משוחררים מרפרסור.

בחידקים קיימות מערכות אחרות בהם יש מצבים שונים לדוגמה אופרון הטריפטופן הוא בעל בקרה בעזרת רפרסור שניקרא טריפ R (TRP R) אשר הוא גם מבקר את ה-Trp aroH וה-TRP R עצמו כלומר הוא מבקר מספר תהליכי תעתוק כולל את התעתוק שלו עצמו. הבקרה העצמית פועלת בעיקרון של לולאה Loop כשיש הרבה TRP R אז הוא ניקשר לאופרטור של האופרון שיוצר אותו ומונע יצירה נוספת של TRP R.

מיקום האופרטור בגן יכול להיות שונה מאופרון אחד לשני, באופרון הלקטוז האופרטור נימצא Down Stream לנקודת התחלת התעתוק לעומתו ב-gal אופרון האופרטור נימצא Up Stream ואפילו לפני הפרומוטור. בעבר הניחו כי קישור הרפרסור הגדול מונע את התחברות ה-RNA Polymerase אך לא כך הדבר הרפרסור וה-RNA Polymerase יכולים להיות קשורים יחד ואף הרפרסור מעלה את יכולת הקישור של ה-RNA פולימראז, אך הרפרסור מעכב את התעתוק.

בקרה שלילית היא בקרה בה קשירת התרכובת הנמוך מולקולרית לחלבון משנה את מידת הקישור ל-DNA לחיוב או לשלילה בעוד שבקרה חיובית היא כאשר החלבון ניקשר ל-DNA הוא מזרז תעתוק גם כאן יש שני אפשרויות הקשורות לתרכובות הנמוך מולקולרית כך שעצם קשירת לחלבון מזרזת את קשירתו של החלבון ל-DNA או שניתוקה מהחלבון הוא זה שמעלה את יכולת החלבון להיקשר ל-DNA.

חידקים ניתנים לגידול בתנאים שונים על קרקעות מזון שונות עם מלחים בופרים ומקור פחמן, כשמגדלים חידקים בקרקע מזון של גלוקוז ומוסיפים לקטוז אז האינדוקציה של אופרון הלקטוז לא יעילה, אך כשמגדלים את החידקים על מקור פחמן אחר כמו סוקצינט (חומצה סוקצינית) ומוסיפים לקטוז מקבלים אינדוקציה גדולה של אופרון הלקטוז. מכאן הגלוקוז או אחד מתוצרי הפרוק שלו מעכבים את התעתוק של אופרון הלקטוז, לדבר זה Catabolite Repression וזוהי בקרה חיובית כיוון שבתאים של חידקים קיים חלבון שנקרא CAP וכדי שיתרחש תעתוק ברמה גבוה צריך שגם הוא היה קשור לאופרון, הקשר לגלוקוז הוא בזה שחלבון זה צריך את התרכובת הנמוך מולקולרית cAMP כדי שיוכל להיקשר ל-DNA והימצאות גלוקוז מורידה את ריכוז ה-cAMP בתא. בקרה חיובית זו באה בנוסף לבקרה השלילית של הרפרסור והאינדיוסר.

חלבון ה-CAP מורכב משתי תת יחידות ולכן הוא נקשר טוב יותר לאתר עם Inverted Repeats, במקרה זה החזרות לא מושלמות וחוף ממספר נוקלאוטידים הנחוץ לקישור לא משנה אלו בסיסים היו חשוב רק שמספרם לא ישתנה. קישור ה-CAP לאתר שלו גורם לכיפוף ה-DNA ב-90° וכיפוף זה חשוב לתעתוק, את זה בדקו על ידי יצירת DNA מכופף במקום זה ב-90° וקיבלו פעולה הזזה למצב בו ה-CAP קשור.

בקרת סטרינג'נט (בקרה מחמירה) Stringent Control

לחיידיקי E.Coli יש את כל האנזימים ליצירת חומצות אמינו אך ניתן ליצור חיידק עם פגיעה מכוונת באחד ממסלולי היצירה של חומצה אמינית מסוימת לזה קוראים Auxotroph. כשגידלו חיידקים כאלו בקרקע מלאה ואז העבירו אותם לקרקע בה חסרה החומצה האמינית שהם לא יכולים ליצור נעצרה סינתזת החלבונים והתאים הפסיקו להתרבות, מתברר כי אותם חיידקים מיד עם המעבר הפסיקו ליצור RNA לסוגיו השונים ובעיקר tRNA ו- rRNA כתוצאה מכך החיידקים חוסכים אנרגיה ומונעים הצטברות של RNA.

את התופעה הזו גילו על ידי מוטנטים שהיו אוקסטרופיים של חומצה אמינית מסוימת אך יצרו RNA ללא הפסקה לחיידקים אלו קוראים Relaxed בניגוד ל- Stringent שזה הסוג שמפסיק את פעולתו (ה- Stringent הוא ה- Wild Type) לגן המוטנט קוראים Rel.

מסתבר שבחיידקים (אך לא בתאים יוקריוטיים) יש תרכובות Magic Spots והם: ppGpp ו- pppGpp כלומר פוספטים גם בצד ה- 3' וגם בצד ה- 5' של הגואנין. מסתבר שתרכובות אלו מעכבות את סינתזת ה- RNA, תרכובות אלו לא מצויות בחיידק ה- Relaxed. האנזים Stringent Factor (או ppGpp Syntase) הוא זה שיוצר את תרכובות אלו מ- GTP ו- ATP (pppGpp) או מ- pppGpp שמאבד פוספט (ppGpp).

בזמן סינתזת החלבונים החיידק חש בקיום של tRNA לא טעון ואז שמגיעים בסינטיזה לקודון של אותה חומה אמינית שחסרה התהליך נעצר, למצב בו קשור ה- tRNA הלא טעון קוראים Ideling וכתוצאה מכך משופעלים ה- Stringent Factors ומתחילה סינתזה של pppGpp ו- ppGpp. הגן המקודד לאנזים זה הוא Rel A.

בקרה בתרגום

סוג בקרה נוסף על ביטוי גנים הוא בשלב התרגום לחלבונים, אך בקרה זו פחות משמעותית. היא מתרחשת בתאים פרוקריוטיים ויוקריוטים בבקרה זו קיים mRNA והוא מתורגם ביעילות גבוהה או נמוכה, באואוציט Oocyte (הביצית הלא מופרת) שם יש ריכוז mRNA גדול אך הוא לא עובר תרגום עד ההפריה ואילו לאחריה הוא מתורגם. לאתר הקישור של הריבוזום ל- mRNA יכול להיקשר חלבון בקרה המונע את החיבור בין הריבוזום ל- mRNA.

כשעל אותו mRNA יש שני אתרי קישור לריבוזום אז ה- mRNA מתקפל במבנה שניוני מסובך כך שה- AUG השני נמצא בתוך אתר של קיפול ונוצר מצב הדומה ל- Heir Pin המונע את קישור הריבוזום. הריבוזום במקרה זה ניקשר ל- AUG הראשון ושהוא מגיע לאזור המקופל שבו ה- AUG השני ואז יש קודון עצירה ומשתחרר החלבון הראשון תוך כדי תנועת הריבוזום משתחרר ה- AUG השני מהקיפול ומתאפשרת קשירת ריבוזום אליו ותרגום של הגן השני.

גם באופרונים של חלבונים המשתתפים בביטוי גנים וגם באופרונים של חלבונים ריבוזומלים יש בקרה ברמת התעתוק והתרגום. לדוגמה הגן SB שהוא של התת יחידה הקטנה של הריבוזום והוא מבקר את LS שנימצא על אותו אופרון. בנוסף לזה קיימת גם בקרה עצמית לדוגמה החלבון L10 מעקב את עצמו לבקרה כזו קוראים בקרה אוטוגנית.

כשחיידיקים חיים בקרקע עשירה הם יוצרים rRNA וחלבונים ריבוזומליים בקצב מהיר, כאשר הם מועברים לקרקע מזון חסר יורד קצב יצירת ה-rRNA ולאחר מכן מואט גם קצב יצירת החלבונים הריבוזומליים על ידי כך שהעודף שלהם שנוצר מעכב את המשך יצירתם. בתאים כמעט ואין חלבונים ריבוזומליים חופשיים. ביצורים יוקריוטיים יש כמות ריבוזומים שונה בכל רקמה כיוון שלכל רקמה יש דרישות משלה ליצירת חלבונים.

בקרת אתנואציה (דיכוי) Attenuation

יש שני סוגים של סיגנלים לעצירת תעתוק (בחיידקים), הראשון אינו דורש חלבון נוסף לפעולתו והוא מבנה של Heir Pin אשר גורם להפסקת התעתוק, מבנה זה נוצר ב-RNA ומיד לאחריו יש מעקובת של U (מספר U בין 6 ל-10 ברצף) מעקובת זו חלשה בקשרי מימן בהשוואה לבסיס ה-Heir Pin העשיר ב GC, סוג זה של עצירה נקרא Intrinsic Terminators. חלק מהאתר העוצר מתועתק ל-RNA והעצירה מתבצעת בשרשרת הקצרה של הפולי U.

הסוג השני הוא אתר עצירה המשתמש בחלבון הנקרא ρ וסוג העצירה ניקרא על שמו ρ Dependent Terminators. החלבון ρ הוא RNA ליקאז והוא גורם לפתיחה של היברידים בין RNA ל-DNA.

הבקרה היא ברמה של עצירה היא יכולה להיות באתר העצירה או בסוף האופרון אם אין אתר עצירה, כלומר יכול להיווצר אתר עצירה או להעלם בהתאם לנדרש. הדבר התגלה באופרון הטריפטופן המקודד למספר אנזימים למסלול מטבולי של טריפטופן, במקרה זה הטריפטופן הוא גם התרכובת הנמוך מולקולרית לרפרסור כך שקשירה מונעת תעתוק על ידי העלאת האפיניות של הרפרסור ל-DNA (בקרה שלילית). באופרון זה לאחר הפרומוטור והאופרטור יש אזור הנקרא לידר Leader ואחריו אתנואטור. כשעשו Deletion לחלק זה קיבלו פעילות מוגברת פי 500 בהעדר טריפטופן מאשר עם טריפטופן (כשיש טריפטופן יש סינתזה באזלית). כאשר משווים עם מוטנט ללא אזור זה רואים כי הרמה הבאזלית גדולה פי 10 מהחיידיק הנורמלי.

בקרת האתנואציה היא כשאינן טריפטופן ה-RNA פולימראז מתחיל בתעתוק וממשיך עד סוף האופרון וכשיש טריפטופן ה-RNA פולימראז נעצר באתר האתנואטור, מכאן בנוכחות טריפטופן אתר זה משמש כאתר עצירה. באתנואטור יש Invert Repeats ב-4 מערכות ברמת ה-RNA והם יוצרות את ה-Intrinsic Terminator שלאחריו יש רצף של U, החזרות לא מושלמות ויכול להיות מצב בו 1 ו-2 יצרו Heir Pin וגם 3 ו-4 יצרו Heir Pin שמיד לאחריו רצף ה-U וזהו המעצור או ש-2 ו-3 יצרו Heir Pin ואז זה לא אתר עצירה.

ה- Leader הוא אזור בין האופרטור לאתנואטור ובו נוצר פפטיד קצר בין 10 ל-20 חומצות אמינו, ברצף זה יש AUG בהתחלה וקודון סיום בסוף, בנקודה מסוימת על רצף זה יש שני קודונים רצופים של טריפטופן, כיוון שהתרגום מתבצע ב-Coupling (בו זמנית עם התעתוק מתרחש תרגום באותו קצב של 45 בסיסים בדקה = 15 חומצות אמינו לדקה) אז כאשר יש מחסור בטריפטופן התרגום של הלידר נעצר. עצירת הריבוזום גורמת לחסימה של אלמנט 1 באתנואטור ואלמנטים 2 ו-3 נקשרים ואז אין עצירה של התעתוק, בעוד שכאשר יש טריפטופן התרגום של הלידר ממשיך וזה גורם לחסימה של אלמנטים 1 ו-2 של האטנואטור ואז אלמנטים 3 ו-4 יוצרים Heir Pin ומקבלים אתר עצירה.

מערכת בקרה בתאים יוקריוטים

גם ביצורים יוקריוטים הבקרה העיקרית היא בשלב תחילת התעתוק מה DNA – ל RNA כך נימנע בזבז מיותר של אנרגיה בתא. התעתוק בתאים יוקריוטים דומה לזה שבחיידקים, בזמן תחילת התעתוק נוצרת בועת תעתוק Transcription Babel וממנה מתחיל התעתוק אך על אף דמיון זה יש הבדלים ניכרים בתחילת התעתוק.

התעתוק ביוקריוטים מתחיל בפרומוטור כמו בחיידקים, בתאים יוקריוטים יש 3 סוגי RNA פולימראזות ולא אחת כמו בפרוקריוטים, בנוסף ביוקריוטים יש מספר רב יותר של Consensus Elements ולכל אחד מהם נקשר חלבון באופן ספציפי חלבונים אלו הם ה- Transcription Factors, בנוסף קיים אלמנט הנקרא Enhancer והוא יכול להימצא גם במרחק של כ- 1000 נוקלאוטידים לפני הפרומוטור.

כל שלושת הסוגים של ה- RNA פולימראזות בנויות מיותר תת יחידות מה- RNA פולימראז הפרוקריוטי שזה 10-12 תת יחידות שונות כל תת יחידה היא חלבון שונה. שלושת התת יחידות הגדולות מהוות את ליבת ה- RNA הפולימראז והם הומולוגיות לאלו של ה- RNA פולימראז הפרוקריוטי. בתת היחידה הגדולה יש מבנה הנקרא CTD (Carboxy Terminal Domain) שזה רצף של חומצות אמינו החוזר על עצמו 1 פעמים בשמרים עד 20 פעם ביצורים מפותחים יותר, רצף זה הוא בעל חשיבות לבקרה. חלק מתת היחידות הקטנות זהות בכל ה- RNA פולימראזות, חלקם משמשות לבקרה וחלקם לקטליזה.

ה- RNA פולימראז 1 מתעתק גנים הקשורים ל- rRNA וזה יכול להגיע למאות גנים שונים הוא נמצא בגרעינון, ה- RNA פולימראז 2 מתעתק Nuclear RNA שזה RNA ליצירת חלבונים כלומר רוב הגנים והוא נמצא בגרעין ובו נעסוק, ה- RNA פולימראז 3 מתעתק את סוגי ה- RNA הקצרים כמו ה- rRNA ורצפים קצרים של rRNA ומולקולות RNA קצרות בעלות תפקידים שונים כמו שיחבור וגם הוא מצוי בגרעין של התא.

קיימות מספר שיטות למיפוי רצף DNA בתאים, כשרוצים רצף השייך לפרומוטור מבצעים Cloning לאזור בו הוא נמצא ואת הפרגמנט המתקבל מכניסים לפלסמיד המכיל גם Reported Gene, הפלסמיד מוחדר לתא יוקריוטי ולא לתא פרוקריוטי, הפרגמנט המכיל את הפרומוטור גורם לביטוי של הגן המדווח שהוא הגן שהוסף ואינו נמצא בתאים מהם נילקח הפרגמנט. אנו מקצרים את הפרגמנט שלנו משני הקצוות ומבצעים סידרה של ניסויי החדרה לפלסמידים ובדיקת התוצאות עד מציאת המקטע המינימלי שגורם לביטוי הגן המדווח, בכל בדיקה אנו גם עוקבים אחרי קצב יצירת החלבון של הגן המדווח שהוא זהה לקצב התעתוק של גן זה.

הפרומוטור המינימלי Minimal Promotor הוא אזור ב- DNA המכיל גם את נקודת התחלת התעתוק, את המקטע Inr הכולל את הרצף Py2CAPy5 כך שה- A הוא נקודת תחילת התעתוק כלומר +1 ואת ה- TATA Box שהיא מעקובת של 8 ± 2 זוגות בסיסים ומכיל רק את הבסיסים A ו- T אך לא בהכרח ברצף TATA.

הפרומוטור המינימלי מכיל פחות מ- 50 זוגות בסיסים וזה נותן רמת תעתוק נמוכה כלומר קצב התעתוק הוא הקצב הבאזלי והוא איטי מידי לפעילות התא התקינה, בכדי שהתעתוק היה מהיר צריך רצפים שנמצאים לפני הפרומוטור המינימלי.

הפולימראזות לא נקשרות ישירות ל- DNA בתאים יוקריוטים בניגוד לתאים פרוקריוטים, בכדי שהיה קישור צריכים להתחבר קודם General Transcription Factors

אשר נקשרים ל-DNA חומרים אלו נקראים TF_{II}D (Transcription Factor של RNA פולימראז 2), TF_{II}A וכו', ה-TF_{II}D הוא קומפלקס של מספר חלבונים רב שהחשוב ביותר הוא TBP שהוא תת יחידה קטנה יחסית (כ-30,000 דלטון) ובנוסף יש חלבונים הנקראים TAF'S (TBP Associated Factors).

ה-TBP נקשר ל-TATA Box ואילו קשורים ה-TAF'S, חיבור של TBP ל-DNA במבחנה יוצר Cocrystal שזה גביש של DNA והחלבון. ה-TBP גורם לכיפוף של ה-DNA הנחוץ לקשירה נכונה של פולימראז, ה-TBP ניקשר לחריץ הקטן ב-DNA ועל ידי הרחבתו נוצר הכיפוף.

לאחר שניקשר ה-TF_{II}D ל-TATA Box ניקשר ה-TF_{II}A ואחריו ה-TF_{II}B, רק ה-TF_{II}D יכול לזהות את ה-DNA ושאר הפקטורים לא יתחברו ל-DNA בלעדיו. ה-TF_{II}A ו-TF_{II}B נקשרים גם ל-DNA אך הקישור ל-DNA הוא בצורה לא ספציפית.

ה-TF_{II}F ניקשר ל-RNA פולימראז וביחד הקומפלקס נקשר לפקטורים שקשורים ל-DNA, אך עדיין אין תעתוק עד הצטרפותם של פקטורים נוספים שהם TF_{II}E, TF_{II}J ו-TF_{II}H. ה-TF_{II}H הוא בעל יכולות של הליקאז קינאז ו-ATPase (כל ההליקאזות הם גם ATPase-ות). הפקטור TF_{II}H מבצע שינוי ב-CTD, שינוי זה הוא פוספורימציה של שיירי סרין וטירוזין בחזרות של ה-CTD. כתוצאה מכך מתקבל מטען שלילי גבוהה וזה מסייע ל-RNA פולימראז להתנתק מנקודת ההתחלה ולהתחיל בתעתוק, בנוסף ה-TF_{II}H עוזר לפתיחה של הסיבים של ה-DNA אך הוא לא פותח את הסיבים באלוונגציה אלא רק בהתחלת התעתוק.

הפרומוטורים ביצורים יוקריוטים הם לא רק הפרומוטור המינימלי, קיימות מעקובות נוספות באזור Up Stream שמסיעות לתפקוד מהיר יותר. את האלמנטים הללו גילו בניסוי עם גן של גלובין, הניסוי נערך על ידי חיבור של פרגמנט של הפרומוטור המכיל 150 נוקלאוטידים בפלסמיד ויצירת מוטציות נקודתיות בכל פרגמנט בבסיס אחד בלבד, כך על ידי סידרת ניסויים קיבלו את השפעתו של כל נוקלאוטיד וכל רצף נוקלאוטידים בפרגמנט על קצב התעתוק.

תוצאות הניסויים הראו כי מוטציות באזורים רבים לא שינו כלל ומכאן אזורים אלו לא משפיעים על התעתוק, אבל מוטציות באזורים מסוימים כן שינו, המוטציה הראשונה ששינתה היא הנוקלאוטיד +1 שהוא הנוקלאוטיד הראשון של התעתוק והשפעתו היא בהורדת הקצב, מוטציות בכל אחד מבסיסי ה-TATA Box גם הורידו את קצב התעתוק, הירידה היא לא של 100%. גם מוטציות באזור ה-CAT Box ו-CG Box גורמות לירידה בקצב התעתוק.

ישנו רצף אחד שמוטציה בו גורמת לעליה בקצב התעתוק, כלומר מעקובת זו של 12 נוקלאוטידים גורמת בדרך כלל להורדת קצב התעתוק כל ידי מעכב שנקשר באזור זה והמוטציה שמונעת את קשירתו גורמת להגברת קצב התעתוק, אנו רואים כי הפרומוטור היוקריוטי הוא בעצם אוסף של מעקובות והתעתוק מושפע מפקטורים שונים הנקראים Transcription Factors שפועלים בנוסף ל-General Transcription Factors.

לכול פרומוטור יש אלמנטים שמורים כאלו שמסודרים ברמה שונה, לא לכל פרומוטור יש את כל הרצפים, קיימים רצפים הנמצאים ברוב הפרומוטורים אך לא בכולם, גם הסדר של הרצפים משתנה אך בדרך כלל הוא בתחום של עד 200 נוקלאוטידים מנקודת התחלת התעתוק. השוני הוא מה שמסייע לבקרה של מה יתועתק ובאיזה קצב, לדוגמה בין אדם לקוף השימפנזה יש הבדל גנומי מזערי אך

ביטוי תאים במוח ובאברים אחרים שונה במידה ניכרת וזאת כיוון שבקרת הביטוי שונה.

אורך המקטעים השמורים הוא כ- 10-7 נוקלאוטידים אך אין זה אומר שרק לאזור זה ניקשר החלבון, נכון לומר שהחלבון ניקשר לאזור זה בצורה ספציפית אך יתכן קישור לא ספציפי והוא מתרחש עם הסביבה הקרובה, לדוגמה ב- CAAT BOX יש 9 זוגות נוקלאוטידים ברצף השמור אך יש סביבה של 22 זוגות נוקלאוטידים הכוללת את הרצף ובסיסים נוספים משני הצדדים שאליו ניקשר החלבון (ל- 9 זוגות בסיסים מתוך ה- 22 יש קישור ספציפי). לאזור זה קוראים DNA Bound ואין זה משנה אילו נוקלאוטידים נמצאים בו (מלבד הרצף השמור שבו יש קישור ספציפי ולכן חשוב סוג הנוקלאוטידים) אלה מספרם.

בכדי שהיה תעתוק צריך להיות שינוי בכרומטין, שינוי זה הוא שינוי של פרוק נוקלאוזומים בכדי לאפשר גישה ל- DNA. בקיפודים יש באשכים ביטוי של גן הנקרא H2B בעוד שבעובר של קיפודים אין ביטוי של גן זה, הסיבה לכך היא פקטור הפועל כרפרסור ונקרא CDP הוא נקשר לאלמנטים באזור של עד 200 נוקלאוטידים Up Stream ומונע קישור של פקטורי תעתוק ובכך הוא מונע את התעתוק של הגן H2B.

אלמנט נוסף הוא ה- Enhancer הוא מורכב משני רצפים של 72 זוגות בסיסים והורדתו גורמת לירידה ניכרת בתעתוק, הוא התגלה ב- SV40 (וירוס הגורם לסרטן בקופים) בגן שאחראי ליצירת מעטפת הוירוס שאמורה להיות מבוטאת במהירות רבה, בהמשך הזמן התגלו גם Enhancers בגנים אחרים וגם באדם. ה- Enhancer הוא אלמנט ניפרד מהפרומוטור אך בניהם יש דמיון כיוון ששניהם בנויים מסדרה של רצפים שמורים הקושרים פקטורי תעתוק (אפילו רצפים זהים בשניהם אך ללא חפיפה מושלמת), ההבדל בניהם הוא שה- Enhancer יכול לפעול גם ממרחקים שונים בגנום (ב- SV40 המרחק יכול להגיע לכ- 2000 נוקלאוטידים Up Stream או Down Stream) ובאינטרקציה שונה.

ה- Enhancer לא חייב להיות קשור לגן אחד הוא יכול לזרז תעתוק של פרומוטורים שונים ולכך חשיבות גדולה במחלת הסרטן שם האונקוגנים שהם גנים שתוצרים גורמים לכך שתאים נורמלים הופכים לסרטניים, לאחר טרנסלוקציה יתכן כי Enhancer שהגיע מכרומוזום מסוים נמצא כעת ליד גן זה ובכך גורם לשפעולו וליצירת תא סרטני. חשוב לציין כי ה- Enhancer אינו מסוגל לפעול בו זמנית על יותר מפרומוטור אחד.

פעולת ה- Enhancer היא על ידי אינטרקציה של חלבונים (פקטורי תעתוק) לפקטורים הקשורים לפרומוטור וכך על ידי אינטראקציה של חלבון לחלבון מוגבר התעתוק, האנטראקציה נוצרת על אף המרחק וזאת על ידי קיפול ה- DNA כך שהפרומוטור וה- Enhancer נמצאים זה ליד זה.

ניתן להכניס פרומוטורים יוקריוטים לתאים פרוקריוטים אך לא להפך כיוון שהפרומוטור הפרוקריוטי לא יביא לביטוי בתא היוקריוטי, בחיידק ה- E. Coli הקוד הגנטי דומה לקוד האנושי אך בריסניות לדוגמה יש מספר קודונים המבצעים תרמינציה בעוד שבאדם הם מביעים התחלה או חומצות אמינו שונות.

פקטורי התעתוק הם בדרך כלל מודולרים ומורכבים ממספר Domains שלכל אחד תפקיד אחר, קיימים בדרך כלל 2 Domains האחד הוא האזור שקושר DNA והוא נקרא DNA Binding Domain (DBD) והשני הוא האזור שאחראי על האקטיבציה Activation

DBD – (AD) Domain Gal4 הוא פקטור תעתוק בשמרים, כאשר מחליפים את אתר ה- Gal4 של LaxA אז החלבון שנוצר פעל רק כאשר הוחלף הרצף השמור מרצף שמתאים ל- Gal4 לרצף שמתאים ל- LaxA.

בכדי שהאקטיבציה תתרחש חייב להיות קישור בין הפקטור ל- DNA וזאת כיוון שריכוז הפקטור קטן מאוד ולא מספיק כדי לגרום אקטיבציה ללא הקישור ששם אותו במקום הנכון ובכך לאקטיבציה. ללא אזור ה- DBD צריך ריכוז גבוה של AD כדי שתהיה אקטיבציה.

הבקרה על התעתוק ביצורים יוקריוטים לא מסתיימת בזה, קיים סוג נוסף של חלבונים והם CoActivators שהם קומפלקסים חלבוניים שיכולים להשפיע על חלבונים רבים, חלבונים אלו לא פועלים ישירות על התעתוק והם לא נקשרים בעצמם לחלבונים של הפעילות הבאזלית אלא על ידי חלבונים נוספים המקשרים ביניהם, ל- CoActivators יש פעילות אנזימטית כמו Acetyl Transferase הגורם לאצטילציה של היסטונים המרכיבים את הנוקלאוזום ובכך לפתיחת מבנה הכרומוטין.

RNA Splicing

גנים בתאים יוקריוטים בדרך כלל לא רציפים והם נקראים Interrupter Genes הם מורכבים מינטרונים ואקסונים, יחידת תעתוק Transcription Unit היא מעקובת DNA מהפרומוטור עד לאזור הטרמינציה זה כולל גם גנים ללא מקטעים וגם גנים בעלי מקטעים.

בכדי לבדוק איזה סוג RNA מסונתז בתאים בפרק זמן מסוים מבצעים את הניסוי הבא, לקחים תאים ומוסיפים להם U רדיואקטיבי למספר דקות ואז בודקים את איזה סוג RNA מסונתז, אנו רואים כי יש פיק חד של יצירת rRNA כיוון שכל המולקולות זהות, אך יש פיק נמוך יותר ורחב יותר והוא כתוצאה של Heterogeneous Nuclear RNA (hnRNA) הפיק רחב כיוון שהמולקולות שונות (באורכים שונים מגנים שונים).

כל ה- mRNA נוצר מעיבוד hnRNA, כל חומצות הגרעין בתא נמצאות במצב קשור לחלבונים וכך גם ה- hnRNA וה- mRNA. ה- mRNA נוצר לאחר התעתוק של כל יחידת התיעתוק כיחידה אחת המכילה את כל האינטרונים והאקסונים, בשלב הבא יש תהליכי עיבוד הכוללים CAPing שזה גוונין שעבר מטילציה ומחובר הפוך בתחילת ה- RNA, לאחריו יש הוספה של פולי A ללא תלות בתבנית (Template) ולאחר מכן Splicing שזה שיחבור של ה- RNA כך שהאינטרונים מוצאים והאקסונים מתחברים ליצירת ה- mRNA. קיים גם תהליך של Editing שהוא החלפה של בסיסים שונים ועל מנגנון זה לא נדבר.

גנים שונים יכולים להכיל כמויות שונות של אינטרונים ואקסונים ואורכם יכול להשתנות במידה רבה, אורך האינטרונים בדרך כלל גדול מהאקסונים. ה- mRNA עובר לציטופלזמה דרך ה- Nuclear Pores שהם נקוביות בגרעין התא דרכם עובר ה- mRNA במעבר אקטיבי.

בין החיבורים של האינטרונים והאקסונים יש רצפים שמורים, הדבר הכרחי לשיחבור כיוון שטעות בנוקלאוטיד אחד תשנה את מסגרת הקריאה. הרצפים השמורים הללו מאוד קצרים שהמרכיב הראשי שלהם הוא GT-AG Rule כך שבאזור 5' של האינטרון יש GT ובצד ה- 3' יש AG ואלו נמצאים ב- 100%. בנוסף לרצפים אלו יש מנגנון מורכב.

הסדר לביצוע השיחבור כאשר יש מספר אינטרוניים ואקסונים לא קבוע אך יש סדר מועדף, כלומר המצב לא רנדומלי לחלוטין, את זה ניתן לבדוק על יד הרצה בג'ל של ה-RNA, אנו רואים שאין רצף אחיד מה שהיה מתקבל במצב הרנדומלי אלה יש מספר נקודות בולטות ואלו מסמנות את האפשרויות המועדפות.

יש מספר מנגנוני שיחבור, ל-eRNA יש מנגנון שחבור שונה עליו לא נדבר. מנגנון השחבור העיקרי הוא המנגנון המוביל ליצירת mRNA, השחבור במנגנון זה מתבצע בשני שלבים עיקריים, באינטרון יש רצף שמור שנימצא כ-30 נוקלאוטידים Up Stream מהקצה 3' (ליתר דיוק זהו רצף קבוע בשמרים ואילו ביצורים יוקריוטים מפותחים יותר זה רצף שמור). ברצף זה יש נוקלאוטיד A אשר בעזרת קבוצת ההידרוקסיל שלו הוא תוקף באזור ה-GU ב-5' של האינטרון, ריאקציה הטרנס-אסטרפיקציה הזו גורמת לניתוק האינטרון מהצד 5', בשלב זה מתקבל תוצר ביניים בצורת Lariat אשר הצד 5' של האינטרון קשור לפחמן 2' של ה-A ברצף השמור שזה נקרא Branch Site.

בשלב השני יש חיתוך של האינטרון בצד 3' ומשתחרר ה-Lariat ונוצר חיבור בין האקסונים, מבחינה כימית ה-OH מהאקסון הראשון שנוצר מהחיתוך הוא זה שתוקף את הקשר בצד ה-3' של האינטרון ומתחבר במקומו ומשתחרר האינטרון. את הפעולות הללו מבצע מנגנון אינזימטי מסובך המורכב מקומפלקס גדול המזהה את הרצפים השמורים ב-RNA (הקומפלקס הזה לא מזהה DNA).

אחד המרכיבים בקומפלקס הזה הוא U1 snRNA ה-sn הוא Small Nucleus (spRNA) מקטעי RNA קטנים (בציטופלזמה) ה-snRNA קשורים לחלבונים כמו כל חומצות הגרעין ושהם קשורים הם נקראים snRNPs, ה-snRNPs הם אנזימים המכילים RNA וחלבון. ל-U1 snRNA יש מבנה שניוני ספציפי הנוצר מ-Heir pins ומבנה שלישוני מיוחד הנוצר על ידי קיפולים שונים, בקצה ה-5' של ה-U1 snRNA יש אזור חד סיבי שנמצא מחוץ למבנה והוא קומפלימנטרי לפחות בחלקו לרצף הקרוב ל-GU בצד ה-5' של האינטרון ויכולה להיווצר בניהם היברידיזציה אשר חשובה לשם השחבור.

כאשר עשו ניסוי ושינו את הרצף באינטרון אז הפקטור הזה לא ניקשר ולא היה שחבור לאחר מכן עשו מוטציה מפצה Compensatory Mutation שזה מוטציה בפקטור כך שהרצף החופשי שבו יתאים לרצף שהועבר מוטציה באינטרון ואז היה שחבור. ה-U1 snRNA הוא מרכיב אחד הנקשר באזור ה-5' של האינטרון אך הוא לא היחיד.

באזור ה-3' של האינטרון יש רצף של פוליפרימידינים ואליו ניקשר הפקטור U2AF וללאסו ניקשר פקטור נוסף שהוא U2. הפקטורים הללו נקשרים ל-RNA ויוצרים קומפלקס. באנליזה הביוכימית ניתן לגלות את סדר התחברותם ואת האינטרקציות בניהם לשם יצירת הקומפלקס. הקומפלקס הוא דינמי וחלק מהפקטורים יורדים בשלבים שונים של קיומו. בשלב מסוים דרושה הידרוליזה של ATP לצורך הקישור של הפקטורים, השבור עצמו לא זקוק לאנרגיה חיזונית. הקומפלקס השלם שנוצר ניקרא Splicesome.

שחבור אלטרנטיבי Alternative Splicing

יתכן שהיו מספר אפשרויות שיחבור שונות כלומר האקסונים יכולים להתחבר בסדר שונה מהנורמלי ואז נקבל חלבון אחר, יתכן גם שהאינטרון היה מחולק למספר חלקים ובשיחבורים שונים יצאו ממנו חלקים שונים. לתופעה זו חשיבות רבה כך ניתן לקבל יותר חלבונים מאותו מספר גנים כך שכל חלבון שנוצר מצורה שונה של שיחבור ישמש לתפקיד אחר.

Catalytic RNA קטליטי RNA

כאשר ביצעו ניסוי בו לקחו את ה-RNA עם הפקטורים כדי לבדק שיחבור וכביקורת שמו RNA ללא הפקטורים, התוצאות היו הפתעה כיוון שה-RNA שהיה לבדו בביקורת ביצא שיחבור ללא הפקטורים וזהו השיחבור העצמי Self Splicing הוא לא מתרחש ב-RNA גרעיני אלא ב-rRNA. כדי ששחבור עצמי יתרחש צריך שהיה בתמיסה יונים חד ערכיים ו-G-OH בצד ה-3' צריך להכיל פוספטים (pG-OH, ppG-OH).

הכימיה של התהליך היא על ידי טראנסאסטרופיקציה כך שה-G-OH תוקף את הקשר הפוספודיאסטרית בצד ה-5' של האינטרון ומתחבר אליו, כשהאקסון הראשון משתחרר הוא תוקף את החיבור בצד ה-3' של האינטרון וכך האינטרון מתנתק ומתקבלים שני האקסונים המחוברים, האינטרון שמתחרר יוצא בצורה מעגלית או ליתר דיוק כלאסו.

תגלית זו חשובה מאוד כיוון שהיא הוכיחה שלא רק חלבונים מסוגלים לבצע פעילות קטליטית ואת ההשערות על קיום עולם ה-RNA. אנזימים שהם RNA נקראים Ribozymes.

התקיפה נעשית במקום הנכון כיוון שה-RNA מקופל במבנה שניוני ושלישוני כך שנוצר אתר פעיל המכיר את הרצף שעליו יש לבצע את הפעולה הקטליטית.

הריבוזימים הם איטיים לעומת החלבונים כאנזימים אך ה- K_m שלהם קטן יותר כלומר הם נקשרים לסובסטרט ביתר קלות.

ט.ל.ח.

סיכומים בביולוגיה מולקולרית 2 חלק ב'

נשאלת השאלה מהי צורת החיים הקטנה ביותר והפשוטה ביותר, בחיידקים יש כ - 4 מיליון זוגות בסיסים הנותנים כ - 1000 גנים אך הם לא הכי קטנים למיכופלסמה יש כ - 500 גנים בלבד. בגנים של המיכופלסמה רק 265 עד 350 גנים הם נחוצים לקיום בעוד שהשאר לא נחוצים והמיכופלסמה יכולה להתקיים בלעדיהם. אך גם המיכופלסמה היא לא הכי קטנה, פאג' הוא נגיף טפילי לחיידקים הוא חיי בתוך החיידק ומגנוני החיידק הם אלו שמשכפלים אותו, גודל הגנום שלו הוא כ - 170,000 זוגות בסיסים הנותנים כ - 100 גנים.

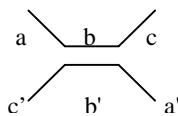
אך גם הפאג' לא הכי קטן וירוסים הם קטנים יותר לדוגמה הוירוס HIV1 (וירוס האידס) מכיל רק 5000 זוגות בסיסים שהם מהווים 7 גנים בלבד, יותר קטן מזה זה הוירוס Tobacco Mosaic הכולל 3000 זוגות בסיסים שזה נותן 4 גנים וירוס זה פוגע בעלי טבק. אך הוירואיד הוא קטן עוד יותר הוא מכיל 200 בסיסים של ssRNA אין לו גנים וגם לא חלבון רק רצף בסיסים היכול להיכנס ולהדביק תאים להשתכפל שם ולצאת ולהדביק תאים נוספים, ה - RNA של הוירואיד הוא בעל מבנה שנוני ולפעמים מעגלי או פרוס.

האלמנט הביולוגי הקטן ביותר הוא אינפורמציה בחומצות בסיס, ככל שמורכבות היצור עולה מספר הבסיסים ב - DNA גדל אך אין הדבר מדויק, בדו חיים יש כ - 10^{10} בסיסים שזה כפי 100 מאדם אך קרפדות פחות מפותחות מבני אדם, כאן נוצר פרדוקס שניקרא פרדוקס כמות ה - DNA או C Value Paradox. הסיבות לגודל ה - DNA הם יותר כרומוזומים, הכפלת הגנום - פוליפולואציה (נפוץ בדגים) ותוספת רצפי DNA חדשים.

ה - DNA הוא דו סיבי וניתן בחימום או בתמיסה בסיסית להפריד בין הסיבים תהליך זה ניקרא דנטורציה, התהליך ההפוך לתהליך זה כלומר חיבור הסיבים ניקרא רנטורציה והוא מורכב ממספר שלבים, הראשון הוא נוקלאציה שזה כשרצף אחד מזהה את האזור המשלים בסיב השני ואז יש התחברות שיכולה להתנתק או להישאר לשלב הבא שהוא Zipering שבו מתחברים שני הסיבים כמו סגירת רוכסן.

ככל שה - DNA יותר מפותח ראקציית הדנטורציה איטית יותר, אנו יכולים לעקוב אחרי הריאקציה על ידי בדיקה של בליעת אור UV בסביבת 230nm, גם תהליך הרנטורציה יותר איטי כיוון שיש יותר פרגמנטים שונים ב - DNA מורכב יותר ולכן פחות סיכוי שהם יתחברו. הקינטיקה של התהליכים תלויה רק בריכוז כך שאם יש פוליפלוואידיות אז ריכוז ה - DNA גדל וכמו כן גם הקצב. אנו רואים כי חלק מה - DNA הגנומי מגיב מהר יותר מהשני, הסיבה לכך היא שריכוז גן מסוים בגנום גדול מריכוזו של גן אחר.

כאשר לוקחים DNA דו סיבי וחותרים ומבצעים דנטורציה ולאחריה רנטורציה לזמן קצר כך שרק הרצפים יתחברו ונבדוק את הרצפים נקבל מעט פרגמנטים דו גדילים והרבה פרגמנטים בצורת H אשר בהם יש התחברות במרכז אך הקצוות לא תואמות.



כדי לבדוק עם יש החזרות זהות בודקים עקומת היתוך של DNA נטיבי ורואים כי הבליעה עולה עם הטמפרטורה ובטמפרטורה של 73 - 82 מעלות צלסיוס רוב ה -

DNA (כ - 90%) כבר ניתןך והפך לחד סיבי. לתוצר הדנטורציה אנו עושים רנטורציה לזמן קצר יחד עם DNA ייחודי שזה DNA חד סיבי (ל - DNA הדו סיבי שעבר דינטורציה קוראים DNA חוזר), ב - DNA הייחודי יש חיבור של 100% ולעומתו בודקים את ה - DNA החוזר.

כדי לבדוק את אחוז ה - DNA המשועתק כ - mRNA צריך לבדוד את ה - DNA הייחודי מכלל ה - DNA וזאת בהנחה שכל הגנים הם ב - DNA ייחודי, ניתן לעשות זאת על ידי הכלאה של ה - DNA לזמן קצר והפרדה על עמודת HAP, בנוסף מסמנים זה DNA בסימון ראדיואקטיבי על ידי פרימרים, DNA פולימראז ונוקלאוטידים מסומנים. את ה - DNA המסומן מוסיפים ל - mRNA בעודף ובודקים את אחוז ההיברידיזציה במידה והוא 50% אז כל ה - DNA הייחודי מתועתק, המקסימום הוא 50% ולא 100% כי ה - DNA הוא דו גדילי ורק סיב אחד מתועתק.

בשלבי התפתחות הראשונים רוב הגנים מתועתקים ובעם לידי ביטוי ולאחר מכן כל רקמה מקבלת את התפקיד שלה בגנום אך בשלבים העובריים הכל מתועתק. אצלנו רק כ - 5% מהגנום הוא גנים שעוברים ביטוי.

עד כה ראינו כי הפרדוקס של הערך c הוא לא פוליפלואידיות, הוא רק חלקית קשור לרצפים חוזרים, לא ריצפי בקרה ולא רצפים מקודדים, מה שנישאר זה סטרוקטורליות ו - DNA סתמי (Junk). התפקיד הסטרוקטורלי הוא לצורך המבנה כלומר לא נועד להיות מבנה אך כיוון שיש "עודף" DNA אז הוא משמש למבנה, השארה נוספת היא שה - DNA מהווה שלד לגרעין התא. ה - Junk DNA הוא DNA סתמי שמכפיל את עצמו אך לא מהווה עומס על התא והתא יכול לתפקד בלעדיו.

חלק מהרצפים החוזרים מהווים משפחות גנים, רוב הגנים נמצאים רק פעם אחת בגנום והתיעתוק מהם נותן 1 - 1000 עותקים אך יש גנים הזקוקים ליותר מזה ולכן נמצאים במספר עותקים, העותקים יכולים להכיל וריאציות שונות כך שנוצרים גנים דומים אך לא זהים המבוטאים בהתאם לצורך, לדוגמה גלובין מהווה 80% מה - mRNA בכדוריות דם אדומות והוא שונה בעובר (גלובין γ) או בבוגר (גלובין β).

ברצף הגנים של הגלובין יש גנים שהם פסידו גנים (גנים לכאורה) הם בעלי רצף דומה למקורי אך לא פעילים הם מסומנים ב - ψ , גנים אלו לא פעילים בעיקבות מוטציה שיוצרת קודון עצירה.

יש דמיון רב בין גלובין בחיות לעומת מרכיב דומה בצמחים אך שהגן של הגלובין כולל 3 אקסונים ובצמחים 4, יתכן כי הגלובין היה קודם ואז אחד האקסונים התפצל או שהצמחים היו קודם ואז שני אקסונים התאחו לאחד.

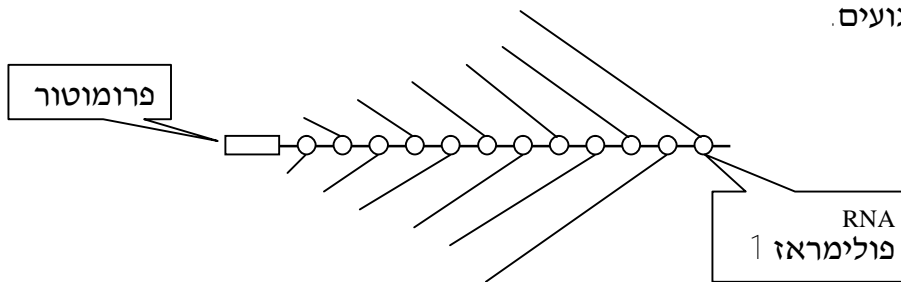
ניתן לראות תלות ישירה בין הזמן לשינויים בגנום ולפי זה לבנות שעון מולקולרי לדוגמה זמן ההפרדה בין אדם לעכבר בגלובין הוא 85 מיליון שנה וההבדל הוא של 10% מה שנותן כ - 0.12% למיליון שנה כמו כן ההפרדה בין עופות ליונקים היא לפני 270 מיליון שנה והיא של 23% מה שנותן כ - 0.09% למיליון שנה בשני המקרים היחס הוא שינוי של כ - 0.1% למיליון שנה. נשתמש ביחס זה לבדוק מתי נפרדו הגלובין α - β אחד מהשני שההבדל בניהם הוא של 50% וכך מקבלים שההפרדה היתה לפני 500 מיליון שנה.

אנו צריכים להשתמש בחישוב באחוזים מתוקנים כיוון שיכולים להיות שני מאורעות שינוי שיחזירו למצב ההתחלתי וחייבים להתייחס אליהם. רוב השינויים לא טובים לחלבון אך יש שינויים שקטים שיוצרים שינויים שלא נראים בחלבון אך

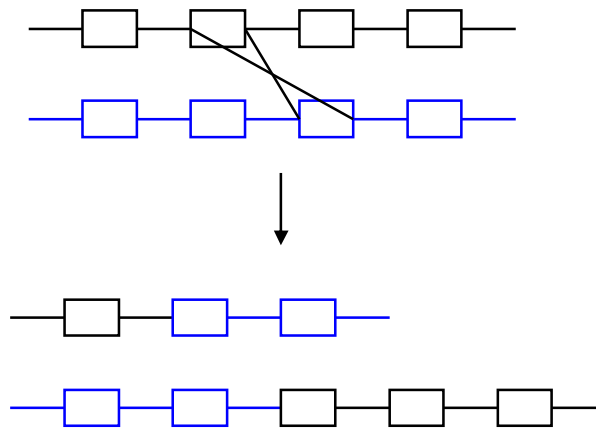
הם קיימים ובכך הם יוצרים לחץ אבולוציוני המאיט את היווצרות השינויים. הלחץ האבולוציוני נוצר כאשר מגיעים בעקבות השינוי לרצף שהוא באחוז מקסימלי אז השינויים לא רצויים, הדבר משפיע גם על התעתוק והתרגום על ידי כך שזה מוריד את היציבות של הקומפלקסים שנקשרים לשם כך.

יש משפחות גנים אשר הגנים בהם מבוטאים לחלבונים והם מכילים צברים של 20 עד 30 גנים לדוגמה גלובינים, היסטינים, אמינוגלובינים, אקטינים וטובולינים, בין הגנים השונים במשפחה יכולים להיות שינויים, קבוצה שונה של משפחות גנים מקודדת ל - RNA בלבד ובצברים אלו יש 500 עד 1000 גנים לדוגמה tRNA, rRNA ו - smRNA בגנים אלו יש זהות כמעט מלאה בין הגנים ואפילו מלאה.

בתוך הגרעין יש את הגרעינון ובו מרוכזים הגנים ל - tRNA, על אותו גן מתחברים מספר פולימראזות מה שנותן מבנה הנראה כמו עץ אשוח, בין הגנים יש מרווחים שנקראים Spacer ומסומנים באות S, כל הגנים הללו זהים אחד לשני כי אחרת יבצרו ריבזומים פגועים.



מנגנון זה נוצר על ידי Unequal Crossing Over כלומר שיחלוף לא שווה:



כך מגבירים את מספר העותקים בפעם אחת.

DNA לוויין

בגנום יש רצפים של DNA שלא מקודדים ל RNA או לחלבון והם מחולקים לשניים כאלו שנמצאים בחזרות של כ - 1000 עד 100 אלף חזרות וכאלו שהם בעלי יותר ממיליון חזרות, רצפים אלו הם רצפים קצרים הנקראים DNA לוויין. DNA זה ניקרא לוויין כיוון שכאשר מעבירים DNA בגרדיאנט צפיפות (CoCl) מקבלים שני פסים אחד בצפיפות של 1.7 וזה של ה - DNA הכללי ופס מלווה ב - 1.69 של רצפים קטנים אלו. DNA זה מהווה כ - 25% מהגנום וכולל רצפים של 6-7 בסיסים החוזרים על עצמם.

השינויים במיני לויינים מהירים בהשוואה לרצפים מקודדים ולכן ניתן לעקוב אחרי שינויים מאוחרים לדוגמה לגלות את מקור התפתחות האנושות, בשיטה זו התגלה כי מוצא האדם הוא מאפריקה.

קבוצה נוספת של DNA לויין היא מיקרו לויין, גם המיקרו לויינים לא מתועתקים ל-RNA והם מופיעים בחזרות של עד 4 בסיסים, בגלל גודלם הקטן הם מצויים בכמות גדולה בגנום והשינויים בהם מהירים מאוד, גם בהם ניתן להשתמש למיפוי גנטי כמו במיני לויינים אך הם יעילים יותר לשם כך.

חזרות המיקרו לויינים יכולות להיות גם בגנים ואז נוצרים חלבונים בהם יש חזרה על חומצה אמינית מסוימת (הדבר קורה רק בחזרות של 3), כשמספר החזרות משתנה אז נוצרת הפרעה ומחלה. בנוסף יכולים להיות חזרות באינטרונים ששינוי בהם או בכמותן יגרום לפגיעה במנגנון השיחבור (Splicing) ובכך לגרום למחלה. אפשרות נוספת היא חזרות באזור בקרה ששינוי בהם יכול לגרום להפסקה, הפעלה או יצירה בקצב שונה של תעתוק.

כאשר יש מצב של פולימורפיזם של CAG בעכברים כלומר עליה במספר החזרות הדבר גורם לשינוי המין כך כשיש 12 חזרות זה הזן הנורמלי ושינוי גורם להפיכת המין.

שימוש במיקרו לויינים להוכחה משפטית דורש השוואה של לפחות 5 מיקרו לויינים שונים.

טרנספוזונים

טרנספוזונים הם מקטעי DNA המסוגלים להיות מועתקים למקום אחר על ידי הכפלה ספציפית או מועברים למקום אחר. היציאה של הטרנספוזון יכולה להיות חלקה או לא, כך שביציאה חלקה המקטע שיוצא חוזר למקומו המקורי ואילו לא חלקה היא שאין חזרה למצב המקורי.

מבחינה כימית יש אנזימים הגורמים לתהליך זה והם הטרנספוזאזות, אנזימים אלו חותכים את מקטע ה-DNA בצד אחד בסיב העליון ובצידו השני בסיב התחתון ובמקביל הם יוצרים חתכים דומים במקום עליו מועתק הטרנספוזון, לאחר מכן האזורים הפתוחים נקשרים לאזור המטרה ואז מקבלים קומפלקס שיכול לעבור פילמור לכל סובב בנפרד. כך מקבלים שני עותקים של הטרנספוזון והקומפלקס מתנתק. אופציה שנייה היא שהטרנספוזון מנותק מהאזור הישן ומתחבר באזור החדש וכך הוא מועבר. יתכן והחתיכה של הטרנספוזון תהיה בקצוות כהים ואילו אזור המטרה היה בקצוות דביקים ואז יש צורך להשלים את החסר.

קיימים מצבים בהם יכולה להתרחש הכפלה של אזור המטרה המכיל 4 עד 8 בסיסים כך שמקבלים עותק של אזור זה מכל צד של הטרנספוזון לאחר המעבר או העתקה. בנוסף יכלה להיווצר פגיעה בעקבות הקפיצה לדוגמה בתירס מקבלים גרעינים בעלי צבע שונה בגלל הקפיצה.

בנוסף לטרנספוזונים שקיימים ב-DNA בלבד יש רטרוטרנספוזונים שהם בעלי מצב מעבר של RNA. הדבר משמש רטרווירוסים כך שהוירוס ניכנס לתא והגנים שלו הופכים ל-DNA על ידי האנזים Reverse Transcriptase ואז הוירוס ניקרא פרו-וירוס ואז הוא פועל כמו כל גן אחר משועתק ומתורגם לחלבונים, החלבונים שנוצרים ממנו בונים מעטפת לנגיפים החדשים שנוצרים וה-DNA שנוצר מהוירוס מתועתק שוב

ל - RNA ומוכנס למעטפת שנוצרת וכך מקבלים עוד נגיפים. המעבר מ - RNA ל - DNA וחזרה לעותקים רבים של RNA היא הקפיצה של הרטרטרנספוזון.

בשני צדדי גנום הנגיף יש רצפים הנקראים LTR המכילים 250 עד 600 בסיסים ואחריהם חזרות קצרות של Direct Repeats. וכניסה של מקטע כזה לגנום יכולה להיות משמעותית מאוד כיוון שאזור בקרה של הרצף שניכנס לדוגמה יכול להיות קרוב לגן אחר ובכך לגרום לביטוי יתר של גן זה או להפסקת הביטוי שלו.

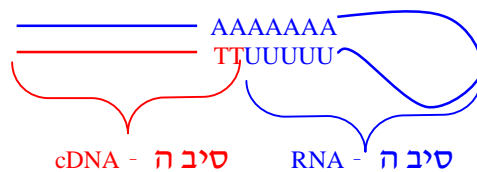
למעטפת הוירוס יכולה להיכנס כמות מסוימת של RNA בלבד ואין זה הכרחי שרק הגנום של הוירוס חודר פנימה יתכן כי רק חלק ממנו מוחדר ובנוסף חודר גן אחר מהחולה, כתוצאה מכך יכולים להיווצר וירוסים סרטניים והדבר קורה בעיקר בבעלי חיים.

הרטרורוירוס Ty תוקף תאי שמרים ומנגנון הטרנספוזיציה שלו פועל כמו רטרורוירוס רגיל. כאשר הכינו טרנספוזון מלאכותי לפרוק גלוקוז עם אינטרון אחד והכניסו אותו לשמרים במצע ללא גלוקוז ושהכניסו גלוקוז הייתה עליה בטרנספוזיציה, בנוסף התברר כי הוירוסים שנוצרו היו ללא האינטרון כיוון שהמעבר היה מ - mRNA שאינו כולל את האינטרון ואז שהמקטע הזה מועתק בחזרה ל - DNA חסר בו הקטע של האינטרון.

כתוצאה מתופעה זו ניתן לקבל גנים שונים אשר דומים ל - RNA ולא ל - DNA ואלו הם פסוודו גנים מעובדים Processed וכיוון שהם דומים ל - RNA ולא ל - DNA הם חסרי פרומוטור.

ישנה גם טרנספוזיציה שקשורה ב - RNA שאינה דומה למנגנון המתרחש בוירוסים והיא מתחלקת לשניים יש את ה - LINEs שהם Long Interspersed Element ויש את ה - SINEs שהם Short Interspersed Element והם נימצאים בגנום פעמים רבות בסמיכות לאזורים של הבסיסים A - ו - T.

ה - RNA שנוצר מה - LINEs יכול להיסגר על עצמו מה שיכול להוות פריימר להשלמת cDNA אשר עליו נוצר הסיב השני של ה - DNA וזה ניכנס לגנום בטרנספוזיציה. הדבר מתרחש בדרך כלל בסגירה של רצף של פולי A הנסגר עם פולי U.



ב - LINEs השעתוק מתבצע על ידי RNA פולימראז 2 והפרומוטור נימצא בתחילת הגן בעוד שה - SINEs משועתקים על ידי RNA פולימראז 3 והפרומוטור נמצא בתוך הגן עצמו אך לא בהתחלתו, חשיבות הבדל זה הוא שב - LINEs הפרומוטור לא מועתק בטרנספוזיציה וכתוצאה מכך מתקבל פסיודו גן ואילו שה - SINEs מועתק בטרנספוזיציה מועתק גם הפרומוטור ומקבלים עותק של הגן שיכול לעבור ביטוי.

בחיידקים הגנום הוא כמעט ולחלוטין רק גנים ללא אלמנטים נוספים, אך בנו וביצורים אוקריוטים יש אלמנטים רבים היוצרים עומס, עומס זה מגדיל את הרבגוניות והדרישות האנירגטייות שלו לא שונה בהרבה. בחיידקים המצב ניתן להגדרה כסוף הדרך לאירגון ולא ניתן להכפיל אף גן כיוון שזה יגרום לפגיעה בגנים

אחרים, דבר זה הופך את הגנום הפרוקריוטי למערכת סגורה לשינויים בעוד שהגנום היוקריוטי פתוח לשינויים.

תפקוד הגנום האוקריוטי

תפקיד הגנום הוא העברת מידע על ידי שעתוק, כך שהפרומוטור ואזורי הבקרה הם אלו שקובעים את מידת ביטוי הגן, לכן יש מידת ביטוי באזלית ואזורי הבקרה הם אלו שמשנים את קצב הביטוי.

ניתן לחבר גן שמבוטא בצורה חלשה לפרומוטור של גן המבוטא בצורה חזקה ולקבל שפעול שלו כלומר לקבל ביטוי מוגבר של גן זה, ניתן גם להוסיף גן לפרומוטור או גן עם פרומוטור לגנום ולקבל ביטוי נוסף לדוגמה צמח טבק בשילוב של הגן המאיר בגחליליות נותן טבק מאיר.

גנים בעלי תפקוד משותף הם סוללת גנים, בחיידקים ארגון זה הוא האופרון. ביצורים אוקריוטים סוללות הגנים מצויות על הכרומוזומים השונים ומופעלות יחד על ידי מערכת מיוחדת. מערכת זו קשורה להגברה למשל שלושה גנים הנמצאים במקומות שונים בגנום ובעלי מגבר זהה יעברו ביטוי יחד בנוכחות מגבר זה. יתכן כי מגבר ישפיע על גן אחר ולא רק על הגן שלו בעקבות קירבה בינו לבין הגן.

גורם השעתוק sp^1 הוא בעל אצבעות אבץ המורכבות מהיסטידינים ואבץ שיוצרים מרכז קשיח, גורם זה כמו סטרואידים והורמונים שונים גורמים לביטוי של גנים על ידי קשירה לאזורי בקרה.

הבקרה יכולה להיות ברמה כמותית, כלומר האם הגן יעבור ביטוי רב או לא, הבקרה יכולה להיות גם מבחינת מקום כלומר באילו מקומות היה ביטוי ובאילו לא היה ביטוי של הגן, וגם בקרה של תזמון כלומר מתי הגן יבוטא ומתי לא.

כדי שמספר גנים השייכים לאותו מסלול ונמצאים באזורים שונים בגנום יעברו ביטוי יחד צריך שהיה להם אותו סוג של מגבר כך שפקטור ההגברה יפעיל את כולם באותו זמן. בנוסף יתכן כי לגן מסוים היו מספר מגברים מסוגים שונים כלומר שהוא יפעל במצבים שונים, לדוגמה הגן של מטלותיונין שהוא הגן האחראי על ניקוי הדם ממתכות לפניו יש את המגברים MRE המגיב למתכות, TRE המגיב להורמון גדילה ו- GRE המגיב להורמונים סטרואידים. גן מסוים יכול להיות גם עם מגברים שונים של סוללות גנים שונות והוא יבוטא עם כל אחד מסדרות אלו.

קיימת גם אפשרות שבגן מסוים היו מספר חזרות על אותו מגבר ומספר זה יכול להשתנות בין רקמות שונות ובכך לגרום לרגישות שונה של ביטוי הגן לגורם השעתוק כך שכשיש יותר מגברים מאותו סוג על גן הוא יותר רגיש וצריך פחות גורם שעתוק על מנת להתחיל את השעתוק.

ביטוי דפרנציאלי של גנים

ישנם גנים שהם מתחזקים את התא גנים אלו הם בעלי ביטוי קבוע וקרואים גם House Keeping כדי לעצור פעילות של גנים אלו צריך לבצע אחד משני האפשרויות לפעולה בגורם השעתוק או לפגוע במגבר, כדי לפגוע בגורם השעתוק שהוא חלבון בעצמו צריך למצוא את הגן שיוצר אותו ולהפסיק אותו על ידי פגיעה בגורם השעתוק שלו או במגבר שלו וכך הלאה, לכן האפשרות היעילה היא פגיעה במגבר,

כדי לעשות זאת יש שתי אפשרויות האחת היא חסימה של המגבר על ידי מתילציה של DNA והאפשרות השניה היא מבנה הכרומטין.

מתילציה של DNA נעשית על ידי הוספת מתיל לציטוזין בעמדה 7 וברצף 3' - CG - 5' לדוגמה: 3' - ATGCGTCCG - 5' המתילציה תהיה על הציטוזינים המסומנים ובסיב המשלים 5' - TACGAGCC - 3' המתילציה תהיה על הציטוזינים המסומנים, המתילציה היא לא מלאה ולא כל הציטוזינים שיכולים לעבור עוברים מתילציה, תבנית המתילציה נשמרת בהכפלת ה-DNA וזאת על ידי אנזים שמשלים את המתילציה באתרים שהם ממותלים למחצה כלומר אתרים שבהם יש מתיל על הציטוזין בסיב המקורי.

ניתן לדעת בניסוי האם הייתה מתילציה על ידי שימוש בשני אנזימים האחד הוא Msp I והשני הוא Hpa II, שני אנזימים אלו מכירים את הרצף CCGG אך האנזים Msp I חותך את כולם ביו C - G ואילו האנזים Hpa II חותך רק אם אין מתילציה על הציטוזין. בצורה זו ניתן לבדוד רק 1/16 מכל האתרים האפשריים למתילציה.

כאשר מתרחשת מתילציה באזור הבקרה אז ביטוי הגן מפסיק כיוון שגורם השעתוק לא יכול להתחבר ל-DNA. כמו כן בזמן ההתפתחות יכולים להיות שינויים שונים שיגרמו לכך גנים שונים יבוטאו בזמנים שונים, דוגמה לכך היא הגלובין עשר אצל העובר יש גלובין γ ובבוגר יש גלובין β , למעשה החלבון הראשון משפחה זו שמבוטא ראשון הוא הגלובין ϵ שנחסם על ידי מתילציה ומתחילה היצירה של גלובין γ על ידי דה-מתילציה שלו כלומר הסרת המתילים ולאחר מכן כך נוצר המעבר מגלובין γ לגלובין β .

בגנים מתחזקים הקשורים למטבוליזם ואנרגיה יש מיעוט של הרצף CG באזור הבקרה וזאת בכדי למנוע נטרול שלהם שיכול להיות לתלי לתא. קיימים אזורים עשירים ב-CG אך המתילציה בהם מורדת על ידי האנזים SPI שהוא חלבון בעל רצף GCGGC הגורם לקישורו ל-DNA והורדת המתילים, האזורים של CG ללא מתילים נקראים CG - Islands.

כאשר גנים מסוימים נמצאים בכמות כפולה הם יכולים להיות לתלים דבר זה משמעותי כיוון שלנקבות יש שני כרומוזומי X בעוד שלזכר יש רק אחד, כדי למנוע נזק התפתחו מנגנונים שונים, בדרוזופילה יש צורך בביטוי הכפול ולכן בזכר כרומוזום ה-X היחיד הוא בביטוי כפול וכך הוא פעיל כמו בנקבה, בנמטודות C. Elegans לעומת זאת בנקבה שני כרומוזומי ה-X מבוטאים בחצי מבזכר, אפשרות שלישית היא ביונקים שם יש Inactivation של כרומוזום שלם.

כאשר כרומוזום עובר אנאקטיבציה הוא נדחס ועובר מתילציה ואז הוא נקרא גוף בר, באנאקטיבציה היא אקראית וכך יכול להיות שאם אחד מכרומוזומי ה-X נושא מוטציה היא תבוטא או שאם כל אחד מכרומוזומי ה-X נושא תכונה בעלת פנוטיפ שונה תתקבל מוזאיקה. בתאי מין לפני הפריה יש מתילציה כמעט מלאה שמוסרת לאחר ההפריה כדי לאפשר את התפתחות העובר.

מתילציה של DNA קיימת גם בתהליך הטבעה הורית, בתהליך זה שיש מתילציה באחד הגנים של אחד ההורים, כאשר יצרו מוטציה בגן IGF II בעכבר שהאלל המוטנטי הגיע מהאב הפגיעה היתה לתלית אך שהוא הגיע מהאם הצאצאים הראו פנוטיפ נורמלי לחלוטין, כאשר המוטננט באם הוא עובר מתילציה בכל מקרה ולכן הוא לא פעיל והצאצאים בריאים כלומר המתילציה שהייתה באם (הוטבעה באם) גורמת לצאצאים נורמליים.

האפשרות השניה להפסקת הביטוי של גן היא כפי שאמרנו קודם במבנה הכרומטין, הכרומטין הוא ה-DNA והנוקלאוזומים שהם אוקטומרים של היסטונים, ה-DNA מקיף את הנוקלאוזום מבחוץ ובין הנוקלאוזומים יש DNA חשוף, ככל שיש יותר נוקלאוזומים באזור מסוים ה-DNA יותר דחוס ויש פחות ביטוי של הגנים באזור הדחוס.

DNA ותוכנית החיים

בזבוב מחזור החיים מתחיל בביצית שמופרית על ידי תא זרע ממאגר הזרעים שיש בנקבה לאחר הזיווג, הביצית מתפתחת לזחל ולזבוב וחזרה על מחזור החיים. בביצית הזבוב בהתחלה הגרעינים נמצאים בחלל והם מוכפלים אך לא נוצרים תאים, לאחר מכן הגרעינים נעים לדפנות ונוצרים פרקים (סגמנטים) המתאימים לאיברים שונים בזבוב הבוגר (החלוקה לסגמנטים קיימת גם בעוברי יונקים).

ביצית הזבוב נראית הומוגנית וממנה מתקבל ביטוי הטרונגי של גנים שונים כך שבאזורים שונים מבוטאים גנים שונים, הדבר אפשרי בגלל גרדיאנט של חלבון Bicoid (בטן כפולה), הביטוי השונה מתאפשר על ידי כך שיש מספר שונה של מגברים לגנים השונים ולכן רגישותם שונה ועל אף שבכל סגמנט יש את כל הגנים יש ריכוז שונה של גורם שעתוק בגלל הגרדיאנט וגנים אחרים מבוטאים. לתופעה זו קוראים מורפוגנטי לינארי כיוון שהוא רק בכיוון אחד.

במידה ויוצרים את הגרדיאנט בכיוון ההפוך ואז כל הסגמנטים התהפכו ויכול להיות גם שינויים כך שיגרמו לחוסר של סגמנט מסוים או שינוי של סגמנט מסוג אחד לסוג אחר.

הגן Bicoid מפעיל את הגן היוצר את הראש אך שיש בו מוטציה אז לא מתקבל ראש אלא דו בטן, עם העובר הוא Bicoid ומזריקים לו את החלבון התקין בקצה מתקבל ראש והכל תקין עם מוסיפים לו את החלבון באמצע מתקבל ראש באמצע עם בטן מכל צד. אם ניקח את הזן W.T. ונזריק לו את החלבון התקין נקבל שני ראשים.

לפני הפרומוטור של הגן Hunchback יש אתר קשירה ל-Bicoid שהוא בעצם מגבר, מידת הביטוי של הגן נקבעת כתוצאה מריכוז ה-Bicoid וגורמת לראש קטן בריכוז נמוך.

כמו ה-Bicoid בחלק הקדמי יש את ה-Nanos בחלק האחורי של הזבוב, מוטציה בגן זה תגרום לראש גם בחלק האחורי של הזבוב, ה-Nanos מפעיל את הגן Caudel. כמו ה-Bicoid גם ה-Nanos פועל בגרדיאנט. הגנים שמופעלים מגורמים אלו יוצרים חלבונים שגם הם גורמי שעתוק ובאזורים של מפגש בין גורמי שעתוק שונים יש ירידה בביטוי וכך נוצרים הסגמנטים השונים שהולכים והופכים צרים יותר עם ההתפתחות של העובר, עד קבלת הפרקים מהם יבצרו האיברים השונים.

ניתן להשתמש בגנים השונים ולגרום לביטויים בסגמנטים אחרים וליצור מוטציות רבות. בניסוי התגלה כי הגן לעיניים של עכבר גורם לביטוי של עיניים בזבוב וזאת בגלל דמיון ברצף הראשוני. כמו כן יש גנים רבים המשותפים למספר של אורגניזמים לדוגמה בעוף אותם גנים שגורמים ליצירת הצלעות נמצאים גם בנחש רק שם הם מפוזרים למרחק רב מה שיוצר בנחש מספר צלעות רב כתוצאה מכך הנחש פיתח אמצעים להשתמש בהם לתנועה ואז הרגליים שלו התנוונו.

חלבוני העזר להתחלת מחזור החיים מוכנסים לתוך הביצית ולכן בשלב זה לא ניתן להחזיר זנים שנכחדו כמו הדינוזאורים כיוון שאין ביצים של דינוזאורים לשם כך, אך יתכן כי אפשר להחזירם על ידי כתיבה של תוכנה חדשה של מחזור חיים ובכך ליצור את הדינוזאור מחדש.

ט.ל.ח