

ביולוגיה מולקולרית חלק א

מרכיביו של ה-DNA הם נוקלאוטידים, הם בנויים משלושה חומרים: בסיס, סוכר ופוספט. קיימות שתי קבוצות של בסיסים פרימידיניים הבנויים מטבעת אחת בעלת 4 פחמנים ושני חנקנים (מבחינת מספור חנקן מספר 1 בבסיס הוא זה שקשור לסוכר) ופוריניים הבנויים משני טבעות אחת מחומשת ואחת משושה (חנקן מספר 9 קשור לסוכר). הסוכר הוא סוכר מחומש ב-DNA הסוכר הוא דיאוקסי ריבוז ובו אין קבוצת OH בעמדה 2 כמו שיש בריבוז שהוא הסוכר ב-RNA.

כאשר הסוכר מחובר לבסיס ללא הפוספט מקבלים נוקלאוזיד, כאשר לנוקלאוזיד מתחברת חומצה פוספורית מקבלים את הנוקלאוטיד, הקשר בין הפוספט לסוכר הוא קשר פוספואסתר. הנוקלאוטידים מצויים בתא ב-DNA, RNA (לסוגיו השונים עליהם נלמד בחלק ב') וגם בגרעין התא כבודדים בריכוזים נמוכים.

בתא שורר PH נטרלי וזאת בעקבות ראקציות בופר רבות המקבעות את ה-PH אך יש אזורים בעלי PH שונה, הנוקלאוטידים מסוגלים לעבור פרוטונציה ודיפרוטונציה בהתאם ל-PH כך שב-PH נמוך גם החנקן עובר פרוטונציה. ב-PH נטרלי החומצה הפוספורית מצויה כיון שלילי.

בין הבסיסים C ו-G יש 3 קשרי מימן ואילו בין A ו-T (או בין A ל-U ב-RNA) יש שני קשרי מימן, קשרים אלו גם קרואים קשרי מימן על שם ווטסון וקריק (מגלי ה-DNA), אך קיימים קשרי מימן שונים ומיוחדים במבנים מסויימים של DNA, ואף קשרי מימן מסוג Wobble שיכולים להוות בעיות ואף לגרום למוטציות. קשרי המימן אינם ייחודיים רק ל-DNA ול-RNA הם מצויים גם בחלבונים ובחומרים אחרים, קשרים אלו מיוחדים כיוון שהם קשרים בין מולקולריים חזקים יחסית ובהם יש מעין שיתוף של פרוטון.

ב-DNA רגיל הקשרים בין הנוקלאוטידים הם דרך הפוספט בעמדות 3' ו-5' סליל ה-DNA בנוי כך שהסוכרים פונים כלפי חוץ ואילו הבסיסים פונים כלפי פנים וקשורים בקשרי מימן עם בני זוגם בסליל השני, הזוגות הם: A ו-T, G ו-C והשני הוא A ו-T, הרוחב של שני הזוגות הוא כמעט זהה מה שמסייע בייצוב של המבנה בסליל. בסליל ה-DNA אחד הסיבים נע מ-5' ל-3' והשני הפוך מ-3' ל-5' סידור זה ניקרא אנטי פרללי (ששני השרשראות באותו כיוון אז הסידור הוא פרללי). ברוב ה-DNA התאי הבסיסים מאונכים או כמעט מאונכים לציר ההליכס מבנה זה מכונה B-DNA.

כשמסתכלים על DNA מהצד אפשר לשים לב לשני חריצים האחד קטן (Minor Groove) והשני גדול (Major Groove), כאשר בצד אחד יש חריץ קטן אז בשני החריץ גדול. קוטר ה-DNA הוא 20Å, מיבנה ה-DNA מחזורי (מלבד הבסיסים המשתנים) וכעבור 360° מגיעים לנקודה אקוויולנטית וזה ניקרא Pitch המרחק בין נקודות אלו הוא 34Å במרחק זה יש 10.5 זוגות בסיסים כך שכל זוג בסיסים הוא בערך בעל אורך של 3.4Å ובין זוג סוכרים בשרשרת המרחק הוא 6Å מה שמחייב את מיבנה ההליכס (בעבר הייתה הצעה שה-DNA מוטה בזווית ואז אורכים אלו מתאימים עם משפט פיתגורס). קיימים מבני הליכס שונים העומדים במידות הגודל ויכולים להיות מבנים בעלי 3 או 4 סיבים, כמו כן יכול להיות הליכס שמאלי או ימני אך בתאים ה-DNA הוא B-DNA.

כאשר ה-DNA מוכפל לשם חלוקת התא נפרדים הסיבים ועל כל אחד מהם נוצר סיב משלים ומקבלים שתי מולקולות DNA זהות הנקראות מולקולות הבת של מולקולת ה-DNA המקורית. ההכפלה נעשית במסעף שיכפול (מזלג שיכפול) Replication Fork.

השכפול מתבצע בשלבים הכוללים פתיחת השרשרת המקורית באופן חלקי, הוספת נוקלאוטידים על כל סיב ליצירת הסיב המשלים וסגירת מולקולות ה-DNA החדשות, כל זה נעשה באופן רציף כך שכל הזמן נפתח חלק חדש ב-DNA והתהליך ממשיך. הנוקלאוטיד מתקרב לשרשרת ואז מנותק ממנו פירופוספט PPI והפוספט שנישאר נקשר ל-OH בשרשרת, הדבר דורש את הנוקלאוטיד המתאים כי צריכה להיות התאמה עם הבסיס הסיב המקורי. כל המערכת הזו מופעלת ומפוקחת על ידי אנזימים לשם הקטנת הסיכוי לטעויות.

בין סיבי ה-DNA ניתן להפריד על ידי חימום לטמפרטורה הנמוכה מ- 100°C וזאת עקב הקשר החלש של קשרי המימן יחסית לקשרים הקוולנטיים ב-DNA. ניתן למצוא את הטמפרטורה להפרדת הסיבים על ידי בדיקת בליעה אופטית אשר בה חלה עליה עם היפרדות הסיבים (Hypochromicity). טמפרטורת ה- T_m היא הטמפרטורה בה מחצית מהבסיסים ב-DNA פרודים (בדרך כלל מחצית ממולקולות ה-DNA בכלי נפרדות ולא כל השרשראות חצי פרודות). את הסיבים של ה-DNA ניתן להפריד גם על ידי תמיסה בסיסית וגם על ידי תמיסה חומצית. ה- T_m תלוי בהרכב הבסיסים כיוון שהצמד GC יוצר 3° קשרי מימן ולכן הוא חזק יותר מהצמד AT בו יש רק שני קשרי מימן, מכאן כאשר ב-DNA יש יותר GC אז ה- T_m יותר גבוהה. ה- T_m תלוי גם בריכוז המלח בתמיסה, ההשפעה שלו מתבטאת בכך שבריכוז מלח נמוך T_m יותר נמוך כיוון שהמלח עוזר לייצב את המטען של ה-DNA ובכך את מבנהו.

הפרדה של הסיבים נקראת דינטורציה וזו ראקציה מסדר ראשון (מונומולקולרית) לעומת זאת ראקציית החזרה הנקראת רנטורציה היא מסדר שני (שתי מולקולות סיבים) מתנגשים ליצירת מולקולה אחת). הרנטורציה היא תהליך ספונטני ב- T_m אך יתכן חיבור לא מדויק ש"יתקע" בניסיון להמשיך את החיבור של הסיבים. תהליך הרנטורציה מורכב משני חלקים האחד הוא Nucleation בו אזורים קומפלימנטריים מוצאים אחד את השני ויוצרים קשרי מימן, יתכן קשרים בין מספר סיבים (יותר משניים) או בין חלקים שונים באותו סיב. השלב השני הוא Zippering שהוא שלב מהיר יותר בו נצמדים זה לזה בסיסים מצידי האזורים הקומפלימנטריים.

גם שתי קצוות של סיב מסוים יכולים להתחבר לסיב דו גדילי בעל מבנה הנקרא Hair Pin המכיל לולאה בה הסיב מגיעה לכיוון המתאים ליצירה של סיב דו גדילי עם עצמו. מבנה מרחבי זה נפוץ ב-RNA, הסידור המרחבי נקבע על פי האנרגיה החופשית.

לשם ביצוע ראקציות בהם מעורב ה-DNA צריך לפתוח את הסיבים ולזה צריך מנגנון מיוחד, כאשר ה-DNA אחוז בשתי הקצוות או שהוא מעגלי פתיחת הסיבים תיצור Super Coil (התגלה לראשונה בוירוס). ה-DNA מתנהג בהתאם לנוסחה הבאה $L_k, T_w + W_r = L_k$ הוא מספר החיבורים בין השרשראות הוא יכול להיות חיובי או שלילי בהתאם לכיוון הליפוף עם או נגד כיוון השעון, T_w הוא מספר הסיבובים שסיב אחד מסתובב סביב השני כאשר ה-DNA שמאלי אז הערך שלילי ואילו הוא ימני אז הוא חיובי. גודל זה תלוי בדרך כלל ב-DNA וערכו הוא 1 לכל 10 בסיסים שזה הסיבוב הטבעי של סליל ה-DNA ו- W_r הוא גודל המציין את ה-Super Coils.

נוסחה זו מתאימה רק ל-DNA האחוז בשתי קצוות או DNA מעגלי, ה- L_k הוא מספר קבוע כל עוד ה-DNA סגור הוא חייב להיות מספר שלם, ה- T_w הוא תכונה בסיסית של DNA, כאשר אין Super Coils כלומר W_r שווה לאפס אז $L_k = T_w$ אולם הוא לא חייב להיות במצב Relaxed (אם למשל יש אזור פתוח לשכפול זה יוצר מתח). הסיבוב של סיב אחד סביב השני לא חייב להיות לאורך כל ה-DNA יכולים להיות אזורים ללא

סיבוב ואזורים עם סיבוב. בתאים יש אנזימים הנקראים Topoisomerase והם משנים את ה- L_k על ידי חתיכה של DNA ביצוע השינוי וחיבורו מחדש האנזים טופו 1 גורם לשינוי של אחד ב- L_k וטופו 2 משנה אותו ב-2.

הכרומוזומים הם שלב של כרומטין הם נראים במיטוזה ובמיטוזה וקיימים בתאים אאוקריוטים בלבד. אורך ה-DNA הוא גדול בהרבה מאורך התא ולכן הוא מקופל פעמים רבות בכדי להיכנס לגרעין התא. הכרומטין מורכב מ-DNA וחלבונים הנקראים היסטונים (מסת ההיסטונים זהה למסת ה-DNA), בכרומטין יש 4 סוגים עיקריים של היסטונים H_2A , H_2B , H_3 ו- H_4 בכל אחד מחלבונים אלו יש בין 102 ל-135 חומצות אמינו, חלבונים אלו שמורים באבולוציה כלומר כמעט וזהים או אפילו זהים בין זנים שונים של אורגניזמים. חלבונים אלו מכילים הרבה ליזין וארגנין מה שמקנה להם מטען חיובי רב שמושך את ה-DNA.

ה-DNA ניצמד מסביב לחלבון בצורה טובה, כאשר צריך שה-DNA ינותק מהחלבון לצורך שיכפול או תעתוק החלבונים עוברים אצטילציה והמשיכה שלהם ל-DNA יורדת. מיבנה ה-DNA הקרוי 30nm Fiber הוא סיב של DNA הוא מורכב ממבנה של Beads On A String בו כל חרוז הוא נוקלאוזום Nucleosome המורכב מאוקטמר של היסטונים כלומר 8 היסטונים 2 מכל סוג ואוקטמר זה הוא ליבת הנוקלאוזום, על הליבה מלופף בערך 2 סיבובים של DNA תהליך זה מתרחש על ידי האנזים Micrococcal Nuclease, סביב הנוקלאוזום יש בערך 146 זוגות בסיסים ובין הנוקלאוזומים יש כ-200 זוגות בסיסים. קיימת דינמיות במקום הנוקלאוזומים כלומר הם אינם תמיד באותו מקום אך יש אתרים מועדפים לליפוף (אתרים רוויים בזוג AT היו קלים יותר לליפוף מאזורים עם הרבה GC).

שלב שני של הקיפול מביא אותנו כבר למצב של 30nm Fiber שבו הנוקלאוזומים מסתדרים במעין סיב דומה להליכס של נוקלאוזומים, גם מיבנה זה לא רציף וקיימים בין החלקים אזורים לא מאורגנים שאליהם קשורים חלבונים בעלי אופי ספציפי כמו חלבוני תעתוק, באזורים אלו אין נוקלאוזומים כיוון ששם יש בדרך כלל גנים הנמצאים בביטוי ובכל תא יכולים להיות אלו אזורים אחרים בהתאם לצרכי התא.

Lampbrush Chromosomes הם כרומוזומים ב-Oocytes שאלו תאי קדם לביציות הם בנויים ככדור וסביבו לופים. מבנה זה דומה לכרומוטודה שהיא בנויה כציר ועליו לולאות המורכבות מ-30nm Fiber והציר הוא שלד של חלבונים אליו קשורות הלולאות בקצוותיהן. שתי כרומוטידות המחוברות בצנטרומר יוצרות כרומוזום ובקצוות הכרומוטודות יש טלומרים. כך מקצרים את אורך ה-DNA על ידי העלאת רוחבו מ-2nm ל-1400nm.

ה-DNA בגוף האדם מוכפל תוך כ-6 שעות בשכפול ה-DNA השרשראות נפתחות ונוספים נוקלאוטידים בכיוון של 5' ל-3' וזה מתבצע על הסיב הקיים המשמש כתבנית. חיבור הבסיסים הוא על ידי תקיפה של הקשר בין הפוספטים ושחרור של פירופוספט (PPi), ראקציה זו מתרחשת על ידי האנזים DNA פולימראז. השכפול מתחיל ב-Origin Of Replication יכולים להיות יותר מאזור אחד כזה על ה-DNA. יש שיכפול Unidirectional שהוא הכפלה המתבצעת על סיב אחד של DNA כלומר יש שני נקודות התחלה אחת לכל סיב (מתקיים באנדו וירוסים), מנגנון שני הוא גם Unidirectional אך הוא מתרחש על שני הסיבים ועם מקור התחלה אחד. (בבקטרי פאג'ים ומספר פלסמידים) ומנגנון שלישי הוא Bidirectional בו מכל מקור יוצאים שני מסעפי שכפול אחד לכל כיוון (באאוקריוטים וחיידקים).

כאשר ה-DNA נפתח הוא נפתח חלקית באזור הנקרא מסעף השכפול (או מזלג השכפול) Replication Fork מה שנותן לנו סיב אחד בכיוון הנכון (Leading Strand) והשני בכיוון ההפוך (Lagging Strand), בשני הסיבים הסינתזה היא מ-5' ל-3'. בסיב ההפוך המנגנון הוא של שכפול במקטעים הקרויים מקטעי אוקאזקי Okazaki Fragments הם מסונתזים מ-5' ל-3' וכוללים 100 – 1000 בסיסים בערך, מקטעים אלו מחוברים לאחר מכאן.

סינתזה של DNA היא תהליך שחייב להיות מדויק מאוד, הפולמיראזות גם מכוונות את הנוקלאוטידים הנכונים למקומותיהם אך זה לא מספיק עדיין מתרחשות שגיאות ובכדי לתקנם יש את מנגנון ה-Proof-reading, בנגיף האידס (HIV1) אין מנגנון תיקון זה ודגימת דם מחולה מראה נגיף שונה כל שבוע. ה-Proofreading מתבצע על ידי אזור אחר של ה-DNA פולימראז הנקרא 3' à 5' Exonuclease החותך נוקלאוטיד אחד אחרי השני מהכיוון 3' ל-5' עד להורדה של הנוקלאוטיד השגוי ואז ממשיכה הסינתזה.

ה-DNA פולימראז לא מתחיל את סינתזת סיב ה-DNA אלא האנזים פרימאז Primase הוא זה שעושה זאת. במקטעי אוקאזקי הפרימאז מזרז חיבור של RNA כיוון שסינתזה של DNA מתחילה ב-RNA בכל אחד ממקטעי אוקאזקי, שרשרת ה-RNA המסונתזת על יד הפרימאז היא קצרה 10 – 20 נוקלאוטידים ולשרשראות אלו קוראים RNA Primers. ביצורים אאוקריוטיים הפרימאז הוא חלק מהפולימראז אך הדבר אינו כך בכל היצורים החיים.

לאחר סינתזת ה-RNA Primers מתחיל להיווצר DNA מה שנותן לנו שרשרת המתחילה ב-RNA ומסתיימת ב-DNA, ה-DNA מסונתזת עד שהוא מגיע לשרשרת ה-RNA של מקטע קודם ואז האנזים חותך את ה-RNA Primer של היחידה הקודמת והרצף מושלם על ידי DNA עד שנישאר Nick שהוא חתך ב-DNA כלומר שני בסיסים צמודים אך לא מחוברים, את ה-Nick מתקן האנזים DNA Ligase על ידי יצירה של קשר פוספואסתר בין הנוקלאוטידים.

אנזים נוסף החשוב לסינתזה של DNA הוא ההליקאז Helicase, אנזים זה אחראי על פרימת סיבי ה-DNA וזאת על ידי זה שהוא נקשר לאחד מסיבי ה-DNA (לאחר יצירת מסעף השכפול) ומזרז את הפרימה של ה-DNA, לשם התקדמותו של האנזים על פני השרשרת יש צורך ב-ATP. קיימות הליקאזות רבות כאלו ההולכות מ-5' ל-3' וכאלו שנעים בכיוון ההפוך.

חלבון נוסף בתהליך הוא Single Strand DNA Binding Protein (SSB) זה חלבון הנקשר באופן סלקטיבי ל-DNA חד סיבי ובכך מונע ממנו להתקפל על עצמו וליצור מבנים כמו Hair Pin. תת היחידה הקרויה Processive Elongation היא זו המאריכה את ה-DNA הנוצר יחידה אחר יחידה.

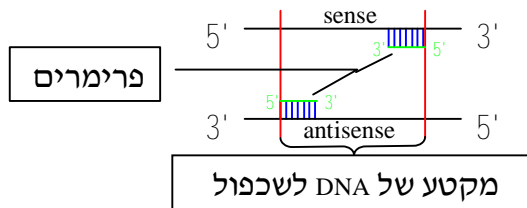
קיימות שתי אפשרויות לסינתזה של DNA האחת בה מתחבר כל פעם אנזים חדש ל-DNA ומוסיף נוקלאוטיד ונפרד מהסיב למצב זה קוראים Non Processive, ואילו המצב השני הוא שיחידה מסוימת קשורה כל הזמן ומוסיפה נוקלאוטידים וזה נקרא Processive. במצב ה-Processive האנזים מחובר ליחידה נוספת הנקראת Clamp שהיא מעין דיסק המורכב משתי תת יחידות אשר ביחד הן מחזיקות את האנזים צמוד ל-DNA. בסיב בו נוצרים מקטעי אוקאזקי הדיסק של ה-Clamp נפתח ומשתחרר כל מקטע.

במציאות סיב ה - Lagging Strand מתהפך בלולאה וגורם לזה שבמרחב נראה כי שני הסיבים משוכפלים באותו כיוון. כל קומפלקס השכפול הוא גדול מאוד, הפולימראז שבקומפלקס הזה מורכב מ- 10 תת יחידות שונות. כל תהליכי השכפול מתרחשים במהירות רבה בקומפלקס אשר עובר שינו מסוים כל סיום של מקטע אוקאזקי.

ה - Proofreading אינו מספיק לתיקון השגיאות ולכן יש מנגנון תיקון נוסף לאחר השכפול והוא מנגנון ה - Mismatch Repair, מערכת תיקון זו היא קומפלקס נוסף של חלבונים בו יש חלבון המזהה את הטעות וחלבון נוסף יוצר Nick (אנזים Endonuclease), ה - Nick שנוצר הוא אזור קרוב לטעות ולאחריו האנזים הליקאז שבקומפלקס פורס את החלק עם הטעות מהסיב הכפול ואז האנזים DNA פולימראז מסנתז את הקטע מחדש ובסופו האנזים ליגאז מחבר את יחידת ה - DNA שסונתזה למקומה. בכדי למנוע מהקומפלקס לפרק את הסיב הישן ללא הטעות אז מתרחשות על סיב זה מודיפיקציות וכך הקומפלקס יכול לפרק רק את הסיב החדש עם הטעות.

שיטה לסינתזה של DNA במעבדה היא PCR השיטה זו ניתן לקבל כמות גדולה מאוד של מולקולות DNA ממולקולת מקור אחת. דבר ראשון בשיטת זו הוא הפרדה של גדילי ה - DNA על ידי דנטורציה, לאחר מכאן אנו משתמשים בפרימרים של DNA ולא של RNA, פרימרים של DNA הם חד גדילים מה שנקרא Oligo, בכדי להתחיל את העבודה אנו מוסיפים dNTPs ופולימראז, הפולימראז הוא פולימראז של Thermus aquaticus והוא אנזים בשם Taq Polymarse כיוון שהוא לא עובר דנטורציה בטמפרטורה של 72° בה מתבצעת הסינתזה (כדי למנוע התחברות הסיבים), כל אנזים אחר יעבור דנטורציה ויאבד את יעילותו.

אנו רוצים בשיטה זו לסנתז מקטע מסוים ולכן צריך שני פרימרים אחד לסיב Sense (העליון) והשני ל - Antisense (התחתון) כך שהפרימרים תוחמים את האזור שאותו רוצים לשכפל, על התהליך חוזרים מספר פעמים (30-60 פעם) ובכל פעם כמות ה - DNA מוכפלת.



כפי שצינו קודם השכפול מתחיל ב - Origin Of Replication אתר זה מכיל בערך 200 נוקלאוטידים ב - E Coli, השכפול באורגניזם זה כמו ברבים אחרים מתחיל על ידי שני מסעפי שכפול הנעים בכיוונים מנוגדים. נקודת המוצא בנויה מ- 4 חזרות על 9 זוגות בסיסים (לא בהכרח צמודים), חזרות אלו לא מושלמות ונקראות Consensus Sequence לדוגמה: TTATNCANA כך ש - N יכול להיות כל אחד מ- 4 הבסיסים ולא בהכרח אותו בסיס בכל החזרות.

ל - 4 החזרות נקשר חלבון בשם DNA A שזה חלבון המורכב מ- 20 עד 40 יחידות היוצרות אגרגט, הקישור הוא קישור ספציפי של החלבון לרצפים בנקודת ההתחלה. בעקבות הקישור ויצירת האגרגט נפתחים הסיבים של ה - DNA באזור צמוד בו יש 3 חזרות של 13 זוגות בסיסים, אזור זה עשיר בבסיסים A ו-T כיוון שבניהם יש רק שני קשרי מימן ולא שלושה כמו בצמד GC. ה - DNA A הוא אחד מהחלבונים הנקראים Initiator Proteine שזו קבוצה של חלבונים המזהה את האזור התחלת השכפול. בכדי למנוע קשירה מיותרת של חלבון זה ל- DNA יש מנגנון בקרה.

במהלך השכפול נוצרים Super Coils בגלל פתיחת הסיבים המשנה את מספר הפיתולים בלי לשנות את מספר הקישורים, כיוון שקיים מקסימום לסיבוב שניתן לבצע יש שיתוף פעולה עם האנזים טופו 1 אשר משנה את מספר הקישורים על ידי חיתוך ה-DNA ויצירת Nick הגורם לכך שאחד הסיבים יוכל להסתובב סביב השני סיבוב אחד ואז האנזים מחבר את הסיבים ומשתחרר.

בסיום השכפול ב-DNA מעגלי מקבלים שני מולקולות זהות של DNA המוצלבות אחת בשניה וצריכות להיפרד, לשם כך האנזים טופו 2 חותך את שני הסיבים של אחד המעגלים ומעביר אותו החוצה ומקבלים שתי מולקולות DNA זהות ונפרדות. לאנזים זה יש מעכבים כמו VP16 המשמש גם כתרופה לסרטן כי הוא מונע את שכפול תאי הסרטן אך לא רק אותם.

באדם יש 2×10^9 זוגות בסיסים הנמצאים ב- 46 כרומוזומים מה שמחייב שכפול באמצעות נקודות התחלה רבות ובכל אחת מהם שני מסעפי שכפול הפועלים בכיוונים מנוגדים, כתוצאה מכך ניתן לשכפל את ה-DNA שלנו בצורה יעילה ובזמן קצר יחסית (6 שעות בערך). כל האזור המשוכפל מנקודת התחלה אחת ניקרא רפליקון Replicon, בחיידקים יש נקודת התחלה אחת ולכן כל ה-DNA הוא רפליקון, באדם קיימת השערה שכל Loop בכרומוסון הוא רפליקון כיוון שהוא זהה ל-DNA מעגלי. כאשר שני אזורים של שכפול בכיוונים מנוגדים נפגשים צריכה להיות סגרציה Segregation המתבצעת על ידי האנזים טופו 2.

במחלת הסרטן נפגעת בקרת השכפול של התאים מה שגורם לחלוקה לא מבוקרת של תאים אלו, הטיפולים לסרטן הם טיפולים הגורמים להפסקת שכפולם של תאים אלו אך פוגעים גם בתאים רגילים. הבקרה מתרחשת בשלב התחלת השכפול, כאשר משוכפל ה-DNA ויש נקודות התחלה רבות צריך שכל אחת מהן תפעל רק פעם אחת כי אחרת לא נקבל שני עותקים זהים, לכן קיים מנגנון חלבוני הנקרא Licensing Factor אשר חייב להיות פעיל בכדי שנקודת התחלה תתחיל בשכפול. חלבון זה נכנס כאשר מתפרק גרעין התא בחלוקת התא. ה- ORC הוא קומפלקס של חלבונים הקשורים לנקודת התחלת השכפול, בשלב מסוים נקשר לחלבון זה החלבון cdc6 המאפשר חיבור של קבוצת חלבונים הנקראת Mem שאחד מהחלבונים בה הוא Licensing Factor.

בנוסף לבקרת השכפול ומנגנוני התיקון קיימים מנגנוני תיקון DNA לאחר שכפול המקטינים עד יותר את הסיכוי לטעות. ל-DNA יכולות להיגרם טעויות ספונטניות כגון הפיכת C ל-U על ידי דהאמינציה, טעות זו מתוקנת במנגנון ה- DNA Repair אשר מחליף את הבסיס הפגום בבסיס הנכון. גם הבסיסים האחרים יכולים לעבור דהאמינציה ונקבל תוצרים שונים, על אף שתופעת הדאמינציה מתרחשת בתדירות נמוכה היא מתרחשת ולכן צריך לתקנה. הפגמים יכולים להיות בתאי מין ואז לעבור לדורות הבאים או פגיעות סומטיות (לא בתאי מין) ולגרום לפגיעה באורגניזם עצמו. קיימת גם אפשרות לפגיעה במערכת הבקרה או במערכות התיקון.

נזקים ל-DNA יכולים להיגרם גם על ידי מטבוליזם בו נוצרים חומרים מחומצנים ורדיקלים חופשיים המסוגלים לגרום מוטציות. גם קרינת UV יכולה לגרום למוטציות ולסרטן (סרטן העור נפוץ בארץ בגלל עור בהיר הרגיש יותר לקרינה). הנזק של קרינת ה-UV הוא ביצירת Thymine Dimers שזה שני בסיסי T הנמצאים על אותו סיב DNA ומתחברים בניהם בקשרים קוולנטיים, דבר זה מפריע לשכפול ה-DNA. כמעט לכל נזק יש מנגנון תיקון המורכב מאנזימים המכירים את השינויים ואת הצורה הנכונה.

סידרה של מחלות גנטיות הנקראות Xeroderma Pigmentosum היא סידרה של פגיעות בגנים שונים ובעלת תופעות שונות, זו היא מחלת עור ואחד הסימפטומים שלה הוא רגישות לקרינת UV ותדירות סרטן העור גדלה. יכולות להיות פגיעות בסיב אחד או בשני סיבים ואז זה נקרא Double Strand Breaks דבר היכול להתרחש על ידי קרני X או קרינה מייננת או אפילו מרדיקלים חופשיים.

תיקון ה-DNA מתרחש בצורה הבאה לאחר זיהוי הנזק מופעל אנזים החותך את הבסיס הפגוע לאחריו יש מנגנון להשלמת הבסיס הנכון מנגנון זה כלל בתוכו את ה-DNA פולימראז ובסוף ה-Nick שנשאר מסודר על ידי ליגאז. את הראקציה משפיעל הפירופוספט שמשחרר ומתפרק בהידרוליזה. לצורך סגירת ה-Nick יש מנגנון המשתמש ב-ATP אשר בשלב הראשון עובר הידרוליזה ומשחרר פירופוספט ו-AMP נקשר בקשר פוספואסתרית לפוספט בקצה ה-5' של ה-Nick בשלב השני ה-OH בקצה ה-3' של ה-Nick מתקיף את הקשר הפוספואסתרית ומשחרר ה-AMP במקביל ליצירת קשר פוספואסתרית חדש ב-DNA. הדבר מתבצע כאשר סיבי ה-DNA מחוברים זה לזה כיוון שהאנזים ליגאז לא עובד ללא הסיב המשלים.

מנגנון תיקון נוסף הוא Base Excision Repair במנגנון זה בו יש החלפה של C ב-U האנזים Uricil DNA Glycosylase מזהה את הנזק ב-DNA ומוציא רק את הבסיס ללא הסוכר על ידי ניתוק הקשר בין הבסיס לסוכר בנוקלאוטיד, החלל שנשאר נקרא Abasic Site, לאחר מכן מוצא הסוכר על ידי שני אנזימים והם: Apoenonuclease ו-PhosphoDiesterase המסירים את הפוספט והסוכר, לאחר מכאן ה-DNA פולימראז מוסיף את הבסיס הנכון והליגאז סוגר את ה-Nick. למנגנונים אלו יש מנגנונים אלטרנטיביים למקרה של פגיעה במנגנון עצמו.

מסלול תיקון נוסף הוא Nucleotide Excision Repair הוא התגלה לראשונה כמתקן נזקי קרינת UV. במנגנון זה נוקלאז מזהה את הטעות ומנתק את הקשרים הפוספואסתרית באזור הפגוע וגורם לביקוע של ה-DNA במרחק של מספר בסיסים מכל צד של הטעות, בשלב הבא האנזים הליקאז מוציא את החלק הפגוע מה-DNA על ידי פתיחת הסיבים באזור זה. אנו מקבלים DNA בו יש סיב שלם וסיב שבו חסר חלק אשר מושלם על ידי DNA פולימראז.

תיקון נוסף הוא תיקון S.O.S או S.O.S Response מנגנון זה מופעל כשיש טעויות רבות הנגרמות לדוגמה על ידי קרינה מייננת גבוהה, כתוצאה מכך עובר התא למצב של מצוקה Stress ונוצרים אנזימי תיקון רבים נוספים ובניהם פולימראזות חדשות אשר מסוגלות לסנתז DNA גם מסיב לא שלם ואז נשארים נזקים מסויימים של בקעים ב-DNA, הפולימראזות החדשות יכולות להכניס כל בסיס שהוא במקום של החלל ובכך ליצור מוטציות רבות אחרות.

לא כל המוטציות רעות חלקן יכול לשפר בהרבה את פעילות האורגניזם וכתוצאה מכך להקנות לו יכולת טובה יותר לשרוד ולפיתוח האבולוציה.

ביולוגיה מולקולרית חלק ב'

ה-DNA הוא החומר הצופן את המידע התורשתי למידע זה ערך רב עם יודעים לנצלו על ידי ידע לקרוא אותו, לשכפל אותו או לבטא אותו. תוצר המידע הגנטי הוא חלבונים והם מבצעים את הפעולות בתא. מספר הגנים ואורך ה-DNA לא מעידים בהכרח על התפתחות לדוגמה תולעת בה ה-DNA מכיל כ-19000 גנים אינה מפותחת יותר מזבוב הפרות (דרוזופילה) שהוא בעל DNA המכיל 16000 גנים כיוון שבזבוב כל גן מבטא יותר חלבונים.

באדם יש כמות בסיסים אדירה ב-DNA אך רק אחוזים בודדים מקודדים לחלבון, הדבר דומה לספר שבכל עמוד יש מילה אחת בעלת משמעות. שאר הבסיסים שזה כ-95% נקראים Junk DNA ותפקידם אינו ידוע עדיין או שהם לשם הקטנת הסיכוי שמוטציה תהיה בחלק מקודד (אך ההסתברות לנזק זהה). ניתן לראות ב-DNA חומר היוצר מכונה שתפקידה לשכפל את החומר ולהעביר אותו לדור הבא לתיאוריה זו קוראים הגנום האנוכי – Selfish DNA. פרויקט פענוח הגנום האנושי נעשה על גנום מעורב ולכן הוא כללי, הגנום של קופים שונה משלנו רק בכ-1.5% כלומר הוא זהה לשלנו ב-98.5%.

קיימות שתי דרכים להעברת המידע הגנטי האחת היא מ-DNA ל-DNA עליה דיברנו בחלק א' של הקורס, צורה שניה הוא העברת המידע לחלבון בעזרת מנגנון מורכב עליו נלמד בחלק זה. ה-DNA נמצא בגרעין התא בעוד שבית החרושת לחלבונים (ריבוזום) מצוי בציטוזול, דבר זה מצריך מתווך בניהם והוא ה-RNA שליח (mRNA). ה-mRNA לא מדויק לחלוטין לפעמים הוא משנה את המידע המועבר.

בעבר לפי הערכות ה-RNA הוא זה שביצע את כל פעולות התא ואילו היום רוב הפעולות מתבצעות על ידי חלבונים. ישנם וירוסים אשר מכילים RNA ולא DNA, כאשר הם תוקפים אורגניזם מופעל בהם מנגנון ההופך RNA ל-DNA הנקרא cDNA. המעבר מ-DNA ל-RNA נקרא תעתוק (או שעתוק) Transcription, המעבר ההפוך מ-RNA ל-DNA נקרא תעתוק לאחור Reverse Transcription והמעבר מ-RNA לחלבון שהוא איננו הפיך בטבע נקרא תרגום Translation.

בתור מתווך ה-RNA צריך להיות בעל מספר תכונות והם: ה-RNA חייב להיות מדויק אך אם הוא מבצע שינוי אזו שהשינוי היה מדויק, הוא צריך להיות בעל יכולת לעבור דרך קרום הגרעין ובעל יכולת להתחבר לריבוזום, הוא חייב להיות בעל יכולת לקרוא את השפה הגנטית (נוקלאוטידים) ולתרגם אותה לשפת החלבונים (חומצות אמינו). הוא חייב להיות קצר חיים ולהתפרק בסוף עבודתו כיוון שאחרת תהייה יצירת חלבון בלתי נשלטת והוא חייב להיות פולי-נוקלאוטיד אך שונה מ-DNA בכדי שהתא יוכל לזהותו בקלות ולפרקו בלי לגרום נזק ל-DNA (ההבדלים הם מתיל המבדיל בין U ל-T והידרוקסיל המבדיל בין ריבוז ל-דיאוקסי ריבוז).

שלב התעתוק של ה-DNA הוא שלב קריטי ונתון לבקרה, בעבר נחשב שלב זה לשלב העיקרי של בקרת הביטוי הגנטי כיום רואים כי מנגנון הביטוי של הקוד הגנטי מבוקר בכל שלב. יש מקטעי RNA שלא יוצאים מהגרעין, יש כאלו המפורקים מיד עם יציאתם, יש כאלו שלא יוצרים חלבון ויש כאלו שהחלבונים הנוצרים מהם מפורקים עם יצירתם.

רצף יחידות לתעתוק קרוי ציסטרון, כאשר יש אחד כזה ה-RNA הוא מונוציסטרוני ושיש מספר קטעים כאלו ה-RNA הוא פולי ציסטרוני והוא מתקבל בדרך כלל על ידי

תהליך עיבוד של RNA (נפוץ בחיידקים וירוסים ואורגנלות). ל-RNA הנוצר מה-DNA בשלב הראשון קוראים RNA ראשוני ולא בהכרח שהוא היה זהה ל-RNA שמגיע לריבוזום. לרצף הבסיסים המהווה את נקודת ההתחלה לתעתוק קוראים פרומוטור, לרצף הבסיסים שלפניו קוראים Up Stream ולכיוון השני (כלומר בכיוון התעתוק) קוראים Down Stream.

בשלב ההתחלה נקשר אנזים לפרומוטור מה שגורם ל-DNA להיפתח בכ- 2 עד 3 סיבובים ונוצרת בועת תעתוק, בועה זו מתחילה לנוע לאורך ה-DNA (או שה-DNA נע דרכה) ועל אחד הסיבים נוספים נוקלאוטידים ליצירת RNA, תנועת הבועה יוצרת פתיחה של הסיבים לפני הבועה וסגירה שלהם אחריה.

בגנום חיידקי המכיל 4-6 מליון בסיסים יש כ- 2000 פרומוטורים, הפרומוטורים מסומנים על ידי רצף של נוקלאוטידים ושינוי באפיוניות מושך את האנזים לרצף. בתא יש הרבה אנזימים המבצעים תעתוק ואנו רוצים שלא כל הגנום יתועתק ולכן צריך מנגנון לזיהוי הפרומוטור המתאים. את פעולה זו מבצע האנזים RNA פולימראז היוצר פולימר של RNA, אנזים זה בחיידקים מורכב מכמה תתי יחידות וגודלו כ- 500 קילו דלטון.

לאנזים RNA פולימראז יש 2 תתי יחידות α שמשקלם המולקולרי הוא 37 קילו דלטון ותפקידם הוא לקשור את האזורים של הפרומוטור וריצפי הבקרה, תתי היחידה נוספת היא β והיא תתי היחידה הקטליטית, תתי יחידה זו יוצרת את הקשרים בין הנוקלאוטידים ל-RNA, באנזים יש גם תתי יחידה β' והיא זו שנקשרת ל-DNA, תתי יחידה נוספת היא σ והיא זה שמזהה את הפרומוטור, האנזים כאשר הוא מכיל את כל תתי היחידות נקרא Hole Enzyme ושהוא ללא תתי היחידה σ הוא נקרא Core Enzyme. בחיידקים יש כ- 6000 מולקולות של אנזים זה במצבו הרגיל וכ- 2500 מולקולות הנמצאות בתעתוק.

לאנזים הזה יש אפיוניות נמוכה ל-DNA במצבו השלם אחרת הוא היה נקשר אליו באופן קבוע, כאשר האנזים מגיע לפרומוטור שצריך תעתוק יורדת האפיוניות באנזים לתתי היחידה σ והיא נקשרת לפרומוטור, עזיבתה של תתי יחידה זו את האנזים גורמת לאנזים לאפיוניות גבוהה ל-DNA והוא מתחבר אליו חזק ומתחיל את הסינתזה. כיום משערים שבתחילת התעתוק יש מנגנון של חצי דיפוזיה באזור בו מרוכז DNA, במנגנון זה האנזים קשור ל-DNA בצורה חלשה ועובר מקטע אחד לשני ב-DNA על ידי דיפוזיה במפגש של המקטעים, כך עובר האנזים על ה-DNA עד שהוא מגיע לפרומוטור.

כאשר נפתחת בועת התעתוק מתחילה תתי היחידה β מיד בתעתוק, ברוב המקרים ה-RNA שנוצר הוא בעל 6-8 נוקלאוטידים ואז מופסק התהליך על ידי חוסר יציבות וה-RNA הקצר שהוכן מפורק. כאשר המקטע מיועד לתעתוק נוצרים כ- 12 עד 20 בסיסים וזה מספיק כדי להמשיך בתעתוק.

בחיידקים נמצא כי באזור של 10- (כלומר 10 בסיסים לפני נקודת ההתחלה של התעתוק) קיים הרצף TATAAT (המכונה TATA Box) וב- 35 קיים הרצף TTCACA, רצפים אלו הם רצפים חוזרים והחזרות אינן מדויקות ב- 100%. ממצא זה אושר על ידי בדיקת Foot Printing שבה בדקו היכן נמצאים תתי היחידות של האנזים מייד לאחר החיבור. עוד לפני רצפים אלו יש רצפים ספציפיים לקליטת חלבונים ספציפיים והם הדכאנים Depressors המעכבים תעתוק ומשרנים Inducers המזרזים תעתוק. המשרן גורם לכיפוף ב-DNA העוזר לאנזים להיקשר בעוד שהדכאן מפריע

לקשירה של האנזים על ידי גודלו. ל- TATA Box נקשר החלבון T.F.II.D ואליו נצמד RNA פולימראז וחלבונים נוספים שהם פקטורים של מערכת התעתוק.

על פרומוטור מסוים יכולים להיות מספר דכאנים או מספר משרנים ואפילו כמה משרנים וכמה דכאנים יחד. המשרנים והדכאנים הם חלבונים והם נוצרים על ידי מנגנון התעתוק שמבוקר על ידי משרנים ודכאנים אחרים.

אחת השיטות לזיהוי פרומוטורים היא Protection Assay או DNase Protection, בשיטה זו ניתן לזהות את גודל האזור אליו נקשר ה-RNA פולימראז וזו על ידי לקיחת מולקולה של DNA דו גדילית והוספה של האנזים RNA פולימראז ולאחר מכאן להוסיף DNase שחותך את ה-DNA באופן לא ספציפי על ידי שבירת הקשרים הפוספואסטרניים הנמצאים בשלד ה-DNA, כתוצאה מכך אנו מקבלים נוקלאוטידים בודדים ומקסימום דינוקלאוטידים אך באזור שבו נקשר ה-RNA פולימראז אין גישה ל-DNase מה שנותן לנו פרגמנט שלם של DNA, לאחר דיסוציאציה של החלבון אנו מקבלים את רצף ה-DNA המכיל כ- 40 עד 44 בסיסים.

שיטה נוספת היא Foot Printing אותה הזכרנו קודם, בה אנו מסמנים את אחד הסיבים בקצה בסימן רדיואקטיבי, אנו נוסיף RNA פולימראז ובמקביל נבצע ראקציית ביקורת ללא אנזים זה, לאחר מכאן אנו לוקחים DNase אך הפעם מפעילים אותו בצורה מבוקרת שיחתוך את ה-DNA רק פעם אחת, כתוצאה מכך אנו מקבלים קטעי DNA באורכים שונים. לאחר מכן מריצים את הפרגמנטים בג'ל ומקבלים סולם עולה אך שחסרים בו מספר שלבים שנמצאים בביקורת ומכאן שה-DNase לא חתך שם כי היה חסום.

שיטה נוספת היא Interference והיא מאפשרת לזהות נוקלאוטידים ספציפיים הנקשרים ל-RNA פולימראז, שיטה זו מבוצעת כמו השיטה הקודמת אך על אזורים מסויימים ובעזרת מודיפיקציות על בסיסים שונים למציאה של הבסיסים אשר בעת שינוי שלהם נמנע הקישור ואלו הם הבסיסים המבצעים את הקישור.

לסיום התעתוק יש שני מנגנונים עיקריים האחד הוא רצף חוזר של G ו-C היוצרים מעין גבעול של לולאה דבר זה גורם להפרעה וניתוק ה-RNA, המנגנון השני הוא על ידי חלבון בשם רו Rho הבנוי מ- 6 תתי יחידות ונקשר ל-RNA בעזרת ATP ההופך ל-ADP, חלבון זה נע על ה-RNA בקצב יותר מהיר מקצב יצירת ה-RNA ואז הוא נכנס לבועת התעתוק ומפסיק את יצירת ה-RNA.

האזורים ב-DNA המקודדים לחלבון קרויים אקסונים Exons ואלו שלא מקודדים נקראים אינטרונים Introns, קיום אזורים אלו נפוץ ביצורים אאוקריוטים אך לא נפוץ בפרוקריוטים. ניתן לראות כי ביצירת ה-RNA מתקפל ה-RNA כל שהאקסונים קרובים זה לזה והאינטרונים יוצרים לולאות. הלולאות מוסרות והאקסונים מתחברים ביניהם וכך מתקבל ה-RNA ללא חלקים אלו, אם עושים היברידיזציה ל-DNA עם cDNA או עם mRNA אנו מקבלים את הלולאות ב-DNA. המעבר מ-RNA ל-mRNA נקרא שיחבור Splicing. טלומרים הם רצפים הנמצאים גם בפרוקריוטים וגם באאוקריוטים, רצפים אלו לא מבוטאים והם עשירים בנוקלאוטידים G ו-C. ככל שאורגניזם מורכב יותר עולה כמות ה-DNA בגנום ההפלואיד.

יש 3 סוגים של RNA פולימראזות, RNA פולימראז I הוא מסנתז את רוב ה-tRNA, RNA פולימראז II הוא זה שמסנתז את ה-mRNA וגם כמה snRNA, הוא נמצא בגרעין התא ופועל על האזורים הפתוחים לתעתוק, ו-RNA פולימראז III המסנתז קצת tRNA ואת ה-tRNA וגם הוא נמצא בגרעין. במיטוכונדריות להם יש DNA עצמאי יש RNA

פולימראזות מסוג אחר הדומה לזה של בקטריו-פאג', בצמחים יש בכלורופלסטים שני סוגי RNA פולימראז האחד דומה לזה של חיידקים והשני לזה של בקטריו-פאג'.

לאחר יצירת ה-mRNA הוא צריך לצאת מגרעין התא ולנוע לריבוזום אך עוד לפני כן הוא עובר שינוי, בקצה ה-5' ה-RNA עובר מודפיקציה של התחברות GTP בצורה מיוחדת (של 5' ל-5' ובניהם נשארים הפוספטים) היוצרת מעין כובע CAP המגן על ה-mRNA. בשלב הבא האנזים מתילאז הופך את המימן שעל החנקן שבאותו GTP למתיל (לפעמים גם המימנים הבסיסיים הקרובים הופכים למתילים). בקצה השני של ה-mRNA לאחר הרצף AAUAAA נוצר על ידי האנזים אנדו-ריבונוקלאז זנב ארוך של כמה מאות נוקלאוטידים A ולו קוראים פולי A.

משמעות הפולי A היא בהעתקה לאחור (במידה וקיימת) ובסימון שהסוף תקין וניתן לתרגם את הרצף. מיד לאחר היווצרות זנב הפולי A הוא מתכסה בחלבון Poly A Binding Protein. פגיעה בחלבון זה מונעת מהריבוזום לבצע את התרגום של ה-mRNA, בנוסף בזמן התרגום ה-mRNA הוא מעגלי מעגל זה נוצר על ידי חיבור של הפולי A לחלבון הנקשר ל-CAP, ורק כאשר ה-mRNA מעגלי יכול להיקשר אליו הריבוזום. בחיידקים רק לכמות קטנה של RNA ניקשר הפולי A כי שם הוא מסמן RNA הנועד לפרוק מידי.

חלבון רגיל הוא בעל בערך 500 חומצות אמינו שזה אומר 1500 נוקלאוטידים ועוד בערך 200 מכל צד שזה כ-2000 נוקלאוטידים, אינטרונים יכולים להיות בגדלים של מכמה עשרות לכמה מאות אלפים של נוקלאוטידים. ה-RNA יודע לפעול כמו חלבונים, עם הזמן נוצרו חומצות אמינו ובשלב מסוים הם חוברו על ידי ה-RNA על ידי פונקציה חדשה שנוצרה, כתוצאה מכך קיבלו קטע של חלבון אשר ידע לבצע פעולה מסוימת, עם הזמן התפתחו חלבונים בעלי אזורים שונים המבצעים פעולות שונות.

תופעת השיחבור מאפשרת לאקסונים להתחבר לאו דווקא בסדר בו הם נוצרים, תופעה זו נקראת חיבור אלטרנטיבי והיא קיימת אצלנו במערכת הנוגדנים בכדי להתגבר על חיידקים שונים. הדבר קיים גם בזבובים שם חיבור אלטרנטיבי קובע את מין הזבוב (זכר או נקבה). תהליך השיחבור מתבצע על ידי קומפלקס ה-snRNP (sn מסמן Small Nuclei) שהוא קומפלקס הבנוי מחלבונים ו-RNA.

השיחבור ב-RNA נעשה על ידי כניסת הקומפלקס וקשירתו ל-5' של האינטרון וקומפלקס שני קצת לפני הקצה 3' של האינטרון, לאחר מכן נקשרים שני הקומפלקסים ונוצרת לולאה, כתוצאה מכך מופרד האינטרון מהאקסון הראשון ולאחריו גם מהשני (בבעלי חיים עילאים ה-RNA בקומפלקס הוא זה שמבצע את ההפרדה). בשלב זה לאחר ההתנתקות מפורק האינטרון לנוקלאוטידים. כל האינטרונים מתחילי בנוקלאוטידים GT (השמורים ב-100%) ונגמרים בנוקלאוטידים AG (שגם הם שמורים ב-100%).

כאשר מסתכלים על אינטרונים ניתן לחלקם ל-3 סוגים לפי דרך השיחבור שלהם, הקבוצה הראשונה מצויה בעיקר במיטוכונדריה של יצורים ירודים, בקבוצה זו כשמוסיפים GTP מתבצע השיחבור באופן עצמאי על ידי ה-RNA עצמו, למנגנון זה קוראים Self Splicing והוא מתבצע על ידי התקפה נוקלאופילית של GTP ודיוקו רב מאוד. הקבוצה השנייה דומה מאוד לראשונה היא קיימת בבקטריו-פאג'ים ואורגנלות, ההבדל בקבוצה זו מקודמתה הוא שכאן אין צורך ב-GTP, כלומר השיחבור מתרחש באופן עצמאי ואינו דורש דבר. הקבוצה השלישית היא זו שדורשת את קומפלקס החלבונים הנקרא שיחבורון Spliceosome, קבוצה זו פועלת

בצורה דומה לקבוצה השניה אך עושה זאת בעזרת הקומפלקס, זו הצורה הנפוצה של שיחבור ברוב הגנים.

יתכן שיחבור של אקסונים משתי מולקולות RNA נפרדות שיחבור זה נקרא שיחבור בטראנס בניגוד לשיחבור בציס שזה השיחבור הרגיל (לא לשכוח את אפשרות השיחבור האלטרנטיבי אליה דיברנו בעבר).

התעתוק הראשוני נותן לנו שרשרת RNA ארוכה בעלת אורך חיים קצר הנקראת hnRNA (Hydrogenos Nuclia). מולקולות RNA רבות עוברות בנוסף למה שכבר אמרנו גם תהליך עריכת RNA (Editing), בעריכה זו מוחלפים נוקלאוטידים מסויימים באחרים במתכוון. הדבר נפוץ במיטוכונדריות של טפילים של מלריה שם נוספות כמויות גדולות של הנוקלאוטיד U ונוקלאוטידים של T ב-DNA לא מקבלים את המשלימים שלהם ב-mRNA. גם באדם יש שינויים כאלו במיטוכונדריות אנזים לפרוק שומנים נוצר מ-mRNA שמשונה בצורה זו, גם במוח שם יש רצפטור לגלוטמט הנוצר עם ידי שינוי של המידע הגנטי. בחיידק של שושנת יריחו במיטוכונדריה יש mRNA שבו 70% מהנוקלאוטידים משתנים במנגנון זה.

מנגנון העריכה הוא לא אקראי אלא הוא מדויק מאוד וספציפי, אנו רואים כי העריכה תמיד מקרבת את החלבון לחלבון הנכון ולא מרחיקה אותנו ויוצרת חלבון חדש. מכאן משערים שזה מנגנון של תיקון מוטציות ברמת ה-RNA.

מנגנון אחד לביצוע עריכה הוא על ידי RNA מדריך שהוא RNA משלים הנצמד ל-RNA החדש וההבדלים מתוקנים. מנגנון שני הוא על ידי האנזים דהאמינאז ההופך את הבסיס C ל-U על ידי הורדת קבוצה NH_2 , לאנזים זה שתי פונקציות האחת היא בקרה על רצף מסוים והשניה היא אתר פעיל המרוחק במרחק קבוע מאזור זה המשנה את C ל-U.

עריכת ה-RNA היא מנגנון הבקרה האחרון לפני הוצאת ה-mRNA מגרעין התא, תהליך שגם הוא מבוקר על ידי הוספת ה-CAP המסמן כי ניתן להוציא את ה-mRNA. בתא יש מנגנון לזיהוי של ה-RNA של התא והבדלתו מ-RNA-ים זרים המפורקים במהירות. מכלל ה-RNA של התא 80% הוא rRNA (ריבוזומלי), 10% הוא tRNA, 5% הוא mRNA ו-5% הוא כל השאר (snRNA, gRNA ועוד).

קיימים מעכבים שונים לתעתוק חלקם נקשרים ל-DNA וחלקם ל-RNA פולימראז, ה-Actinomycin D נקשר ל-DNA דו גדילי בין G ל-C ב-DNA הוא לא מפריע להיקשרות של ה-RNA פולימראז לפרומוטור אך הוא מפריע לפולימראז לבצע את התעתוק. מעכב נוסף הוא Rifampycin (Rifampycin) הוא נקשר לתת יחידה β ב-RNA פולימראז ומונע ממנה ליצור קשרים פוספודיאסטרניים, מעכב זה לא פוגע בפולימראזות שכבר התחילו תעתוק רק ב-RNA פולימראזות שעוד לא נקשרו ל-DNA לשם התחלת התעתוק. מעכב נוסף הוא Amanitin α והוא מעכב של RNA פולימראז II באאוקריוטים.

האינפורמציה הגנטית המוצגת כ-2 או 3 קשרי מימן (שפת הנוקלאוטידים) מועברת לרצף חומצות אמינו, שלב זה נקרא תרגום והוא בעייתי כיוון שהוא חייב להיות מדויק ומבוקר. אנו רואים שכל 3 נוקלאוטידים מקבילים לחומצת אמינו אחת אך קיימות מספר אפשרויות קריאה של רצף לדוגמה הרצף ABCDE יכול לתת 3 אפשרויות שונות ABC, BCD ו-CDE מה שנותן שפה חופפת דבר הקיים בוירוסים מסויימים לשם חיסכון בגודל הגנום. השלשה הקובעת את הקריאה נקראת מסגרת הקריאה ובקטע גן יכולות להיות 6 מסגרות (3 בכל כיוון).

כיוון שיש 4 נוקלאוטידים קיימות 64 שלשות אפשריות אך יש רק 20 חומצות אמינו, דבר זה נותן לנו חומצות אשר להן יש יותר מרצף אחד היוצר את אותה חומצה אמינית דבר זה נקרא צופן גנטי מנוון. כתוצאה מהצופן המנוון יורד הסיכוי למוטציה עקב טעות כי יכלה להיות טעות שלא תשנה את החומצה האמינית (על המוטציות השונות נפרט בהמשך). אם היו רק 20 רצפים המקודדים לחומצות אמינו ה-44 הנותרים היו מקודדים לסיום התרגום. קיימות שתי חומצות אמינו בעלות רצף אחד, אחת מהן היא מתיונין חומצה זו היא גם החומצה הראשונה, כלומר היא החומצה שממנה מתחיל התרגום. המערכת יודעת להבדיל בין מתיונין שבאמצע החלבון למתיונין שמתחיל את החלבון - המתיונין הראשון הוא זה שקובע את מסגרת הקריאה. בנוסף קיימים גם 3 קודוני סיום (קודון רצף של 3 נוקלאוטידים), קודונים אלו עוצרים את התרגום אך ניתן למצוא גם מספר קודוני סיום לפני ה-AUG הראשון שהוא הקודון של המתיונין.

התא משתמש לשם תרגום במתאם בין שפת הנוקלאוטידים לשפת חומצות האמינו, מתאם זה בנוסף ל"ידיעת" שתי השפות צריך גם להתקרב לנשאים אחרים הנושאים חומצות אמינו, זה מחייב אותו להיות קטן ומדויק, חייבים להיות מתאמים שונים לכל חומצת אמינו הנושאים את הרצף המשלים לקודון (רצף זה של 3 נוקלאוטידים נקרא אנטי קודון).

המתאם הוא ה-tRNA שהוא מולקולת RNA המכילה כ-70 עד 90 נוקלאוטידים, כפי שאמרנו יש tRNA שונה לכל חומצה אמינית אך כל ה-tRNA-ים דומים חוץ מהבדלים קטנים המפרידים בניהם. בקצה ה-3' של ה-tRNA יש תמיד את הרצף CCA הקשור לחומצה האמינית, רצף זה בחיידקים מקודד על ידי ה-DNA וביצורים אוקריוטים הוא מוסף ל-tRNA בתהליך עיבוד.

מולקולות ה-tRNA יוצרות צורה של עלה תלתן על ידי קשרי מימן ביו הבסיסים במולקולה, אנו מקבלים 3 עלעלים רגילים ואחד קטן שגודלו משתנה ונותן הבדל ברור ביו המולקולות השונות. בצורה מרחבית ה-tRNA יוצר צורה של T, העלעל התחתון הוא העלעל עליו נמצא האנטי קודון.

באינטרקציה בין הקודון לאנטי קודון יש מצב של ריפוף Wobble, כלומר הבסיס השלישי לא נמצא במישור של ה-mRNA ולכן הוא כמעט ולא משתתף באינטרקציה במתיונין ובטריפתופן האנטי קודון שונה כי יש רק רצף אחד ליצירתם ולכן צריך התאמה מלאה. ב-tRNA נמצאים גם נגזרות של הבסיסים U, G, C, A וגם הם מבדילות בין המולקולות, כל נגזרת מסומנת ברישום על ידי * והם נוצרות על ידי מודיפיקציות שלאחר תעתוק.

אנו רואים כי בריבויזום אין בקרת איכות לזיהוי הקשר בין חומצת האמינו ל-tRNA אך יש בקרה במנגנון המחבר את חומצת האמינו ל-tRNA והוא נקרא הצופן הגנטי השני וטעות בו תגרום ליצירת חלבון לא נכון. בריבויזום כן מתבצעת בקרת איכות רק אחרת, בקרה זו משתמשת באנזים הפועל אקראית ולא תמיד מגלה את הבעיה. אנו צריכים אנזים מאוד ספציפי שיחבר בין חומצת האמינו ל-tRNA והוא האנזים אמינו אציל tRNA סינתאז, אנזים זה צריך לזהות את שני הגורמים, חומצת האמינו וה-tRNA, המתאימים בוודאות ולכן יש אנזים שונה לכל חומצה אמינית. חיבור ה-tRNA לחומצת האמינו מתבצע בציטוזול ובעזרת שימוש ב-ATP או GTP ושלב ביניים בו לאנזים קשורה חומצה אמינית ו-AMP או GMP ולאחר כניסת ה-tRNA מתנתק ה-AMP או ה-GMP בהתאמה.

גילוי הרצפים שנותנים את חומצות האמינו החל בניסוי של מרשל נירנברג בו בודד ציטוזול ואליו הוכנס פולי U כ-mRNA וגם ATP ו-GTP, הניסוי נערך ב-20 מבחנות שבכל אחת מהם הוכנסה חומצה אמינית אחרת המסומנת בפחמן רדיואקטיבי ו-19 חומצות אמינו רגילות וכך התקבל רק חלבון של Phe, לאחר מכן חזרו על הניסוי עם פולי A וקיבלו חלבון המורכב רק מ-Lys ושהשתמשו בפולי C החלבון כלל רק את חומצת האמינו Pro. כדי למנוע מה-DNA בניסוי ליצור מולקולות לא רצויות של mRNA הוא השתמש באנזים דיאוקסי ריבו נוקלאז לפרק את ה-DNA. את הפולי נוקלאוטיד הוא יצר על ידי האנזים Polynucleotide Phosphorylase בהוספה רק של סוג נוקלאוטיד אחד לתמיסה ו-ATP כדי לספק אנרגיה. את שאר הקודונים הוא סינתז בדרכים כימיות שונות.

בעזרת ניסויים באורגניזמים שונים התברר כי הצופן הגנטי הוא אוניברסלי כלומר זהה לכל האורגניזמים מלבד כמובן מספר יוצאים מהכלל, לדוגמה במיטוכונדריות של חיידקים מסוימים יש קודונים שונים משלנו כגון קודון שאצלנו נותן חומצה אמינית מסוימת להם הוא קודון עצירה, הדבר אפשרי כיוון שלמיטוכונדריה יש DNA של עצמה והיא מתפקדת בקצב שונה משאר חלקי התא.

מוטציות המתרחשות בתאים סומטיים משפיעות רק על האורגניזם עצמו בעוד שמוטציות בתאי מין משפיעות גם על הדורות הבאים. קיימים מספק סוגים של מוטציות הקשורות לתרגום, הראשונה היא מוטציה שקטה Silent Mutation בה שינוי של אחד הביסים לא משנה את חומצת האמינו וזאת בזכות הצופן המנוון. מוטציה שניה היא Missense Mutation בה שינוי של בסיס אחד משנה את חומצת האמינו, במוטציות מסוג זה השינוי יכול להוביל לחומצה אמינית בעלת תכונות דומות מה שאולי לא יפגע בפעילות החלבון או שהשינוי היה גדול יותר והחלבון לא היה פעיל (יתכן גם שינוי באתר הפעיל שיפגע בצורה דרסטית בחלבון). מוטציה נוספת היא ה-Nonsense Mutation בה בעקבות השינוי נוצר קודון עצירה ומקבלים חלבונים קצרים וחסרי פעילות (יתכן שהמוטציה תפגע באחת מחומצות האמינו האחרונות בחלבון מה שלא יגרום לפגיעה רבה בתפקודו). מוטציה נוספת היא Frame Shift Mutation בה מוסטת מסגרת הקריאה על ידי הוספה או הסרה של בסיס אחד או יותר ואז מקבלים חלבונים שונים לחלוטין (בדרך כלל לאחר קודון העצירה המקורי יש קודוני עצירה נוספים למסגרות הקריאה השונות כדי לעצור חלבונים שיכולים להיווצר מהם).

בנוסף למוטציות נקודתיות אלו יש מוטציות כרומוזומליות בהם משתנה חלק גדול של 2000-1000 נוקלאוטידים וזאת בעיקר על ידי שבירה ואיחוי של מולקולות DNA. קיימות 4 סוגי מוטציות כאלו: מוטציית חסר בה חסר חלק מה-DNA שנשבר ויוצא החוצה וה-DNA מתחבר מחדש ללא חלק זה, מוטציה שניה היא הכפלה בה מוכפל אזור מסוים ב-DNA זאת על ידי תהליך המיוזה בו נוצרים כרומוזומים הומולוגיים זהים מבחינת מטען גנטי וחלק מאחד מהם מועבר לשני לפי הרעיון הבא ABCDEFG ו-1 ABCDEFG הם כרומוזומים הומולוגיים והחלקים המסומנים בקו תחתי מתחלפים ומקבלים ABEFG ו-1 ABCDCDEFG. מוטציה שלישית היא היפוך שבה קטע מסוים ב-DNA מתהפך כלומר מ-1 ABCDEFG מקבלים 2 ABEDCFG. מוטציה רביעית היא טראנסלוקציה בין כרומוזומים לא הומולוגיים כלומר כמו מוטציה 2 אך מכרומוזומים שונים.

הריבוזום הוא קומפלקס חלבוני אנזימטי ענק ובו מתבצעת העברה של המידע הגנטי לחלבונים. מבנה הריבוזום התגלה על ידי קריסטלוגרפיה וביוכימיה. הריבוזומים נעים על ה-mRNA או שהוא נע דרכם ובו נוצרים קשרים פפטידים בין חומצות האמינו. הריבוזומים בנויים משני יחידות, גדלי יחידות אלו נמדדים ב-S

שזה סימון למידת השקיעה בשדה צנטרפוגלי, היחידה הגדולה בחיידקים היא 50s והקטנה 30s ושהם ביחד גודלם 70s (בגלל המבנה). בין שתי היחידות יש מעין תעלה שדרכה עובר ה-mRNA. כ-60-70 אחוז מהריבוזום הוא rRNA ולא חלבון היחידה הגדולה מורכבת מ-34 חלבונים ושני מולקולות RNA ובקטנה יש 21 חלבונים ומולקולת RNA אחת.

באאוקריוטים הריבוזומים גדולים יותר היחידה הגדולה היא 60s המכילה 50 חלבונים ו-3 מולקולות RNA והקטנה 40s המכילה 33 חלבונים ומולקולת RNA אחת וביחד נותנות את הריבוזום שזה 80s. הבדלים אלו מביאים לכך שבעזרת חומרים ספציפיים ניתן לפגוע בפעולות של הריבוזומים חומרים אלו הם אנטיביוטיקות והן מעייפות אותנו בזמן שהן פוגעות בריבוזום של החיידקים הן פוגעות גם במיטוכונדריות שהריבוזום שלהם דומה לזה של חיידקים, על חומרים אלו נפרט בהמשך.

המתיונין הראשון מובדל ממתיונין שבתוך החלבון על ידי tRNA שונה ובפרוקריוטים יש הצמדת קבוצה של פורמיל על הצד האמיני מה שנותן לנו פורמיל מתיונין, לאחר יצירת החלבון מוסר הפורמיל ובחלק מהחלבונים מוסר גם המתיונין.

בתחילת הסינתזה של החלבון מגיעה היחידה הקטנה ומחפשת את ה-AUG הראשון היחידה הזאת נקשרת ל-CAP בעזרת קומפלקס גדול המורכב מחלבונים רבים שהם פקטורי האיניציאציה, היחידה נעה על ה-mRNA עד ל-AUG הראשון, כ-10 בסיסים לפני רצף זה מצוי בחיידקים רצף שמור המתאים לרצף בסיסים ב-tRNA של היחידה הקטנה של הריבוזום, לרצף זה קוראים שייך דלגרנו. ה-IF³ הוא פקטור איניציאציה 3 הוא נקשר ליחידה הגדולה ומונע את חיבורה ליחידה הקטנה לפני הזמן, מניעת הקישור נעשה על ידי הורדת האפיניויות של היחידה הגדולה לקטנה כאשר הוא מוסר נקשרות שתי היחידות. כניסת ה-tRNA הראשון מווסתת על ידי IF² המקשר בין ה-tRNA של המתיונין פורמיל וה-AUG הראשון.

הריבוזום מכסה כ-30 נוקלאוטידים אך אותנו מעניינים רק 6 שהם אלו של החומצה האמינית הקשורה ואלו של החומצה הבאה שצריכה להתחבר. בשלב הבא הריבוזום נע ומתחברות חומצות אמינו לפי מסגרת הקריאה. החומצה הראשונה נקשרת באתר P, אתר A הוא האתר אליו נקשרת חומצת האמינו השניה ואתר E בו נמצא ה-tRNA ללא החומצה לפני שהוא עוזב את הריבוזום. כאשר המולקולה הנכונה נכנסת למקום חל שינוי במבנה המרחבי מה שגורם לתפיסת המולקולה ואז נוצר הקשר הפפטידי על ידי Peptidyl Transferase וכתוצאה מכך מנותקת חומצת האמינו מה-tRNA שבאתר P ונוצר פפטיד על ה-tRNA שבאתר A, לאחר מכן יש את תנועת הריבוזום ומה שהיה באתר A נמצא עכשיו באתר P ומאתר P עבר ה-tRNA הריק לאתר E, פעולות קטליטיות אלו מבוצעות על ידי ה-tRNA ולא החלבון בריבוזום.

לאחר יצירת הקשר הפפטידי חל שינוי קונפורמטיבי גדול אשר גורם להתנתקות ה-tRNA הריק ותזוזה של הריבוזום בדיוק 3 בסיסים וכל הלאה. בשלב האחרון בו מגיעים לאחד מקודוני הסיום להם אין tRNA אז נכנסים לאתר A פקטורי סיום ואז חל שינוי במבנה המרחבי מה שגורם לשחרור החלבון, לאחר מכן מתנתקים פקטורי הסיום ונפרדות יחידות הריבוזום זו מזו ליחידה הגדולה נקשר פקטור האיניציאציה וה-mRNA נלקח לפרוק או סינתזת חלבון נוספת. אין חובה שאותם יחידות יתחברו שוב כלומר כל יחידה גדולה יכולה להתחבר עם כל יחידה קטנה.

כפי שציינו קודם יש מעכבים לפעולות הריבוזומים והם :

ה-Pyromycin – אנטיביוטיקה מפריעה בשלב האלונגציה היא דומה לחומצת אמינו ונכנסת לאתר A יוצרת קשר עם הקרבוקסיל של הפפטיד בכך גורמת לזה שהחלבון לא יוכל להמשיך להיווצר והוא משוחרר לא שלם. מעכב זה משפיע על היחידה 50s. מעכב נוסף משתמש באנלוגים של GTP המעכבים את שלבי האלונגציה.

Streptomycin הוא מעכב הפוגע בתחילת התרגום על ידי הפרעה לפורמיל מתיונין tRNA להיקשר ל-mRNA, הפרעה זו נעשית על ידי קשירתו ליחידה 30s ובכך גורם לקשירה לא נכונה של קודונים מעכב זה ספציפי לפרוקריוטיים.

אנטיביוטיקה נוספת היא Tetracycline היא נקשרת ל-30s ולכן היא ספציפית לפרוקריוטיים, אנטיביוטיקה זו מונעת את קישור ה-tRNA עם החומצה האמינית לאתר A. (אנטיביוטיקה זו לא ניתנת לנשים בהריון ולילדים מתחת לגיל 12 כי היא פוגעת באמייל השן).

עוד אנטיביוטיקה היא Chloramphenicol הנקשרת ליחידה 50s ולכן ספציפית לפרוקריוטיים היא משפיעה על השלב השני באלונגציה על ידי עיכוב של האנזים פפטידיל טראנספראז כלומר יצירת הקשר הפפטידי (משמשת לטיפול בדלקות עיניים).

Cyclohexamide היא אנטיביוטיקה נוספת היא מעכבת את פעילות האנזים פפטידיל טראנספראז גם כן אך באאוקריוטים על ידי קשירה ליחידה 60s.

אנטיביוטיקה נוספת היא Erythromycin היא נקשרת ל-50s ומעכבת את השלב השלישי באלונגציה שזה הטראנסלוקציה כלומר מעבר הריבוזום לשלושת הבסיסים הבאים.