

ביולוגיה של התא- סיכום קורס (134128)

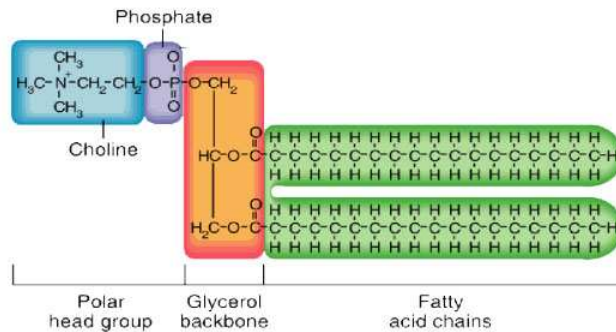
חלק ראשון של הקורס

מבנה ממברנה:

lipid bi-layer מורכב מפוספוליפידים. יש חלבונים טרנס ממברנליים המשמשים עוגן לשלד התא. למשל band 3 המשמש עוגן לחלבון ספקטרין (Spectrin). בין ספקטרין לבנד 3 נמצא החלבון המקשר Ankyrin.

החלבונים הטרנס ממברנליים יכולים להוות תעלות, רצפטורים- הם מתווכים בין הפנים לחוץ התא.

פוספוליפידים- הליפידים של הממברנות. אלה ליפידים עם בסיס של גליצרול. הגליצרול קשור בקשר אסתר ל-2 חומצות שומן, והוא גם קשור לשייר פוספט. על שייר הפוספט יושב ראש פולרי למשל כולין (PC) שהוא הכי נפוץ.



סוגים אחרים- PE ו-PS, PI מהווה רק 5% מהפוספוליפידים של הממברנה והוא משמש להעברת סיגנלים. בחומצת השומן יש בדרך-כלל בעמדה 2 קשר כפול אחד או יותר. הקשרים הם cis ולכן השרשרת לא ישרה אלא מכופפת (לא נראה באיור). לכל פוספוליפיד מטען שונה. פוספטידיל סרין מכיל מטען שלילי לעומת שאר הליפידים שיש להם מטען כולל ניטרלי. פוספטידיל סרין פונה לפנים התא והפוספוליפידים האחרים פונים כלפי חוץ. כך על הממברנה מטען שלילי מבפנים בגלל הפוספטידיל סרין, ומבחוץ בגלל סוכרים.

ספינגוליפידים- סוג אחר של ליפידים, המשתמש בבסיס ספינגוזין במקום גליצרול. ליפידים אלה מהווים כ- 10-15%. בספינגוזין יש קבוצה אמינית במקום אחד מה-OH שיש בגליצרול. הבלד נוסף בספינגוליפידים הוא שהספינגוזין נוצר ביחד עם חומצות השומן ולכן אין כמה סוגים. הבלד שלישי, הקשר הוא trans ולכן אין כיפוף אלא מתקבלת שרשרת ישרה. בגלל שיש קבוצה אמינית נוצר קשר אמידי במקום קשר אסתר שהוא קשר הרבה יותר יציב ולכן המולקולה יותר יציבה. ספינגומילין הוא ספינגוליפיד המשתמש בספינגוזין, עם ראש כולין (PC). הראש הפולרי של הספינגוליפידים מופנה אל מחוץ לתא ולכן אפשר לזהות אותם.

כולסטרול- מהווה כמחצית ממשקל הליפידים בממברנה. הוא לא מסיס, לא יוצר מבנים של bi-layers, אבל הוא משתלב בממברנה העשויה מפוספוליפידים. הראש הפולרי מאוד קטן.

הכולסטרול סותם את המרווחים ב-bi-layer הנוצרים בגלל הכיפוף ומייצבים את מצב הביניים בין מוצק לנוזל.

חלבוני ממברנה: חלבונים טרנס ממברנליים או מעוגנים לממברנה

חלבונים טרנס ממברנליים- האזור הטרנס ממברנלי הוא בצורת α הליקס. רוב השיירים הטרנס ממברנליים הם הידרופוביים. בחלק החוץ תאי יש בדרך-כלל סוכרים. בחלק הציטוזולי אין סוכרים. קשרים דיסולפדיים יכולים להתקיים מחוץ לתא.

חלבונים מעוגנים לממברנה- עיגון יציב על-ידי חומצת שומן. הקשר לחומצת השומן הוא קשר קוולנטי אל חומצת השומן שנמצאת ב-bi-layer. בכך העיגון הוא לחצי מהממברנה (ולא לשני שכבות ה-bi-layer). עיגון חזק יותר לממברנה הוא כאשר החלבון הינו טרנס ממברנלי. שלושה סוגי עיגון על-ידי חומצת שומן:

1. חומצת שומן מיריסטט- חומצה רוויה עם 14 פחמנים. המיריסטט נקשר לשייר אמינו בחלבונים- תמיד לגליצין. החומצה קצרה ולכן העיגון לממברנה הפוך. הקשר בין החלבון לחומצת השומן הוא קשר אמידי ולכן המודיפיקציה קבועה.
2. חומצת שומן פלמיטט- חומצה רוויה עם 16 פחמנים. הפלמיטט נקשר בכמה מקומות בחלבון, בדרך-כלל קרוב לקצה הקרבוקסילי. העיגון לממברנה במקרה הזה קצת יותר חזק אבל גם כן הפוך. הקשר בין החלבון לחומצת השומן במקרה הזה הוא חלש יותר מכיוון שקשר טיו-אסתר חלש יותר מקשר אמידי.
3. פוספוליפיד- קשר קוולנטי לפוספוליפיד הקשור לממברנה. הקשר יציב.

חלבונים המעוגנים באמצעות חומצות שומן פונים לציטוזול.

gpi anchor- במקרה הזה החלבון פונה אל מחוץ לתא. זוהי מודיפיקציה קבועה. תהליך הוספת gpi anchor: חלבון טרנס ממברנלי שנחתך באזור הטרנס ממברנלי שלו ובכך הופך למסיס, נקשר ל-gpi anchor וכך הופך להיות חלבון המעוגן לממברנה.

שיטות למחקר במעבדה:

פלואורוסנציה- באמצעות החלבון GFP. הקרנת אור באורך גל מסוים. אנרגיית האור הנפלט תהיה נמוכה מאנרגיית האור הנקלט. לכן הפליטה תהיה באורך גל ארוך יותר, בגלל שחלק מהאנרגיה נאבדת. יש אורך גל שבו הבליעה מקסימלית ויש אורך גל שבו הפליטה מקסימלית. יאחוי החלבון GFP לחלבון מטרה יוצרת חלבון רקומביננטי שאותו אפשר לראות בתאים. דרך החדרת החלבון הרקומביננטי הוא על-ידי החדרת DNA רקומביננטי בתא שיתבטא בתא החי.

FRAP- שיטה לחקירת תנועת חלבונים. מכניסים לתא חלבון מטרה עם פלואורוסנט ובעזרת לייזר הורסים אזור מסוים. אם החלבונים נעים, נראה שכעבור זמן תהיה שם שוב פלואורוסנציה. הפרקציה המובילית תחושב לפי:

פלואורוסנציה ברוויה

פלואורוסנציה בהתחלה

זמן מחצית חיים: הזמן שלוקח ל-50% מהפלאוארוסנציה הסופית לחזור. זה מעיד על מהירות תנועת החלבונים.

FRET - מדידת אינטראקציות בין חלבונים. אם החלבונים עוברים אינטראקציה, נוכל לראות זאת על-ידי כך שמתרחשת התופעה שבה בהקרנת אור על מולקולה, אורך הגל של הפליטה יהיה שונה מאורך הגל של הפליטה של מולקולה זו. הדבר נובע מכך שאנרגיית הפליטה של המולקולה שעליה הוקרן האור תעבור למולקולה אחרת ואז אורך הגל של הפליטה יהיה של המולקולה השנייה. האנרגיה תועבר מהדונור לאקספטור רק אם הם מותאמים באורכי הגל שלהם. כלומר, ספקטרום הפליטה של הדונור יתאים לספקטרום הקליטה של האקספטור. נאחה חלבונים למולקולות אלו כדי לראות אם יש ביניהן אינטראקציה. אם יש, נקבל ב-FRET אורך גל שמתאים לפליטה של האקספטור. אם אין אינטראקציה, נראה את הפליטה של הדונור מכיוון שהמולקולות רחוקות מדי בשביל שתרחש התופעה.

הפרדת אורגנלות - פירוק הממברנה והיקשרותו, לצורות ששומרות על המבנה - מיקרוזומים. סרוז אקסטרקט התאים להשקעת החלקיקים הכבדים - הפרדה נעשית לפי גודל, צורה וצפיפות. את האורגנלות ניתן אחרי זה להמשיך להפריד על גראדינט סוכרוז. בשיטת cell free אפשר להפריד בין סוגי ER. בשיטת גראדינט סוכרוז נבודד מיקרוזומים של ER. ה-ER המחוּספס יהיה למטה, ויופרד מה-ER החלק (שבו יש ייצור חומצות שומן ופוספוליפידים).

סינתזת חלבונים של מערכת ההפרשה:

חלבונים של מערכת ההפרשה הם חלבוני ה-ER, גולג'י, ליזוזום, אנדוזום, חלבוני הלומן של ה-ER, חלבוני ממברנות של האורגנלות, חלבוני ממברנת התא, חלבונים המופרשים אל מחוץ לתא.

(1) ציטופלסמה - תחילת היווצרות החלבון על-גבי ריבוזום חופשי בציטופלסמה. הסינתזה נמשכת עד להגעה לסיגנל - (cleavable signal sequence) SS. הסיגנל מזוהה על-ידי SRP שגורם להפסקת הסינתזה ומביא את הריבוזום עם הפפטיד אל ממברנת ה-ER על-ידי קישור לרצפטור שלו, ותוך ניצול GTP החלבון נכנס לתוך הטראנסלוקון תוך כדי המשך הסינתזה. תוך כדי הסינתזה הסיגנל נחתך.

(2) ER (רשת הקשורה לממברנה החיצונית של הגרעין, עליה מתיישבים הריבוזומים) - קומפלקס חלבונים SRP (עם RNA המכיל אזור לעצירת התרגום ואזור שנקשר ל-SS) מקפל את פפטיד הסיגנל לריבוזום ועוצר את התרגום. SRP רצפטור מזהה SRP ומוסר את הריבוזום יחד עם החלבון לטראנסלוקון. הטראנסלוקון סגור וכאשר SRP והרצפטור שלו מתנתקים הטראנסלוקון נפתח וסיגנל פפטידאז חותך את הסיגנל והחלבון ממשיך להסתנתז (עם הידרוליזת GTP). תוך כדי הסינתזה יש הוספת פרקורסור סוכרי (גליקוזילציה N-linked) עם 14 סוכרים. לאחר מכן 2 גלוקוזים מוסרים על-ידי אנזים מסוים ואז עוד גלוקוז על-ידי אנזים שני, ואז יש הסרת מנוז. החלבון עם 10 הסוכרים שנותרו מחוברים אליו, יוצא אל הגולג'י ששם ממשיך העיבוד.

המעבר בין ה-ER לגולג'י (לאחר שהחלבון התקפל נכון) תוך כדי שמירה על האוריינטציה, הינו דרך וסיקולות שנעות על המיקרוטובול.

3) גולג'י- המשך עיבוד הסוכרים- מנוזידאז מסיר עוד 3 מנוזים, אחר-כך מתוסף N-אצטילגלוקוזאמין ועוד מנוז. אם אין את המשך עיבוד הסוכרים בגולג'י מתקבל high mannose אוליגוסכריד, הנפוץ בעיקר לליזוזום. אחרי המשך העיבוד בגולג'י, יתקבל complex אוליגוסכריד. הגולג'י נמצא במרכז התא, קצה המינוס של המיקרוטובול. הסוכרים נכנסים לגולג'י על-ידי מפל ריכוזים, ללא צריכת אנרגיה. עיבוד הסוכרים בגולג'י קורה בכל הציטרנות: CGN- זרחון של מנוז של החלבונים של הליזוזום בלבד. ציס- הסרת 3 מנוזים על-ידי מנוזידאז. מדיאן- הסרת 2 מנוזים נוספים והוספת N-אצטילגלוקוזאמין. טרנס- הוספה של סוכרי קצה האופייניים לחלבוני ממברנת הפלסמה (חומצה סיאלית וגלקטוז). לחלבוני ממברנת הפלסמה יש הוספה של גלקטוזים ו-N- אצטילגלוקוזאמין להארכת השרשרת. בהוספת חומצה סיאלית ההארכה נפסקת. TGN- הוספת פוספט לסוכרים/ לחלבון עצמו.

4) יעד- לחלבונים יש סיגנל המכוון אותם ליעד בסוף התהליך. בהיעדר סיגנל זה, החלבון יופרש כברירת מחדל אל מחוץ לתא.

signal patch- סיגנל שמופיע כשהחלבון מקופל. הסיגנל לא מורכב מרצף חומצות אמינו מסוים. סיגנל זה גם כן גורם לחלבון לנוע לאברון מסוים אך לא ניתן להשתיל את הסיגנל הזה כי הוא תלוי בקיפול.

endoH- אנזים שיכול לחתוך את הקשר בין שני ה-N-אצטילגלוקוזאמינים עד לשלב הסרת המנוז על-ידי מנוזידאז 2 (שלב זה קורה בגולג'י). לאחר שלב זה החלבון הוא endoH resistant כלומר, אם נוסף את האנזים הוא לא יוכל לחתוך את הקשר בין שני ה-N-אצטילגלוקוזאמינים. אם החלבון תקין, כל האנזימים פועלים וזהו חלבון האמור לעבור המשך עיבוד סוכרים בגולג'י ובכל זאת רואים שהוא נחתך על-ידי endoH, המסקנה היא שהוא בכלל לא הגיע לגולג'י.

טופולוגיה: לחלבונים טרנס ממברנליים

SS- סיגנל הנמצא בקצה ה-N טרמינלי ונוצר בסינתזה, וגורם למעבר ל-ER, זאת במנגנון ה-SRP. סיגנל זה מוסר מהחלבון כאשר הוא ממשיך את הסינתזה תוך כדי השחלה.

SA- סיגנל שנמצא במיקום כלשהו בחלבון (לא בהכרח בקצה ה-N טרמינלי) וגורם למעבר ל-ER, במנגנון SRP. סיגנל זה לא מוסר והוא מהווה מקטע טרנס ממברנלי. ה-SA מתמקם כך שתמיד קצה הפלוס פונה לציטוזול והמינוס פונה ללומן.

stop transfer/start transfer- עוצר/ מתחיל השחלה ללומן. מהווה מקטע טרנס ממברנלי ואינו מעביר ל-ER.

Type 1- הקצה הקרובוקסיטרמינלי פונה לציטוזול והאמינוטרמינלי ללומן. חלבונים מסוג זה מכילים אזור טרנס ממברנלי אחד בלבד. ישנן שתי דרכים לקבלת סוג זה:

1. SA בודד שהאורינטציה שלה היא שהפלוס פונה ל-C טרמינלי והמינוס פונה ל-N טרמינלי. דרך זו פחות נפוצה.

2. עם SS ו-stop signal. ה-SS מכונן ומכניס את החלבון ולאחריו stop כדי שייוצר חלק טרנס ממברנלי. לא ייתכן שהבא אחרי SS יהיה start.

Type 2 - הקצה ה-N טרמינלי פונה לציטוזול וה-C טרמינלי ללומן. חלבונים מסוג זה מכילים אזור טרנס ממברנלי אחד בלבד. דרך יחידה לקבלת סוג זה:

1. SA בודד שהאוריינטציה שלו היא שהפלוס פונה ל-N טרמינלי, והמינוס פונה ל-C טרמינלי.

Multi pass - שלוש אפשרויות לקבל סוג זה:

1. SS מתחיל השחלה פנימה, ההשחלה נעצרת על-ידי stop ומתחילה שוב עם start.

2. SA שמתחיל את ההשחלה כאשר הפלוס ליד ה-N טרמינלי, ולאחריו stop.

3. SA שמתחיל את ההשחלה כשאר הפלוס ליד ה-C טרמינלי, ולאחריו start.

חלבונים מסיסים - נוצרים בדרך הכי פשוטה - רק SS אחד.

גליקוזילציה:

רוב החלבונים (כ-80%) עוברים גליקוזילציה. הגליקוזילציה מתרחשת בצד החלבון שפונה ללומן. בחלבונים ממברנליים הסוכרים על החלבון מקנים לו יציבות (מטען שלילי) ועמידות מפני פרוטאזות. הסוכרים גם מהווים לפעמים אתר היכרות.

N-linked - הגליקוזילציה הנפוצה יותר. מתרחשת על שייר אספרגין בחלבונים. האמין של האספרגין מהווה בסיס לקישור הסוכרים. הקישור לפרקורסור הסוכרי הוא ב-ER אל N-אצטילגלוקוזאמין, תוך כדי סינתזת החלבון. יצירת הקשר הגליקוזידי דורשת אנרגיה. אנרגיה זו מגיעה מכך שהסוכרים הם משופעלים - UDP-N-אצטילגלוקוזאמין, GDP-מנוז. הסוכרים קשורים ל-UDP למשל, וכאשר מוסיפים את הסוכר, ה-UDP משתחרר וכך נוצר הקשר הגליקוזידי. הפרקורסור הסוכרי נבנה על הליפיד דוליכול שיושב בממברנת ה-ER, וחוצה אותו הרבה פעמים. הפרקורסור בנוי מ-14 סוכרים והוא מועבר בבת אחת על-ידי אוליגוסכריל טרנספראז לשייר אספרגין בחלבון אשר מכיל את רצף הקונצנזוס ASN-X-SER/THR. הפרקורסור בנוי מ-2 N-אצטילגלוקוזאמין, מנוזים ו-3 שיירי גלוקוז שתמיד מוסרים בסוף. הסוכרים מוספים על-ידי גליקוזיל טרנספראזות ומוסרים על-ידי גליקוזידאזות.

O-linked - גליקוזילציה פחות נפוצה. מתרחשת בגולג'י (ייתכן גם בציטוזול או בגרעין) על כל חומצות האמינו שיש להן שייר OH (סרין, טריאנין). התהליך אינו מסודר ויש לו הרבה אפשרויות. הסוכרים מוספים אחד אחרי השני ולא בבת אחת (כמו הפרקורסור).

• שיירי חומצה סיאלית בשני סוגי הגליקוזילציות הם הסוכר היחיד עם מטען שלילי.

בקרת איכות ב-ER:

calnexin - קושר את החלבון כאשר הוא במצב של גלוקוז אחד. הוא מתחרה עם גלוקוזידאז שמסיר את הגלוקוז האחרון. בזמן הקישור לקלנקסין יש לחלבון הזדמנות להתקפל נכון.

גלוקוזיל טרנספראז מזהה חלבונים שקופלו לא נכון ומוסיף להם שייר גלוקוז וכך עוברים שוב לקלנסין. כשולן המעגל- אם עובר מספיק זמן, מנוזידאזות מסירות מנוזים עד ל-5 ואז החלבון נשלח לפירוק בציטוזול.

HSC 70 - שפרונים שנקשרים לחלבון תוך כדי הטרנסלוקציה ללומן. הם מונעים אגרגציה של שרשראות לפני שהחלבון מתקפל. התהליך דורש ATP.

PDI - אנזים המכיל שיירי SH תוקף קשרי S-S לא יציבים (לא נכונים) ויוצר איתם קשרי S-S. אז S-H אחר בחלבון תוקף את הקשר וכך התהליך נמשך עד שנוצרים קשרי S-S הנכונים והיציבים.

Bip - שפרון שנקשר ל-heavy chain של נוגדנים ומונע מהם לצאת מה-ER. כשמסוננת ה-light chain (תת היחידה השנייה) הוא נקשר יותר חזק מ-Bip ואז הנוגדן יכול לצאת. כך בעצם יש בקרה על יצירת הקומפלקס החלבוני, לוודא שתתי היחידות התחברו נכון לקומפלקס חלבוני.

VSVG - חלבון מוירוס המאפשר איחוי עם ממברנת התא. בטמפרטורה מעל 32°C החלבון לא עובר קיפול ונשאר ב-ER. בחיבור ל-GFP אפשר לאתר את החלבון בכל שלב. בהורדת הטמפרטורה בחזרה החלבון יתקפל נכון ולאחר כ-40 דקות נראה אותו בגולג' ולאחר 180 דקות הוא יגיע ליעדו- ממברנת הפלסמה.

פירוק חלבון בציטוזול:

חלבון שנשאר זמן רב מדי ב-ER נשאר רק עם 5 מנוזים ומועבר לציטוזול לפירוק. החלבון יוצא דרך הטרנסלוקון שבו מוספים שיירי יוביקויטין. בציטוזול מוסרים הסוכרים והחלבון הולך לפרוטאזום לפירוק. הפירוק דורש ATP. תוך כדי הכנסת החלבון לפרוטאזום 3 אנזימים שעובדים אחד אחרי השני פועלים להוספת שיירי יוביקויטין (נדרשים לפחות 3-4 כדי שהחלבון ייכנס). E1 קושר יוביקויטין ומעביר אותו ל-E2. E3 מעביר את היוביקויטין מ-E2 לחלבון. הפרוטאזום מכיל 3 סוגי פרוטאזות שמפרקות את החלבון לפפטידים קצרים. בציטוזול יש פפטידאזות שמפרקות את הפפטידים הקצרים לחומצות אמינו. שתי תתי היחידות האחרות של הפרוטאזום הן המכסה ומהוות אזור רגולטורי- קובעות אילו חלבונים ייכנסו ונעשה unfolding לחלבון הנכנס. שלב 1: הקצה הקרבוקסילי של היוביקויטין עובר אקטיבציה, ריאקציה שדורשת ATP שבה הקצה הקרבוקסילי יוצר קשר תיאסטרי עם שייר טיול של האנזים E1. שלב 2: שייר היוביקויטין המשופעל מועבר מ-E1 ל-E2. שלב 3: יוביקויטין ליגאז-E3, האנזים החשוב שמזהה חלבון לפירוק, מוסיף לו את היוביקויטין.

- מונו-יוביקויטינציה- מוביל לליזוזומים ומעודד פירוק בליזוזומים.

Post golgi sorting (השלב האחרון בסינתזת חלבונים של מערכת הפרשה): ישנם שלושה יעדים

1. ליזוזום - אברון שיש בו pH נמוך (בשביל מידור האנזימים ותורם לפירוק המולקולות על-ידי דנטורציה) שנוצר על-ידי ATPase שמפרק ATP תוך שאיבת פרוטונים. ה-ATPase נקרא V-type. ההגעה לליזוזום היא דרך: אנדוציטוזה דרך אנדוזום, פאגוציטוזה דרך פאגוזום (לחומרים גדולים למשל חיידק), או אוטופאגיה דרך

אוטופאגוזום. נלמד על חלבונים ליזוזומליים מסיסים. החלבונים הליזוזומליים מכילים signal patch שגורם להוספת פוספט על שייר מנוז 6 (M6P), על-ידי האנזים הראשון שמוסיף שייר פוספט, ב-CGN. החלבון הליזוזומלי מוכר על-ידי רצפטור בממברנה וההיקשרות גורמת ליצירת וסיקולת קלטריין בציטוזול המכילה את החלבון והרצפטור יחד הם נעים לאנדוזום (לאחר שמעטפת הקלטריין יורדת) ובסוף מגיעים לליזוזום. תהליך הפוספורילציה של חלבוני הליזוזום: ב-CGN מוסף N-אצטילגלוקוזאמין משופעל המכיל פוספט, על-ידי N-אצטילגלוקוזאמין פוספורנספראז (שמזהה signal patch). זה מהווה חסימה לרצפטור של M6P שנמצא ב-TGN כך שהחלבון לא ייצא מהר מדי. ב-TGN N-אצטילגלוקוזאמין פוספוגליקוזידאז מסיר את ה-N-אצטילגלוקוזאמין כך שנותר M6P שיכול להיקשר לרצפטור, ולצאת אל הליזוזום. כשהחלבון נכנס לאנדוזום, ה-pH הנמוך גורם לו להיפרד מהרצפטור ושם נחתך הפוספט וכך הרצפטור יחזור ל-TGN. פגיעה באנזים הראשון למשל מונעת את הסיגנל שמכוון לליזוזום (M6P) ובכך חלבונים אלה יופרשו אל מחוץ לתא.

AP-1 - האדפטור של וסיקולת קלטריין המסיעה חלבונים ליזוזומליים מה-TGN אל הליזוזום. זהו התהליך העיקרי (לעומת הסעה באמצעות וסיקולות עם AP-2).

AP-2 - האדפטור של וסיקולת קלטריין המסיעה חלבונים ליזוזומליים מממברנת הפלסמה אל הליזוזום (וגם באנדוציטוזה למשל עם LDL).

2. גרנולות הפרשה - חלבונים שצריכים להיות מופרשים אל מחוץ לתא כתלות בסיגנל- למשל הפרשת אינסולין. יש בקרה. בהתחלה הגרנולה לא בשלה, היא מכילה קלטריין והוסיקולה לא מלאה בחלבונים. אופציה אחרת היא שהחלבון לא בוגר והוא עובר עיבוד לקבלת גרנולה בשלה. גרנולה בשלה לא מכילה קלטריין והיא מלאה בחלבון ומוכנה לאיחוי והפרשה. גם בגרנולות הפרשה המערכת היא קלטריין. החלבונים יוצרים אגרגטים ואז נוצרת הגרנולה.

3. תהליך הפרשה רציפה - זוהי ברירת המחדל. תהליך הפרשה רציפה של חלבונים מסיסים החוצה או לממברנה, אם הם טרנס ממברנליים.

אנדוציטוזה:

קלטריין - חלבון המכיל 3 תת יחידות של heavy chain ו-3 תת יחידות של light chain שיוצרים כל אחד תלת רגל. התלת-רגליים נקשרים למבנה קשיח עם קוטר 50-60nm. זוהי וסיקולת הקלטריין. משמש באנדוציטוזה, ב-TGN לפני הליזוזום, ובגרנולות הפרשה.

HSP 70 - חלבון המפרק את מעטפת הקלטריין על-ידי פירוק ATP.

האדפטור של הקלטריין - טטראמרים. תת יחידה μ אחראית לקישור הרצפטורים. β מכילה מבנה של "אוזן" ועוד חלק ששם נקשר הקלטריין. α קושרת חומרים אחרים. האדפטורים פועלים באמצעות רצפי סיגנל הפונים לציטוזול. ל-AP-2 בעיקר טירוזין ועוד שתי חומצות אמינו אחרות.

fission - ניתוק הוסיקולה מממברנת האם.

dynamain - חלבון GTPase (מפרק GTP). הוא יוצר סליל סביב צוואר הוסיקולה ותוך פירוק GTP מתהדק על צוואר הוסיקולה עד ל-fission. פירוק GTP הכרחי לניתוק הוסיקולה, אחרת הדינמין יאריך את הצוואר אך לא יתהדק לניתוק.

טרנספורט LDL - הכולסטרול מועבר כאגרגט הקשור לחלבון ApoB. החלבון נקשר לרצפטור ונכנס עם AP-2 לתוך coated pits ונכנס על-ידי מנגנון הקלטריין. באנדוזום המוקדם הרצפטור נפרד מה-LDL וממוחזר בציטוזול. בפירוק בליזוזום ה-LDL והחלבון מפורקים.

טרנספורט ברזל - ברזל נכנס לתא על-גבי חלבון פרוטרנספרין. רצפטור לטרנספרין מכניס באנדוזיטוזה במנגנון הרגיל. באנדוזום המוקדם הטרנספרין משחרר את הברזל אל הציטוזול ושם הוא נמצא על-גבי חלבון ferritin. הרצפטור ממוחזר עם הטרנספרין ללא הברזל. אפוטורנספרין (ללא ברזל) נקשר לרצפטור באנדוזום (pH נמוך) ובאיחוי עם הממברנה האפוטורנספרין משתחרר מהרצפטור (pH 7).

multivesicular body - נוצרים במטרה להשפיע על עוצמת סיגנלים בתא, על-ידי בקרה על כמות הרצפטורים על הממברנה. על הרצפטורים המיועדים לפירוק יש יוביקוויטין. יש אנדוציטוזה של הרצפטורים ולאחר מכן אינוגינציה (invagination) של הרצפטורים לקבלת multivesicular bodies שבהם כל הרצפטור נמצא בפנים. כך הליזוזום יוכל לפרק את כל הרצפטור (ולא רק את החלק הציטוזולי) ויפרק גם את הממברנות שנכנסו לוסיקולה. הרצפטורים המגיעים לליזוזומים הינם רצפטורים של העברת איתות. למשל LDL רצפטור לא מגיע לשם כי רצפטורים אלה ממוחזרים. רצפטור להורמון גדילה כן יגיע כך לליזוזום ויפורק.

G-Proteins

אלה חלבונים המגיסים את חלבון המעטפת (האדפטור) בציטוזול, אל ממברנת הפלסמה. באנדוציטוזה אין G-protein. ישנם שני מצבים אפשריים לחלבון G:

קושר GDP - מצב לא פעיל. חלבוני GEF/GEP מזרזים את החלפת GDP ל-GTP. ה-GEP ספציפיים. BFA - מעכב GEP.

קושר GTP - מצב פעיל. נקשר לחלבון המטרה-effector (למשל אדניליל ציקלאז מופעלת על-ידי G-protein ליצירת CAMP). קבוצת חלבוני GAP מזרזים הידרוליזה של GTP לקבלת המצב הלא פעיל. חלבוני ה-GAP יגרמו לפירוק המעטפת. חלבוני G פעילים רק על הממברנה. GTPγS - מעכב GAP.

Arf 1 - G-protein בגולג'י המעוגן לממברנה עם מיריסטט, כאשר החלבון שנקשר אליו הוא AP-1 ב-TGN או COPI.

Sar 1 - G-protein קושר COPII ב-ER.

תנועת וסיקולות ואיחוי עם ממברנת המטרה:

COPII - טרנספורט מה-ER לגולג'י (anterograde). sec12 הוא פקטור השחלוף (GEP) של Sar 1. המעטפת כאן שונה מקלטריין, היא מורכבת משני הטרו דימרים, גמישה ומאפשרת כניסה של חלבוני מטען גדולים. sec23 הוא ה-GAP של Sar 1. וסיקולות COPII עוברות ליצירת ERGIC ואז לגולג'י.

ERES - הנקודה שממנה נוצרות וסיקולות COPII ברגע שמגיע ה-cargo (חלבוני המטען).

COPI - טרנספורט מהגולג' ל-ER (retrograde). המעטפת כאן דומה לקלטרין, והיא כוללת את האדפטור-coatomer עם 7 תתי יחידות.

הסיגנלים של חלבוני ER שמזוהים על-ידי COPI להחזרה ל-ER: KKXX - בחלבונים טרנס ממברנליים בצד הציטוזולי ובקצה ה-C טרמינלי. (K-ליזין).
KDEL - בחלבון לומינלי מסיס בקצה ה-C טרמינלי. הסיגנל מוכר על-ידי הרצפטור ואז נכנס ל-COPI.

fusion - איחוי וסיקולה.

Snares - חלבונים טרנס ממברנליים שיש עליהם Snare motif שנקשר לאחרים ליצירת קומפלקס. הוסיקולה תורמת Snare אחד וממברנת המטרה תורמת 3 מוטיפים של Snare.

v Snare - אחד, הנמצא על הוסיקולה (v-vesicle).

t Snare - שלושה, באתר המטרה (t-target).

Snap 25 - זהו Snare מיוחד שאינו טרנס ממברנלי אלא קשור על-ידי פלמיטט. יש לו שני מוטיפים ולכן אם הוא נמצא באתר המטרה צריך רק עוד מוטיפ אחד.

NSF - מפרק ATP.

αsnap - מהווה אדפטור בין ה-Snares ל-NSF. יחד הם מפרקים את הקומפלקס שנוצר בין ה-Snares.

trans complex - כשיש קומפלקס בין המוטיפים אבל הממברנות (של הוסיקולה ואתר המטרה) עוד לא התאחו.

cis complex - הקומפלקס בין המוטיפים לאחר שהממברנות התאחו.

טרנספורט מ/אל הגרעין:

חלקיקים עד 5kDa יכולים לעבור בדיפוזיה דרך ה-nuclear pores. החלבונים נכנסים לגרעין כשהם כבר מקופלים, והמעבר אל הגרעין מתווך על-ידי אדפטורים שיוצרים אינטראקציות חוזרות עם FG repeats. התהליך דורש אנרגיה, פירוק GTP על-ידי Ran שהוא G-protein. החלבון Ran נמצא בציטוזול ובגרעין.

Ran GAP - נמצא בציטוזול (גורם למצב לא פעיל של Ran).

Ran GEP - נמצא בגרעין (גורם למצב פעיל של Ran).

import - בגרעין Ran-GTP מנתק בין הרצפטור לחלבון. הרצפטור נקשר ל-Ran והם חוזרים לציטוזול. Ran GAP עושה הידרוליזה וזה מאפשר ניתוק בין Ran לרצפטור. הרצפטור כעת פנוי וה-Ran חוזר לגרעין למצבו הפעיל.

export - בגרעין Ran-GTP מעודד את הקשר בין החלבון לרצפטורי export ונוצר קומפלקס משולש-Ran-GTP, רצפטור וחלבון. בציטוזול Ran GAP גורם לדיסוציאציה של הקומפלקס.

טרנספורט אל המיטוכונדריה:

נלמד על חלבוני המטריקס. החלבונים נכנסים לא מקופלים. סיגנל הכוונה למיטוכונדריה-הליקס אמפיפטי בקצה ה-N טרמינלי. החלבון נכנס על-ידי שימוש ב-ATP לפירוק הקשר שלו לשפרון שהחזיק אותו לא מקופל, וגם מניצול הפוטנציאל של ממברנת המיטוכונדריה. הטרנסלוקון הראשון-Tom complex. הסיגנל נכנס לחלל בין הממברנות ומזוהה על-ידי הטרנסלוקון השני-Tim complex ב-contact site. הכניסה דרך הטרנסלוקון השני קורה על-ידי פוטנציאל שהחלבונים טעונים חיובית נמשכים פנימה. כשהחלבון נכנס ההשחלה נעשית על-ידי שפרונים שמפרקים ATP. כשהחלבון נכנס למטריקס הסיגנל נחתך. בתוך המטריקס שפרונים עוזרים לחלבון להתקפל ולהפוך לפעיל. החלבון נכנס למטריקס באופן רציף וכאשר הסיגנל בפנים הוא נחתך גם אם לא כל שאר החלבון בפנים.

הציטוסקלטון-Cytoskeleton:

מהווה את שלד התא. לשלד התא יש גם תפקיד בשמירה על מבנה התא וגם מאפשר תנועה. הוא מורכב משלושה סוגי חלבונים מאורכים סיביים:

- אקטין**- הסיבים הדקים ביותר (microfilaments). מורכב לרוחב מ-2 תתי יחידות. זהו פולימר של חלבון אחד של אקטין שעובר הרכבה לסיבים. סיבי האקטין נמצאים מתחת לממברנת התא. המונומר של האקטין נקרא G אקטין. כאשר G אקטין נמצא בסיב הוא נקרא F אקטין. ל-G אקטין יש מבנה אסימטרי. יש מוטור פרוטאינים שהולכים לכיוונים שונים על האקטין. לאקטין יש קצה מינוס וקצה פלוס, אך ההגדרות שרירותיות ואינן קשורות למיקום בתא או לקצוות המיקרוטובול. הפולימריזציה יותר מהירה בקצה הפלוס מאשר בקצה המינוס. האקטין בתא עובר צילוב על-ידי חלבונים מסוימים. ישנם כמה סוגי צילוב:
1. בצורה ישירה short distance, מופיע ב-stress fiber. אלה הם סיבים ארוכים לאורך התא שיש להם יכולת התכווצות מסוימת.
 2. מתחת לממברנה יש את הרשת המסועפת, מבנים הנוצרים על-ידי חלבונים מצלבים שיש להם זווית.
 3. חלבון מצלב שגם מצלב וגם מהווה מרכז נוקליאציה. החלבון המצליב נקרא Arp והוא יוצר רשת מסועפת במהירות כשהתא רוצה לנוע קדימה.

סיבי הביניים (intermediate filaments) גודלם בין המיקרופילמנט למיקרוטובול. מבנה סיבי הביניים הוא הכי מורכב. הוא יכול להיות מורכב מהומו דימרים או הטרו דימרים. המונומר הוא בעצמו חלבון סיבי, וזאת לעומת המיקרופילמנט והמיקרוטובול שמורכבים מתתי יחידות גלובולריות המורכבות יחד לסיבים. המונומר עובר דימריזציה והדימר הופך למצב טטראמר, ראש-זנב. מכאן שהטטראמר סימטרי, אין כיוון. סיבי הביניים לא פולריים ולכן אין עניין של תנועה אלא רק חוזק ובנייה של רקמות מתות. שני טטראמרים מתחברים לאוקטמר, ושמונה יחידות כאלה יוצרות סיב. המבנה הסופי מאוד חזק- מכיל סך-הכל 64 מונומרים. המיקרוטובול הוא צינור חלול לעומת סיב הביניים ולכן המיקרוטובול יותר עבה למרות שמכיל פחות תתי יחידות. בניגוד למיקרוטובול ואקטין, סיבי הביניים הם באאוקריוטיים בלבד ואף לא מופיעים באאוקריוטיים ירודים. תפקיד סיבי הביניים הוא התנגדות למתיחה. יש הרבה סוגים של סיבי ביניים ויש להם תפקיד חשוב ביצירת רקמות מתות- שיער, ציפורניים, שריונים, קשקשים.

מיקרוטובול-דימר של טובולין α ו- β שחוזר על עצמו לאורך ולרוחב. הטובולין הוא G-protein. תת יחידה β היא GTPase. תת יחידה α תמיד במצב GTP. לפי הידרוליזת GTP בתת יחידה β נקבעת הדינמיקה. הדימרים של הטובולין מסודרים בצורת proto-filament, כלומר סידור ראש-זנב בצורה מעגלית כאשר כל סיבוב מכיל 13 proto-filaments. סיבי המיקרוטובול הולכים ממרכז התא אל הממברנה, בדינמיות מאוד גבוהה. סיבי המיקרוטובול קובעים את מרכז התא ויוצאים ממנו, יוצאים מהצנטרוזום. דרך המיקרוטובול נעשית התנועה של הוסיקולות לשני הכיוונים. למיקרוטובול יש פולריות ולכן גם כיוון. קצה הפלוס הוא הקצה היציב שמכיל β עם GTP. קצה המינוס הוא ללא GTP, ההידרוליזה ספונטנית. סיבי מיקרוטובול מתארכים בקצה הפלוס ומתקצרים בקצה המינוס.

MTOC - מרכז הנוקליאציה של המיקרוטובול. הוא מכיל חלבונים שיוצרים את המיקרוטובול.

צנטרוזום - זהו ה-MTOC המרכזי. הוא מהווה את מרכז התא ומכונן את הארגון הפנימי של התא. מכיל שתי צנטריולות במרכזו המשמשות במיטוזה. על פני הצנטרוזום יש γ tubulin ring complexes שהם מרכזי נוקליאציה. הם מכילים חלבון γ tubulin שעושה נוקליאציה למיקרוטובול אבל לא נמצא לאורך המיקרוטובול. הקצה הפנימי של המיקרוטובול הוא מינוס והחיצוני פלוס.

basal body - הבסיס לנוקליאציות של מיקרוטובול בפלגלות (flagellum) וסיליה (cilium). פלגלות קשורות בתנועה של תאים, סיליות קשורות לתנועת נוזל או לתחושה.

רעלים שמשפיעים על הציטוסקלטון:

1. טוקסינים מפרקים את הציטוסקלטון (מיקרוטובול ואקטין) או מונעים יצירה.
2. טוקסינים שמונעים דה-פולימריזציה. ברגע שהמיקרוטובול לא יכול להתארגן מחדש, התא לא יכול להתחלק.

תנועה לאורך המיקרוטובול והאקטין:

התנועה נעשית לאורך סיבים אלו מכיוון שיש להם פולריות- כיוונית. התנועה יכולה להיות בשני הכיוונים והמטרות הן: תנועה לכיוון מסוים, יצירת כוח על-ידי תנועה של התכווצות.

kinesins - חלבונים (מוטור פרוטאינים) הנעים על המיקרוטובול לכיוון הפלוס. לקינזין יש שני רגליים המאפשרים לו ללכת לאורך הסיב מבלי להתנתק ממנו. זה נקרא תנועה פרוסיבית- צעד אחר צעד מבלי להתנתק. קינזין הוא דימר- יש שני רגליים ואז יש אזור ארוך של coiled coil שבקצהו אתר לקישור לרצפטור- חלבון על-גבי האורגנלה/ וסיקולה שיודע להיקשר לקינזין. בין הרגל ל-coiled coil יש linkers שבמצב הפעיל מתקפלים להליקס וגורמים לתנועה. הקינזין קופץ כל פעם על זוג α ו- β . בקשירת ATP ה-linker מתקפל על הרגל וגורם לרגל השנייה להיזרק קדימה. כשהרגל השנייה נקשרת יש הידרוליזה של ה-ATP ברגל הקודמת כדי שתוכל להשתחרר.

לינק לקטע וידיאו המבהיר את התהליך:

<http://www.youtube.com/watch?v=686qX5yzksU>

dyneins - מוטור פרוטאינים שנעים על המיקרוטובול לכיוון המינוס. חלבונים אלה, בדומה לקינזין, מסיעים וסיקולות ואורגנלות והתהליך די דומה. הדינאין מופיע בקומפלקס עם חלבונים

עזר. הקומפלקס מאוד גדול ומכיל סיבי Arp1, וספקטרין ואנקירין שמכירים את הגולג'י שיש עליו גם ספקטרין. מנגנון התנועה של הסיליה והפלגלה מתבצע בעזרת דינאין.

myosin - אלו הם ה-motor proteins הנעים על-גבי סיבי האקטין. רוב המיוזינים נעים לכיוון הפלוס, ויש אחד הנע לכיוון המינוס.

זחילה של תאים - מנגנון של האקטין. יש צמיחה של רגל שמכילה רשת אקטין והיא מתקדמת קדימה. הזחילה של רוב התאים נעשית על-ידי רגל הנקראת lamellipodium. הרגל מתקדמת באוויר ואז יוצרת היקשרות למצע. החלק האחורי יימשך קדימה להתקדמות התא. מנגנון פולימריזציה של אקטין דוחף את התא קדימה באמצעות חלבון Arp 2/3. חלבונים אלו מאוד דומים לאקטין בכך שהם קושרים ומפרקים ATP, אך לא יוצרים סיבים (לעומת אקטין). כמות האקטין בתא מוגבלת ולכן תוך כדי ההתקדמות צריך לפרק את החלק האחורי לשימוש חוזר, וכדי שלא כל התא יתפלמר באקטין. יש פקטורים שעושים דה פולימריזציה של סיבי אקטין. המוכר ביותר הוא cofilin - זהו פקטור שנקשר לסיבי אקטין במצב ADP ולכן מעדיף את האזורים הישנים שאין שם ATP. הקופילין נקשר לסיבי האקטין וגורם לו לעיוות- כיפוף ההליקס ואז זה מחליש את האינטראקציה בסיב ונוטה להתפרקות.

חלק שני של הקורס

חלק 1 Integrating cells into tissues:

התפתחות הרקמות: אקטודרם מתפתח לעור ומערכת העצבים. מזודרם לרקמת חיבור- עצם, שריר, סחוס. אנדודרם מתפתח לתאי אפיתל של פנים הגוף. תאי האפיתל האלה מהווים 85% מהתאים. תאי האפיתל בעור הם רב שכבתיים, ובמעיי חד שכבתיים ובעלי פיתולים. מתחת לתאי האפיתל יש רקמת חיבור כאשר ברקמת האפיתל התאים מאוד צפופים וברקמת החיבור אין הרבה תאים. תאי האפיתל בעור, שנקראים אפידרמיס, קשורים בקצה הבזלי שלהם לממברנה הבזלית והיא מצידה השני קשורה לרקמת החיבור. הממברנה הבזלית מונעת מעבר תאים מרקמה אחת לשנייה. החמצן מגיע לתאי האפיתל דרך קפילות שעוברות ברקמת החיבור. ברקמת החיבור בין התאים ישנו מטריקס- חומר חוץ תאי (ECM) שמכיל פרוטאוגליקנים וגליקופרוטאינים. תאי האפיתל קשורים לממברנה הבזלית (BM), גם כן חומר חוץ תאי) באמצעות אינטגרנים. תאי רקמת החיבור (הנקראים פיברובלסטים) מוחזקים במקום, במקום הנקרא focal contact, על-ידי אינטראקציה עם ה-ECM דרך סוג מסוים של אינטגרנים. יש סוג אחד של קשרים. ישנם ארבעה סוגי קשרים בין תאי האפיתל:

- tight junctions - מקרבים את ממברנות תאי האפיתל ולא מאפשרים מעבר מים או יונים. קשרים אלו נמצאים בצד החיצוני יותר של שכבות הרקמה.
- adherens junctions and desmosomes - קישור בין שלד התא של תא אחד לשני. הקישור הוא לאקטין וסיבי ביניים, ליצירת חגורה של שלד התא. adherens - קישור לאקטין על-ידי קדהרינים, desmosomes - קישור לסיבי ביניים.
- gap junctions - תעלות שמשמשות לתקשורת בין תאים. בתעלות עוברים יונים, cAMP.
- cell-matrix - קשירת תאי האפיתל לממברנה הבזלית- נקראים המי דסמוזומים.

linker - חלבון חוצה ממברנה שיוצר קשרי תא-תא/ תא-מצע, למשל קדהרין, אינטגרין. בצד הפונה לציטוזול הלינקר קשור לשלד התא (בדרך-כלל אקטין). מצידו השני, קשור ללינקר נוסף מהתא השני או למולקולה אחרת מהחומר החוץ תאי. באמצעות קישור הלינקרים נוצרת חגורה רציפה של שלד התא בין תאי האפיתל ברקמה וזה מקנה לרקמה חוזק נגד לחצים מכניים. ברקמת החיבור המטריקס החוץ תאי (ECM) מקנה עמידות ללחץ.

ריאקציה הומופילית- קשר בין לינקרים דומים, מאותו סוג.

ריאקציה הטרופילית- קשר בין לינקרים שונים או בין לינקר לחומר חוץ תאי.

-cell-matrix adhesion

הממברנה הבזלית- BM, סוג של חומר חוץ תאי. זוהי ממברנה שעבה יותר מממברנת התא והיא נמצאת בדרך-כלל מתחת לתאי אפיתל. הממברנה הבזלית מקיפה גם שרירים חלקים וקושרת כך בין השרירים החלקים. הממברנה הבזלית בכליה נמצאת בין תאי האפיתל לבין הקפילות, תאי האנדותרל, בשכבה כפולה. הממברנה הבזלית מאפשרת סינון סלקטיבי של חומרים בחדירות רבה יותר מממברנת התא.

רקמת חיבור - החומר החוץ תאי מהווה מעל 90% מנפח רקמת החיבור. תאי רקמת חיבור מתחת לתאי אפיתל- פיברובלסטים, מתחת לתאי סחוס- כונדרובלסטים, מתחת לתאי עצם- אוסטיאובלסטים. שלושה מרכיבים של החומר החוץ תאי שמקנים לו את תכונותיו:

1. חומרים שמקנים צמיגות, למשל פרוטאוגליקנים, GAGs.
2. השפעה על מבנה וחוזק על-ידי יצירת סיבים- גליקופרוטאינים מבניים למשל קולגן.
3. קישור בין התאים למצע החוץ תאי- גליקופרוטאינים מקשרים למשל פיברונקטין ולמינין.

החלבונים החוץ תאיים מאורכים והם עוברים אינטראקציות עם עצמם ועם חלבוני מטריקס אחרים. תפקידי המרכיבים בחומר החוץ תאי- "סימון שבילים" לנדידת תאים, חוזק, "דבק", תמיכה פיזית, עמידה בפני מתיחה.

קולגן - חלבונים (27 סוגים) שנמצאים רק במטריקס החוץ תאי. חלקם יוצרים סיבים. זמן חיים ארוך (עד 20 שנה), עמידות למתיחה (סיב מחזיק 10 ק"ג), החלבון הכי נפוץ (>25%). סוג הקולגן תלוי ברקמה, הסוגים הנפוצים הם 1 ו-2. מבנה הקולגן: מורכב מ-3 שרשראות α שיוצרות יחד הליקס עם סיבוב שמאלי. בכל סיבוב יש גליצין, פרולין ובדרך-כלל ליזין. גליצין מקנה גמישות (בסיבוב) ופרולין קשיחות (לא בסיבוב). יש בקולגן הידרוקסילציה של ליזין ופרולין, וזה מאפשר יצירת קשרי מימן לייצוב. הקולגן נוצר במערכת ה-ER ויצירת הסיבים מתרחשת מחוץ לתא. סוג 4 של קולגן נוצר לממברנה הבזלית על-ידי תאי האפיתל. סוגים 1 ו-2 נוצרים על-ידי רקמת החיבור לחומר החוץ תאי של רקמת החיבור. הקולגן מתארגן באופן ספונטני מחוץ לתא בתור סיב בתנאי טמפרטורה ו-pH מתאימים (ללא אנזימים). לא כל הסוגים של קולגן יוצרים סיבים. קולגן שלא יוצר סיבים- למשל סוג 4 שבממברנה הבזלית. בקולגן זה יש אזורים שהם לא במבנה הליקס ולכן יש יותר גמישות ונוצר משטח דו מימדי. סיבי קולגן נוספים קושרים בין סיבי קולגן ליצירת המשטח.

מחלת אוסטיוגנזיס אימפרפקטה - פריכות עצמות כתוצאה מפגיעה בקולגן 1.

מחלת scurvy - מחסור בויטמין C גורם לכך שאין הידרוקסילציה ובכך נפגע ייצוב הקולגן.

פרוטאוגליקנים - (וגליקוזאמינוגליקנים-GAGs). אלו חלבונים שיש להם שרשראות סוכר. שרשראות הסוכר יכולות להתקיים ללא החלבון- אלו הם ה-GAGs. ה-GAGs הם פולימר של חזרות של אותו די סכריד. הסוכרים טעונים שלילית, וחומציים. הסוכר יכול לעבור התמרת סולפט שתורם לייחודיות ולמטען השלילי. ה-GAGs וחלבונים נוצרים בגולג'י ויכולים לעבור שם אינטראקציה, או לאחר ההפרשה אל מחוץ לתא. מולקולות אלה מושכות מים בגלל מטען השלילי ולכן יוצרות את הג'לטיניות של המטריקס החוץ תאי. כאשר הפרינאז מופרש למטריקס הוא מפרק GAG מסוג הפרן סולפט.

Hyaluronan-GAG - חופשי במטריקס החוץ תאי, לא קשור לחלבון ולא עובר סולפונציה. הוא תופס נפח ותורם לג'לטיניות. ההילורון בסחוס יכול להיקשר ספציפית לחלבונים שונים וליצור הסתעפויות על-ידי הקשרים המעגנים. תפקיד של פרוטאוגליקנים והילורון הוא בתקשורת. הפרוטאוגליקנים מעבירים סיגנל על-ידי היקשרות לרצפטורים על ממברנת התא. קישור ה-GAG לחלבון גם מונע מפירוק החלבון.

אגרקן - אגרגט של הילורון, פרוטאוגליקנים וחלבונים נוספים.

גליקופורטאינים - לא יוצרים סיבים. תפקידם לקשר בין התאים למטריקס המכיל סיבי קולגן ופרוטאוגליקנים. אלה הם חלבוני העיגון. ב-ECM של רקמת החיבור הגליקופורטאין הוא פיברונקטין ובמברנה הבזלית הגליקופורטאין הוא למינין. פיברונקטין מורכב מ-2 מולקולות ליצירת צורת האות Y. מודול אחד קושר GAG ונקרא heparin binding (דומיין) השני קושר קולגן. ה-GAG שהוא קושר הוא הפרן סולפט. הפיברונקטין נקשר מצד אחד למרכיבים העיקריים של המטריקס החוץ תאי ומצד שני ללינקר בממברנת התא. למינין מורכב מ-3 שרשראות ויוצר מבנה של צלב. הלמינין קושר אינטגרין וגם יכול להיקשר ללמינינים אחרים (self assembly). הלמינין יכול גם להיקשר לקולגן מספר 4. הפרוטאוגליקן העיקרי שהלמינין נקשר אליו הוא פרלקן. פיברונקטין חשוב ליצירת בלוטות בגוף, ושניהם חשובים בהתפתחות עוברית. פירוק המטריקס החוץ תאי נעשה על-ידי חלבונים פרוטאוליטיים (MMPs), שמופרשים אל מחוץ לתא או על הממברנה.

אינטגרנים - זהו סוג של linker. זהו הלינקר העיקרי הנמצא רק בבעלי-חיים והוא נקשר לגליקופורטאינים במצע החוץ תאי. סוג האינטגרין נקבע לפי קומבינציות בין סוגי שרשראות α ו- β שבהטרו דימר. יש 24 סוגים כאשר בכל תא יכול להיות יותר מסוג אחד. רוב המולקולה היא הראש, הקצה ה-N טרמינלי שפונה אל מחוץ לתא. יש זנב קטן שפונה אל הציטוזול. קצה ה'ראש' הוא הקצה בו נקשרים יונים דו ערכיים הנחוצים לחיזוק הקשר בין האינטגרנים לחלבוני המטריקס. הלינקר נקרא הרבה פעמים הקולטן/ הרצפטור והחלבון שנקשר אליו (הגליקופורטאין) נקרא הליגנד. על-מנת שהליגנד יוכל להיקשר לאינטגרין, הוא צריך להכיל לפחות את הטריפפטיד RGD (חומצה אספרטית, גליצין וארגנין) הדרוש לקישור אך לא מספיק כי לא קובע ספציפיות. כך אם אין RGD לא יהיה קישור אך אם יש RGD לא בהכרח יהיה קישור. זה יהיה תלוי בשאר חומצות האמינו. פיברונקטין יכול להיקשר לכמה סוגי אינטגרנים כאשר העיקרי הוא מסוג $\alpha 5 \beta 1$. גם ייתכן שאותו אינטגרין יקשר כמה סוגי גליקופורטאינים (למשל פיברונקטין ופיברינוגן בטסיות). הפעלת האינטגרנים מתבססת על שינוי קונפורמציה ואפקט אלוסטרי (סיגנל מקצה אחד משפיע על הקצה השני).

Outside in - סיגנל המגיע מבחוץ פנימה ומפעיל את האינטגרין. למשל כשאין ליגנד תת יחידה β מתקפלת על α כך שהם לא יכולים לקשר את הליגנד. נקודת המפגש בין α ו- β היא בצד החוץ תאי ב'ראש'. כשיש ליגנד, יש שינוי קונפורמציה המאפשר קישור. מבחינת הצד התוך תאי, כשאין ליגנד השרשראות קרובות ולא מתאפשר קישור לטלין. כשהליגנד קשור שתי השרשראות מתרחקות בצד הציטוזולי ואז טלין נקשר ל- β .

טלין - המולקולה המרכזית שקשורה בתיווך בין האינטגרין לשלד התוך תאי ('חלבון דבק').

Inside out - השפעה על ריכוז/ אפיניות של טלין, יגרמו לשינויים בצד החוץ תאי. זרחון טלין למשל מעלה את האפיניות.

קשרי תא-מצע:

1. focal adhesion - קשר מקומי. זהו קישור אופייני לתאי רקמת חיבור (פיברובלסטים בעיקר) עם המטריקס החוץ תאי.

2. המידסומוזומים - קשר עם הממברנה הבזלית בדרך-כלל. ההמידסומוזום מכיל אקטין לקישור.

-cell to cell adhesion

החלבונים המשתתפים בקשרי תא-תא התגלו על-ידי נוגדן מונוקליני MAL שהוספתו פגע בקשרים בין התאים. על-ידי כרומוטוגרפיית אפיניות אפשר לבדוד את החלבונים המשתתפים בקשר. ה-cell adhesion molecules (CAMs) מתחלקים לשני סוגים: קדהרינים (CADs) שפעילותם תלויה בקלציום, ו-Immunoglobulin superfamily CAMs (N-CAMs) שפעילותם לא תלויה בקלציום. ה-CAMs מכילות מולקולות סוכר טעון שלילית הנקרא חומצה סיאלית שמתווך בקביעת חוזק הקשר בין ה-CAMs. הם משתתפים בקשרי תא-תא יציבים ו/או זמניים ומאפשרים למשל דחייה בנדידת תאים.

קדהרינים - יש כמה סוגים, והם משתתפים ב-adherens junctions. הקשר בין הקדהרינים הוא באפיניות נמוכה ולכן הקשרים הם בצברים. זה מאפשר קישור חזק אבל עם דינמיות. הקדהרינים מהווים לינקרים והאינטראקציה בין קדהרינים היא הומופילית. הקשר נמצא מתחת ל-tight junctions. הקדהרינים הנמצאים ב-adherens junctions נקשרים לסיבי אקטין ליצירת חגורה בין התאים. מבנה הקדהרין- הקדהרין חוצה פעם אחת את הממברנה כאשר החלק הארוך (ה-N טרמינלי) פונה אל מחוץ לתא. בצד החוץ תאי יש חזרות שנקראות cadherin repeat והחזרות קשורות ביניהן על-ידי לינקר גמיש ושם אתר הקישור לקלציום. הקדהרין נקשר לקדהרינים האחרים דרך ה'ראש' (קצה N טרמינלי). בתוך התא הקדהרין קשור לשלד התוך תאי בתיווך של 'חלבוני דבק' כמו למשל β catenin (שהוא גם פקטור שעתוק). יצירת קשרי תא-תא באמצעות קדהרינים- בריכוז קלציום נמוך הקדהרינים גמישים ונמצאים בצורת מונומרים. כשריכוז הקלציום עולה, הוא נקשר באתרי הקישור והחלק החוץ תאי מתיישר ומתקשח. כתוצאה מכך שני קדהרינים של אותו תא יוצרים הומודימר ואז יש ריאקציה שהרבה דימרים נקשרים אחד לשני ויוצרים adherens junction. הקישור בין הדימרים (בין התאים) הוא ב'ראש' דרך חומצות האמינו HAV שהכרחיות לקישור. הקלציום משתתף בקשר ומגן מפני פרוטאזות. קבוצות עיקריות של קדהרינים- e קדהרין שנמצא בתאי אפיתל. N קדהרין נמצא במערכת העצבים, בעדשה, בשריר הלב ובשרירי השלד. P קדהרין נמצאים בשליה ובאפיתל קיר הרחם באזור החיבור עם שליה. הקישור בין הקדהרינים הכרחי להיווצרות שאר קשרי תא-תא.

דסמוזומים - קשר פחות חזק מ-adherens junction ו-tight junction. הדסמוזומים קשורים בחלק התוך תאי לסיבי ביניים (בתאי אפיתל זה קרטין) ולא לאקטין. הבדל נוסף מ-adherens junction הוא שמשותפים שני סוגי קדהרינים- הטרודימר. גם כאן יש תלות בקלציום. חלבוני הדבק בחלקם משותפים בין דסמוזומים ו-adherens junc. וחלקם ייחודיים לכל אחד. הבדל שלישי הוא שהאינטראקציה עם חלבוני הדבק הוא לאורך הקדהרינים ולא רק בקצה. תפקידי הדסמוזומים הם להקנות חוזק מכני ולמנוע מעבר מים בעור (פגיעה גורמת למוות).

IG-superfamily CAMs - אינטראקציות שלא תלויות בקלציום. לא דורשות קישור קדהרינים כדי שיוכלו להיקשר. הלינקרים כאן אינם קדהרינים. מדובר בנוגדנים שהמשותף להם הוא קיום לולאות חלבוניות שיוצרות קשרי S-S. אחרי הציסטאין הראשון בלולאה חייב לבוא טריפטופאן. CAMs נמצאים בתאי מערכת החיסון, ו-L/N-CAMs במערכת העצבים. האינטראקציות יכולות להיות הומופיליות או הטרופיליות.

tight junctions - לא מאפשרים מעבר חומרים ובכך מאפשרים מידור של חלבונים וליפידים בין הצד הבזולטרלי לבין הצד האפיקלי (שפונה לפנים התא/ לחוץ הגוף) העשיר בפוספטידיל

כולין. ה-tight junctions שומרים על המידור אך לא קובעים אותו. מבנה- מורכב משני סוגי חלבונים- claudin ו-occludin, ששני הקצוות שלהם פונים לפנים התא, שם הם מחוברים לאקטין באמצעות חלבוני דבק. גם כאן האינטראקציה תלויה בקלציום. ה-tight junction לפעמים נפתחים כדי לאפשר מעבר חומרים, כמו למשל במעי. מעבר חומרים זה נקרא פארא-צלולרי, והמעבר פסיבי. גם כשיש מעבר זה לא של מקרומולקולות. מעבר חומרים בין קצוות התא (לעומת בין תאים) נקרא טרנס-צלולרי. הטרנספורט בתא הוא בכיוון מסוים וניתן להשתמש ב-tight junctions כדי למנוע ערבוב של הכיוונים. claudin הוא החלבון היותר חשוב כי אין לו תחליף.

gap junctions - תעלות המאפשרות מעבר חומרים בין ציטוזולים. התעלה מורכבת חצי מתא אחד וחצי מהתא האחר שקשור אליו, כאשר חצי תעלה מורכבת מ-6 תת יחידות של חלבון קונקסין. ישנם סוגי קונקסין שונים והקישור יכול להתבצע בין הסוגים השונים. (בין סוגים זהים נקרא- הומוטיפית, בין סוגים שונים- הטרוטיפית). חצי תעלה נקראת קונקסון. ה-gap junctions משתתפים בהתכווצות תאים בשריר הלב ובתנועה הפריסטלטית. התעלה נפתחת ונסגרת כתלות בריכוז הקלציום וה-pH. ב-pH חומצי וריכוז קלציום גבוה התעלה סגורה. ריכוזי קלציום גבוהים יכולים להוביל למוות תאים מתוכן. בתעלה עוברים חומרים רק עד 1000 דלתון (יונים, דו סוכרים, חומצות אמינו).

חלק 2 Intercellular communication:

מולקולה שמעבירה סיגנל (SM), שיכולה גם להיקרא ליגנד, נוצרת בדרך-כלל בתא מסוים ואז מועברת לתא מטרה. בתא המטרה, שמגיב לסיגנל, יש אינטראקציה בין ה-SM לרצפטור להפעלת הרצפטור, ולבסוף הפעלת הרצפטור מפעילה קסקדה של העברת סיגנלים בתא. הרצפטורים מפעילים בדרך-כלל יותר ממסלול אחד. בסוף יש הפסקה של הסיגנל, שהוא לא פחות חשוב. (סך-הכל 6 שלבים בהעברת הסיגנל). סוגי מולקולות שמעוררות סיגנל:

- מולקולות הנוצרות בתא, מופרשות ממנו ופועלות בתא מטרה רחוק או קרוב. התנועה היא בדיפוזיה או אקסוציטוזה. רוב מולקולות הסיגנל שייכות לקבוצה זו.
- מולקולות הקשורות לממברנה ופועלות על רצפטור של תא שכן. נדרשת קרבה גדולה בין התאים.
- תת קבוצה של הסוג הראשון- כאשר אותו תא שמייצר את הסיגנל גם מגיב לו.

ניתן לחלק את מולקולות הסיגנל לפי מסיסות במים/שמן. מסיסות במים: פפטידים, חלבונים, חומצות אמינו, קטכולאמינים, גזים. מסיסות בשמן: חומצות שומן והורמונים סטרואידים. ישנם ארבעה דרכים להעברת סיגנל:

סיגנל פרקריני- פועל בעור. התגובה היא מקרוב. ה-SM הם בדרך-כלל חלבונים ממשפחת gf (growth factor) וציטוקינים (שהם gf שיש להם תפקיד גם במערכת החיסון). האפיניות בין ה-SM לרצפטור מאוד גבוהה.

סיגנל אנדוקריני- הליגנדים הם הורמונים. הסיגנל לא מהיר כי ה-SM עובר בזרם הדם ולכן תלוי במהירות הזרם ובמהירות הדיפוזיה. ריכוז ה-SM בסביבת תא המטרה נמוך ולכן יש אפיניות גבוהה לרצפטור. ה-SM לא יורד מהר ויש לו זמן מחצית חיים ארוך.

סיגנל עצבי (סינפטי)- מהיר מאוד. הסיגנל לא עובר במערכת הדם אלא דרך האקסונים. התא שמייצר את הסיגנל רחוק מתא המטרה אך מקום שחרור הסיגנל קרוב מאוד לתא המטרה. האפיניות לרצפטור נמוכה והסיגנל צריך להיות מופסק במהירות. יש הרבה ליגנד כי האפיניות נמוכה. בהפסקת הסיגנל או שה-SM מפורקים מיידית או שהם חוזרים למקום ממנו שוחררו.

סיגנל אוטוקריני- אותו תא שמגיב לסיגנל גם מייצר את ה-SM. נמצא בדרך-כלל בעוברים ובהתכווצות הרחם בלידה.

סוגי רצפטורים: רצפטורים ממברנליים ורצפטורים תוך תאיים (בדרך-כלל להורמונים סטרואידים או גזים). על-מנת להגיע לרצפטורים התוך תאיים ה-SM צריכות להיכנס בדיפוזיה לתא. רצפטורי הורמונים סטרואידים הם בדרך-כלל פקטורי שעתוק. לרצפטורים יש ספציפיות לליגנד הנקבעת על-ידי אפיניות ומבנה. אך הרצפטור יכול גם להפעיל כמה מסלולים שונים בקישור אותו SM כתלות באפקטור שיכול להיות שונה בתאים שונים. דוגמא: אצטיל כולין (SM) נקשר לאותו רצפטור בשריר הלב ובבלוטות רוק. בשריר הלב הקישור יגרום להרפיה של השריר ואילו בבלוטות הרוק הקישור יגרום להפרשת רוק. זה נובע מכך שהאפקטור שונה. בשריר שלד התוצאה הפוכה משריר הלב- קישור גורם להתכווצות השריר. אבל כאן הדבר נובע מכך שהרצפטור שונה.

דרכים להפסקת הסיגנל:

1. פירוק מולקולת הסיגנל בליזוזום על-ידי אנדוציטוזה.
 2. פירוק המולקולה והרצפטור. כמו למשל ב-gf. גם אם נמשיך לשים gf לא יהיה סיגנל כי אין רצפטורים.
 3. עיכוב בתוך התא. מניעת שלב כלשהו בתהליך העברת הסיגנל להפסקת השרשרת. זה יכול להיות על-ידי עיכוב הרצפטור (להפוך אותו ללא פעיל) או עיכוב אפקטורים במסלול.
 4. ייצור חלבון מעכב שיעכב שלב כלשהו במעבר הסיגנל.
- שלושה סוגי רצפטורים ממברנליים עיקריים: המשפחות מחולקות על סמך מבנה הרצפטור, אופן ההפעלה ומנגנון הפעולה.
1. רצפטורים שמהווים תעלות יונים- למשל הרצפטור לאצטיל כולין. הרצפטור מורכב מ-5 תת יחידות שקשורות לממברנה ו-2 מהן קושרות ליגנד. כשהרצפטור לא קשור לליגנד הוא מהווה תעלה סגורה. קישור הליגנד משנה את הקונפורמציה של הרצפטור כך שהתעלה נפתחת ויונים יכולים לזרום פנימה. דבר זה משנה את פוטנציאל הממברנה וזה מביא לשרשרת תגובות שגורמות להתכווצות שריר השלד.
 2. GPCRs- הרצפטור חוצה את הממברנה 7 פעמים, כאשר הקצה ה-N טרמינלי פונה אל מחוץ לתא וה-C טרמינלי פנימה (לציטוזול). דוגמאות: רצפטור לאדרנלין (אפינפריין) וגלוקגון.
 3. רצפטורים בעלי פעילות של קינאז- או סרין/טריאונין קינאזות או טירוזין קינאזות (RTKs). הרצפטורים יודעים גם לזרז את עצמם וזה נחוץ ליכולתם להעביר את

הסיגנל. התהליך דורש ATP (העברת זרחון γ). תת קבוצה: רצפטורים שאינם קינאז אבל נמצאים בקשר איתם. כשהרצפטור מופעל הוא גורם להפעלה של הקינאז שמזרחן את הרצפטור והם נשארים יחד לעברת הסיגנל. זהו הסוג העיקרי ב-gf וציטוקינים.

ישנן שתי דרכים להעברת הסיגנל לאחר הפעלת הרצפטור:

- הפעלת חלבון G ואז הפעלת אפקטור (חלבון תוך תאי) שמפעיל שליח משני שממשיך את השרשרת (למשל cAMP, קלציום). זוהי הדרך של GPCRs.
- הזנב התוך תאי (המזרחן על טירוזין) של הרצפטור עצמו משמש כעוגן לקשירת חלבונים מוליכי סיגנל בתוך התא. זוהי הדרך של ציטוקינים ו-gf.

המשפחות העיקריות של החלבונים שמעבירים את הסיגנל בתוך התא:

- חלבונים קושרי GTP קטנים (מונומרים) או טרימרים. אלה הם בעצם G-proteins. למשל אדניליל ציקלאז.
- קינאזות/ פוספטאזות הפועלות על מולקולות שמעבירות סיגנל בהמשך. לפעמים הזרחון גורם להפעלה ולפעמים להפסקה.
- חלבונים חסרי פעילות אנזימטית המתפקדים כאדפטורים. העברת הסיגנל נעשית על-ידי קירוב בין שתי מולקולות הנקשרות לאדפטור וכך הסיגנל מועבר ביניהן. האדפטור יכול להיקשר לשני חלבונים להעברת הסיגנל או שהוא יכול לקשור כמה חלבונים ובכך לאפשר פתיחה של מסלולי סיגנל שונים.

מעבר סיגנלים באמצעות GPCRs-

זוהי המשפחה הגדולה ביותר של רצפטורים (כ-1000). מגוון הליגנדים כולל פוטונים, הורמונים, גלוקגון, חומרי טעם/ריח. מפעיל בדרך-כלל מסלולים מטבוליים. מנגנון הפעלת הרצפטור: קישור הליגנד לרצפטור, שמשנה את הקישור בין ה- α הליקסים של הרצפטור. הרצפטורים פועלים על אפקטורים באמצעות חלבוני G טרימריים. הפעלת הרצפטור גורם לקישור הרצפטור לתת יחידה α של חלבון ה-G וגם לקישור GTP בתת יחידה α , שמוריד את האפיניות שלה לתת יחידה $\beta\gamma$. תפקיד הרצפטור בתהליך זה הוא בעצם פקטור שחלוף-GEP. תת יחידה α לאחר הפעלתה והדיסוציאציה יכולה להפעיל אפקטורים כמו אדניליל ציקלאז, $PLC\beta$, תעלות יונים (פוטסיום, קלציום).

ישנן שלוש משפחות עיקריות של חלבוני G הטרימריים: אין הרבה חלבוני G ולכן יכולים להיות מופעלים על-ידי כמה רצפטורים.

1. Gs - פועל באופן חיובי. תת היחידה הפעילה היא α המאקטבת אדניליל ציקלאז (אפקטור). השליח המשני הוא cAMP.
2. Gi - פעילות מעכבת. תת היחידה הפעילה היא α ו-Gi מעכב למשל אדניליל ציקלאז. השליח המשני הוא cAMP.

cAMP פועל על PKA. PKA מזרחן ובכך מפעיל פקטורי שעתוק למשל CREB.

3. Gq - פועל על האפקטור $\text{PLC}\beta$ שיוצר שליחים משניים IP_3 , Ca^{2+} ו-DAG. מדובר בדרך-כלל במסלולים מטבוליים.

פגיעה בפעילות חלבוני G - חיידק הכולרה המפריש טוקסין. הטוקסין מעכב את ההידרוליזה של GTP בחלבון ה-Gs ובכך אדניליל ציקלאז פעיל קונסטיטוטבי (בעצם פועל כמו GTP γ S). במקרה הזה התוצאה היא איבוד מים והתייבשות. טוקסין אחר המופרש על-ידי חיידק הגורם לשעלת. כאן ההשפעה היא למניעת הפעלת חלבון ה-G. פועל על סוג Gi.

דרכים להפסקת הסיגנל שמופעל על-ידי GPCRs:

1. דסנסיטיזציה - הליגנד קשור לרצפטור אבל הסיגנל לא יכול לעבור הלאה. הרצפטור מזרחן על-ידי קינאז GRK ובכך מונע ממנו להיקשר לתת יחידה α להפעלתו. זה מכיוון שהרצפטור המזרחן נקשר ל-arrestin.

2. הידרוליזה של GTP ב-Gs הגורמת לתת יחידה α להיות לא פעילה ואז היא נקשרת שוב ל- $\beta\gamma$ ליצירת הקומפלקס.

3. פירוק שליחים משניים ומודיפיקציות לאחר תרגום של חלבונים המעבירים את הסיגנל במסלול.

אפינפרין - ישנם כמה סוגים כאשר לכל אחד וריאציה של הפעילות וקשורה לרצפטור אחר. הרצפטורים הם מסוגים α ו- β . כאשר הרצפטור מופעל יש הפעלת אפקטור. בקישור לרצפטורים אחרים חלבון ה-G יהיה אחר ובכך גם התוצאה. קישור האפינפרין לרצפטור β_1/β_2 מפעיל Gs שמאקטב אדניליל ציקלאז וזה גורם להתכווצות שריר הלב והרפיית שריר המעי. קישור האפינפרין לרצפטור α_1 מפעיל Gi שמעכב אדניליל ציקלאז וזה גורם להרפיית שריר הלב ותנועה פריסטלטית במעי. קישור האפינפרין לרצפטור α_2 מפעיל Gq שמאקטב $\text{PLC}\beta$. אותו רצפטור גם יכול לקשור כמה ליגנדים אך המגוון לא גדול שכן המבנה של הליגנדים צריך להיות מסוים. למשל רצפטור α קושר נוראפינפרין חזק יותר מאפינפרין ורצפטור β להיפך. דבר זה ישפיע על עוצמת הסיגנל כתלות בסוג הרצפטור על התא. הפעלת אדניליל ציקלאז הוא ביחס ישר לאפיניות בין הליגנד לרצפטור.

מסלול ה-Gq- $\text{PLC}\beta$ מפרק PIP_2 (פוספטידיל אינוזיטול) לליפיד הנשאר בממברנה DAG (דיאציל גליצרול) ו- IP_3 (אינוזיטול) שהוא סוכר 6 פחמני המזרחן ב-3 מקומות (עמדות 1,4,5). לכל שליח משני (DAG ו- IP_3) תפקיד אחר. PIP_2 הוא הסובסטרט גם של $\text{PLC}\gamma$. הפוספטים שעל האינוזיטול מוספים כל אחד על-ידי קינאז ספציפי אחר. PIP_2 מעוגן לממברנה (על-ידי הליפיד DAG) ולכן $\text{PLC}\beta$ צריך אתר עיגון. אתר העיגון הוא PIP_3 (שהוא בעצם PIP_2 שמזרחן על-ידי PI-3K בעמדה 3). השליח המשני DAG פועל על משפחה של סרין/טריאנין קינאזות הנקראות PKC. להפעלת PKC נדרשת עליה בריכוז Ca^{2+} בציטוזול שגורמת לביקוע הפרקורסור הארוך של ה-PKC ובכך מאפשרת לקישור ל-DAG ובכך מופעל PKC. ל-PKC יש פעילויות מטבוליות ומאפשר שעתוק על-ידי הפעלת פקטורי שעתוק וחלוקת תאים. כך אם למשל מוסיפים חומר PE המאקטב PKC או הפעלת PKC באופן קונסטיטוטבי, מתקבלת חלוקת תאים מוגברת, מצב סרטני. השליח המשני IP_3 יוצר שליח משני Ca^{2+} ובכך מגביר מיידית את ריכוז הקלציום בציטוזול. אך ריכוז הקלציום בתא חייב להישאר נמוך (10^{-7}M) ולכן יש מאגרי קלציום ששואבים אותו מהציטוזול, וגם חלק מהקלציום מועבר בתעלות החוצה. המאגרים נמצאים ב-ER החלק. בנוסף IP_3 מנוטרל על-ידי אנזים שהופך אותו ל-PIP שכבר לא יכול לגרום לשחרור קלציום מהמאגרים לציטוזול.

ריכוז גבוה של קלציום בתא מסוכן כי מפעיל אנזימים פרוטאוליטיים שמפעילים מוות תאים מתוכנן. הרצפטור של ה-IP3 במאגרי הקלציום מכיל 4 תתי יחידות שכל אחת יכולה לקשור IP3.

קלציום בתהליך ההפריה - כאשר תא זרע נכנס לתא הביצית נוצר קרום שלא מאפשר כניסה נוספת של תאי זרע וזה על-ידי עלייה בריכוז הקלציום. לאחר ההפריה יש עליה נוספת בריכוז הקלציום והיא בשביל איחוי שני הגרעינים.

מעבר סיגנלים באמצעות RTKs-

אלה רצפטורים הפועלים כטירוזין קינאזות והם חשובים בדיפרנציאציה, יצירת רקמות, נדידת תאים וכו'. יש 90 טירוזין קינאזות מתוכן 58 רצפטורים על הממברנה ו-32 נמצאות בתוך התא. ה-gf הם ה-SM של RTK, הפועלים בדרך-כלל במנגנון פרקריני (אוטוקריני בסרטן). אינסולין משמש כ-gf. הרצפטורים חוצים פעם אחת את הממברנה והם מסוג Type 1. הרצפטור לאינסולין הוא דימר. הרצפטורים הם אנזימים שמזרחנים טירוזינים בקצה התוך תאי. הקצה החוץ תאי קושר את ה-SM. יש תתי משפחות של רצפטורי RTK והם נבדלים בצורתם בצד החוץ תאי, על-ידי לולאות ואזורים עשירים בציסטאין. גם בקצה התוך תאי יש הבדלים בדומיינים שמזרחנים טירוזין. מנגנון הפעלת הרצפטור: כשה-SM נקשר לרצפטור, הוא מגייס עוד רצפטור ובעצם זה מאפשר את ההפעלה- דימריזציה. הרצפטור מזרחן את עצמו בטרנס (כל חלק בדימר מזרחן את השני) ואז כל חלק בדימר יכול להמשיך לזרחן את עצמו- זרחון ב-cis.

יש שני מנגנונים לדימריזציה של הרצפטור כתלות בליגנד:

1. הדימריזציה נעשית על-ידי gf שהוא דימר. הקישור מונווולנטי והסטוכיומטריה 2:2 (אתרי קישור, 2 רצפטורים).

2. gf שהוא מונומר. מנגנון ביוולנטי- ליגנד הגורם לדימריזציה בלי שני אתרי קישור זהים. על ה-gf יש אתר הנקרא site1 שבעל אפיניות גבוהה יותר לרצפטור. ברגע שהם נקשרים, האתר השני, בעל האפיניות הנמוכה יותר, יכול לגייס את הרצפטור השני ליצירת הדימר. לאחר הקישור נוצרים קשרים בין האזורים החוץ תאיים של הרצפטור לייצוב. לאחר הקישור הליגנד כבר לא נחוץ והסיגנל מועבר למשך כמה דקות. לפעמים יש מבנים על הממברנה שעוזרים לליגנד להגיע לרצפטור. למשל ב-FGF יש פרוטאוגליקנים שעוזרים לו להגיע לרצפטור.

The Ras-MAPK pathway - ras הוא חלבון G קטן שמהווה מרכז בהעברת סיגנלים. ניסוי שעשו לגילוי המנגנון: ביצירת עיניות הדרוזופילה מעורב RTK. מוטציה גורמת להחסרת פוטורצפטור R7 ובכך הזבובים לא רואים UV. הרצפטור הוא מסוג RTK. למוטציה קוראים sevenless ולגן-sev. העינית מורכבת מ-7 תאים כאשר תא מספר 8 מגייס את כל התאים הקדמיים כשהאחרון הוא 7. במוטציה חסר תא מספר 7 (או שלא נוצר הליגנד המתאים). ליגנד Boss הוא טרנס ממברנלי ונקשר לתא R8 שמפעיל את R7. חלבון הקשור לתהליך היה ras וה-GEP שלו הוא Sos, DRK חלבון אדפטור. כשלקחו ras מוטנטי פעיל התקבל R7 כי זה כבר עקף את השלב של ה-Boss. כך הוכיחו ש-ras קשור לתהליך downstream לרצפטור. GRB2- הומוולוג של DRK, הנמצא באדם (DRK בדרוזופילה).

ה-pathway עצמו: ras צמוד לליפיד בממברנה וגם הרצפטור בממברנה. הרצפטור

באמצעות אדפטור GRB2/DRK קושר בין הרצפטור ל-Sos. ה-GRB2/DRK נקשר לטירוזין מזרחן ספציפי על הרצפטור. לאחר הקישור (כתוצאה מסיגנל), Sos מפעיל את ras. ras גורם לחלוקה של תאים. זהו המסלול הקלאסי לחלוקת תאים. ERK-MAPK הוא סרין/טריאונין קינאז הפועל downstream ל-ras. בתגובה להפעלת ras, הוא מגיב עם MAPKKK (raf) להעברתו לממברנה. כתוצאה מכך יש שינוי קונפורמציה של MAPKKK שגורם לו להיות פעיל ובכך מזרחן את MAPKK (MEK), שהוא גם סרין/טריאונין קינאז וגם טירוזין קינאז, בסרין וטריאונין ואז יש זרחון של MAPK (ERK) ברצף סרין/טריאונין X טירוזין. MAPK נכנס לגרעין ומפעיל שכפול. המסלולים של טירוזין קינאזות מהירים (כמה דקות, פחות מ-10). בקרה על MAPKKK: כשאין סיגנל הוא במצב לא פעיל, קשור לחלבון 14-3-3 ומזרחן בסרין 259 וסרין 261. באמצעות הסרינים הוא קשור לחלבון שמתפקד כדימר ושומר על מצב לא פעיל. כדי שהוא יפעל, צריך לסלק את הפוספט מסרין 259. כש-ras עובר שפעול, הוא נקשר לקצה ה-N טרמינלי של MAPKKK ומושך אותו לממברנה. כתוצאה מכך החלבון מוסר ואז גם הפוספט מסרין 259. יש כמה מסלולים של MAPK וכמה סוגי ras אך מנגנון זה שמור. האינטראקציה בין החלבונים שמעבירים את הסיגנל היא לפי מודולים ספציפיים והם:

- SH2-SH2 domain זהו טירוזין קינאז תוך תאי. מקטע של כ-100 חומצות אמינו המזהים טירוזין מזרחן ספציפי- משמש לקישור לרצפטור.
- SH3 domain- מזהה מקומות עם פרולין. 50-70 חומצות אמינו. נקשר ל-GEP (Sos למשל).
- PH domain- נחוץ לעיגון חלבוני ממברנה.

מנגנון PLC γ - ה-RTK מזרחן טירוזין להפעלת PLC γ . יש לו גם PH דומיין. שאר התהליך דומה לזה של PLC β ב-GPCRs, העלאת IP3 להעלאת ריכוז הסיידן.

The PI-3K pathway- PI-3K הוא חלבון שמורכב מ-2 תתי יחידות- רגולטורית (85 kDa) וקטליטית (110 kDa). במצב ששתי תתי היחידות קשורות החלבון לא פעיל. במצב פעיל P110 משוחררת ומזרחנת PIP2 בעמדה 3 ליצירת PIP3. PIP3 משמש אתר עיגון לחלבונים שיש להם PH דומיין. במסלול אחר, קינאז נוסף נמצא בקסקדה- PDK. הקינאז האחרון בקסקדה הוא PKB (גם AKT) שהוא חלבון המעכב אפופטוזיס וכך PIP3 משתתף גם במסלול הגורם לכך שתאים לא ימותו.

מסלול נוסף- הרצפטור מפעיל חלבונים- STATs שנכנסים לגרעין ומשמשים כפקטורי שעתוק. הפעלת ה-STATs על-ידי RTK: ה-STATs מכילים SH2 דומיין שעוברים זרחון לאחר קשירה לרצפטורים, ולאחר מכן יוצרים הומו/הטרודימרים על-ידי קישור ראש-זנב. הדימרים הם ה-STATs הפעילים המשמשים כפקטורי שעתוק.

מנגנוני הפעלה של חלבונים מעבירי סיגנל בתא (אפקטורים) כאשר הרצפטור RTK:

- הטרנסלוקציה לממברנה גורמת להפעלה. למשל: raf, PLC, Sos, MAPKKK).
- שינוי קונפורמציה. למשל: ras וקינאזות רבות.

- פוספורילציה- בדרך-כלל מפעילה אך לפעמים גם מעכבת (כמו באחד הפוספורילציות של raf). הפוספורילציה היא על טירוזין או סרין/טריאונין בחלבונים שונים.

דרכים להפסקת הסיגנל שמופעל על-ידי RTKs:

1. receptor down regulation - אנדוציטוזה של הרצפטור ופירוק שלו.
 2. מניעה של הרצפטור מלקשור עוד מולקולות סיגנל.
 3. דה פוספורילציה- להפסקת פעילות חלבונים שהפכו לפעילים בהמשך הקסקדה.
- דרכים שמשפיעות על ספציפיות הסיגנל: מביא לשונות של התוצאה הביולוגית

- הפעלת מולטי אדפטורים על-ידי רצפטור מסוים.
- מידור של הקסקדות בתא. הפרדה של המולקולות ומניעת cross talk כשאינו נחוץ.
- scaffold proteins - משפיעים על הספציפיות.
- feedback antagonists - לא נלמד.

דוגמא: הפעלת EGF על תא אדרנל גורם לחלוקה ואילו הפעלת FGF על תא אדרנל גורם לדיפרנציאציה. עוצמה ומשך ההפעלה תלויים ב-gf ולכן התקבלו תוצאות אחרות. משך הפעלה קצר- חלוקת תאים, משך הפעלה ארוך- התמיינות תאים. כך אותו מסלול (raf MAPK) גורם לתוצאה שונה כתלות במשך הפעלה.

בשמרים- יש 5 קסקדות של MAPK. אין שם RTKs אבל יש MEK שמזרחן. הסיגנל החיצוני הוא פרומון או שינויים בריכוז המלח- לא בהכרח gf. יש סוגי MAPK שכל אחת גורמת לתוצאה אחרת. FUS3 הוא הכי דומה ל-MAPK ERK הקלאסי. הפרומונים נקשרים ל-PCR-G זה גורם להפעלה של ההומולוג של ras בשמרים- ste20. שאר הקסקדה דומה כאשר המקבילה של raf היא ste11 ושל MEK היא ste7. יש חלבון עיגון ששומר על כל החלבונים יחד. במסלול אחר ההומולוג של MEK הוא pb52 והוא משמש בתור חלבון העיגון. ניסוי שעשו: הוציאו את fus3 וראו שאין מניעה של תוצאת הקסקדה, זיווג. בנוסף השמרים יצרו קורים- תוצאה של מסלול MAPK אחר. כנראה Hog1, המקביל של fus3 בקסקדת MAPK האחרת, פעל במקום fus3 ועשה את שתי הפעולות. לבדיקה יצרו מוטנט של fus3 שיכול להיקשר אך לא לפעול ובכך למנוע מ-Hog1 לפעול במקומו. התוצאה אכן הייתה שלא התקבלה תוצאת הקסקדה.

חלק 3 Regulation of the cell cycle:

לחלוקת תאים נדרש gf. החלוקה מתעכבת על-ידי contact inhibition - ברגע שנוצרת שכבה אחת של תאים החלוקה תיפסק גם אם יש gf.

השלבים במחזור התא:

- הכפלת הדנ"א וגדילה במסה.
- סגרגציה של הכרומוזום המוכפל.

- חלוקה לשני תאי בת.

פרוקריוטים- כרומוזום מעגלי אחד שצמוד לדופן החיידק. הגדילים צמודים לממברנה וכאשר התא מתחלק הגדילים נפרדים. צורה זו של חלוקת תא נקראת binary fission.

באדם- 46 כרומוזומים לינאריים (בעייתיים בהשלמת הקצוות- טלומרים), גרעין, היסטונים.

שלבי מחזור התא:

G1- התא גדל במסה ומכין את המשאבים הדרושים להכפלת הדנ"א. אורך שלב זה משתנה.

S- הכפלת הדנ"א. אורך השלב קבוע.

G2- הפרדה בין תכולת הדנ"א לגרעין. אורך השלב קבוע.

M- מיטוזה- הפרדת כרומוטידות אחיות וחלוקת הציטופלסמה. אורך השלב קבוע.

cohesin- חלבונים המחזיקים את הכרומוטידות יחד. בשלב האנאפאזה, כאשר הכרומוטידות האחיות נפרדות, יש סילוק של ה-cohesin.

במיטוזה יש כמה שלבים: פרופאזה- דחיסה של הכרומוזום, מעבר בין המטפאזה לאנאפאזה- הפרדת כרומוטידות אחיות, ציטוקנזה- חלוקת התכולה של הציטופלסמה והאורגנלות.

סוגי תאים מבחינת חלוקה:

- תאים שמתחלקים מהר בבוגר.
- תאים עובריים שמתחלקים מהר.
- תאים שיכולים להתחלק אבל לא מתחלקים כל הזמן.
- תאים שאיבדו את יכולת החלוקה.

למשל תאי עצב איבדו את יכולת החלוקה אבל אם יש פגיעה בתאי כבד הם יכולים להתחלק שוב. כך גם בתאי שריר. זה קורה על-ידי חלוקת תאים לא ממויינים, תאים סטליטים, שיכולים אחר-כך לעבור התמיינות. על-מנת להבדיל בין תאים שיצאו ממחזור התא (אינם מתחלקים) לבין תאים בשלב G1, קוראים לשלב שלהם G0. על-מנת לחזור למחזור התא יש מעבר מ-G0 ל-G1. באדם בוגר התאים שהכי מתחלקים הם תאי אפיתל במעי. בעובר יש חלוקה מאוד מהירה, ללא שלבי G1 ו-G2 וכתוצאה מכך התאים קטנים.

checkpoints- נקודות בקרה במסלול. במקרה של תקלה המסלול נעצר בנקודת הבקרה על-מנת לאפשר תיקון. אם התקלה לא תתוקן התא לא ישרוד. התקלות שיזוהו על-ידי נקודות הבקרה הן: נזק שנגרם לדנ"א, פגיעה בשכפול הדנ"א, תהליכי מפתח שלא הושלמו. נקודות הבקרה נמצאות ב:

- מעבר מ-G1 ל-S. בדיקה אם התנאים מאפשרים חלוקה. כאן נקבע אם התא יתחלק או לא.

- מעבר מ-G2 ל-M. בדיקה אם הדנ"א הוכפל באופן תקין, וששאר התהליכים נעשו באופן תקין עד לנקודה זו.
 - במיטוזה עצמה. בדיקת סגרגציית הכרומוזומים. לא מתאפשרת החלוקה עד שכל הצנטרומרים מסודרים.
- ה-checkpoints מכילים סנסורים שחשים בתקלה וזה גורם לעצירת התהליך כדי לאפשר תיקון. אם התקלה לא ניתנת לתיקון, נשלח סיגנל אפופטוטי כדי לסלק את התא. אם מערכת ה-checkpoints מתקלקלת, לא תהיה בקרה על התהליך של מחזור התא והוא ימשיך להתקדם ללא הפרעה גם אם יש מוטציות ותקלות. הבקרה במעבר משלב G1 ל-S ו-G2 ל-M היא בקרה חיובית. כלומר מעבר לשלב S מעודד מעבר לשלב S. אך למשל אם התא בשלב G2 כבר, הוא לא ייכנס לשלב S כי הוא לא רגיש לפקטורי איניציאציה.

מרכיבי מערכת הבקרה:

CDK - קינאז תלוי ציקלין, מבוקר על-ידי ציקלין. מערכת הסנסורים פועלת באופן של בקרה שלילית ואינה דרושה להתקדמות מחזור התא. קישור של ציקלין ל-CDK מפעיל אותו. התקדמות משלב לשלב דורשת ציקלין ו-CDK. על-מנת לעצור את התהליך מסולק הציקלין. CDK תמיד נמצא בתא. יחסי הגומלין בין CDK לציקלין קובע את קצב התקדמות מחזור התא.

MPF - פקטור הדרוש לשלב המיטוזה. מורכב מתת יחידה קטליטית CDK, ותת יחידה רגולטורית ציקלין.

FACS - שיטה שמודדת את רמת הדנ"א.

סוגי ציקלינים:

- ציקלין של G1, נקרא ציקלין D. קובע אם לדחוף את התא קדימה למחזור התא.
- ציקלין שחשוב במעבר מ-G1 ל-S, נקרא ציקלין E. גם ה-CDK אחר. זוהי נקודת האל-חזור במחזור התא.
- ציקלין של S.
- שני ציקלינים בשלב המיטוזה.

בבעלי-חיים יש 4 ציקלינים ו-4 CDK. בשמרים יש רק CDK אחד.

הבקרה על CDK - בקרה חיובית ושלילית. במצבו הלא פעיל, CDK מקופל פנימה (יש לו דומיין שמקופל פנימה). קישור הציקלין גורם לשינוי קונפורמציה שמשחרר את הדומיין המקופל לכך שהוא יהיה פעיל באופן חלקי. לאחר מכן קינאז CAK מזרחן את ה-CDK על טריאונין 161 ובכך גורם להפעלה מלאה של ה-CDK, זוהי בקרה חיובית. מצד שני, זרחון על טירוזין 51 על-ידי wee1 מעכב את פעילות CDK. פעילות של פוספטאז CDC25 שיסיר את הפוספט הזה, יאפשר פעילות מלאה של CDK. להפסקת הפעילות של CDK יש צורך בפירוק הציקלינים. הפירוק קורה במחזורים מבוקרים לאורך מחזור התא. מוטציה ב-wee1 תגרום לחלוקה

מוקדם מדי, לפני שיושלם G2 ובכך יתקבלו תאי בת קטנים. מוטציה בפוספטאז תגרום לחוסר חלוקה ויתקבל תא גדול.

מעכבים נוספים של CDK כאשר wee1 לא פעיל: (wee1 פועל במיטוזה)

CKI - פועל במעבר מ-G1 ל-S וב-S עצמו. הוא נקשר לקומפלקס CDK-ציקלין ולא מאפשר ל-CDK לקשור ATP. P27 הוא CKI שמבקר את S ציקלין. אם יש מוטציה ב-P27 בעכברים מתקבלת בלוטת טימוס מוגדלת ולא תקינה.

בקרה על-ידי דגדציה של חלבונים:

פירוק CKI - מפורק על-ידי SCF. הוא מזהה את CKI המזרחן ומוסיף לו יוביקויטינים ששולחים לפירוק.

פירוק ציקלינים - APC מפרק את הציקלינים. הוא מאוקטב על-ידי CDC20 וגורם לקישור יוביקויטין לציקלין (שמחובר ל-CDK) כך שיישלח לפירוק.

APC הוא גם זה שגורם לפירוק cohesin (החלבון הקושר בין הכרומוטידות האחיות).

רמות SCF קבועות לאורך מחזור התא אך מכיוון שמכיר רק CKI מזרחן הוא לא יפעל תמיד אלא רק כש-CKI מזרחן- שזה כשצריך לפרק אותו.

בקרות נוספות:

- בקרה על שעתוק של ציקלינים ויציבותם. למשל ERK/MAPK שמשפעל שעתוק של ציקלין D. אותו ציקלין D מבוקר על-ידי Pkb/Akt שמייצב אותו. כל עוד Pkb/Akt פעיל, ציקלין D לא יפורק.
- בקרה על ציקלינים על-ידי מיקומם בתא. על-ידי צביעה מתאימה ניתן לראות כי ציקלין B ממוקם בגרעין בפרופאזה אבל מחוץ לגרעין ב-G2.

מעבר בין השלבים G1 ל-S - בשלב G1 יש נקודה חשובה לקראת סוף השלב, שנקראת R. זוהי נקודת האל-חזור. אם נסלק gf מהמצע לפני הגעה ל-R, התאים יחזרו לתחילת G1 או אף יעברו ל-G0. כדי שיתרחש המעבר מ-G1 ל-S צריך אקטוב פקטור השעתוק E2F שמעוכב על-ידי RB שקשור אליו. (מוטציה במעכב RB גורמת לרטינובלסטומה - retinoblastoma). RB הוא tumor suppressor gene שפעיל בשלב G1 וקושר E2F לעיכובו. gf גורמים לסינתזה מוגברת של ציקלין D ובכך מתקבל קומפלקס CDK-ציקלין D פעיל ב-G1. קומפלקס זה מזרחן את RB (על סרינים) וזה גורם לאינאקטיבציה שלו ושחרור E2F. E2F נחוץ לשעתוק גנים הנחוצים לשלב S, וביטוי של ציקלינים שמאפשרים לעבור את נקודת ה-R שהם ציקלינים של שלב S (A ציקלינים) וציקלינים של G1/S (E ציקלינים). E2F מהווה גם פקטור השעתוק של עצמו וצריך שכל ה-RB יהיה לא פעיל. קומפלקס CDK-ציקלין E מזרחן את RB על כל 15 הסרינים שלו ובכך הוא עובר אינאקטיבציה מלאה. כך נוצרת לולאה של בקרה חיובית, וזה מבטיח שהמחזור ימשיך קדימה ולא יחזור אחורה. השפעת CKI בתהליך: כאשר CKI מסולק, זה מאפשר שהקומפלקס CDK-ציקלין D יהיה פעיל.

בקרה על שלב S- שכפול הדנ"א- חשוב שתהיה מהימנות (fidelity)- שכל בסיס ישוכפל פעם אחת, ושכל origin יאתחל מסלול אחד בכל מחזור. תא ב-G2 או M לא יגיב לפקטורי איניציאציה של שלב S. מכאן שבמעבר מ-M ל-G1 קורה משהו שגורם ליכולת להתחיל שכפול דנ"א לחזור (קומפוננטיות). בניסוי שעשו בשמרים שמכילים CDK יחיד, ראו שהקומפלקס G2/M-CDK מעכב את שכפול הדנ"א (מעבר ל-S), אך גם מאפשר חלוקה. כך כשהייתה שם מוטציה התאים לא יכלו להתחלק אך הכפילו כל הזמן את הדנ"א ונהיו גדולים. ORC- קומפלקס לתחילת שכפול שיושב על אתר הקישור שלו על הדנ"א באופן קבוע. cdc6 הוא אדפטור בין ORC לבין ההליקאז Mcm. כל זה קורה ב-G1. Pre RC complex= cdc6+. ORC+ Mcm. כעת cdc6 מפריע לתחילת ההכפלה. S-CDK מאוקטב מזרחן את cdc6 וזה גורם לפירוקו מהקומפלקס ושליחה שלו לדגרדציה. כעת מגייס S-CDK קינאז שמזרחן את ORC כדי שלא יוכל לקשור cdc6 נוסף להתחלת מחזור הכפלה נוסף מוקדם מדי. גם Mcm מזרחן ונשלח לפירוק. כך יש שלוש בקורות שמבטיחות שלא תתחיל הכפלה נוספת: פירוק cdc6, זרחון ORC ופירוק Mcm. עד סוף יצירת ה-Pre RC זהו שלב G1, וכאשר נוצר הקומפלקס cdc6 ומזרחן ומפורק ממנו זה כבר שלב S. על מנת שיוכל להתחיל שכפול נוסף, יש צורך בדה פוספורילציה של ORC. גם פעילות M-CDK צריכה לרדת. S-CDK ירד כבר בתחילת המיטוזה. כששניהם לא פועלים תהיה דה פוספורילציה של ORC וייצור cdc6 ו-Mcm.

שלב M- אם השכפול לא הסתיים באופן תקין ה-checkpoint של G2 יעכב על-ידי cdc25 את הכניסה לשלב M. מוטציות בסנסור יגרמו לחלוקת התא להמשיך גם אם יש מוטציות. למשל deletion של RB גורם לכך שלא צריך את מנגנון ההפעלה של CDK. גם RTK פעיל קונסטיטוטיבית גורם לפגיעה.

הבקרה על כניסה ויציאה של שלב M- הבקרה נעשית על-ידי M-CDK. הצטברות הציקלין מתחילה כבר ב-G2 ומגיעה לשיא בסוף G2. ה-CDK לא פעיל למרות שהציקלין קשור אליו מכיוון שקשור אליו פוספט שמעכב אותו. CDC25 מוריד את הפוספט ומאפשר ל-M-CDK להיות פעיל.

תפקידי M-CDK- קשור להפרדת הכרומוטידות האחיות, פירוק ממברנת הגרעין, דחיסה של הכרומוזומים, ארגון שלד התא, ארגון הגולג'י וה-RER (rough ER) כדי שיתחלקו באופן שווה בתאי הבת.

הבקרה על הפרדת כרומוטידות אחיות- נעשה בדרך-כלל על-ידי זרחון חלבונים. זרחון קונדנסין גורם לדחיסת הכרומוזום. M-CDK משפעל את CDC20 שנקשר ל-APC ונוצר קומפלקס פעיל. הקומפלקס גורם לפירוק סקורין שעיכב את ספראז. הספראז הלא מעוכב יכול לפרק את הקוהזין (cohesin) להפרדת הכרומוטידות.

סוף המיטוזה- בעובר פעילות CDK נפסקת ופעילות APC נפסקת ואז רמת ה-M ציקלין עולה וכך נכנסים ישר לשלב S ו-M חדשים. בבוגר צריך לשמור על ציקלין M ו-S ברמה נמוכה בשלבי G1. G1-CDK לא מבוקר על-ידי CKI או APC אלא על-ידי gf המפעילים את הקומפלקס. זה גורם לזרחון RB, עלייה של פקטור E2F וזה יוצר ציקלין G1/S ו-S. למעבר צריך לפרק את CKI ולהפסיק את פעילות APC כדי ש-S-CDK יפעלו, ומי שעושה את זה, זה G1-CDK כי הוא לא מבוקר על-ידי.

מנגנון ה-checkpoint ב-G1- לעיכוב התהליך, במקרה שהדנ"א לא הוכפל נכון, צריך להפעיל את המעכב CKI. למרות שהציקלין ממשיך להצטבר הקומפלקס לא יפעל כי מעוכב על-ידי CKI. הקומפלקס החלבוני P53 ו-MDM2 נמצא ב-checkpoint ופועל לתיקון נזקים בדנ"א. P53 הוא הסנסור והוא tumor suppressor. בדרך-כלל ריכוזו נמוך מכיוון ש-MDM2 נקשר אליו ושולח אותו לפירוק. כדי לאפשר ל-P53 להצטבר יש לסלק את MDM2. כשיש פגיעה בשכפול הדנ"א, מערכת ATM גורמת לזרחון P53 וכך נפרד מ-MDM2 ויכול להצטבר ולהיות פעיל. הוא פועל על גן P21 שהוא CKI וגורם לשעתוק שלו כך שמעכב את ה-CDK. התקדמות מחזור התא מתאפשרת, אחרי תיקון הדנ"א, על-ידי דה פוספורילציה של P53 וקישורו בחזרה ל-MDM2.

ה-checkpoint של הפרדת הכרומוזומים- זהו הקינטוכור עצמו. הוא מביא את הכרומוזום להסתדר במישור המשווה. הקינטוכור מעכב את APC. כשהכרומוזומים מסודרים מופסק הסיגנל לעיכוב APC. כשה-checkpoint מתקלקל תהיה חלוקה בלתי שווה של הכרומוזומים בין התאים. זה יכול למשל לגרום לאיבוד גן tumor suppressor באחד התאים וזה מביא תועלת להתפתחות סרטנית. גם תוספת של גנים למשל PI3K או MAPK מועילים לסרטן שכן אלה רצפטורים של gf. גן שמגביר את החלוקה טוב לסרטן וגן שמעכב את מחזור התא יפגע בסרטן.