

קורס חומצות גרעין, תשע"ד

דר' שירלי דאובה

מיפוי תכנים של הרצאה 7

המיפוי נשעה על ידי מירב דינור בהנחיית פרופ' רון בלונדר

תוכן	זמן
חזרה על ההרצאה הקודמת, שתי קבוצות של חלבונים שקושרים דנ"א 1. חלבונים שנקשרים בלבד. לדוג' רנ"א פולימראז, חלבוני בקרה 2. חלבונים שנקשרים לדנ"א ועושים שינויים. לדוג' אינזימים שחותכים, מחברים... איך נקשרים החלבונים לדנ"א? מה חוזק הקישור?	0:31-1:50
ספציפיות- יש 2 צורות לספציפיות: 1. רצף- זיהוי רצף. חלבון שקושר לדנ"א ברצף מסוים. זהו הרצף הספציפי שאותו הוא מזהה. 2. קשטרה ספציפית לדנ"א- הכוונה קשירה חזקה. הקישור הוא לא אקראי. ברוב המקרים 2 הדברים הללו הולכים ביחד, חלבון מזהה את הרצף שלו, ובד"כ נקשר אליו חזק. ישנם מקרים של זיהוי רצף אבל חוזק הקישור הוא לא גבוה מסיבות מסוימות.	2:17-3:31
מתי צריך שיהיה קישור חזק? ומתי לא? מתי צריך קישור חזק ולא רצף מסוים?	3:39-3:50
איך מזהים חלבונים קושרי דנ"א?	4:03-4:24
שיטה לזיהוי חלבונים- מחברים חתיכת דנ"א שחושבים שיש בה את הרצף שקושר חלבון מסוים. מחברים אותה למשהו מוצק (קולונה למשל) לוקחים תאים, ממצים אותם, ומערבבים אותם עם חתיכות הדנ"א. מבין החלבונים שיש בתא מישהו יקשר לדנ"א.	4:24-5:16
ניתן להפריד בין מה שנקשר למה שלא נקשר, ע"י צנטריפוגה או קולונה ושטיפה. שיטה כללית חזרה חלבון ספציפי שמחפשים או שלא יודעים מי החלבון, מה שנשאר קשור לדנ"א אותו חוקרים, וכל השאר נשטף.	5:34-6:14
מהתא הפקנו תערובת של חלבונים כולל החלבון אותו רוצים לחקור. שולים מהתערובת את "הביד" שמחובר לדנ"א וכל מה שנקשר לדנ"א ישלה יחד איתו.	6:34-6:55
אנחנו רוצים לאפיין את חוזק הקשר לדנ"א, ולבדוק לאיזה רצף הוא נקשר, והאם הוא מזהה רצף מסויים. או שהוא נקשר לדנ"א / רנ"א אבל לא לרצף מסויים.	8:02-8:45
בסוף מגיעים לאיפיון מפורט, איך נראה הקומפלקס חלבון + דנ"א. אילו חומצות אמינו משתתפות בקישור, ואיך נעשה הקישור.	8:45-9:02
בד"כ פותרים את המבנה הקריסטלוגרפי של החלבון + דנ"א רק אנשים מומחים. ואז יש את הידע הספציפי לפי אטומים.	9:13-9:28
אפיון חוזק הקישור הוא כמו תגובה כימית $A + B \leftrightarrow A:B$ את חוזק הקישור יאפיין קבוע ש"מ. היחס בין הריכוזים של דנ"א חופשי וחלבון חופשי לעומת הריכוז שלהם כשהם מחוברים. Ka הרכבה Kd פירוק	9:42-10:48
ריכוז החלבון הקשור = $[Pb] - [Pt] = [Pf]$ ריכוז החלבון המשוחרר = ריכוז החלבון הכללי -	10:57-11:51

תוכן	זמן
לפעמים ניתן להזניח את ריכוז החלבון הקשור, כשהוא מאוד קטן.	
[Pb] החלבון הקשור, חלק מהחלבון קשור לדנ"א וחלק נמצא בתמיסה.	11:56-12:11
הקומפלקס זה [P:D] חלבון מחובר לדנ"א. הוא יכול להתפרק ולהווצר. היחס בין המובר למפורק מעיד על חוזק הקישור.	12:18-12:35
כשנמצאים בחצי, יש דרך קלה להעריך מה קורה.	12:42-12:54
חתי מהמולקולות קשורות וחצי מופרדות, אותו יחס. מתקבל ש $K_d = [Pf]$ וזה בתנאי שהחלבון הכללי שווה בקירוב לחלבון החופשי. ז"א שמלכתחילה הוא היה בעודף. K מבטא את היחס בין המולקולות הקשורות למולקולות שלא קשורות.	13:08-14:46
שיטה אנליטית פשוטה להעריך את קבוע הדיסוציאציה.	14:50-15:22
דוג' עקומות קישור. ציר ה y הוא % הקישור(צריך שיטה לדעת כמה דנ"א יש חופשי מחלבון וכמה יש קשור לחלבון) אנחנו יודעים לקבוע את % הקישור של הדנ"א עבור כל אחד מהריכוזים של החלבון. בנק' שבה הגענו ל 50% קישור זה יהיה K_d (בהנחה שהחלבון לא מגביל) ריכוז החלבון שמופיע בגרף הוא Pt. אם Pb זניח, ניתן לומר ש $K_d = Pt$	15:29-16:54
הריכוז הוא ביחידות של ננומולר. עקומת קישור אדומה היא עבור חלבון שבו $K_d = 4 \text{ nM}$	17:12-17:21
ב 20 nM אנחנו יודעים שכבר אל כל הדנ"א מחובר חלבון.	17:45-17:51
כדי שנוכל לעשות את ההזנחה של Pb ולומר $Pt = Pf$ צריך לשים חלבון בעודף (חזרה על החישוב)	18:06-19:39
הניסוי עצמו פשוט, החישובים קצת יותר מורכבים, כיון שיש הרבה הזנחות והנחות. יכול להיות שמלכתחילה נעבוד בריכוז קטן של דנ"א ואז הכל יהיה קשור ולא נקבל עקומה. צריך למצוא את התנאים הנכונים.. חזרה- תנאים לקבלת העקומה	19:51-20:42
בחלבון לא מוכר עושים את הניסוי מספר פעמים עם ריכוזים שונים של דנ"א עד שמתקבלת עקומה.	20:45-20:55
המטרה- זיהינו את החלבון, מאפיינים אותו ע"י חוזק הקישור לדנ"א, אנחנו רוצים ללמוד על מנגנון הפעולה שלו.	20:59-21:17
דוגמא לחלבון נוסף במקרה זה צריכים ריכוזים גבוהים יותר של דנ"א כדי שהחלבון והדנ"א יקשרו אפיניות- צריך להעלות את הריכוז כדי האינטראקציה בניהם תבוא לידי ביטוי. עבור החלבון הזה K_d גבוה יותר, $K_d = 23 \text{ nM}$ הערך של K_d מעיד על חוזק הקישור בין החלבון לדנ"א.	21:24-22:44
אנחנו רוצים להיות מסוגלים ויזואלית להפריד בין 2 סוגים של מאקרומוולקולות. דנ"א היא מולקולה גדולה וגם דנ"א + חלבון זו מולקולה גדולה, ולכן זה לא פשוט. נשתמש בשונות בין המרכיבים כדי לעשות הפרדה.	23:32-24:08
כדי לצייר את העקומה צריך להפריד בין דנ"א שקשור אליו חלבון לדנ"א שלא קשור אליו.	24:12-24:27
3 שיטות איך להפרדה בין מולקולות מאוד גדולות	24:29-24:41
שיטה 1- קישור לפילטר וסינון. הפילטר עשוי מניטרוצלולוז. הוא עושה הפרדה כימית כי רק חלבונים מסוגלים להיקשר אליו.. אם נעביר תערובת דרך הפילטר יספח הדנ"א שקשור לחלבון, והחלבונים. ושאר הדנ"א יעבור דרכו	24:43-25:42

תוכן	זמן
אם הדנ"א יהיה מסומן רדיואקטיבית / פלורוסנטית נוכל להשוות בין מה שנספח לפילטר לבין מה שעבר דרכו. חישוב היחס בניהם הוא אחוז הקישור. החלבונים לא מפריעים בכלל כי הם לא מסומנים ולא רואים אותם.	25:42-26:57
חזרה- אחוז קישור	27:12-27:20
כתיבת היחס- DNA filter / (DNA filter + DNA out)	27:54-28:30
בדרך ניסיונית עושים את הסיכום של דנ"א שעבר ודנ"א שנקשר. בעולם האידיאלי בלי איבוד חומר זה שווה לדנ"א הכללי שהתחלנו ממנו.	28:43-28:57
צריכים לחזור על הניסוי בכמה ריכוזי חלבון. עבור כל ריכוז של חלבון יהיה יחס שונה. מצירים עקומה. בערך המתקבל עבור 50% זה ה Kd	29:25-29:57
בשיטת הקישור לפילטר מקבלים אינפורמציה לגבי קשור / לא קשור בלבד.	30:10-30:40
בשתי השיטות הבאות חוץ מ Kd ניתן לקבל עוד אינפורמציה שיטה 2 foot printing- דומה לריצוף. עושים קביעת רצף של דנ"א בנוכחות חלבון. כמו מקסם גילברט- במקום לעשות פילמור דנ"א בכל מיני מקומות, חותכים את הדנ"א ואז עושים ריצוף בלי החלבון ועם החלבון. במצב שהחלבון קשור לדנ"א הריאגנט שיחתוך את הדנ"א לא יוכל לפעול כיון שהוא חסום, החלבון משאיר טביעת רגל על הדנ"א בזה שהוא מגן עליו.. בהרצה בגלל, חלק ממולקולות הדנ"א לא יהיו שם כיון שהן לא נחתכו (מוצג יפה בשקף)	30:40-32:20
חזרה על שיטה 2- לוקחים דנ"א מסומן בקצה, עם חלבון ובלי חלבון. לוקחים משהו שיחתוך את הדנ"א נוקלואז נפוץ- דנאז- יודע לחתוך דנ"א לא רק מהקצה.	32:24-33:23
דנאז 1- לא ספציפי לרצף. כשמוסיפים אותו לדנ"א, הדנ"א יחתך באופן רנדומלי. אם יש מעט דנ"א והרבה אינזים, כל מולקולה תחתך פעם אחת במקום שונה. מתקבל סולם. כשהחלבון קשור לדנ"א, חלק מהמקומות לא נגישים לאינזים, ז"א שחלק מהפסים יעלמו.	33:46-34:40
הערך המוסף של השיטה- אנחנו יודעים להגיד גם את חוזק בקישור וגם את מקום הקישור. על איזה בסיסים החלבון הגן.	34:44-35:00
חישוב Kd עושים את הניסוי כמה פעמים בריכוז שונה, בודקים את עוצמת הפסים, כמה נחתך וכמה לא.	35:02-35:21
דוגמא foot printing של רנ"א פולימראז על דנ"א מסוים באיזור של הפרומוטור. איך ידעו לזהות רצף של פרומוטור?	35:46-36:10
חייבים לעשות את הניסוי עם רצף מסויים, ועכשיו יודעים את הרצף, ורואים לאן האינזים נקשר. ניתן לראות בדוגמא לאן נקשר הרנ"א פולימראז. בניסויים נוספים ראו ששינוי רצף במקרום מסויים גורם לכך שלא יהיה שום קישור, ושינוי של רצף במקום אחר, לא משפיע על הקישור.	36:15-37:17
שוב הסבר על הדוג' בשקף- עמודה אמצעית, דנ"א ללא חלבון. ניתן לראות שדנאז 1 הוא לא לגמרי לא ספציפי, כי למרות שלא היה חלבון במקרה זה החיתוך לא נעשה בכל מקום בצורה יעילה. הניסוי הזה נעשה לבקרה כדי לדעת מתי החיתוך "נעלם" בגלל החלבון, ומתי החיתוך מראש לא היה.	37:25-38:49
ישנן 2 עמודות נוספות, באחת הוספו חלבון רנ"א פולימראז שנקשר	38:59-39:19

תוכן	זמן
לפרומוטור , בשניה הוסיפו חלבון שהוא רפרסור.	
הרפרסור נקשר לדנ"א ומונע מרנ"א פולימראז לייצר רנ"א. איך הרפרסור מעכב את השיעתוק?	39:24-39:50
הוא נקשר לפרומוטור, לאיזור בדנ"א שגבולי לפרומוטור. מתחרה עם רנ"א פולימראז על אותם אתרים. בשיטת foot printing ניתן לראות ויזואלית את החפיפה הזאת.	39:58-40:37
רואים שיש איזורים שדנאז יכול לחתוך אבל כששמים את החלבונים הללו, הוא לא יכול לחתוך. יכול להיות שהחיתוך של הדנאז 1 במקומות מסויימים נפגע גם ללא החלבון בגלל הרצף של הדנ"א שגורם לו להיות בצורה מרחבת מסויימת.	41:22-41:33
שיטה 3- jel shift – מסתכלים על איך החלבון נקשר לדנ"א ומשפיע על המוביליות שלו בג'ל מבלי לחתוך את הדנ"א	42:18-42:48
ג'ל נטיבי (לא דנטורטיבי) הוא מאפשר לקשרי המימן להתקיים. כל הג'לים שמשמשים בהם לקביעת רצף מכילים חומרים שעושים דנטורציה למשל אוראה. החלבון לגמרי מתפרק ולא משפיע. בג'ל הזה אין אוראה, זה רק ג'ל שבו יש תעלות שהמולקולות יכולות לנוע. קשרי המימן והו.ד.ו של המולקולות מתקיימים אפילו החלשים. ניתן ממש לראות את הקומפלקס דנ"א + חלבון לעומת דנ"א חופשי.	42:57-44:06
אנחנו משתמשים בדנ"א מסומן, אנחנו בודקים איך הוא נע בג'ל בלי חלבון. המיקום אליו הוא מגיע מוכתב ע"י הגודל ומטען. בהוספת חלבון קבלנו מולקולה יותר גדולה עם מטען שונה- המולקולה פחות טעונה ובעלת יותר מסה. דנ"א שקשור לחלבון מגיע למקום גבוה יותר בג'ל כי הוא רץ פחות מהר.	44:06-44:18
שיטה מאוד נוחה (דומה לקישור לפילטר) מפרידה בצורה נוחה. ניתן לראות קשור / לא קשור. היחס הכמותי בין עובי הפסים (לבין הסה"כ) יתן את אחוז הקישור.	44:32-45:50
צריך לדעת כמה דנ"א שמנו. ביחידות של פלורסנציה / רדיואקטיביות, זו הדרך המדוייקת ביותר. צריך רק לדעת את היחס בניהם שהוא גודל חסר יחידות.	45:57-46:28
האם השיטה כללית לכל מערכת שחוקרים?	46:37-47:19
לפעמים יש מצב של חלבונים גדולים מאוד או בעלי מטען חיובי מאוד, שלא יכנסו לג'ל. ואז לא משתמשים בשיטה זו. במדע הניסיוני, צריך לסרוק יותר משיטה אחת, כי לא כל שיטה מתאימה לכל חלבון. אם יש בעיה של המטען ניתן לעבוד בשיטה של הפילטר.	47:39-47:45
ניתן להשיג מהשיטה עוד אינפורמציה., ניתן ללמוד על מנגנון הקישור.	47:49-48:44
ניתן לראות אם יש מולקולה שמתחרה בחלבון שלנו, או ללמוד על ספציפיות לרצף הוסיפו לדנ"א ברצף אחר ובדקו האם החלבון נקשר גם אליו. ניתן לראות שאם שמים את הרצף השני בלבד. החלבון יכול להיקשר אליו, אהל התערובת החלבון נקשר לדנ"א הראשון.	49:17-50:11
הוסיפו שני רצפים, אחד שמתחרה והחלבון נקשר אליו, והשני לא הצליח להתחרות והחלבון לא נקשר אליו.	50:43-51:03
שיטה נוחה להשוות בין רצפים ובין חלבונים.	51:12-51:19
הרבה מהחלבונים שקושרים דנ"א הם דימרים. רצו לדעת לגבי חלבון מסויים, האם הוא נקשר לדנ"א כדימר או כמונומר?	51:30-52:13

תוכן	זמן
לקחו את החלבון ויצרו ממנו חלבון קטן יותר. אתר הקישור נמצא אבל חלק חסר לו ולכן המסה המולרית קטנה יותר.	
עשו את הניסוי הגל' בשלושה הרכבים שונים. 1. חלבון שלם וגדול, 2. חלבון קטן יותר. מחברים את החלבונים לדנ"א א. 1 לדנ"א ב. 2 לדנ"א ג. תערובת של שניהם לדנ"א	52:13-52:58
אם החלבון היה נקשר לדנ"א כמונומר, היינו מקבלים בערבוב 1 ו 2 שני פסים בלבד, אבל מסתבר שכשמערבבים את 1 ו 2 מתקבלים 3 פסים.	53:20-53:47
אם אין פס באמצע, ז"א שהחלבון נקשר כמונומר. למולקולה אחת נקשר החלבון הגדול ולשניה הקטן. פס הביניים שהתקבל מעיד על כך שהחלבון נקשר כדימר.	54:09-54:37
ציור של התהליך- דנ"א שקשור עליו החלבון השלם, ודנ"א שקשור אליו חלבון קטן יותר, והוא רץ מהר יותר.	55:05-55:20
אם החלבון נקשר כמונומר אין אפשרות לקבל יותר משני הפסים.	55:28-55:44
הפס הנוסף מעי על כך שזה דימר, יש קומבינציה נוספת אפשרית. לאותו דנ"א נקשר חלבון שלם וחלבון חסר. זו דרך פשוטה יחסית כדי ללמוד האם החלבון הוא דימר או מונומר.	55:56-57:07
דימר נוצר כי יש אתר בחלבון שגורם למונומרים להיקשר אחד לשני וכך הם נקשרים לדנ"א. מצב נוסף הוא שכל אחד מהחלבונים נקשר לדנ"א וכך נוצר דימר.	58:14-58:53
Gsp חלבון פלורסנטי שהרבה פעמים משתמשים בו	59:51-59:57
החלבון שמר על היכולות שלו, לא להפריע לשום דבר וגם להיות מספיק משמעותי.	1:00:32-1:00:45
אם לאר ההוספה רואים שהוא לא נקשר לדנ"א ז"א שבמקום של התוספת זה מקום הקישור לדנ"א	1:01:08-1:01:25
יש חלבון שיודעים לאיזה רצף הוא נקשר בדנ"א. יצרו מקטעי דנ"א שהשוני בניהם הוא מיקום הרצף הספציפי בתוך המקטע. למה זה אמור להשפיע?	1:02:01-1:02:50
אם הדנ"א רץ לפי גודל, אז המקטעים לא אמורים להראות שונה בגל'. מה שניתן לראות בתוצאות הוא שמיקום הרצף השפיע על המיקום בגל'. לרצפים של הדנ"א בלי החלבון המיקום של המקטע לא משפיע, אבל כשמוסיפים חלבון מיקום המקטע משפיע. ניתן לראות שכשהמקטע באמצע זה רץ הכי לאט, ובקצוות הכי מהר. מסתבר שהחלבון שנקשר לדנ"א גם מכופף אותו, וזה אופייני להרבה חלבונים קושרים דנ"א, הם יוצרים כיפוף זה יכול להשפיע על השיעתוק כיון שהכיפוף יכול לגרום לרנ"א פולימראז להיקשר יותר או פחות.	1:02:53-1:4:40
הערה מהקהל- אולי החלבון לא גורם לכיפוף אלא יש לו ספציפיות שונה, במיקומים שונים של המקטע? תשובה- ספציפיות תבוא לידי ביטוי ביחס של הכמות ולא במיקום. בנוסף יכול להיות שהחלבון שינה את המבנה שלו, אבל יותר הגיוני שהדנ"א שינה את המבנה, כי הוא זה שקובע בריצה בגל'.	1:04:57-1:05:35
תמיד הולכים על ההסבר הפשוט ביותר, אם רואים שהוא לא מתאים אז הולכים למסובך יותר.	1:06:07-1:06:32

תוכן	זמן
צריך לאפיין בשיטות ברזולוציה אטומית איך חלבון נקשר לדנ"א?	1:07:06- 1:07:17
בהתחלה חשבו שלחלבון שקושר דנ"א יש מוטיב מאפיין פשוט. היום כשידועים מבנים של מאות חלבונים קושרי דנ"א, הבינו שאין מוטיב כזה. ישנם כמה מוטיבים במבנה של חלבונים קושרי דנ"א, אבל יש די הרבה קובצות, ויש חלבונים קושרי דנ"א ללא שום מוטיב.	1:08:34- 1:09:30
אין תנאים ברורים לחלבון כדי שהוא יקשור דנ"א, אבל בכ"ז יש דברים שידועים שצריך. כאשר מגלים חלבון חדש קושר דנ"א צריכים לאפיין אותו כיון שאין שני חלבונים קושרי דנ"א שהם בדיוק אותו הדבר. החלבון הראשון שמצאו את המוטיב שלו : helix turn helix	1:09:30- 1:10:24
לחלבונים יש שני מוטיבים עיקריים α helix β sheet. מצאו שבחלבון קושר דנ"א יש α helix 2 שנכנסים בתוך המייג'ור גרוב של הדנ"א. שני ההליקסים מאונכים זה לזה ומחוברים קוולנטית ע"י שרשרת במבנה של מעין סיבוב. ניתן לראות שזה דימרים. בכל אחד שני ההליקסים (תמונה ברורה)	1:10:38- 1:11:54
כמעט בכל הדימרים יש חלק שהוא שייך לאינטראקציה בין שני המונומרים ובנוסף כל אחד נקשר לדנ"א.	1:12:31- 1:12:48
הליקאז חלבון שפותח את הגדילים, ברוב המקרים זה הקסמארים, ששה מונומרים שיוצרים טבעת וכך מנגנון ההפעלה שלהם. רוב החלבונים שנקשרים לרצף מסוים, וחלבוני השיעתוק הם דימרים. אבל באופן כללי ניתן למצוא הכל.	1:13:26- 1:13:58
למה לחלבון מסוים יש K_d נמוך וחלבון אחר K_d גבוה? בחלק מהחלבונים צריך קישור חזק לדנ"א, ובחלק אחר צריך קישור לדנ"א אבל לא חזק כדי שיוכלו לנוע למקום הבא.	1:14:31- 1:14:48
יש מוטיב נוסף דומה (לא זהה helix loop helix ההבדל הוא הרצף המחבר את ההליקסים. הלופ החלק הזה ארוך יותר. לכל מונומר יש את הגרוב אליו הוא נקשר.	1:15:06- 1:15:33
אחרי שמיפו המון מבנים של חלבונים קושרי דנ"א, גילו שהקישור מאופיין ע"י המון אינטראקציות, ברובן הן קשרי מימן. מאוד דומה לגורמים שמאפשרים חיבור של שני גדילי דנ"א. קשרי מימן, אינפלקציות אלקטרוסטטיות, קשרי ו.ד.ו בין חומצות אמינו לבסיסים	1:17:41- 1:18:31
בכל קומפלקס של חלבון קושר דנ"א ניתן למצוא מספר אינטראקציות	1:18:42- 1:18:56
בהתחלה חשבו שחייב להיות α helix שיוצר קשרי מימן וזהו. גילו שזה לא חייב להיות α helix, ולא רק קשרי מימן, יש המון גורמים אחראיים. אפקטיים הידרופוביים, חומצת אמינו שהיא דוחת מים תתחבר באיזור שבין הבסיסים, שזה איזור לא טעון, איזור הטבעות האורמטיות.	1:19:09:19:34
החוקרים מחפשים כללים- ראו שיש קורלציה בין הספציפיות של הקישור, לדרך שבה חומצת אמינו נקשרת	1:19:39- 1:20:24
ברוב המקרים יש קשר ספציפי כאשר חומצת אמינו יוצרת יותר מקשר מימן אחד, לדנ"א	1:20:52- 1:21:17
דוג' סכמטית- 2 דוגמאות לחומצות אמינו שיוצרות 2 קשרי מימן עם הבסיסים של דנ"א בנוסף ניתן לראות כיצד חומצות אמינו יוצרות קשרי מימן עם הבסיסים, בלי לפתוח את הדנ"א דרך הגרוב.	1:21:38- 1:23:13

תוכן	זמן
כשמהו צריך ליצור 2 קשרי מימן ז"א שהמבנים צריכים להיות הרבה יותר מדויקים, כדי ששני הקשרים יתממשו. גם החומצה האמינית צריכה להיות מתאימה(ספציפית), וגם הבסיס כדי לאפשר יצירה של מספר קשרי מימן.	1:23:14- 1:23:47
יש חלבונים שקושרים דנ"א ברצף מסויים, ויש שלא. וזה לא מעיד על חוזק הקישור. לא מספיק לדעת את ה Kd צריך foot printing ג'ל shift, ולפתור את המבנה הגבישי על מנת לאפיין במדויק את מנגנון הקישור. צריך מכלול של מידע. חלבונים שונים קושרים דנ"א בצורות שונות. הקישור מותאם לפונקציות שאותם הם תריכים למלא. דוגמא- חלבונים כמו היסטונים, צריכים להגן על הדנ"א, הם נקשרים חזק, אבל לא ספציפי לרצף מסויים. לכן אנחנו לא מצפי לראות קשרי מימן כפולים / משולשים.	1:23:57- 1:25:09
המטען של הדנ"א הוא שלילי ולכן לחלבון שקושר דנ"א יש מטען חיובי.	1:25:36- 1:25:42
(תמונה ברורה) דוגמא לחלבון שהוא פקטור שיעתוק- המבנה פתור. החלבון הוא דימר והוא גורם לכיפוף הדנ"א. אלו חלבונים שניתן גם למנוע מהם להיקשר לדנ"א. לחלבון יש 2 קונפורמציות, זזות של שני חלקים, בזזית אחת החלבון להקשר לדנ"א ובזזית השניה לא.	1:25:47- 1:27:07
יש מולקולה קטנה שנקשרת לחלבון וגורמת לו לשינוי קונפורמציה שיתאים / לא יתאים לקישור לדנ"א	1:27:25- 1:27:37
חזרה- מולקולה קטנה וחשובה מאוד שנקשרה ושינתה את המבנה.	1:27:56- 1:28:21
ציקליק AMP אדין מונופוסטט. הפוספט מחובר גם ל 5 וגם ל 3 מולקולה שמעבירה סיגנלים, הוא מעביר מידע שנינו, הראשוני נקשר לרצפטור והוא מעביר לרמה של השיעתוק.	1:28:29- 1:29:36
איך חלבון יכול להשרות כיפוף בדנ"א? אם הוא יעשה אינטראקציה עם הפוספטים, הוא ימסך על המטענים, בין חומצות האמינו שמנטרלות את המטען. תהיה פחות דחיה, והן יוכלו להתקרב אחת לשניה. החלבון מייצב את המבנה המכופף. החלבון מנטרל את הדחיה הטבעית.	1:29:40- 1:30:47
חלבונים שנקשרים לדנ"א והם לא α helix. יש להם הליקס אבל הוא לא קושר לדנ"א. Zinc finger	1:31:12- 1:31:35
מוטיב נפוץ, רצף של חומצות אמינו- ציסטאינים קושרים יון של Zn^{+2} היון יוצר כיפוף בשרשרת החלבנית- מין אצבע. המבנה הזה הוא קושר דנ"א.	1:31:39- 1:32:15
הרדיוס היוני הוא חשוב מאוד, אין הרבה קטיונים שיכולים להחליף את האבץ.	1:32:21- 1:32:44
שרשרת של חלבון שיוצרות 2 אצבעות (או יותר) וכך הם נקשרים לדנ"א	1:32:59- 1:33:13
יש הליקס אבל בלי האצבע, הוא לא קושר את הדנ"א, האצבעות מכוונות את ההליקס למקום המתאים.	1:34:13- 1:34:29
היום משתמשים באצבעות האבץ לחלבונים מהונדסים. לוקחים אינזימי רסטריקציה, ומוסיפים אצבעות אבץ, כיון שכל אצבע מזהה איזשהוא רצף בדנ"א. לוקחים אצבעות שונות שמזהות רצפים שונים. אינזימי רסטריקציה מזהים 4, 6, 8 בסיסים. אם רוצים לחתוך גן, להחליף גן שהיה עם מוטציה משתמשים באינזימי	1:35:13- 1:37:31

תוכן	זמן
רסטריקציה. בשביל שכרומזום יחתך רק פעם אחת, צריך להגדיל את רצף ההכרה. אינזים מלאכותי- מוסיפים לו הרבה אצבעות אבץ, וכך מגדילים את רצף ההכרה בצורה מלאכותית.	
לאינזים רסטריקציה משנים חומצות אמינו כדי לגרום לו לא לזהות את הרצף, רק האצבעות מסייעות בזיהוי והאינזים רק חותך.	1:37:50- 1:38:14
האצבעות מגדילות את רצף ההכרה, במקום שהאינזים יזהה 6 בסיסים, הוא יזהה 30, כיון שכל אצבע מזהה 3 בסיסים ויצרו 10 אצבעות על האינזים. הסיכוי לזהות 30 הוא מאוד קטן.	1:38:22- 1:38:46
האצבעות לא חותכות, הם מכונות את האינזים לחתוך במקום שבו הן נקשרו.	1:39:59- 1:40:07
אלקטרוסטטיות- מוטיב שמאפיין חלבונים קושרי דנ"א נקרא Leucin zipper	1:40:51- 1:41:05
משפחה של חלבונים, שני הליקסים ארוכים שחלק משמש כאתר לדימריזציה. מורכבים מלאוצינין, חומצות אמינו ארוכות. חומצות אמינו לאוצינין מופיעות כל 7 בחלבון ונקשרות אחת לשניה כי הן הידרופוביות. הן מחזיקות את ההליקסים ביחד, אבל בקצה ההליקסים נפרדים ותופסים את הדנ"א. האתרים בחלבון ממופים על פי המטען. כחול הוא מטען חיובי. ניתן לראות (בתמונה) שהחלק של החלבון שקושר דנ"א הוא בעל מטען חיובי כדי להקטין את הדחיה.	1:41:11- 1:42:37
הדנ"א מגיע עם היונים שמנטרלים אותו. (את הפוספטים) למה צריך שגם החלבון יהיה טעון חיובית? מה שדוחף את האינטראקציה לקרות זה השיחלוף. כשהיונים מנטרלים את הדנ"א יש רווח אנטלפי אבל יש הפסד אנטרופי. כאשר החלבון עם המטען החיובי נקשר לדנ"א היונים נדחפים החוצה לתמיסה. והרווח האנטרופי הוא זה שדוחף את יציבות הקומפלקס.	1:42:42- 1:44:01
מה גורם לכיפף? פעם חשבו שכשחלבון משרה כיפוף בדנ"א, הדנ"א היה ישר לגמרי ורק החלבון יצר את הכיפוף.	1:45:33- 1:46:04
הבינו שהרבה פעמים חלבון נקשר לדנ"א שיש לו כבר נטיה ליצור כיפוף. זה קשור לרצף, זו קומבינציה של כמה גורמים. דוגל- לדנ"א שבו החליפו את הפוספט במתיל פוספט שהוא לא טעון. החלבון לא נקשר לדנ"א אבל בכ"ז היה כיפוף.	1:46:10- 1:47:02
אלקטרוסטטיקה מאוד חשובה. היונים מאוד חשובים בייצוב. הקישור בין חלבון לדנ"א, תלוי מאוד הריכוז המלח. תמיד חייבים לדעת מה ריכוז המלח בתמיסה. דוגמא להשפעת ריכוז המלח על קישור החלבון- ניתן לראות מהגרף (תמונה) שיש ריכוז מלח שבו הפעילות אופטימלית העלאת / הורדת ריכוז המלח גורם לקישור לרדת.	1:47:07- 1:48:04
בריכוזי מלח נמוכים רב החלבונים יהיו קשורים בצורה לא ספציפית, כי אין את הכח המניע לקשירת יונים. כיון שריכוזם נמוך מראש, הקישור לדנ"א יהיה לא ספציפי ז"א חלש. חושבים שהעובדה שחלבון נקשר לא ספציפית לדנ"א מאפשר לו למצוא את אתר המטרה בתא. בפועל גילו שהזמן שחלבון נקשר לאתר בתא הוא פי 2 סדרי גודל מהזמן המחושב לכך. חושבים שזה קורה ע"י אינטראקציות לא ספציפיות, שהן מעין חיפושים	1:48:22- 1:50:37

תוכן	זמן
מהירים של האתר.	
יש חיפוש שהוא תערובת בין 3 מימדים, למימד אחד. שילוב של קפיצות וסריקות במימד אחד.	1:51:33- 1:51:58
מצד אחד לחלבון צריכה להיות אפיניות לדנ"א, אבל אסור לו להיות קשור חזק מדי חוץ מלאתר הספציפי שלו.	1:52:22- 1:52:57
דרך נוספת- יש הרבה עותקים של החלבון בתא, ולא הרבה אתרים. כך שהחלבון בד"כ נמצא שם או קרוב לשם, כך שהוא לא בהכרח צריך לסרוק את כל נפח התא.	1:54:28- 1:55:06
היכולת להיקשר לדנ"א לעשות סליידינג- תנועה על דנ"א, זה קורה בריכוז מלח נמוך. בריכוז מלח גבוה, החלק האנטרופי לא מהווה רווח. בתוך התא ריכוז המלח הוא גבוה, ולכן המנגנונים המוצעים לא מתאימים לתנאים השוררים בתא.	1:56:18- 1:57:20