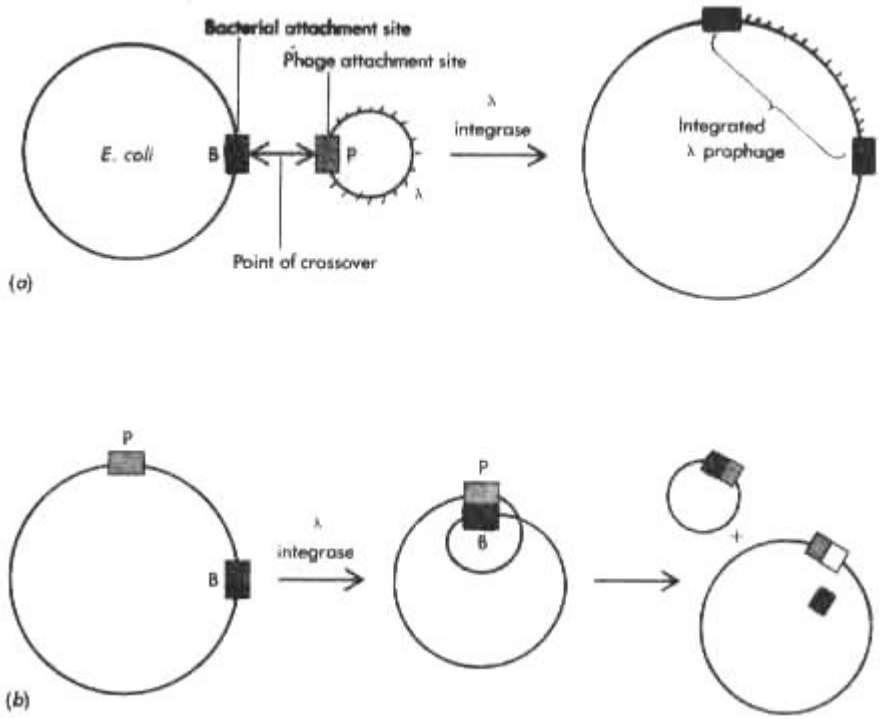
اختصاصی بودن جایگاه نوترکیبی سبب بازآرایی دقیق DNA می‌شود

عمل تبادل قطعه معمولاً به دلیل طبیعت خاص آن سبب حفظ نظم توالی‌های DNA موجود در کروموزوم‌های همولوگ می‌شود. به هر حال در موارد استثنایی سلول‌ها با استفاده از روند نوترکیبی کاملاً کنترل شده خاصی سبب تغییر در بعضی از توالیهای DNA (بازآرایی DNA) می‌شوند. این بازآرایی‌ها که در نواحی کاملاً اختصاصی صورت می گیرند به نام نوترکیبی در جایگاه ویژه خوانده می‌شوند حاصل این نوع نوترکیبی آن است که قطعات خاصی از DNA می‌توانند از ناحیه‌ای به ناحیه‌ای دیگر رفته و بدین ترتیب ژن یا ژنهای متفاوتی (نسبت به وضعیت قبل از بازآرایی) بیان خواهند شد. اولین مورد بازآرایی ژنی که در سلول‌های عالی کشف شد، بازآرایی ژن‌های سازنده آنتی‌بادیهای اختصاصی است. بدین ترتیب به کمک این پدیده با وجود توالی‌های پیش‌ساز نسبتاً محدود تنوع عظیمی از آنتی‌بادی‌ها بوجود می‌آید .

برخلاف تبادل قطعه (کراسینگ‌اور)، نوترکیبی در جایگاه ویژه صرفاً به دلیل وجود توالیهای همتراز در DNAهای نوترکیب شونده بوجود نمی‌آید (اگر چه در این مورد نیز توالیهای کوتاه همتراز لازم هستند) بلکه این عمل به دلیل وجود توالیهای معینی که انزیمهای اختصاصی مربوط به قطع و اتصال مجدد قطعات به آنها متصل می‌شوند، صورت می‌گیرد. این نوع نوترکیبی از طریق در دسترس بودن آنزیمهای اختصاصی آن تنظیم می‌گردد، در حالی که پدیده تبادل قطعه تصادفی بوده و کنترل نمی‌شود بدین معنی که هر نوع توالی که در معرض اتصال به پروتئین‌های اتصال مانند $RecA$ قرار گیرد میتواند در تبادل قطعه شرکت کند.

نوترکیبی در جایگاه ویژه اولین بار از طریق مطالعات ژنتیکی انجام شده بر روی نوترکیبی DNA فاژ لامبدا با جایگاه ویژه‌ای از کروموزوم کلی‌باسیل مشخص شد. در اثـر ایـن نـوترکیبی DNA فـاژ در DNA کلی‌باسیل قرار می‌گیرد به چنین فاژی پروفاژ گفته می‌شود . این نوترکیبی (نوترکبی DNA فاژ و باکتری) از دو خصوصیت مشرتک با نوترکیبی جایگاه ویژه برخودار است. تعویض به صورت متقابل انجام می‌شود تمام DNAهای قبلی حفظ می‌گردند، ضمناً عمل تعویض در محل نوکلئوتیدهای خاصی که خـود جزئی از توالی کوتاه همتراز در فاژ و باکتری هستند رخ می‌دهد. DNAهایی که به کمک آنـزیم انتگـراز لامبدا در نوترکیبی در جایگاه ویژه شرکت می‌کنند، دارای توالی کوتاه همترازی هـستند کـه کـاملاً بـا جایگاههای اتصال پروتئین متفاوت می‌باشند.

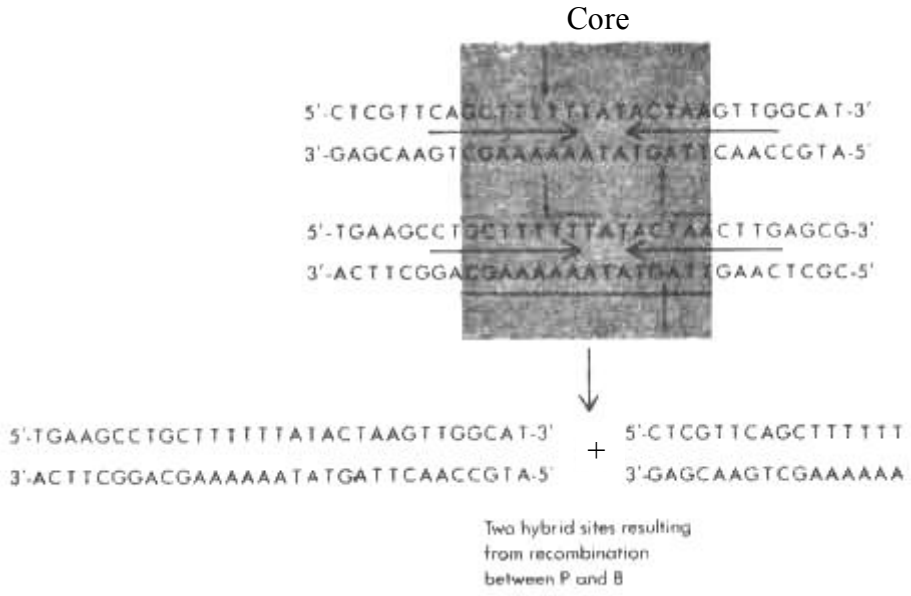
باکتریوفاژ لامبدا آنزیم به نام انتگراز لامبدا را تولید می کند که سبب قرار گرفتن DNA فـاژ در کروموزوم کلی‌باسیل می‌شود. این عمل به واسطه وجود جایگاههای ویژه موجود در هر دو مولکول DNA صورت می‌گیرد و بدین ترتیب یک مولکول DNA حلقوی از دو مولکول قبلی بوجود می‌آید (شکل 1).



قرار گرفتن *DNA* فاژ لامبدا در کروموزوم کلی‌باسیل از طریق عمل نوترکیبی جایگاه ویژه *(a)* واکنش طبیعی که در آن نوترکیبی سبب اتصال دو مولکول می‌شود *(b)* سوبسترای غیرطبیعی که به طور مصنوعی ساخته شده است و دارای جایگاههای اتصال فاژ *(attP)* و باکتری *(attB)* می‌باشد. هنگامی که انتگراز این دو جایگاه را در کنار هم قرار می‌دهد سبب نوترکیبی *P* و *B* شده، در نهایت دو مولکول *DNA* حلقوی کوچکتر پدید می‌آورد. از آنجایی که این مولکول‌ها را بسرعت میتوان در اثر الکترونفورز ژل آگاروز جدا کرد، این واکنش به عنوان ابزار ساده‌ای برای تشخیص فعالیت انتگراز محسوب می‌گردد.

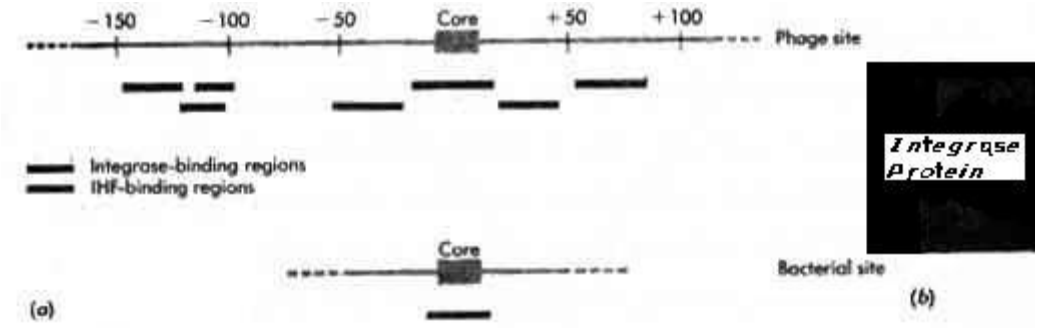
آنزیم انتگراز به فراوانی در مرحله اولیه عفونت فاژ تولید می‌شود به طوری که تقریباً در کلیه سلول‌ها دخول فاژ در *DNA* میزبان صورت می‌گیرد. چگونگی قرار گرفتن *DNA* فاژ لامبدا در کلی‌باسیل با مطالعات آزمایشگاهی بخوبی نشان داده شده است. بدین ترتیب که وجود مخلوط واکنشی ساده‌ای که تنها دارای چهارجزء پروتئین انتگراز خالص، پروتئین کمکی که کلی‌باسیل می‌سازد و به نام *IHF* خوانده می‌شود، یونهای منیزیم و *DNA*های فاژ و باکتری که واجد جایگاههای اختصاصی که به ترتیب *attP* و *attB* خوانده می‌شوند، برای این عمل کافی است. راه مناسبی که برای بررسی انجام و یا عدم انجام این

عمل مورد استفاده قرار می‌گیرد، استفاده از پلاسمیدهای مصنوعی است کــه دارای جایگاههــای $attB$ و $attP$ هستند. این دو توالی به نحوی قرار گرفته‌اند که بخوبی می‌توانند به یکدیگر متصل شوند. چنانچــه در محیط انتگراز موجود باشد این دو توالی به یکدیگر متصل شده دو DNA حلقوی کوچکتر از پلاسمید حلقوی اولیه بوجود خواهد آمد (شکل $1b$). کلیه واکنش های قرار گرفتن و یا جدا شدن فاژ در بــاکتری به صورت جفت شده صورت می‌گیرند. در طی این مراحل چهار رشته DNA (دو مارپیچ مــضاعف فــاژ و باکتری) بریده، تعویض و مجدداً در امتداد یکدیگر قرار می‌گیرند و این در حالی است که هیچ ماده حــد واسط مقاومی تشکیل نمی‌گردد. چنین واکنشی به واکنش توپوایزومراز II شباهت زیادی دارد که در آن هر دو رشته مارپیچ مضاعف DNA بریده و مجدداً پیوندهای فسفودی‌استر بدون استفاده از انرژی ATP تشکیل می‌شوند. در واقع آنزیم انتگراز به عنوان یک توپوایزومراز عمل می‌کند و سبب مــی‌گــردد کــه ابرمارپیچ‌های واجد جایگاههای Att یا توالیهای مشابه آنرا به حالت استراحت در آورد و به عبارت دیگــر واکنش فوق مسیر فرعی واکنش انتگره شدن طبیعی است. انتگراز نیز مانند توپوایزومراز بــه نحــوی در مارپیچ مضاعف قطع ایجاد می‌کند که در هر دو انتهای یک رشته اولیگو نوکلئوتیــدی آزاد بــاقی بمانــد. تعداد این نوکلئوتیدها در مورد انتگراز هفت عدد می‌باشد که با توجه به آنکه مکان قطع در باکتری و فاژ یکسان است نواحی تک‌رشته‌ای حاصل نه تنها با خود بلکه با قطعه همتــراز خــود نیــز مکمــل هــستند (شکل 2).



توالی نوکلئوتیدی نواحی مرکزی *(Core)* توالیهای *attP* و *attB* و جایگاههای نوترکیبی هیبرید توالی مرکزی در مربع قرار داده شده است. پیکانهای عمودی جایگاههای تبادل را مشخص می‌کنند. پیکانهای افقی بین رشته‌ها جایگاههای متقارن اتصال آنزیم انتگراز هستند و همانگونه که مشاهده می‌شود با نواحی مرکزی همپوشانی نشان می‌دهند. این نواحی باعث می‌گردند که انتگراز بطور صحیحی در نواحی تبادل قرار گیرد.

در این جا این پرسش مطرح می‌شود که انتگراز چگونه جایگاههای اختصاصی خود را تشخیص می‌دهد؟ آزمایشهایی در این زمینه انجام گرفته است و به کمک آنها مقدار *DNA* لازم در مجاورت جایگاههای واقعی *DNA* لازم در مجاورت جایگاههای واقعی تبادل (جهت اتصال و عمل انتگراز) تعیین شده است بدین ترتیب معلوم شده است که جایگاه *attP* حدود ۲۵۰ جفت باز و جایگاه *attB* تنها حدود ۲۰ جفت باز طول دارند. انتگراز و فاکتور میزبان *IHF* هر دو به محلهای معینی از *attP* متصل می‌شوند به طوری که فعالیت انتگراز عمدتاً مجاور جایگاههای تبادل *DNA* فاژ ثابت می‌گردد (شکل 3).



اتصال انتگراز IHF به DNA. (a) ساختمان جایگاههای اتصال فاژ و باکتری. در اینجا محل اتصال آنزیم انتگراز، IHF و DNA نشان داده شده است. مقیاس طول برحسب تعداد نوکلئوتیدها می‌باشد (b) عکس الکترون میکروسکوپی پروتئین انتگراز که به یک قطعه محدود شوند DNA که حاوی $attP$ می‌باشد متصل شده است درجه تراکم DNA در اثر اتصال انتگراز را می‌توان با مشاهده همان قطعه DNA بدون وجود انتگراز نشان داد (قسمت پایین و سمت چپ عکس b).

بنظر می‌رسد که قطعه کامل ۲۵۰ نوکلئوتیدی ناحیه $attP$ ساختمان شبه نوکلئوزومی تشکیل دهد و DNA این ناحیه به دور هشت مونومر انتگراز (که وزن مولکولی هر یک ۴۰۰۰ است) تاب می‌خورد (شکل $3b$). توالی کوتاهتر موجود در باکتری عمدتاً شامل ناحیه مرکزی ۱۵ جفت باز می‌باشد که در $attP$ نیز وجود دارد. انتگراز به هر دو توالی مرکزی که جایگاههای واقعی تبادل قطعه هستند نیز متصل می‌شود. چنانچه توالیهای مرکزی $attP$ و یا $attB$ حتی در حد بسیار کمی تغییر کنند، میزان وقوع نوترکیبی کاهش زیادی می‌یابد ولی چنانچه توالیهای مرکزی هر دو جایگاه فوق بطور یکسانی تغییر یافته باشند، میزان نوترکیبی تغییر نخواهد کرد. بنابراین می‌توان گفت که عمل انتگراز مستلزم وجود همولوژی نواحی مرکزی و نیز وجود توالی خاصی که بتواند آنزیم به آن متصل شود است ولی هنوز معلوم نشده که آیا انتگراز به همولوژی بین دوپلکس‌های مجزا قبل از بریدن و بازکردن تاب نیاز دارد (مثلاً هلیکس اختصاصی چهاررشته‌ای از نوعی که قبلاً بحث شد) و یا اینکه ابتدا DNA را می‌برد و واکنش معکوس را تنها زمانی انجام می‌دهد که در ناحیه همپوشانی هفت جفت باز مجاورش همولوژی وجود داشته باشد.

هنگامی که عمل رشد پروفاژ لامبدا آغاز می‌گردد، انتگراسیون معکوس می‌شود (این مرحله به نام اکسیژن موسوم است) و بدین ترتیب DNA فاژ و باکتری تمامیت خویش را باز می‌یابند. پروفاژ لامبدا عمل برش (اکسیژن) را از طریق بیان پروتئینی به نام اکسیژناز انجام می‌دهد و باعث می‌شود که انتگراز نوترکیبی بین جایگاههای اتصال پروفاژ و باکتری را انجام دهد. مجموعه انتگراز – اکسیژناز به جایگاههای اتصال هیبرید فوق متصل می‌گردد و برخلاف انتگراز بی‌شک تنها این مجموعه امکان انجام واکنش معکوس را می‌دهد.