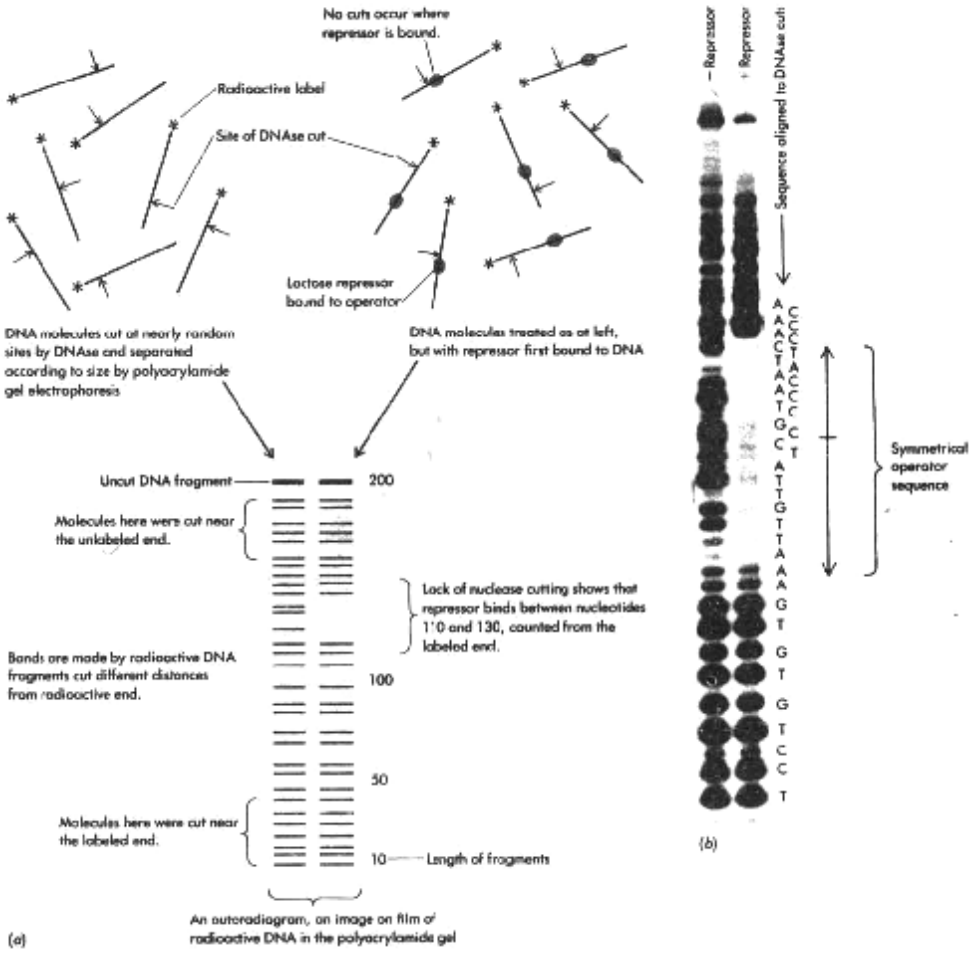
روشهای مهم شناسایی جایگاههای اتصال در *DNA*

چگونه می‌توان جایگاه اتصال یک پروتئین مانند جایگاه اپراتور را در *DNA* شناسایی کرد؟ اولین اقدام در این زمینه جداسازی و تعیین توالی قطعاتی از *DNA* بود که در اثر اتصال اختصاصی سدکننده به آنها از حمله آنزیمهای نوکلئاز در امان مانده بودند ولی این روش طولانی بود. امروزه با ساخت و تعیین توالی قطعاتی از *DNA* که در اثر آنزیم‌های محدودکننده بوجود آمده‌اند می‌توان با سرعت بیشتری جایگاههای اتصال پروتئین‌ها را شناسایی کرد. همچنین می‌توان نشان داد که دقیقاً چه گروههای شیمیایی *DNA* (متیل، آمین یا فسفات) با یک پروتئین تماس می‌یابند.

یک اصل اساسی مشابه آنچه در روش شیمیایی تعیین توالی *DNA* وجود دارد بر این روش حاکم است: چنانچه قطعه‌ای *DNA* تنها در انتهای یک رشته آن با یک اتم رادیواکتیو نشاندار شود جایگاه هر برشی در آنرا می‌توان از روی اندازه قطعه نشاندار حاصل تعیین کرد. اندازه یک قطعه را نیز می‌توان بسادگی با استفاده از الکتروفورز در ژل پلی‌اکریلامید معین نمود. در روش ردپا (نامگذاری این روش پس از روش انگشت‌نگاری که با استفاده از کروماتوگرافی انجام می‌شود صورت گرفته است) جایگاه اتصال با تعیین توالی قطعه‌ای از *DNA* که در اثر اتصال پروتئین از حمله نوکلئازها در امان مانده است، مشخص می‌گردد (شکل **1**).

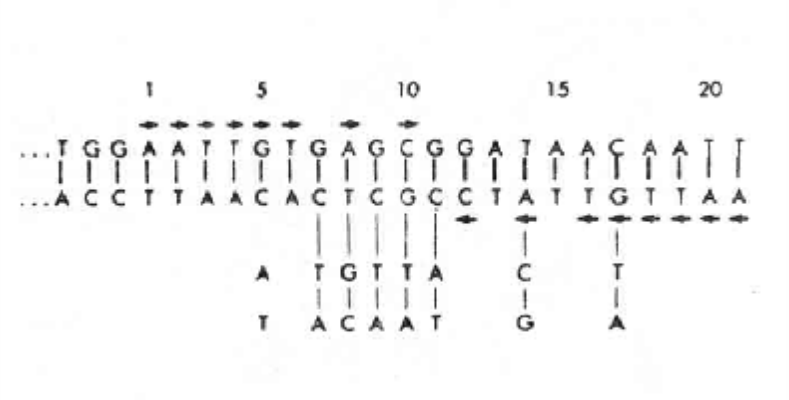
شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir



شکل1 : روش ردپا (*Footprinting*) برای شناسایی جایگاههای اتصال پروتئین در *DNA*. (*a*) چگونگی تعیین جایگاه اتصال پروتئین به *DNA* غالباً یک قطعه *DNA* واحد برای تعیین توالی شیمیایی و ردپا مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش جایگاه دقیق اتصال با استفاده از محلهایی که بوسیله یک نوکلئاز بریده شده است، تعیین می گردد. (*b*) عکس یک ردپای واقعی که جایگاه اتصال سدکننده لاکتوز به اپراتور مربوط به آنرا نشان می‌دهد. ابتدا توالی نوارهای الکتروفورز شده بطور کاملاً دقیقی کنار هم قرار داده می‌شوند بطوریکه هر باندی که رادیواکتیو وجود داشته باشد نشانه وجود برشی است که آنزیم نوکلئاز در قطعه *DNA* مورد آزمایش ایجاد کرده است. طول قطعه فوق 48 نوکلئوتید است و در واقع رشته فوق رشته پایینی ای است که در شکل2 نشان داده شده است.

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

شکل2



شکل2: توالی اپراتور لاکتوز و ارتباط آن با نقطه شروع رونویسی $mRNA$ مربوط به آن (نوکلئوتید شماره I). در قسمت بالا گونه وحشی نشان داده شده است و در پایین آن انواع تغییراتی که چنانچه در جفت بازهای DNA بوجود آیند، باعث اتصال ضعیف سدکننده لاکتوز می‌شود، مشخص شده‌اند. مرکز تقارن قطعه فوق نوکلئوتید شماره 11 است. پیکانهای افقی بازهایی را نشان می دهند که در دو طرف مرکز تقارن مشابه هستند.

روش دیگری که تاحدی به روش بالا شبیه است این است که با اتصال یک پروتئین به جایگاه اتصال، واکنش‌پذیری بازهای آن جایگاه نسبت به معرفهای اختصاصی که باعث ایجاد برش در اسکلت DNA می‌شوند از بین می‌رود و بدین ترتیب از طریق روش استاندارد شیمیایی توالی DNA فوق را می‌توان تعیین نمود.

با تعیین ردیف دو مرحله اول بکمک روش سومی می توان نشان داد که کدام طرح ساختمانی DNA لازم است تا پروتئین بتواند به آن متصل شود. بطور متوسط در هر DNA یک تغییر شیمیایی ایجاد می‌شود و سپس کمپلکس‌های DNA – پروتئین جدا می‌شوند. اگر وجود یک تغییر دریک جایگاه خاص مانع اتصال پروتئین به DNA نشود این نشان می‌دهد که DNA جدا شده از کمپلکس فوق دارای گروه شیمیایی تغییر یافته‌ای است و با روشهای شیمیایی امکان قطع در جایگاه تغییر یافته فوق وجود دارد. از

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

طرف دیگر چنانچه جایگاه اتصال بلوکه شده باشد کلیه *DNA* هایی کـه در ایـن جایگـاه تغییـر یافتـه‌انـد نمی‌توانند با پروتئین اختصاصی خود کمپلکس ایجاد کنند در نتیجه قطعات جدا شده با روشـهای شـیمیایی بعدی در این جایگاه قطع نمی‌شوند. با کمک این سه روش می‌توان دریافت که کدام قسمت یک پـروتئین بـا بازها یا گروههای فسفات اسکلت قند – فسفات بطور اختصاصی تماس می‌یابند.

ساختمان اپراتورها

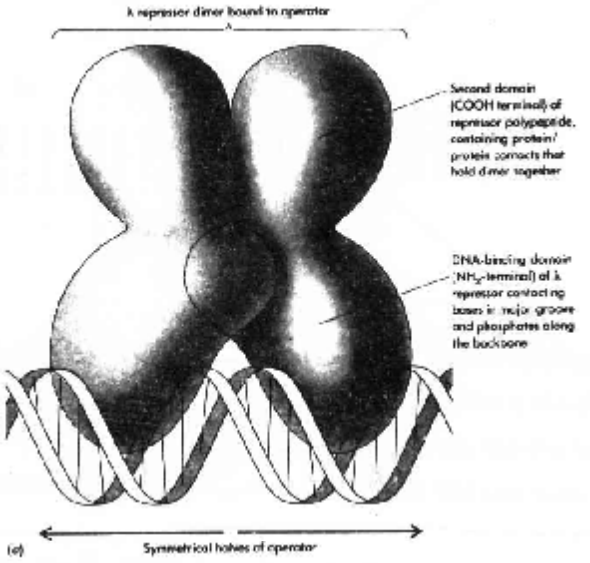
امروزه ساختمان بسیاری از اپراتورها با استفاده از روشهای ردپا و محافظت شیمیایی شناخته شده‌اند. همچنین با بررسی توالی *DNA* اپراتور جهش‌یافته‌هایی که اتصال سـدکننده بـه آنهـا تغییـر یافتـه اسـت. اطلاعات خوبی در مورد ساختمان اپراتورها بدست آمده است.مهمترین ویژگی اپراتورهـا وجـود یـک تکـرار معکوس در آنها است که به آنها شکل متقارنی می‌دهد. برای مثال از 24 جفت باز موجـود در قطعـه اپراتـور لاکتوز (که بعد از هضم نوکلئازی *DNA* فوق پس از اتصال به سدکننده تعیین توالی شده‌اند) 16 نوکلئوتید در دو طرف یک محور تقارن دوتایی واقع شده‌اند. مرکز تقارن نوکلئوتید شماره 11 است (شکل2). هنگامی کـه توالیهای اپراتور تعیین شدند مشخص گردید که چنین تقارنی می‌تواند امکان اتصال دو زیرواحد یک رپرسور مولتی‌مر را بطور همزمان بوجود آورد. ابتدا گفته شد عدم تقارن دقیق فوق شاید این باشد که تمـامی جفـت بازهای موجود در یک طرف خاص اپراتور به سدکننده متصل نمی‌شوند. تحقیقـات بعـدی نـشان داد کـه در واکنش پروتئین – اسیدنوکلئیک تنها جفت بازهای متقارن شرکت می‌کنند. با بررسی اپراتورهای جهش یافته معلوم شد که هر گونه تغییر بازهای این ناحیه که باعث کاهش قدرت اتصال سدکننده به اپراتور شـود ممکـن است در نواحی متقارن یا نامتقارن رخ دهند.

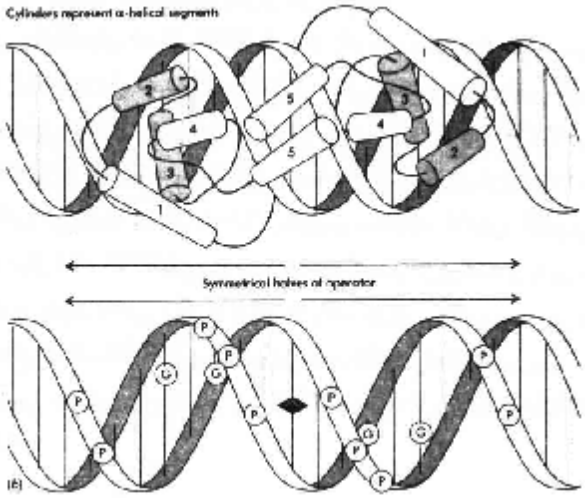
شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

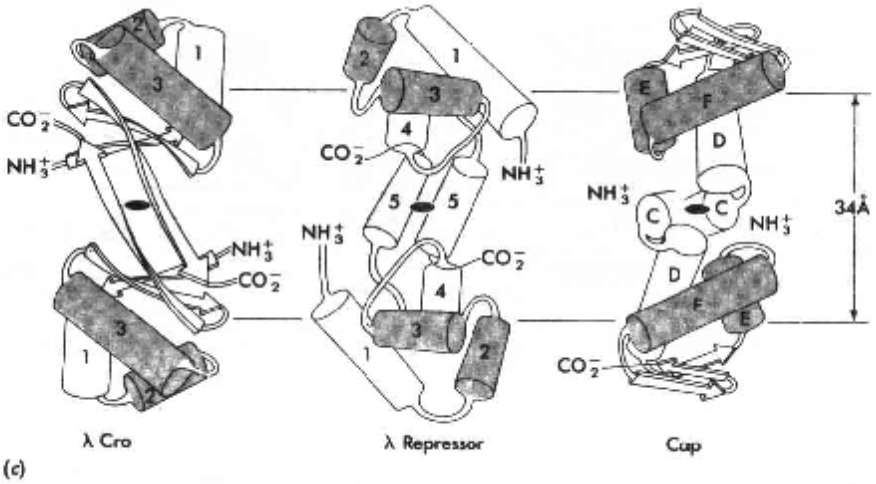
نحوه اتصال سدکننده به اپراتورها

اخیراً با استفاده از کریستالوگرافی با اشعه X توانسته‌اند ساختمان سه بعدی و چگونگی اتصال چندین پروتئین که بطور اختصاصی به DNA متصل می‌شوند را تعیین کنید. این پروتئین‌ها بمقدار زیاد از طریق مهندسی ژنتیک ساخته می‌شوند. از جمله این پروتئین‌ها می‌توان از سدکننده‌ها نام برد. اولین پروتئینی که ساختمان آن تعیین شد CAP بود و سپس بتدریج ساختمان پروتئین‌های Cro و سدکننده لامبدا و سدکننده فاژ 434 (یکی از بستگان نزدیک فاژ لامبدا) شناخته شد. همانگونه که متخصصین کریستالوگرافی انتظار داشتند قسمتی از پروتئین که به DNA متصل می‌شود دیمری است که از دو زنجیره پلی‌پپتیدی کروی تشکیل شده است و در دو جهت مخالف هم در فضا قرار گرفته، شکلی با تقارن دوتایی پدید می‌آورد که با جایگاه اتصال در DNA کاملاً متناسب می‌باشد. برای مثال در مورد سدکننده لامبدا انتهای آمین هر زنجیره آنچنان تاخوردگی می‌یابد که دومن فوق به نیمی از اپراتور متصل می‌شود (شکل $3a$). مهمترین قسمتهایی که با DNA تماس می‌یابند دو مارپیچ آلفای کوتاه مجاور هم بوده که در محل اتصال هر مونومر واقع شده‌اند. مارپیچ‌های شماره 2 و 3 در ساختمان سدکننده لامبدا در شکل ($3b$) و در پروتئین‌های Cro, CAP و سدکننده لامبدا در شکل ($3c$) نشان داده شده‌اند. در مورد سدکننده لامبدا مارپیچ3 از سطح پروتئین بیرون زده است و با مشابه خود در زیرواحد دیگر به اندازه 34 انگستروم یعنی یک دور مارپیچ $B-DNA$ فاصله دارد. بکمک مدل‌سازی فوق گفته می‌شود که مارپیچ 3 در شیار بزرگتر بگونه‌ای قرار می‌گیرد که با تماس مارپیچ‌های 3 هر مونومر با یک نیمه اپراتور، دیمر سدکننده به یک طرف DNA متصل می‌شود (شکل3).

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir



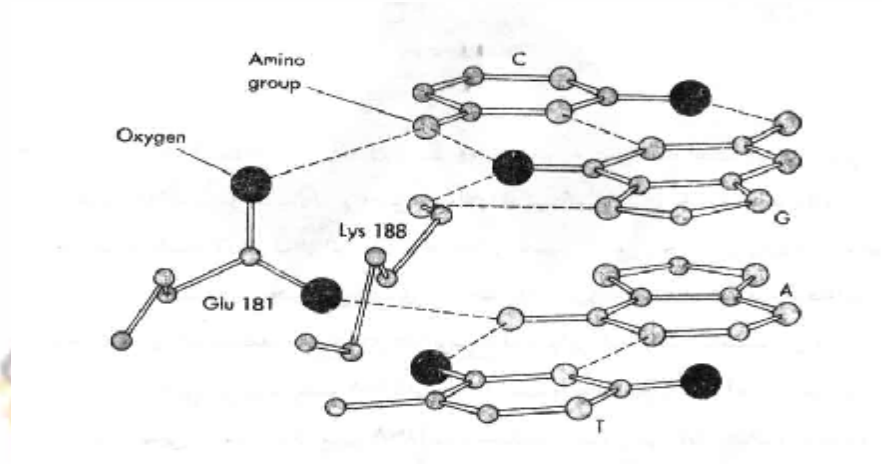




شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

شکل3: (a) طرحی از ساختمان سدکننده لامبدا که به اپراتور متصل شده است. در این شکل دومن‌های انتهای آمین که به DNA متصل می‌شوند و دومن‌های انتهای کربوکسیل نشان داده شده‌اند (b) چگونگی قرار گرفتن دو مونومر سدکننده لامبدا در اپراتور. در شکل بالایی قسمتی از هر زنجیره پلی‌پپتیدی در سطح اتصال اپراتور نشان داده شده است. دو زنجیره پلی‌پپتیدی بطور متقارن بر روی دو نیمه اپراتور قرار گرفته‌اند. استوانه‌ها نشان‌دهنده مارپیچ‌های آلفا هستند. مارپیچ‌های آلفا بوسیله قسمتهایی که آرایش نامنظم‌تری دارند بیکدیگر وصل شده‌اند. انتهای آمین پلی‌پپتید پشت DNA قرار گرفته است و به مارپیچ شماره I متصل می‌شود. در شکل پایینی بازها و قسمتهایی از اسکلت فسفاتی DNA که با سدکننده تماس می‌یابد نشان داده شده است (با استفاده از روش حمایت شیمیایی). (c)ساختمان سه پروتئین تنظیم کننده DNA در هر سه پروتئین، هلیکس‌های شماره 3 (که در پروتئین CAP مارپیچ F خوانده می‌شود) به اندازه 34 آنگستروم یعنی طول یک دور مارپیچ DNA نوع B، از هم فاصله دارند.

قسمت اعظم تماسهایی که باعث تشخیص اختصاصی اپراتور لامبدا می‌شود مربوط به پیوندهای هیدروژنی بین لبه جفت بازهای موجود در شیارهای بزرگتر و زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه مارپیچ 3 می‌باشد (شکل4).



شکل4: پیوندهای هیدروژنی بین زنجیره‌های جانبی دو اسیدآمینه در پروتئین CAP. گلوتامیک 181 و لیزین 188 و دو جفت باز موجود در جایگاه اتصال CAP در اینجا نشان داده شده‌اند.

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

در تایید مدل فوق باید تذکر داد که اکثر جهش‌هایی که سبب تغییر اسیدهای آمینه در دو مارپیچ آلفای مجاور می‌شوند بر قدرت اتصال سدکننده لامبدا به اپراتور اثر می‌گذارند. اخیراً با کمک اشعه ایکس نحوه اتصال سدکننده فاژ 434 به قطعه اولیگونوکلئوتیدی صناعی که حاوی توالی اپراتور 434 بوده است صحت مدل فوق بطور مستقیم باثبات رسید.

امروزه با داشتن اطلاعاتی در مورد توالی اسیدهای آمینه و ساختمان واقعی دو مارپیچ آلفای مهم این پروتئین‌ها، رابطه اسیدهای آمینه یک پروتئین و ساختمانهای فوق را می‌توان دریافت. با بررسی بیش از ده پروتئینی که به DNA متصل می‌شوند نشان داده شده است که دو مارپیچ آلفای فوق در کلیه جایگاههای فعال پروتئین‌های تنظیم‌کننده‌ای که به توالیهای خاصی از DNA متصل می‌شوند وجود دارد. کشف موتیف مارپیچ – دور – مارپیچ موجود در پروتئین‌های تنظیم کننده بزرگترین پیشرفت در زمینه درک اساس ساختمانی تنظیم ژنتیکی محسوب می‌شود.

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir