عنوان : کونژوگاسیون باکتریایی و ماشینهای پروتئینی دخیل در آن

نویسندگان: شهناز بهشتی (عضو هیئت علمی دانشکده پرستاری و مامایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان) ـ حسین خلخالی (کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پرستاری و مامایی)

چکیده: کونژوگاسیون باکتریایی یکی از مکانیسمهای اصلی برا ی انتقال ژن افقی است که در طی این فرایند یک DNA تک ر شته ای از پلاسمید کونژوگاتیو از یک سلول باکتریایی دهنده به پذیرنده منتقل می گردد. در طی فرایند کونژوگاسیون، باکتری دهنده نقش میزبان عنصر ژنتیکی کونژوگاتیو متحرکی را بازی می کند که اغلب یک پلاسمید یا ترانسپوزون متحرک یا کونژوگاتیو می باشد. همچنین اکثر پلاسمیدهای کونژوگاتیو دارای سیستمهایی هستند که تضمین می کنند سلول پذیرنده فاقد عناصر ژنتیکی مشابه با عنصر منتقل شونده باشد. اطلاعات ژنتیکی منتقل شده اغلب به نفع سلول پذیرنده بوده و ممکن است شامل ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی، تحمل زنوبیوتیکها، ویا توانایی مصرف یک متابولیت جدید می باشد. این قبیل پلاسمیدهای مفید گاهی اوقات به عنوان درون همزیستهای باکتریایی مورد توجه قرار می گیرند. البته برخی عناصر کونژوگاتیو نیز به صورت انگلهای ژنتیکی رفتار می کنند و در این حالت کونژوگاسیون، مکانیسمی تحول یافته ای است که عنصر ژنتیکی متحرک از آن برای انتشار خودش به درون میزبانهای جدید استفاده می کند.

پلاسمیدهای کونژوگاتیو در داخل گروههای ناسازگاری مختلفی (Incompatibility groups:Inc) ازجمله IncF-i، IncF-ii، IncI، IncN، IncQ، IncP، IncW و... گروه بندی می شوند.

فرایند کونژوگاسیون باکتریایی فرایندی پیچیده بوده و شامل پنج مرحله یا فعالیت متمایز است که عبارتنداز تنظیم فرایند کونژوگاسیون، ممانعت سطحی و ممانعت از ورود مجدد، پایدارسازی جفت شدگی ایجاد شده در حین فرایند کونژوگاسیون، مونتاژ و تخریب (واپس گیری) پیلی جنسی، و در آخرانتقال DNA پلاسمیدی تک رشته ای.

کمپلکس های پروتئینی مختلفی در مراحل مختلف این فرایند پیچیده و مهم فعالیت می کنند و سبب می شوند که باکتری دهنده از طریق پروتئینهای حسگر مستقر درسطح سلول باکتری پذیرنده فاقد پلاسمید را شناسایی نموده و از طریق پیلی جنسی خود که توسط ژنهای موجود در سطح همان پلاسمید در باکتری دهنده بیان می شوند به باکتری پذیرنده متصل شود. پس از اطمینان یافتن از برقراری اتصال محکم و پایدار بین دو سلول دهنده و پذیرنده کمپلکس پروتئینی ویژه ای موسوم به ریلاکسوزوم درون سلول دهنده تشکیل می شود که نقش آن باز کردن سوپرکویل های منفی در DNA دو رشته ای پلاسمیدی و ایجاد یک تک رشته ای موسوم به T-DNA یا DNA انتقالی است که می تواند توسط سیستم ترشحی نوع چهار که آن نیز توسط ژنهای مستقر بر روی پلاسمید بیان می شوند از غشاها و دیواره های دو سلول عبور کرده و به درون سلول پذیرنده وارد شود. سپس T-DNA تک رشته ای وارد شده توسط سلول پذیرنده اغلب به روش همانندسازی حلقه چرخان همانندسازی نموده و به صورت دو رشته ای در می آید.

در این مقاله مروری سعی بر آنست که مکانیسم عمل و ساختار ریلاکسوزوم مورد بررسی قرار گیرد.

واژه های کلیدی: کونژوگاسیون، پلاسمید، پیلی جنسی، ریلاکسوزوم، ترانسفرازوم

مقدمه: انتقال ژن ما بین باکتری ها به دو صورت رخ می دهد. در حالت اول که نتیجه تقسیم دو تایی باکتری ها است ژنوم کروموزومی باکتری مادری پس از همانند سازی کامل به طور مساوی بین سلول های دختری حاصل از تقسیم، توزیع می شود. این نوع انتقال ژن فقط بین سلول های حاصل از یک سلول مادری رخ می دهد ولی در حالت دوم انتقال ژن مابین باکتری ها که انتقال ژن افقی نامیده می شود، DNA ی خارج کروموزومی ما بین سلول های باکتریایی بالغ جابجا می گردد. دراین روش، انتقال ژن از سلول باکتریایی دهنده به پذیرنده(و فاقد آن قطعه ژنی) بدون انجام تقسیم سلولی رخ می دهد و روشی برای گسترش قطعات ژنی خارج کروموزومی ما بین باکتری ها است.

قطعات ژنی خارج کروموزومی در باکتری ها به دو گروه اصلی قابل تفکیک هستند که عبارتند از:

1 - توالی های داخل شونده باکتریا یی(IS:bacterial insertion sequences) که تا سال 1998 بیش از 500 مورد IS شناسایی شده بود.

این قبیل توالی های داخل شونده تنها اختصاص به پروکاریوت ها نداشته و بلکه به صورت گسترده ای در سلسله یوکاریوتی نیز وجود دارند از جمله حشرات، قارچ ها، پستانداران، ماهی ها و حتی گیاهان. به دلیل فراوانی انواع و تعداد، توالی های داخل شونده بر اساس شباهت ها و تفاوت هایشان در ساختار، سازماندهی، و روابط توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی به صورت سیستماتیک رده بندی شده اند. این گروه از DNA های متحرک (mobile DNA)، قطعات کوچک ژنتیکی با طول کمتر از2.5 Kb هستند که سازماندهی ژنتیکی ساده ای داشته و قادرند در چندین جایگاه به داخل مولکول ژنومی هدف اعم از کروموزوم باکتریایی یا پلاسمیدها وارد شوند. ورود IS ها به داخل مولکول هدف نیازمند آنزیم هایی به نام رکامبیناز یا ترانس پوزاز(recombinase/transposase) است که واکنش های جابجایی ترانس (transposition reactions)را کاتالیز می کنند. توالی های داخل شونده در خانواده های IS_2 , IS_3 , IS_4 , IS_5 , Is_1, IS_{3o}, Is_{66}, IS_{91}, IS_{110}, IS_{200}/IS_{605},IS_{256},IS_{630},IS_{982},IS_{1380},$ISAs_1$,ISL_3 گروه بندی می شوند.

توالی های داخل شونده باکتریایی اولین بار در خلال مطالعات انجام شده بر روی مدل های سیستم های ژنتیکی توسط قابلیت آن ها در تولید جهش هایی در نتیجه جابجایی شان شناسایی شدند. ورود آن ها به داخل پلاسمیدهای مقاومت آنتی بیوتیکی و قابل جابجایی نقش مهمی را برای این عناصر متحرک در انتشار ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی و در پیشرفت و ترویج اکتساب و به دست آوردن ژن آشکار ساخته است. به ویژه مشاهده شده که اغلب چندین عنصر مختلف به صورت جزایری درون ژنوم های پلاسمیدی خوشه بندی شده اند و در پیشروی یکپارچگی یا مجتمع سازی و برش پلاسمیدی عمل می نماید. علاوه بر این دو کپی از برخی از ISها یک قطعه DNA را احاطه نموده و قادرند که در هماهنگی با هم برای تحویل ناحیه متحرک بینابینی عمل نمایند. این ساختارها اصطلاحاً ترانسپوزون های مرکب یا پیچیده نامیده می شوند. این عناصر متحرک در ویرولانس و بیماریزایی باکتریایی دخالت دارند که از جمله آن ها می توان به ترانسپوزونهای مرکب مبتنی بر IS_2 که به طور اختصاصی یک توکسین مقاوم به حرارت را کد می کند اشاره نمود. ارتباط مابینIS ها و بیماریزایی و ویرولانس باکتریایی در پاتوژنهای حیوانی مثل باسیلوس، بوردتلا، بروسلا، کمپیلوباکتر،کلوستریدیوم، اشریشیا، هموفیلوس، نایسریا، ویبریو و یریسینا و همچنین در پاتوژن های گیاهی مثل آگروباکتریوم، اروینیا و سودموناس و همچنین در همزیست هایی چون ریبوزوم به اثبات رسیده است.(1)

2 - پلاسمیدها

پلاسمیدها قطعات ژنومی خارج کروموزومی هستند که در بین کلیه انواع باکتری ها اعم از گرم منفی و گرم مثبت وجود دارند و به دلیل فراوانی آن ها در داخل گروههای ناسازگاری مختلفی تقسیم بندی می شوند. پدیده ناسازگاری پلاسمیدی با تنظیم تعداد کپی پلاسمید و جداسازی آن ها مرتبط است. یک گروه ناسازگاری به صورت مجموعه ای از پلاسمیدهایی که اعضای آن ها از حضور همزمان در یک سلول باکتریایی ناتوان هستند توصیف می شود. دلیل ناسازگاری آن ها اینست که آنها نمی توانند در برخی مراحلی که برای حفظ و نگهداری پلاسمید ضروری است از همدیگر متمایز شوند. همانند سازی و جداسازی DNA مراحلی هستند که در آنها ممکن است این ناتوانی در تمایز رخ دهد. مدل کنترل منفی برای ناسازگاری پلاسمیدی از این عقیده پیروی می کند که کنترل تعداد کپی توسط سنتز مهارکننده ای حاصل می شود که غلظت نقاط شروع را اندازه می گیرد. ایجاد یک نقطه شروع جدید در شکل یک پلاسمید ثانویه از گروه سازگاری نتیجه همانند سازی پلاسمید موجود قبلی را تقلید می کند، یعنی حالا دو نقطه شروع وجود دارند، بنابراین تا زمانی که دو پلاسمید بین سلول های مختلف تفکیک شده اند از همانند سازی بیشتر ممانعت می شود تا اینکه تعداد کپی قبل از همانند سازی به طور صحیح ایجاد شود.

اثر مشابهی به هنگامی که سیستم جداسازی کننده بتواند محصولات را به دلیل تمایز ندادن بین دو پلاسمید مابین سلول های دختری تفکیک نماید، ایجاد می شود. برای مثال، اگر دو پلاسمید جایگاههای تفکیک با عملکرد سیس (cis-acting partition sites) یکسانی داشته باشند، سازگاری ما بین آنها تضمین می نماید که آنها بین سلول های مختلفی تفکیک شوند و بنابراین نمی توانند دریک خط سلولی بقا داشته باشند و به همین دلیل پلاسمیدها ژنهای خودخواه نامیده می شوند.بر این اساس پلاسمید ها به داخل گروههای ناسازگاری زیر تفکیک می شوند:

IncW , IncN, IncQ-2, IncQ-1,IncP, IncI,IncF-2,IncF-1.(13)

بحث و نتیجه گیری:

کونژگاسیون باکتریایی

کونژگاسیون باکتریایی اولین بار در سال 1946 توسط لدربرگ و تاتوم کشف شد که نامبردگان نوترکیبی ژنتیکی را ما بین مشتقات آکسوتروفیک اشرشیالکی K12 مشاهده کردند. کونژگاسیون باکتریایی مسوول گزارش صفات ژنتیکی مابین طیف وسیعی از گونه های باکتریایی بوده و مکانیسم اساسی و اولیه برای انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی مابین پاتوژیهای انسانی است(5)

کونژگاسیون باکتریایی یکی از مکانیسم هایی است که از طریق آن انتقال ژن افقی یا جانبی بین سلول های باکتریایی دهنده و پذیرنده رخ می دهد و به طور قابل توجهی ما بین طیف وسیعی از پلاسمیدها در هر دو گروه باکتری های گرم منفی و گرم مثبت حفاظت شده است(2و3و4)

تظاهر باکتریهای چند مقاومتی نسبت به آنتی بیوتیکها انتقال ژن افقی را مورد توجه بسیاری از دانشمندان در سراسر جهان قرار داده است، چون انتشار ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی توسط پلاسمیدهای کونژوگاتیو مشکلات جدی بهداشتی را بوجود آورده است .(3)

تقریباً کلیه فعالیت های مورد نیاز برای وساطت کونژوگاسیون توسط پلاسمیدهای کونژگاتیوی مثل پلاسمید F کد می شوند.(5)

پلاسمیدهای کونژگاتیو معمولاً حاوی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی(پلاسمید های فاکتور R) و چندین کپی از عناصر داخل شونده(IS) هستند که به نوترکیبی همولوگ با کروموزوم اجازه می دهند. همچنین برخی پلاسمید ها قادرند که از باکتریهای گرم منفی به باکتریهای گرم مثبت منتقل شوند و یا حتی با سرعت انتقال خیلی پایین به درون سلول های مخمری و پستانداران نیز منتقل گردند. (5)

برخی از پلاسمیدها نیز دارای ژن هایی برای تحمل زنوبیوتیک ها و همچنین ژن هایی هستند که به باکتری ها توانایی مصرف متابولیت های جدید را می دهند(13)

در مورد انگل های ژنتیکی، کونژگاسیون باکتریایی مکانیسم تحول یافته ای است که به پلاسمید ها توانایی انتشار به برون میزبان های جدید را می دهد(13)

از جمله پلاسمیدهایی که توالی ژنومی، ساختار و مکانیسم های انتقالی آن ها به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است می توان به پلاسمیدهای F و R1متعلق به گروه ناسازگاری IncF-I ، پلاسمیدهای R1162 و RSF1010متعلق به IncQ، پلاسمید RP4 متعلق بهIncP ، پلاسمید ColIb متعلق به IncI ، PKM101 متعلق به IncN و پلاسمید R388 متعلق به IncW اشاره کرد.(5و4و6)

با وجود تنوع پلاسمیدهای کونژوگاتیو شناسایی شده و وجود برخی اختلافات در توالی نوکلئوتیدی آنها، گستره میزبانی و سازگاری آن ها با هم، چندین ویژگی عمومی فرایند انتقال مابین این پلاسمید ها در طول دوران تحولی حیات حفاظت شده اند و این سیستم های کونژوگاسیون تشابه عملکردی با سیستم پلاسمیدی F دارند.(5و7)

فرایند انتقال کونژوگاتیوDNA (Conjugative DNA Transfer :CDT) شامل پنج مرحله متوالی است که عبارتند از :

1 - تنظیم فرایند کونژوگاسیون که شامل تنظیم تعداد کپی های پلاسمید نیز می شود.

2 - ممانعت سطحی و ممانعت از ورود مجدد (surface & entry exclusion).

3 - مونتاژ و تخریب پیلی جنسی (F-pilus assembly& retraction).

4 - پایدار سازی جفت تشکیل شده در طی فرایند جفت گیری.

5 - انتقال DNA ی پلاسمیدی تک رشته ای و همانند سازی آن به روش همانند سازی حلقه چرخان.(8)

فرایند انتقال DNA کونژوگاتیو(Conjugative DNA Transfer :CDT) با تشکیل جفت پایدار در حال جفت گیری(stable mating pair formation) آغاز می شود ، این فرایند تماس سلول به سلول نزدیکی را ایجاد می کند که برای انتقال فیزیکی DNA ی تک رشته ای (single stranded DNA:ssDNA) از سلول باکتریایی دهنده به پذیرنده مورد نیاز است این فرایند توسط تولید یک برش اختصاصی جایگاه و رشته در محلی بر روی پلاسمید کونژوگاتیو موسوم به nic site ادامه می یابد که این محل برش(nic

site) در داخل ناحیه ای موسوم به نقطه شروع انتقال(Origin of Transferیا OriT) قرار دارد، و پس از آن باز شدن مولکول DNA مارپیچی مضاعف (duplex DNA: dsDNA) یک ssDNA انتقالی موسوم به T-DNA به وجود می آوردکه به داخل سلول پذیرنده وارد می گردد. در داخل سلول پذیرنده آنزیمهای میزبان از طریق همانندسازی به روش حلقه چرخان ، ssDNA انتقال یافته را به صورت dsDNA تبدیل می کنند که می تواند به صورت یک پلاسمید مستقل حلقوی درآید و یا اینکه به داخل کروموزوم سلول پذیرنده نو ترکیب شود.(8)

ساختار و توالی نوکلئوتیدی نقطه شروع انتقال

F oriT از نظر ساختمان ژنومی به شدت پیچیده بوده و به طول 500bp می باشد که شامل چندین جایگاه متصل شونده به پروتئین (sbmA-sbmC,sbyA,ihfB,ihfA,sbi) وعناصر ساختاری (خمیدگیهای درونی (intrinsic bends)، تکرارهای مستقیم(direct repeats:DRs)، A-tracts وتکرارهای معکوس (indirect repeats:IRs)) می باشد.(7)

جایگاه برش (nic site) بر روی رشته DNA معنی دار(sense DNA) قرار گرفته و تمامی جایگاههای متصل شونده به پروتئین و اکثریت عناصر ساختمانی در سمت '5 نسبت به جایگاه برش قرار دارند. جایگاههای ihfA و sbyA در نزدیکترین موقعیت نسبت به جایگاه برش قرار دارند واین سه جایگاه متصل شونده به پروتئین (sbyA, ihfA, sbi) همراه با پروتئینهای متصل شونده به آنها در واکنش برش دخالت دارند.(7)

سه جایگاه متصل شونده به TraM (sbmA ,sbmB ,sbmC) و جایگاه با تمایل پایین برای اتصال به پروتئین IHF موسوم به ihfB ، پشت سر sbyA قرار دارند. جایگاه sbmC که با کمترین تمایل به TraM متصل می شود و به طور جزئی با جایگاه sbyA همپوشانی می کند، برای فرایند برش ضروری نیست ولی برای انتقال مورد نیاز است. جایگاههای sbmA و sbmB نیز در تنظیم بیان TraM دخالت دارند. جایگاه ihfB که مابین sbmC وsbmB قرار دارد در فرایند برش و شکافت دخالتی ندارد.(7)

جایگاه متصل شونده به IHF با تمایل پایین ،ihfA، شامل توالی '5-WWWCAANNNNTTR-3' (که W=A/T وR=A/G) و یک ناحیه غنی از A/T در ناحیه '5 خود است. معمولترین توالی متصل شونده به IHF در داخل ihfA توالی '3-AAATAGAGTGTTA-'5 (توالیهایbp 182-194) است. جایگاه sbyA حاوی سه زیر جایگاه است که هر یک از آنها به یک منومر TraY متصل می شوند. دو تا از این زیرجایگاهها به صورت یک توالی تکراری معکوس ناقص آرایش می یابند که حاوی زیرجایگاههای با تمایل اتصالی بالای GA(T/G)A هستند که به صورت متعاون به TraY متصل می گردند. سومین زیر جایگاه که به نظر می رسد به صورت یک تکرار مستقیم با جایگاه مجاور آن مرتب می گردد، در غلظتهای بالاتر به TraY متصل می شود و یا اینکه به طور متعاون به مولکولهای TraY متصل به IR اتصال می یابد.(7)

ساختار و عملکرد ریلاکسوزوم

کمپلکسی از چندین پروتئین ، که اغلب ریلاکسوزوم(relaxosome) نامیده می شوند، در محل شروع انتقال(oriT) قبل از انتقال DNA پلاسمیدی تشکیل می شود. ریلاکسوزوم حداقل دو فعالیت انجام می دهد. یکی از این فعالیتها تسهیل فعالیت ریلاکساز (Relaxase) است، پروتئینی که یکی از رشته های DNA پلاسمیدی را به منظور آماده سازی آن برای انتقال به سلول باکتریایی پذیرنده می برد. دومین فعالیت آن مشارکت در یک مکانیسم احساسی است که نقش این مکانیسم احساسی تعیین تشکیل جفتی پایدار مابین سلولهای دهنده و پذیرنده در طی پروسه جفت گیری به منظور فراهم نمودن امکان انتقال T-DNA است. ریلاکسوزوم یک کمپلکس نوکلئوپروتئینی شامل پروتئینهای کد شده پلاسمیدی TraY و TraI و همچنین میزبانی یکپارچه سازی(Integration Host)

Factor:IHF کد شده توسط ژنوم میزبان است. TraY و IHF پروتئینهای کمکی متصل شونده به DNA دو رشته ای هستند که مولکول DNA را در محل اتصال خم می کنند و احتمالا کنفورماسیون DNA تک رشته ای ایجاد می کنند که برای اتصال TraI مناسب است. TraI ، یک نوکلئاز یا ریلاکسازssDNA است که یک رشته ای از DNA پلاسمیدی را می برد و سپس در اتصال به این رشته بریده شده به سلول پذیرنده منتقل می گردد. درون سلول پذیرنده رشته مکمل رشته منتقل شده سنتز شده و پلاسمید حلقوی تشکیل می گردد.(7)دو پروتئین TraY و IHF بارگیری TraI را که حاوی جایگاه کاتالیتیکی برای واکنش برشی ترانس استریفیکاسیونی است هدایت می کنند.(7)

پروتئین TraM

این پروتئین یکی از پروتئین های کد شده توسط فاکتورF است که با سایر پروتوینهای کد شده توسط فاکتورF و DNA پلاسمیدی میانکنش می نماید، و فعالیت اتصال به DNA آن با فعالیتin vivo آن رابطه دارد. TraM به سه جایگاه در oriT متصل می گردد. دو جایگاه اتصالی با تمایل بالای sbmA و sbmB که با دو پروموتر ژن traM همپوشانی می کند و به صورت منفی بیان پروتئین TraM را خود تنظیمی می کند. اتصال TraM به سومین جایگاه اتصال موجود بر روی oriT موسوم به sbmC که جایگاه اتصالی با تمایل پایین است، ممکن است برای نقش ضروری آن در اتصال به DNA کونژوگاتیو مورد نیاز باشد. TraM علاوه بر اتصال به DNA با یک پروتئین غشای داخلی باکتریایی کد شده توسط پلاسمید به نام TraD نیز مرتبط می شود. گمان می رود که TraD در انتقال پلاسمید تک رشته ای از طریق منفذ انتقال به سلول پذیرنده دخالت دارد. توانایی TraM در اتصال به oriT DNA و یک پروتئین غشای داخلی پیشنهاد می کند که ممکن است این پروتئین برای لنگراندازی پلاسمید در نزدیکی محل انتقال DNA فعالیت نماید.لنگراندازی توسط TraM در پاسخ به سیگنال جفتگیری انجام می شود که به توانایی TraM برای میانکنش با oriT یا TraD که توسط سیگنال جفتگیری تنظیم می شود، دلالت دارد. TraM با کنفورماسیون تترامری به سه جایگاه اتصالی برروی oriT DNA به صورت متعاون متصل می شود. بنابراین تغییرات کمی در غلظت سلولی TraM تترامری در پاسخ به سیگنال جفتگیری می تواند میزان اشغال شدن جایگاه اتصالی با تمایل پایین، sbmC ، را تغییر دهد. غلظت TraM در سلول در سطح رونویسی تنظیم شده و افزایش می یابد، به دلیل اینکه بیان آن به صورت منفی خودتنظیمی می شود.(2)

سیگنال جفتگیری می تواند تعادل اولیگومریزاسیون TraM را تنظیم نماید. در این مدل، خودتنظیمی منفی TraM ، غلظت درون سلولی پروتئین را در سطحی تنظیم می کند که فقط جایگاههای اتصالی با تمایل بالای sbmA وsbmB توسط تترامرهای TraM اشغال می شوند. پس از اینکه جفتی پایدار در حین پروسه جفتگیری تشکیل شد، سیگنال جفتگیری تعادل اولیگومریزاسیون را تغییر می دهد و غلظت تترامر TraM افزایش می یابد. این تغییر تعادل منجر به اشغال شدن جایگاه اتصالی sbmC می گردد که به موجب آن اجازه شروع انتقال DNA را می دهد. این مدل همچنین با ویژگیهای فیزیکی TraM نیز سازگار است.(2)

TraM یک پروتئین سیتوپلاسمی پیام رسان است که علاوه بر انتقال پیام تشکیل جفت پایدار در خلال فرایند جفتگیری به DNA پلاسمیدی سبب لنگراندازی ناحیه oriT DNA پلاسمید به غشای سیتوپلاسمی باکتری و در واقع یکپارچه سازی ریلاکسوزوم با دستگاه انتقالی موجود در غشا و دیواره سلولی باکتری موسوم به ترانسفرازوم می گردد.(8و10)

درکل می توان نقش مهم و حیاتی پروتئین TraM را در فرایند CDT به صورت زیر خلاصه نمود:

1-تنظیم منفی رونویسی خود

2-اتصال دایمری به جایگاههای با تمایل بالا و تترامریزه شدن و همچنین اتصال به جایگاه با تمایل پایین در مجاورت محل برش به هنگام تشکیل جفت پایدار در فرایند جفتگیری

3-اتصال به ناحیه C-انتهایی TraI وتحریک واکنش ریلاکساسیون توسط آن

4-اتصال به پروتئین TraD وکمک به کوپل کردن ریلاکسوزوم با ترانسفرازوم(T4SS) مونتاژ شده در غشای سلول دهنده که تا غشای سلول پذیرنده نیز ادامه می یابد.(8)

پروتئین TraD

پروتئین TraD به خانواده پروتئینهای مشابه با TraG (در پلاسمید RP4) یا VirD4 (در پلاسمید Ti آگروباکتریوم) تعلق دارد. این پروتئین درون غشای داخلی باکتریایی مستقر بوده و یک پروتئین غشا گذر محسوب می شود و همچنین دارای یک جایگاه متصل شونده به نوکلئوتید تری فسفات است . TraD پروتئین کوپل کننده ای است که از طریق میانکنش با TraM با سایر پروتئین های ریلاکسوزوم پلاسمید F ، از جمله TraI ، میانکنش نموده و به لنگراندازی oriT DNA در محل منفذ انتقال کمک می نماید.(11)

TraD سبب کوپل شدن ریلاکسوزوم به سیستم ترشحی نوع چهار (T4SS) می شود که برای صدور ssDNA از سلول دهنده به سلول پذیرنده مورد نیاز است.(8)

پروتئین TraI

پروتئین TraI یک پروتئین دوکاره است که با هر دو نقش هلیکازی و ترانس استرازی خود برای ایجاد یک بریدگی تک رشته ای اختصاصی جایگاه و اختصاصی رشته در محل oriT فعالیت می نماید، که این بریدگی برای شروع انتقال کونژوگاتیو DNA (CDT) مورد نیاز است. ترانس استریفیکاسیون کاتالیز شده توسط TraI در nic site در oriT پلاسمید F به طور قابل توجهی توسط افزایش پروتئینهای IHF و TraY روی مولکولهای DNA سوپرکویل شده تحریک می شود و به افزایش هر دو مولکول پروتئینی IHF وTraY بر روی مولکولهای خطی DNA وابسته است.(8)

پروتئینهای TraY و IHF در معماری و تشکیل ساختمان سه بعدی ریلاکسوزوم فعالیت می کنند. از آنجایی که پروتئین TraI یک پروتئین دوکاره است دو منطقه کاتالیتیک یکسان دارد. فعالیت ترانس استرازی که بریدگی اختصاصی وجایگاه و اختصاصی رشته ای را کاتالیز می کند درون منطقه ای در انتهای N- انتهایی پروتئین قرار دارد که حدود 300 آمینو اسید طول دارد. منطقه هلیکازی نیز در بخش مرکزی پروتئین قرار گرفته وعمل هر دو ناحیه پروتئین برای انتقال DNA ضروری است. سومین منطقه ضروری برای انجام CDT در بخش C- انتهایی پروتئین TraI قرار دارد. به نظر می رسد که این بخش از پروتئین برای مشاهده تحریک فعالیت برشی توسط TraM مورد نیاز است. TraM از طریق منطقه C- انتهایی TraI با آن میانکنش می کند و این میانکنش برای تحریک فعالیت برشی پروتئین TraI بر روی nic site ضروری است.(8)

فعالیت تحریکی TraM بر روی واکنش ترانس استریفیکاسیون کاتالیز شده توسط TraI نیازمند حضور هردو پروتئین TraY و IHF است. IHF و TraY در کنار همدیگر ساختمان فضایی یا معماری DNA احاطه کننده محل برش(nic site) فعالیت می کنند. این فرایند تغییر دهنده معماری DNA که سبب خمیده شدن ناحیه oriT DNA در محل برش می گرددبه اتصال ریلاکساز TraI اجازه می دهد و احتمالا پروتیئن TraM هیچگونه نقشی در این اتصال ندارد. وقتی که ساختارDNA مناسبی تشکیل و ریلاکساز به آن

متصل گردید، افزایش پروتئین TraM به آن تشکیل DNA ریلاکس شده را از طریق واکنش ترانس استریفیکاسیون به طور اختصاصی تحریک می کند.(8)

تغییرات ایجاد شده در توپولوژی DNA در ناحیه sbi که توسط خمیدگی ایجاد شده از طریق اتصال TraY و IHF به وجود می آید، مکانیسمی است که برای اتصال و به کارگیری TraI به sbi ضروری است. با این حال تغییرات کنفورماسیونی F oriT DNA در خلال فرایند شروع انتقال، اغلب پروتئین TraY را در نزدیکترین فاصله نسبت به sbi قرار می دهد که احتمال میانکنشهای مستقیم TraY-TraI را برای تقویت اتصال TraI پر رنگ می سازد. TraY به جایگاه sbyA و IHF به جایگاه ihfA بر روی oriT DNA متصل می شوند.(7)

پروتئین TraI پس از ایجاد بریدگی در محل برش (CCTG↕CCCG) به انتهای '5 باقی مانده '2 –داکسی سیتیدیل نوکلئوتید '5 انتهایی رشته بریده شده متصل می شود و این اتصال از طریق باقی مانده تیروزین جایگاه فعال آنزیم رخ می دهد.(3)

TraI متصل به تک رشته بریده شده از طریق یک کمپلکس پروتئینی بزرگی که از هر دوغشای باکتری دهنده می گذرد و تا غشای داخلی سلول باکتریایی پذیرنده نیز امتداد می یابد و به سیستم ترشحی نوع چهار موسوم است به درون سلول پذیرنده وارد می شود. این انتقال از طریق کانالی پروتئینی به نامپیلی جنسی رخ می دهد و همراه با مصرف انرژی حاصل از هیدرولیز ATP است. پس از اینکه T-DNA-TraI Complex به داخل سلول پذیرنده منتقل گردید در آنجا به روش هکانندسازی حلقه گردان همانندسازی می شود.(11)

مراجع

1-Jacques Mahillon & Michael Chandler. 1998. Insertion Sequences. Microbiology and Molecular biology Reviews. Vol.2, No.3, p.725-774.

2-Danal Miller & Joel F.Schildbach. 2003. Evidence for a Monomeric Intermediate in the Reversible Unfolding of F Factor TraM. The Journal of biological chemistry. Vol.278, No.12,Issue of March 21, p.10400-10407.

3-Athanasia Varsaki, Gabriel Moncalián, Maria del piral, Garcillán Barcia, Constantin Drainas, & Fernando dela Cruz. 2009. Analysis of ColE1 MbeC unveils an Extended Ribbon-Helix-Helix Fammily of Nicking Accessory proteins. Journal of bacteriology. Vol.191, No.5, March, p.1446-1455.

4-Christopher Parker, Eric Becker, Xiadin Zhang, Sarah Jandle, Richard Meyu. 2005. Elements in the Co-evolution of relaxasesand their origins of transfer. Plasmid.53.p.113-18.

5-Vitallya Sayulenko, Evgeniy Sagulenko, Simon Jakubowski, Elena Spudich,& Peter J.christie.2001.VirB7 lipoprotein Is Exocellular and associates with the Aggrobacterium tumefaciens T Pilus. Journal of Bacteriology. June,p.3642-3651.

6-Michael T.Howard, William C.Nelson, & Steven W.Matson.1995.Stepwise Assembly of a Relaxosome at the F Plasmid origin of Transfer. The Journal of Biological Chemistry.Vol.270,No.47,Issue of November 24,p.28381-28386.

7-Sarah L.Williams & Joel F.schildbach.2007.TraY and Integration Host Factor oriT Binding Sites and F Conjugal Transfer, Sequence Variations,but Not Altered Spacing,Are Tolerated. Journal bacteriology, May.Vol.189,No.10,p.3813-3823.

8-Heather Ragonese, Debi Haisch, Ernesto Villareal, June Hyukchoi & Steuen W.Matson.2007. The F Plasmid-encoded TraM Protein Stimulates relaxosome-mediated Cleavage at oriT through on interaction with TraI. Molecular Microbiology.vol.63,No.4,p.1173-1184.

9-Claire M.Hamilton,Hyewon lee, Pei-lili, David M.Cook, Kevin R.Piper,Sussane Beck, von Bodman, Erich Lanka, Walf Ream & Stephen K.Farrand.2000. TraG fram RP4 and TraG & VirD4 from Ti Plasmids Confer Relaxosome Specificity to the Conjugal Transfer System of pTiC58. Journal of Bcteriology. Vol.182,No.6,p.1541-1548.

10-Tatsuhico Abo & Elichi Ohtsubo.1993. Repression of the tram gene of Plasmid R100 by Its Own Product and Integration Host Factor at one of the Two Promoters. Journal of Bacteriology. Vol.175,No.14,p.4466-4474.

11-J.Ignacio Sastre, Elene Cabenzón, & Fernando dela Cruz.1998. The Carboxyl Terminus of Protein TraD Adds Specificity and Efficiency to F-Plasmid-Conjugative Transfer. Vol.180,No.22,p.6039-6042.

12-Werner Panegrau, Günter Ziegelin, and Erich Lanka.1990. Covalent Association of the traI gene product of Plasmid RP4 with the 5'-Terminal Nucleotide at the Relaxation Nick Site. The Journal of biological chemistry. Vol.265,No.18,Issue of june 25,p.10637-10644.

13-Benjamin Lewin.2005. Genes7.Oxford University Press.