

چاپرون‌ها، مولکول‌های حیاتی در میکروبوها

کیمیا گلستان‌فر*^۱

۱. دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

نویسنده مسئول: Golestanfark@gmail.com

چکیده

چاپرون‌های مولکولی پروتئین‌های بسیار حفاظت شده‌ای هستند که تاخوردگی مناسب سایر پروتئین‌ها را در داخل بدن ترویج می‌کنند. سیستم‌های چاپرون متنوع به فولد کردن و انتقالات پروتئین، جمع‌آوری کمپلکس‌های الیگومری، و بازیابی از باز شدن ناشی از استرس کمک می‌کنند. یک عملکرد اساسی چاپرون‌های مولکولی مهار فعل و انفعالات پروتئین غیرمولد با شناسایی و محافظت از سطوح آبریز است که در هنگام تا شدن یا به دنبال استرس پروتئوتوکسیک در معرض قرار می‌گیرند. بنابراین چاپرون‌ها در سیستم‌های سلولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند که در این مقاله مروری در مورد این مولکول‌ها و مکانیسم‌های عمل آن‌ها، بحث شده است. همچنین در مورد تغییرات بیان ژن در شرایط اکسیداتیو در باکتری در راستای تحمل شرایط محیطی بحث خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: چاپرون، اکسیداتیو، فولدینگ، استرس دمایی

مسیر رسیدن به حالت اصلی عبور کنند و در نتیجه حداواسط‌های فولدینگ در این مسیر به وجود می‌آید (شکل ۱). واسطه‌های فولد ناصحیح خارج از مسیر اصلی فولدینگ منجر به آهسته شدن فرایند می‌شوند. از طرفی در این مسیر برهمکنش‌های غیر طبیعی می‌توانند منجر به حالت‌های فولدینگ نادرست و پایدار شود (۱). علاوه بر این، واسطه‌های فولدینگ سطوح آبریز را در معرض محیط قرار می‌دهند که می‌توانند در تعاملات غیر عملکردی بین مولکولی موثر بوده و منجر به تجمع پروتئین‌های فولد نشده گردد (شکل ۱). مطالعات بیوفیزیکی فولدینگ پروتئین معمولاً بر روی پروتئین‌های مدل کوچک (اغلب کمتر از ۱۰۰ اسید آمینه) تمرکز می‌کنند که به صورت نو ترکیب بیان می‌شوند و فولدینگ برگشت پذیر قوی را در شرایط آزمایشگاهی نشان می‌دهند (۲).

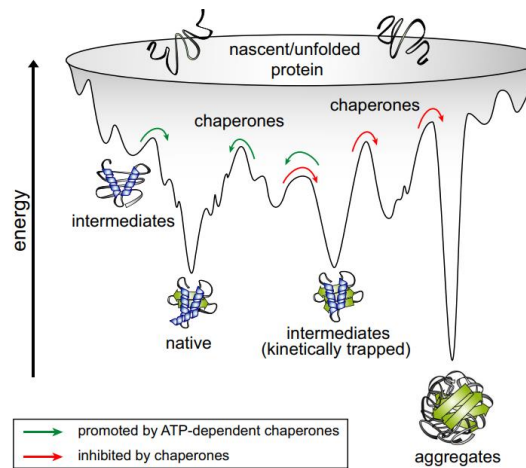
مقدمه

باکتری‌ها و موجودات مختلف در شرایط حاد محیطی مختلفی قرار می‌گیرند. موجودات برای مقابله با این شرایط محیطی مکانیسم‌های مختلفی دارند تا به زنده ماندن آن‌ها کمک کند. در این مقاله ابتدا به چاپرون‌ها که از پروتئین‌های ضروری برای مقابله با شرایط حاد محیطی در موجودات مختلف هستند اشاره خواهد شد. در قسمت دوم تغییرات بیان ژن در شرایط اکسیداتیو در باکتری بررسی خواهد شد.

چاپرون‌ها

فولدینگ پروتئین‌ها

چندین عامل منجر به پیچیده شدن فرآیند فولدینگ پروتئین‌ها می‌شوند. مسیر انرژی آزاد فولدینگ ناهموار است: زنجیره‌های پروتئینی باید از موانع انرژی قابل توجهی در



شکل ۱- فرایند فولدینگ طبیعی پروتئین‌ها (۳).

کند. لاسکی نوکلئوپلاسمین را یک همراه مولکولی می‌نامد، زیرا عملکرد یک همراه انسان را تقلید می‌کند که تعامل صحیح بین افراد را تضمین می‌کند. ایس و جورجوپولوس پروتئینی را مورد مطالعه قرار دادند که در نهایت به عنوان چپرونین^۶ (Cpn60) شناخته شد و مسئول شروع سیل عظیمی از مقالات در مورد چپرون‌های مولکولی در دو دهه گذشته بود. در حال حاضر، ایس یک چپرون مولکولی را اینگونه تعریف می‌کند: «یکی از گروه بزرگ و متنوعی از پروتئین‌ها که دارای خاصیت کمک به مونتاژ/جداسازی غیرکووالانسی سایر ساختارهای ماکرومولکولی هستند، اما در صورت وجود، اجزای دائمی این ساختارها نیستند. عملکردهای بیولوژیکی طبیعی خود را انجام می‌دهند. تغییر و اصلاح بیشتر اصطلاحات قدیمی در مورد چپرون‌ها ضروری است، زیرا چپرون‌های مولکولی به طور دائمی در سلول تولید می‌شوند و غلظت‌های درون سلولی آن‌ها لزوماً در پاسخ به استرس افزایش نمی‌یابد. این پروتئین‌ها به عنوان چپرون‌های مولکولی تعریف می‌شوند اما Hsps یا پروتئین‌های استرس نیستند. چپرون‌های مولکولی، که غلظت آنها در پاسخ به استرس افزایش می‌یابد، هم چپرون هستند و هم پروتئین‌های استرس / پروتئین‌های شوک حرارتی (۶).

انواع چپرون‌های مولکولی

اولین چپرون مولکولی فولدینگ- پروتئینی که کشف شد Cpn60 بود. از زمان شناسایی این پروتئین به عنوان یک چپرون مولکولی در سال ۱۹۸۸، پروتئین‌های بسیار بیشتری با عملکرد مولکولی واقعی یا فرضی کشف شده‌اند و این اصطلاح در حال حاضر برای ۲۵ خانواده از پروتئین‌ها به کار

مشکل فولدینگ پروتئین‌ها در شرایط آزمایشگاهی پیچیده تر می‌شود. غلظت بالای ماکرومولکول‌ها در سلول، تمایل پروتئین‌های غیربومی به تجمع را افزایش می‌دهد، در حالی که استرس پروتئوتوکسیک حالت طبیعی را بی‌ثبات می‌کند. علاوه بر این، تاخوردگی پروتئین در هنگام ترجمه اتفاق می‌افتد، که در نتیجه آن پلی‌پپتیدهای تازه سنتز شده در یک حالت ناقص از نظر فولد صحیح در معرض محیط سلولی قرار می‌گیرند که فاقد اطلاعات ساختاری مورد نیاز برای فولدینگ طبیعی پروتئین است. چپرون‌های مولکولی در پاسخ به این چالش‌ها تکامل یافته‌اند (۴).

چپرون‌ها

از سال ۱۹۶۲، زمانی که فروچیو ریتوسا الگوهای پف کردن جدیدی را در کروموزوم‌های پلی‌تن مگس سرکه در دمای بالا انکوبه شده بود، کشف کرد، که استرس در سطح سلولی با تولید محصولات ژنی خاص پاسخ داده می‌شود. این محصولات پروتئین‌های شوک حرارتی (Hsps) یا پروتئین‌های استرس سلولی نامیده شدند و در ابتدا به عنوان مولکول‌هایی شناسایی شدند که در پاسخ به حضور پروتئین‌هایی که ساختار فضایی خود را از دست داده‌اند، در سلول تولید می‌شوند (۵). با این حال، تا زمانی که کار پیشگامانه گروه‌های لاسکی، ایس و جورجوپولوس^۱ رابطه بین تولید درشت مولکول‌هایی که به درستی مونتاژ شده‌اند و پروتئین‌هایی که برای اطمینان از مونتاژ صحیح عمل می‌کنند، برقرار نشد. محققان پروتئین هسته‌ای نوکلئوپلاسمین را مورد مطالعه قرار دادند که مونتاژ صحیح هیستون‌ها و DNA را در نوکلئوزوم‌ها تضمین می‌کند.

می‌رود (جدول ۱). در همه موجودات زنده، چاپرون‌های مولکولی به عنوان پروتئین‌های ضروری طبقه‌بندی می‌شوند و توالی‌های بین پروتئین‌های مورد استفاده توسط پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها (مانند اعضای خانواده تیوردوکسین [Trx]،

سیکلو‌فیلین‌ها، چپرونین‌ها، Hsp70 و Hsp90) حفظ می‌شود (۷).

جدول ۱- انواع چاپرون‌ها و عملکرد آن‌ها

خانواده پروتئینی	پروکاریوت‌ها	یوکاریوت‌ها	عملکرد
Chaperonins	GroEL, GroES	Hsp60, TriC, CCT	تا شدن پروتئین‌ها در ساختار قفس (cage)
Thioredoxin	Trx, DsbA to DsbE, glutaredoxin	Trx, glutaredoxin, protein disulfide isomerase	تبادل پروتئین تیول-دی سولفید
Small Hsps	IbpA, IbpB	Hsp25/27, a-crystallins	جذب زنجیره‌های باز شده برای جلوگیری از تجمع استرس
Peptidyl-prolyl isomerases	Cyclophilins, FKBP, parvulins	Cyclophilins, FKBP, parvulins	ایزومریزاسیون پیوند پپتیدی قبل از پرولین
GrpE	GrpE	GrpE	عامل تبادل ADP/ATP در تعامل با DnaK/DnaJ
Hsp40/DnaJ	DnaJ, CbpA, Rcs	Hsp40, Hdj2, Mtj1	کوچاپرون‌های Hsp70 که فعالیت Hsp70 را تنظیم می‌کنند
Hsp70	DnaK, Hsc66, BiP, mitochondrial Hsp70, etc	Many (e.g., Hsp70, Hsc70)	جلوگیری از تجمع زنجیره‌های پروتئینی باز شده
Hsp90	HtpG	Hsp90, Gp96	تنظیم مونتاژ پروتئین‌های انتقال سیگنال
Hsp100	ClpA, ClpB, ClpC, ClpX, ClpY	Hsp100	جداسازی الیگومرها و اگرگیته‌ها
Prefoldin nascent chain associated complex	Prefoldin	Nascent chain-associated complex	اتصال به زنجیره‌های تازه سنتز شده پروتئین‌ها هنگام بیرون آمدن از ریبوزوم‌ها

می‌توانند در خارج از سلول وجود داشته باشند و در اعمال غیر فولدینگ شرکت کنند (۸).

مکانیسم عمل چاپرون‌ها

در ادامه برخی از مکانیسم‌های مهم چاپرون‌ها در فولدینگ پروتئین‌ها توضیح داده شده است.

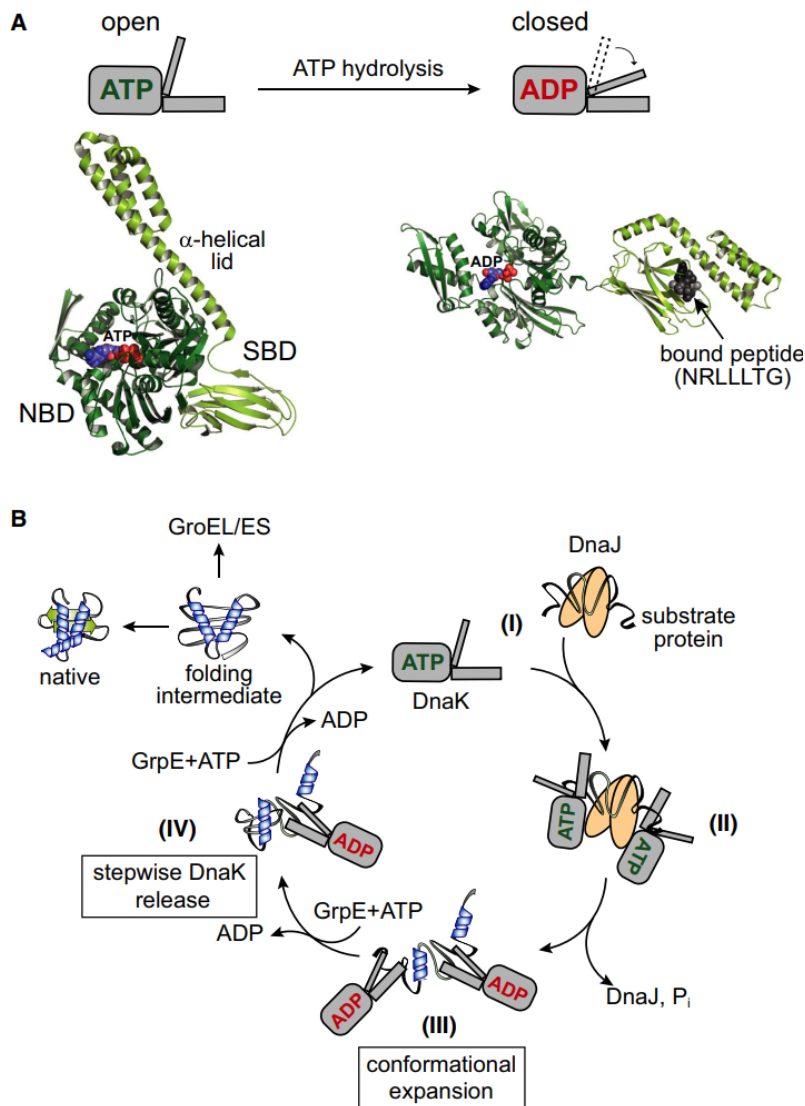
تاخوردگی پروتئین‌ها به کمک سیستم چاپرون Hsp70

چاپرون‌های کلاس Hsp70 (DnaK در باکتری‌ها) ماشین‌های مولکولی آلوستریکی هستند که در طیف وسیعی از فرآیندهای سلولی از جمله تاخوردگی مجدد پروتئین، ری فولدینگ، جابه جایی، جداسازی و تخریب شرکت می‌کنند. این فعالیت‌های متنوع از به دلیل تمایل مولکول Hsp70 برای عناصر توالی کوتاه (۵-۷ اسید آمینه) در اسید آمینه‌های آبگریز (اغلب توسط اسیدهای آمینه با بار مثبت در کنار آن‌ها) می‌باشد (۹). اتصال برگشت پذیر پپتیدهای آبگریز به C ترمینال دومین اتصال سوبسترا (SBD) به Hsp70 توسط

سلول‌های یوکاریوتی دارای بخش‌های متعددی هستند (سیتوزول، شبکه آندوپلاسمی، میتوکندری، هسته)، و در این محفظه‌ها تاخوردگی پروتئین ناشی از استرس به عنوان پاسخ پروتئین باز شده شناخته می‌شود. پاسخ‌های پروتئینی باز شده عنصر مهمی در زیست‌شناسی یک پارچه سلول هستند، با مسیره‌های سیگنال‌دهی کلیدی درون سلولی مرتبط هستند و اکنون با بیماری‌های انسانی مرتبط هستند. ضمناً در تعریف چپرون‌های مولکولی این بود که آن‌ها پروتئین‌های درون سلولی هستند که در تاخوردگی پروتئین‌ها در داخل محفظه‌های سلولی نقش دارند، که به دلیل غلظت بالای پروتئین (در حد ۲۰۰ تا ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر)، پروتئین-پروتئین نامناسب را ترجیح می‌دهند. فعل و انفعالات، که منجر به دناتوره شدن پروتئین قابل توجهی می‌شود. با این حال، مشخص شده است که بسیاری از چاپرون‌های مولکولی

شود، در نتیجه یک کمپلکس پایدار بین پروتئین سوبسترا و Hsp70 در ترکیب بسته و متصل به ADP ایجاد می‌کند (شکل ۲). اتصال بعدی به NEF تبادل ADP/ATP را کاتالیز می‌کند و آزادسازی بستر را تسهیل می‌کند، با پیشروی میانی تاشو حاصل یا مستقیماً به حالت اصلی یا انتقال به سایر سیستم‌های چاپرون، مانند چاپرونین یا Hsp90 (شکل B۲، حالت III) (۱۰).

اتصال ATP و هیدرولیز در دومین اتصال به نوکلئوتید (NBD) تنظیم می‌شود (شکل A۲). چرخه ساختاری مبتنی بر ATP Hsp70 توسط پروتئین‌های دامنه J کلاس Hsp40 (در باکتری DnaJ) و عوامل تبادل نوکلئوتیدی (NEFs؛ در باکتری GrpE) هماهنگ می‌شود. سوبستراها را به حالت باز و متصل به ATP Hsp70 تحویل می‌دهد (شکل B۲، حالت II). اتصال Hsp40 و پروتئین سوبسترا به طور هم افزایی باعث هیدرولیز ATP متصل می‌



شکل ۲- مکانیسم مولکولی سیستم چاپرون Hsp70 (۱۱).

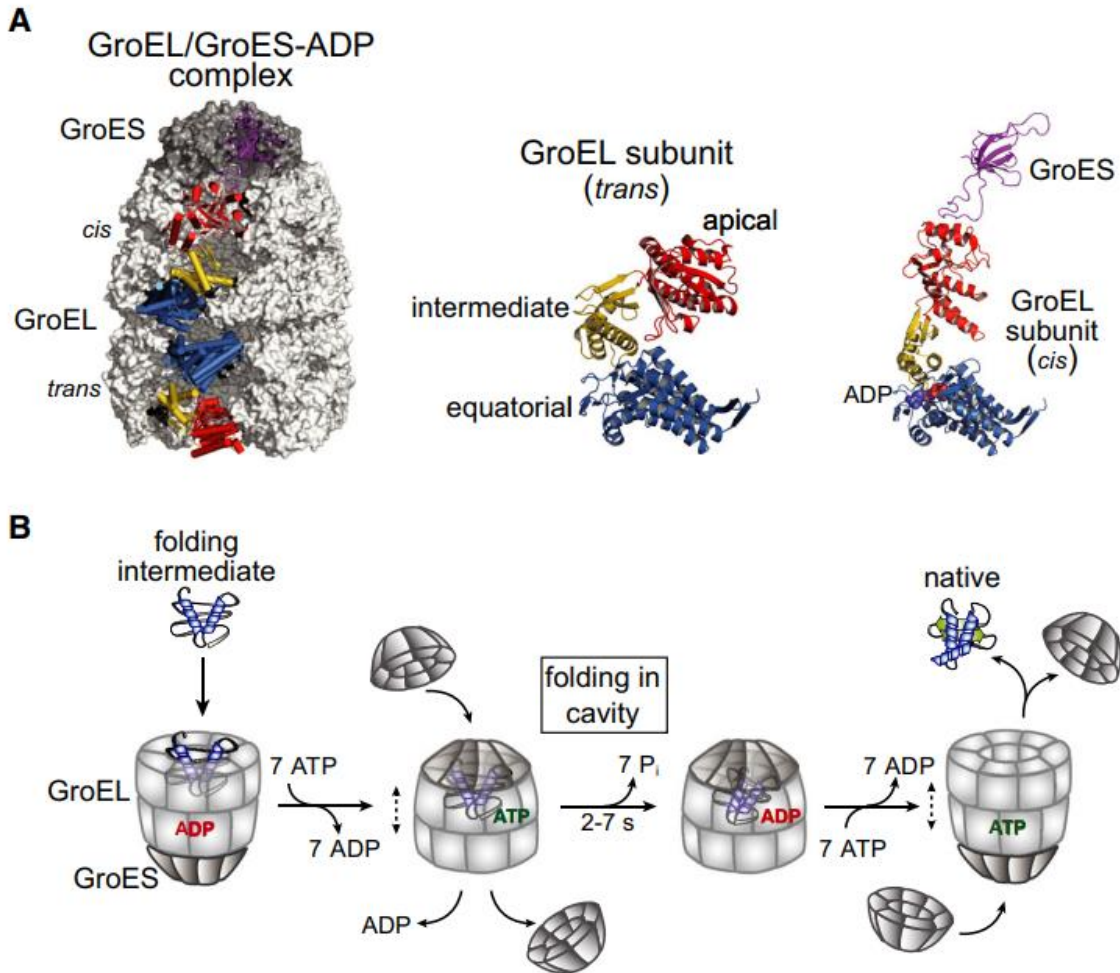
شوند. آن‌ها در فولدینگ ~ ۱۰٪ از پروتئوم سیتوزولی شرکت می‌کنند، از جمله پروتئین‌های ضروری که نمی‌توانند خود به خود به حالت اصلی خود برسند و نمی‌توانند از سایر سیستم‌های چاپرون استفاده کنند. چپرونین باکتریایی GroEL از دو حلقه از هفت زیرواحد یکسان ~ ۶۰ کیلو دالتون تشکیل

کاتالیز فولدینگ توسط چپرونین GroEL/ES

چاپرونین‌ها (هم‌چنین به عنوان Hsp60s نیز شناخته می‌شوند) کمپلکس‌های الیگومری بزرگی هستند که به عنوان نانو قفس برای مولکول‌های پروتئین منفرد عمل می‌کنند تا جدا

GroES ایجاد می‌شود، یک هپتامر از زیر واحدهای ~ 10 کیلو دالتون که به حوزه های آپیکال GroEL متصل می‌شود (شکل A3) (۱۲).

شده است. هر زیر واحد شامل یک دامنه ATPase استوایی، یک دامنه لولای میانی، و یک دامنه آپیکال است که باقی‌مانده های آگریز را برای اتصال بسترهای غیربومی در معرض نمایش می‌گذارد (شکل A3). محفظه فولدینگ با تعامل با



شکل ۳- مکانیسم مولکولی چپرونین GroEL/ES

اساساً شدت چندین اختلال عصبی و بسیاری دیگر از تا زدن اشتباه پروتئین‌ها را کاهش می‌دهند (۱۳).

نقش چاپرون‌ها در بیماری

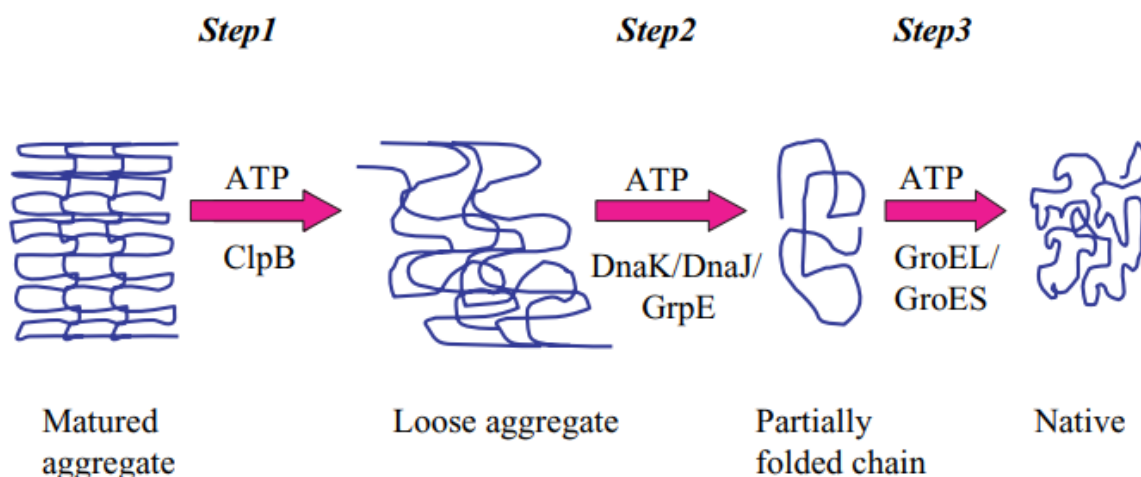
چاپرون های مولکولی عملکردهای مهمی برای کنترل آسیب در حین و پس از استرس دارند. در شرایط آزمایشگاهی، بسیاری از چاپرون‌ها مانند DnaJ, DnaK, E.coli IbpB, GroEL, HtpG و SecB و پروتئازهای مانند DegP, HslU و Ion می‌توانند پلی پپتیدهای باز شده را متصل کرده و از تجمع آنها جلوگیری کنند. آن‌ها هم‌چنین در حل شدن اگیربگیت‌ها نقش دارند. اگیربگیت‌های پایدار در هنگام عملکرد جداگانه در برابر اکثر سیستم‌های چاپرون ATPase مقاوم هستند، به عنوان مثال GroELS, Hsp90, ClpB.

بیماری های مرتبط با فولدینگ پروتئین‌ها

تعداد زیادی از بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی در انسان ناشی از تاخوردگی و تجمع اشتباه پروتئین است. اعتقاد بر این است که تا کردن اشتباه پروتئین علت اصلی بیماری آلزایمر، بیماری پارکینسون، بیماری هانتینگتون، بیماری کروتسفلد-جاکوب، فیبروز کیستیک، بیماری گوچر و بسیاری از اختلالات دژنراتیو و عصبی است. چاپرون‌های مولکولی سلولی، که همه‌جا پروتئین‌های ناشی از استرس هستند، و چاپرون‌های شیمیایی و دارویی تازه یافته‌شده، در جلوگیری از تا زدن نادرست پروتئین‌های مختلف بیماری‌زا مؤثر بوده و

چپرون Hsp104 وجود دارد و تولید بیش از حد یا غیرفعال شدن Hsp104 باعث از دست دادن [psi+] می‌شود، تکثیر می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که چپرون‌ها در پیشرفت بیماری پریون بسیار مهم هستند و سطح مشخصی از بیان چپرون می‌تواند سلول‌ها را از شر پریون‌ها خلاص کند، بدون اینکه بر قابلیت حیات آن‌ها تأثیر بگذارد. کنترل سطح بیان Hsp104 ممکن است درمانی در برابر بیماری پریون ارائه دهد. علاوه بر این، Hsp104، همراه با Hsp70، مسئول حل شدن دانه‌های پریون مانند در ساکارومیسیس سرویزیه است. بسیاری از پاسخ‌های مثبت دیگر در مورد جداسازی همراه با واسطه سلولی در داخل بدن گزارش شده‌اند. یک آزمایش کلاسیک توسط Goloubinoff و همکاران انجام شد، که پدیده‌های فعال‌سازی مجدد در شرایط آزمایشگاهی و تجزیه توده‌های پایدار مالات دهیدروژناز توسط ClpB همراه با DnaJ، DnaK و GrpE (KJE) را اثبات کردند و مکانیسم کل فرآیند تجزیه را بیشتر توضیح دادند. (شکل ۴).

و غلظت‌های پایین DnaK . Skowyra و همکاران مشاهده کردند که سیستم چپرون DnaK ممکن است برخی از اشکال تجمع پروتئین را دوباره فعال کند. مشاهده شده است که Hsp100، که شامل ClpA، Ipb، HslU و ClpX در شریشیا کلی است، دارای فعالیت جداسازی است. مشخص شده که ClpA و ClpX برخی از ساختارهای پروتئینی طبیعی را بی‌ثبات می‌کنند (۱۴). شریمر و همکاران نشان داده‌اند که Hsp70 و Hsp100 در ترکیب برای فعال کردن مجدد بسیاری از توده‌های پروتئینی عمل می‌کنند. آنها همچنین نشان دادند که Hsp104 با Hsp70 و Hsp40 در یک تجزیه آهسته و ناکارآمد همکاری می‌کند، که به طور کلی محدود به دانه‌های کوچک لوسیفرافز و α -گالاکتوزیداز است. یافته‌های آن‌ها با شواهدی تأیید شده است که نشان می‌دهد هر دو همراه در کسب سلولی تحمل حرارتی با یکدیگر همکاری می‌کنند. گزارش شده است که فاکتور غیر مندلی مخمری [psi+]، که مشابه پریون‌های پستانداران است، زمانی که مقادیر متوسطی از پروتئین



شکل ۴- فرآیند ضدتجمع پروتئین در شریشیا کلی توسط چپرون

تخریب می‌شود، در حالی که در دمای پایین‌تر بخشی از آن ساختار طبیعی را تشکیل می‌دهد. این به کشف برخی از ترکیبات شیمیایی کمک کرد که پروتئین‌ها را در برابر دناتوره شدن حرارتی تثبیت می‌کنند و ممکن است به اصلاح عیوب تا خوردگی پروتئین‌ها کمک کنند. این ترکیبات در مجموع چاپرون‌های شیمیایی نامیده می‌شوند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که چاپرون‌های شیمیایی در جلوگیری از تشکیل ساختار نادرست چین خورده و متعاقب آن تشکیل آمیلوئید موثر هستند. آن‌ها ترکیباتی با جرم مولکولی کم هستند که

نقش چاپرون‌های شیمیایی و دارویی در حفظ ساختاری پروتئینی

چاپرون‌های شیمیایی راهبرد دیگر برای جلوگیری از تا خوردگی نادرست یا اصلاح ساختار کشنده پروتئین جهش یافته، تأثیرگذاری بر محیط فولدینگ پروتئین در داخل سلول است. به منظور آزمایش این ایده، پروتئین $\Delta F508$ CFTR برای توانایی فولدینگ آن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و > 30 درجه سانتی‌گراد آزمایش شد. مشاهده شد که در دمای بالاتر، بخشی از پروتئین تازه سنتز شده به اشتباه تا خورده و

است. در اینجا، دو فاکتور σ جایگزین ($\sigma 32$ و σE) در تنظیم شوک حرارتی نقش دارند، با $\sigma 32$ نقش عمده‌ای در سنجش محرک‌های سیتوپلاسمی و غشای داخلی دارد، در حالی که σE متعهد به پاسخ استرس برون سیتوپلاسمی است (۱۸). در سایر گونه‌های باکتریایی، همزیستی مکانیسم‌های کنترل مثبت و منفی، همراه با تنظیم بیان مجموعه‌های متمایز -های شوک حرارتی، مشاهده شده است. به عنوان مثال، در پاتوژن گرم مثبت *لیستریا مونوسیٹوژنز*، سه گروه از ژن‌های شوک حرارتی وجود دارد که هر کدام با استراتژی متفاوتی کنترل می‌شوند. به طور مفصل، ژن‌های متعلق به کلاس I (اعضای رمزکننده سیستم‌های چپرون اصلی *DnaK* و *GroE*) و کلاس III (شاپرون‌های کدکننده و پروتئازهای *Clp* وابسته به ATP) به ترتیب توسط *HrcA* و توسط مهارکننده شوک حرارتی *CtsR* تنظیم منفی می‌شوند. در مقابل، ژن‌های متعلق به کلاس II (کدکننده پروتئین‌های استرس عمومی) به طور مثبت توسط فاکتور سیگما جایگزین σB کنترل می‌شوند. جالب است که در سیانوباکتری‌ها، هر دو استراتژی مثبت و منفی تنظیم رونویسی برای کنترل بیان برخی از ژن‌های شوک حرارتی ترکیب می‌شوند. به عنوان مثال، در *Synechocystis PCC6803*، اپرون *groESL* به طور منفی توسط سیستم *HrcA/CIRCE* تنظیم می‌شود و به طور مثبت توسط فاکتورهای سیگما جایگزین *SigE* و *SigB* تنظیم می‌شود. علاوه بر این، هیستیدین کیناز *Hik34* در تنظیم منفی ژن چاپرونین نقش دارد. علاوه بر مکانیسم‌های رونویسی، تنظیم ژن‌های شوک حرارتی مبتنی بر RNA در سیانوباکتری‌ها نیز گزارش شده است. بیان ژن *hsp17* که برای پروتئین شوک حرارتی کوچکی که *HspA* نیز نامیده می‌شود، کد می‌کند، از نظر رونویسی به فاکتورهای سیگمای جایگزین *SigE* و *SigB* وابسته است و پس از رونویسی توسط ساختار RNA حساس به دما در بخش ۵'-UTR از ژن کنترل می‌شود (۱۹).

برای تثبیت ساختار پروتئین در برابر دنا توره شدن حرارتی و شیمیایی شناخته شده اند. نشان داده شده است که چاپرون-های شیمیایی اگریگیت و تاخوردگی نا صحیح درون سلولی چندین پروتئین مختلف مانند CFTR، α -آنتی تریپسین، آکوپورین-۲، گیرنده وازوپرسین-۲، α -گالاکتوزیداز-A، p53 و P-گلیکوپروتئین را معکوس می‌کنند (۱۵، ۱۶).

تنظیم بیان ژن‌های شوک حرارتی

مکانیسم‌های تنظیم کننده ژن‌های شوک حرارتی

در باکتری‌ها، تنظیم ژن‌های شوک حرارتی می‌تواند مثبت یا منفی باشد. تنظیم مثبت از عوامل سیگما جایگزین استفاده می‌کند تا به طور خاص ماشین رونویسی را به زیر مجموعه ای از پروموتورهای انتخاب شده هدایت کند، در حالی که تنظیم منفی توسط سرکوبگرهای رونویسی تنظیم می‌شود. جالب توجه است، در حالی که چندین باکتری مکانیسم‌های منحصراً مثبت یا منفی را اتخاذ می‌کنند، در برخی میکروارگانیسم‌ها این استراتژی‌های متضاد با هم وجود دارند و یک شبکه تنظیمی پیچیده از ژن‌های شوک حرارتی ایجاد می‌کنند (۱۷).

فاکتورهای تنظیم کننده رونویسی شوک حرارتی

تنظیم رونویسی ژن‌های شوک حرارتی درجات مختلفی از پیچیدگی را در میان میکروارگانیسم‌های مختلف نشان می‌دهد که منعکس کننده تنوع شدید مکانیسم‌های تنظیم کننده ژنتیکی در باکتری‌ها است. در چندین باکتری، تنظیم رونویسی شوک حرارتی منحصراً توسط یک عامل σ اختصاصی مدیریت می‌شود که آنزیم RNA پلیمراز را قادر می‌سازد تا ژن‌های خاصی را که برای پاسخ به استرس دما مهم هستند رونویسی کند (جدول ۲). در چنین موارد ساده‌ای، تمام ژن‌های پاسخ‌دهنده به حرارت تحت کنترل یک تنظیم کننده هستند. برای مثال، در سودوموناس آئروژینوزا و در ویبریوکلا، تنظیم رونویسی ژن‌های شوک حرارتی توسط یک فاکتور سیگما جایگزین خاص برای تنش گرمایی کنترل می‌شود که از نظر توالی و عملکرد مشابه $\sigma 32$ /شریشیا کلی

جدول ۲- فاکتورها و ژنهای تحت تاثیر (۱۷).

ژنهای تنظیم شده	فاکتور تنظیم رونویسی	باکتری
<i>groESL, dnaK-dnaJ, grpE, clpP</i> and others	RpoH	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>groESL</i>	HrcA	
Class I: <i>groESL, dnaK-dnaJ, grpE</i> , and others	HrcA	<i>Bacillus subtilis</i>
Class II: genes coding for general stress proteins	σ^B	
Class III: <i>clpP, clpE, ctsR-mcsA-mcsB-clpC</i> and others	CtsR	
	Unknown	
Class IV: <i>htpG</i>	CssS/CssR	
Class V: <i>htrA, htrB</i> and others	Unknown	
Class VI: <i>ftsH, clpX</i> and others		
<i>groESL, dnaK-dnaJ, grpE, ibpA</i> and others	σ^{32} (σ^H , RpoH)	<i>Escherichia coli</i>
<i>degP, clpX, lon</i> and others	σ^E (σ^{24})	
<i>cbpA-hspR-helicase, groESL, hrcA-grpE-dnaK</i>	HspR	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>groESL, hrcA-grpE-dnaK</i>	HrcA	
Class I: <i>groESL, dnaK</i> , and others	HrcA	<i>Listeria monocytogenes</i>
Class II: genes coding for general stress proteins	σ^B	
Class III: <i>clpP, clpB, hslU</i> and others	CtsR	
<i>dnaK, lon, clpB</i>	HrcA	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>groESL, dnaK, clpP, hsp18</i> and others	HrcA	<i>Oenococcus oeni</i>
<i>groESL, dnaK</i> , and others	σ^H (RpoH)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>hrcA-dnaK, groESL</i>	HrcA	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>clpP, clpC, clpB, hrcA-dnaK, groESL</i>	CtsR	
genes coding for general stress proteins	σ^B	
<i>groESL, dnaK-dnaJ, grpE</i>	HrcA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>groESL, clpP, clpC, clpE</i>	CtsR	
<i>clpP, groESL, dnaK</i>	HrcA	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>clpP, groESL</i> , other <i>clp</i> genes	CtsR	
<i>groESL1, groEL2, dnaJ2</i>	HrcA	<i>Streptomyces albus</i>
<i>dnaK, clpB</i>	HspR	
<i>hsp18</i>	RheA	
<i>groESL, groEL-2, dnaK2</i> and others	HrcA	<i>Synechocystis PCC6803</i>
<i>groESL, groEL-2, dnaK2, hspA, htpG</i> and others	SigB	
<i>groESL, groEL-2, dnaK2, hspA, htpG</i> and others	SigE	
<i>groESL, dnaK2, htpG</i>	HiK34	
<i>groESL, dnaK-dnaJ, lon, clpB</i> , and others	σ^{32} (RpoH)	<i>Vibrio cholerae</i>

کنند که تغییرات دمای محیط را تشخیص داده و پاسخهای سلولی مربوطه را آغاز می‌کنند. مکانیسم‌های حسگر گرما می‌توانند مستقیم باشند، که توسط آن دما به طور مستقیم بر فعالیت مولکول زیستی حسگر تأثیر می‌گذارد، یا می‌تواند غیرمستقیم باشد، که به وسیله آن پیامدهای افزایش ناگهانی دما (به عنوان مثال، تجمع پروتئین‌های تا شده اشتباه در سیتوپلاسم) شناسایی می‌شود. اگرچه دما یک سیگنال فراگیر است که چندین مسیر سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، این فصل عمدتاً بر مکانیسم‌های حسی متمرکز است که بیان ژن شوک حرارتی را تحریک می‌کند و تنها چند نمونه از

مکانیسم‌های سنجش گرما در باکتری‌ها در پاسخ به محیط

توانایی باکتری‌ها برای واکنش سریع به افزایش ناگهانی دما به مکانیسم‌های حسگر حرارت بستگی دارد که نشانه‌های محیطی را برای فعال کردن مسیرهای پاسخ مناسب ادغام می‌کنند. تا به امروز، مکانیسم‌های مختلفی از تنظیم حرارت در باکتری‌ها توصیف شده است و تقریباً تمام کلاس‌های بیومولکول‌ها از جمله لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک (یعنی هم DNA و هم RNA) را شامل می‌شود. همه این کلاس‌ها می‌توانند به عنوان حسگرهای حرارتی عمل

دماسنج‌های RNA به نام ROSE برای سرکوب بیان ژن‌های شوک حرارتی است. عناصر ROSE به طور معمول در تنظیم پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک نقش دارند و طول آنها از ۶۰ تا حدود ۱۲۰ نوکلئوتید متغیر است. عناصر ROSE به عنوان یک عنصر DNA حفاظت شده قبل از چندین ژن شوک حرارتی در ریزوبیاهای مختلف مورد توجه قرار گرفتند. در ابتدا، حدس زده شد که آن‌ها در سطح DNA عمل می‌کنند و مکانیسم تنظیمی آنها به اتصال یک پروتئین سرکوبگر وابسته است. با توجه به اینکه امکان پیش‌بینی ساختار ثانویه مشابه برای همه ۱۵ عنصر ROSE شناخته شده وجود داشت، یک مکانیسم پس از رونویسی پیشنهاد شد و با تجزیه و تحلیل جهش دقیق یک همجوشی ترجمه‌ای ROSE-hspA-lacZ تأیید شد. مشخصات مولکولی و ساختاری گسترده بعدی برخی از ویژگی‌های کلیدی این نوع دماسنج‌های RNA را نشان داد. جالب توجه است، نشان داده شد که دماسنج‌های RNA مبتنی بر ROSE شامل دو تا چهار حلقه ساقه هستند و می‌توانند به تدریج به تغییرات دما پاسخ دهند و سطوح مختلف تنظیم بیان را با توجه به شدت تنش گرمایی ارائه دهند (۲۲).

سنجش دما از طریق DNA

در برخی موارد، تغییرات دما را می‌توان مستقیماً توسط DNA سلول باکتری تشخیص داد. چندین مسیر متابولیک فیزیولوژیکی یک میکروارگانیسم تحت تأثیر شرایط خارجی تجربه شده است. به نوبه خود، وضعیت متابولیک سلول از جمله نسبت ADP به ATP تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در نتیجه، آنزیم‌هایی که به ATP به عنوان کوفاکتور نیاز دارند، مانند DNA gyrase، تحت تأثیر قرار خواهند گرفت. این آنزیم که فعالیت آن کاملاً با وضعیت توپولوژیکی DNA مرتبط است، به ATP وابسته است و توسط ADP مهار می‌شود (بنابراین تغییر در نسبت ATP:ADP بر فعالیت DNA گیراز تأثیر می‌گذارد). به همین دلیل، شرایط نوسان خارجی که بر فرآیندهای متابولیک، از جمله شوک اسمزی و حرارتی تأثیر می‌گذارند، می‌توانند در نهایت بر سطح جهانی ابرپیچ‌زنی DNA تأثیر بگذارند. با توجه به اینکه ابرپیچ DNA می‌تواند بر رونویسی ژن تأثیر بگذارد، DNA را می‌توان به عنوان یک حسگر حرارتی تغییر دمای محیط در نظر گرفت که از طریق تغییرات وضعیت توپولوژیکی جهانی کروموزوم در پاسخ به محرک‌های خارجی عمل می‌کند. یکی از پارامترهای اولیه توپولوژی DNA که به تغییرات دما پاسخ می‌دهد، ابرپیچ پلاسمیدی است. به طور خاص، هم در

حسگرهای حرارتی که در تنظیم عوامل بیماری‌زا است توضیح داده می‌شوند (۲۰).

سنجش دما از طریق RNA

سریع‌ترین روش تغییر بیان ژن در پاسخ به تغییرات دما بر اساس یک عنصر تنظیم‌کننده سیس است که بخشی از mRNA است که پروتئین شوک حرارتی را کد می‌کند. این مکانیسم تنظیم حرارت، پاسخ بسیار سریعی را پس از درک سیگنال تضمین می‌کند، زیرا دما بر کارایی ترجمه هر دو مخزن درون سلولی مولکول‌های mRNA و هم‌چنین رونویسی در حال انجام تأثیر می‌گذارد. اصل کلی مبتنی بر تشکیل ساختارهای ثانویه زیپ مانند و حساس به دما است که mRNA های تحت این نوع تنظیم را مشخص می‌کند (شکل A۵). به طور خاص، در دمای فیزیولوژیکی، ناحیه ۵' این دسته از mRNA ساختاری را تشکیل می‌دهد که مانع از عناصر توالی حیاتی برای شروع ترجمه می‌شود، مانند محل اتصال به ریبوزوم (همچنین به عنوان دنباله شاین-دالگارنو شناخته می‌شود) و شروع ترجمه. کدون هنگامی که چنین عناصر توالی در یک ساختار ثانویه دخالت دارند، تشخیص و اتصال رونوشت توسط ریبوزوم با مشکل مواجه می‌شود و در نتیجه بر ترجمه mRNA منفی می‌گذارد. با افزایش دما، ساختار ثانویه از طریق یک بازآرایی یا ذوب جزئی می‌رود. در نتیجه، ریبوزوم‌ها می‌توانند به راحتی به ناحیه 5' mRNA دسترسی پیدا کنند و ترجمه افزایش می‌یابد. چندین توالی RNA حساس به دما که به عنوان دماسنج RNA نیز شناخته می‌شوند، در دو دهه اخیر کشف و با جزئیات مشخص شده‌اند (۲۱).

اولین دماسنج RNA در اشریشیا کلی کشف شد و بیان فاکتور سیگما جایگزین شوک حرارتی σ^{32} را تنظیم می‌کند. این یکی از پیچیده‌ترین دماسنج‌های RNA را نشان می‌دهد که تاکنون شناخته شده‌اند، با ساختار ثانویه گسترده‌ای که فقط به ناحیه 5' RpoH mRNA محدود نمی‌شود. به طور خاص، اگرچه در ساختار ثانویه مشخص شده، توالی Shine-Dalgarno تا حدی در معرض دید قرار می‌گیرد، ترجمه mRNA ژن *rpoH* در دمای پایین توسط جفت شدن درون مولکولی بین ناحیه ترجمه نشده ۵' و بخشی از توالی کد کننده بلافاصله در پایین دست کدون شروع AUG مانع می‌شود. با این حال، دماسنج‌های RNA بسیار ساده‌تری وجود دارند که نمونه‌ای از آن با کنترل بیان ژن تنظیم‌کننده سیس، عضو موسس فراوان‌ترین دسته

تجربی آزمایشگاهی نشان داده شد. به طرز جالبی، با افزایش دما، این ناحیه DNA تحت یک انتقال ساختاری ناگهانی (در حدود ۳۲ درجه سانتیگراد) قرار می گیرد که بر دسترسی H-NS به سایت های DNA هدف تأثیر می گذارد و پروموتور *virF* را سرکوب می کند. یک فعل و انفعال مشابه بین خم شدن DNA وابسته به دما و اتصال H-NS برای تعدیل بیان ژن همولیزین در ارگانیزم مدل /شریشیا کلی و افزایش بیان یک سیستم ترشح نوع III در بالای ۳۰ درجه سانتیگراد در *S. enterica* نشان داده شد (۲۵).

به طور خلاصه، حتی اگر چندین مثال از تنظیم بیان ژن وابسته به دما به نقش DNA به عنوان یک مولکول زیستی حسگر اشاره می کند، به نظر می رسد که این مکانیسم سنجش گرما به جای گرما، برای تنظیم بیان ژن های حدت- پاسخ شوک بسیار مناسب تر است.

پروتئین های حسگر

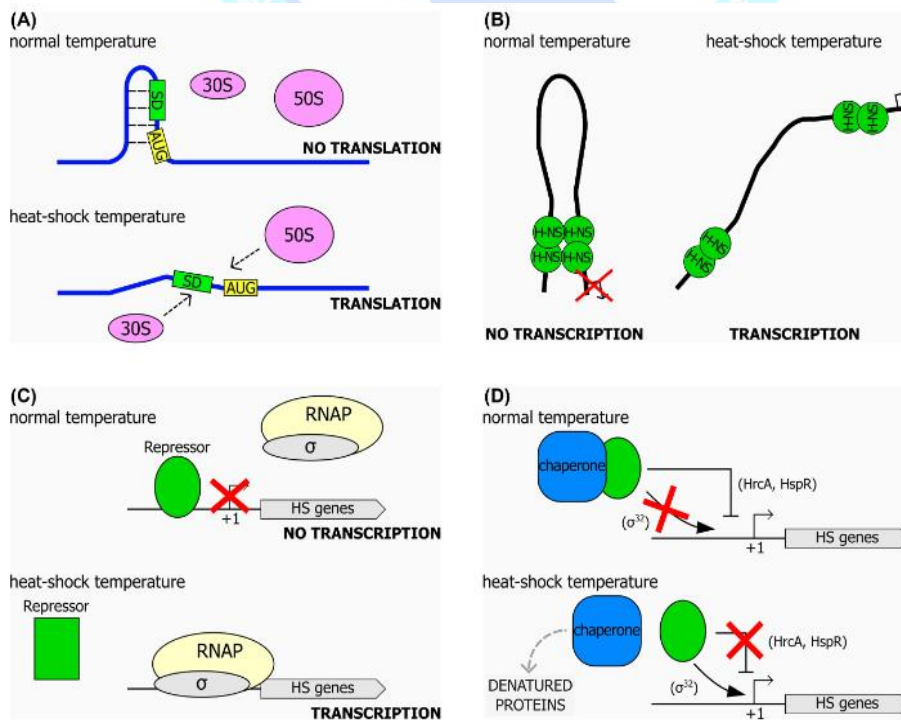
باکتری ها همچنین می توانند با استفاده از پروتئین ها به عنوان حسگرهای حرارتی، نوسانات دما را در جایگاه های اکولوژیکی خود حس کرده و به آن پاسخ دهند. طبقات مختلف پروتئین-ها، از جمله کینازها، سرکوبگرهای رونویسی شوک حرارتی و چاپرون ها، به عنوان حسگرهای تغییرات دما مشخص شده اند. با این حال، دو دسته اخیر پروتئین ها در درجه اول برای انتقال سیگنال های استرس گرمایی استفاده می شوند که پاسخ شوک حرارتی رونویسی را تحریک می کنند. سرکوبگرهای رونویسی حسگر حرارت ذاتی قادر به تعدیل مستقیم رونویسی ژن های هدف در پاسخ به نوسانات دما هستند. به طور خاص، آن ها فقط در دمای فیزیولوژیکی برای اتصال پروموتور و سرکوب رونویسی ژن صلاحیت دارند. پس از شوک حرارتی، این سرکوبگرهای حرارتی تحت یک تغییر ساختاری قرار می گیرند که میل اتصال نسبی را برای اپراتورهایشان کاهش می دهد. در نتیجه، رونویسی ژن هدف کاهش می یابد (شکل C۵). با توجه به نکته قبلی، *CtsR*، سرکوبگر جهانی ژن های شوک حرارتی *باسیلوس سوبتیلیس* و سایر باکتری های گرم مثبت با *GC* پایین، یکی از بهترین نمونه های مشخص شده است (۲۶). سنجش های اتصال به DNA آزمایشگاهی که در دماهای مختلف انجام شد نشان داد که فعالیت اتصال *CtsR* به پروموتور *clpC* در شرایط شوک حرارتی (۵۰ درجه سانتیگراد)، در مقایسه با دمای طبیعی رشد در ۳۷ درجه سانتیگراد، به شدت کاهش می یابد. جالب توجه است، از دست دادن وابسته به دما فعالیت اتصال به DNA *CtsR* برگشت پذیر نشان داده شد. در واقع، زمانی

باکتری های مزوفیل و هم در باکتری های هیپرترموفیل نشان داده شد که تغییرات ناگهانی دما منجر به تغییرات گذرا در توپولوژی DNA پلاسمید می شود و این اثر، به نوبه خود، تأثیر قابل توجهی بر کارایی رونویسی دارد (۲۳).

با این حال، در برخی موارد دیگر، ساختارهای DNA محلی، حس دما را واسطه می کنند و رونویسی ژن های همسایه را تحت تأثیر قرار می دهند. برخی از توالی های DNA شناسایی شده در *E. coli* و در چندین باکتری دیگر با ترکیب توپولوژیکی خاص توالی مشخص می شوند که می تواند ترکیب های مختلفی را در پاسخ به تغییرات دما در نظر بگیرد. هنگامی که این نواحی DNA نزدیک به پروموتورها هستند، تغییرات ساختاری محلی ناشی از شوک حرارتی به مدولاسیون از کارایی اتصال RNA پلیمرز تبدیل می شود و در نتیجه رونویسی ژن های پایین دست را تحت تأثیر قرار می دهد. یک مثال با ناحیه بالادست ژن *plc* نشان داده شده است که فسفولیپاز *C (PLC)* را در کلسترییدیوم پرفریژنز کد می کند. در این مورد، سه بخش *A-tracts* که قبل از ژن کد کننده PLC هستند، یک ترکیب خمیده قوی به این توالی DNA می دهند. با استفاده از روش های رونویسی آزمایشگاهی، نشان داده شد که اثر تحریکی بر فعالیت پروموتور توالی *A-tract* وابسته به دما است، احتمالاً به دلیل تغییر در زاویه خمش بر نوسانات دما. علاوه بر فعال سازی مستقیم رونویسی با واسطه DNA خم شده از طریق تسهیل اتصال RNA پلیمرز، انحناهای DNA محلی وابسته به دما می توانند به طور غیرمستقیم کارایی رونویسی را با تأثیر بر تعامل پروتئین ها با نقش تنظیمی بر بیان ژن تنظیم کنند. از این نظر، پروتئین های مرتبط با نوکلئید مانند *HU*، *Fis*، *IHF* و *H-NS* نشان داده شده است که در این نوع فرآیند نقش دارند. یکی از بهترین نمونه های مطالعه شده مربوط به تنظیم وابسته به دما رونویسی *virF* در *شیگلا فلکسنری*، یک باکتری بیماری زا است که می تواند به اپیتلیوم روده انسان حمله کند (شکل B۵). تنظیم کننده *VirF* شبه *AraC*، پروتئینی که باعث فعال شدن چندین ژن با عملکردهای تهاجمی می شود، باید تنها پس از انتقال از محیط بیرون به میزبان بیان شود. نشان داده شده است که رونویسی پروموتور *virF* در دماهای غیرمجاز (زیر ۳۲ درجه سانتیگراد) توسط پروتئین H-NS مرتبط با نوکلئید سرکوب می شود (۲۴). علاوه بر این، نشان داده شد که پروموتور *virF* دارای دو محل اتصال H-NS است که توسط یک منطقه خمیده ذاتی جدا شده اند، که وجود آن در سیلیکو پیش بینی شده بود و با نتایج

B. باسیلوس سوبتیلیس و کمپلکس‌های *thermoglucosidasius HrcA-CIRCE* بسیار با دماهای رشد متفاوت دو میکروارگانیسم سازگار است، به این پیشنهاد منجر شد که رپرسور *HrcA* ممکن است نقشی به‌عنوان حسگر حرارتی داشته باشد. نقش مستقیمی به‌عنوان حسگر حرارتی اخیراً برای سرکوبگر *HrcA* هلیکوباکتر پیلوری نشان داده شده است. به‌طور خاص، نتایج سنجش ردیابی *DNaseI* در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که اتصال *DNA* با واسطه *HrcA* به شدت وابسته به دما است. هنگامی که هلیکوباکتر پیلوری *HrcA* در معرض دمای بالاتر از ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت، به‌طور چشمگیری میل اتصال به اپراتورهای *CIRCE* را کاهش داد و اساساً غیرفعال شد. به‌طور جالب توجهی، از دست دادن فعالیت اتصال پس از درمان شوک حرارتی به‌نظر می‌رسد در شرایط آزمایشگاهی غیرقابل برگشت باشد، که احتمالاً به‌عنوان یک نتیجه از تغییرات ساختاری عمده در دمای بیش از ۴۰ درجه سانتیگراد است. با این حال، وضعیت در داخل بدن متفاوت است، جایی که *HrcA* قادر است عملکرد سرکوب کننده خود را پس از چالش دما بازیابی کند (۲۷).

که *CtsR* ابتدا در دمای غیرمجاز و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، تنظیم کننده فعالیت اتصال به *DNA* را به دست آورد. در مورد *CtsR*، تغییر ساختاری وابسته به دما که مسئول از دست دادن فعالیت اتصال به *DNA* است، به یک ناحیه حلقه غنی از گلیسین کوتاه در *DBD* محدود می‌شود، که مکان عملکردی دقیقی را برای سنجش گرما تشکیل می‌دهد. نشان داده شد که سرکوبگر شوک حرارتی *Streptomyces albus RheA*، قادر به تشخیص تغییرات دما در غیاب سایر عوامل است و رفتاری مشابه با *CtsR* دارد. پس از چالش گرما، *RheA* فعالیت اتصال به *DNA* را از دست می‌دهد و انتقال از شکل فعال به غیرفعال به یک تغییر ساختاری برگشت پذیر ناشی از دما مربوط می‌شود (۲۷). یک الگوی مشابه از ظرفیت اتصال به *DNA* وابسته به دما نیز به‌وضوح برای تنظیم کننده *RovA* مرتبط با حدت یرسینیا پستیس و برای تنظیم کننده *TlpA* باکتری *سالمونلا انتریکا* نشان داده شد. در مثال دوم، به‌طور خاص، دما به‌طور برگشت‌پذیری بر دومین‌های مناسب اتصال به *DNA* در حالت الیگومریزه شده پروتئین تأثیر می‌گذارد و در نتیجه بر توانایی اتصال به *DNA* تأثیر می‌گذارد. یکی دیگر از مهارکننده‌های شوک حرارتی گسترده، *HrcA*، می‌تواند در برخی موارد به‌عنوان یک دماسنج پروتئینی ذاتی عمل کند. مشاهده این‌که پروفایل‌های دناتوراسیون حرارتی



شکل ۵- مکانیسم‌های حسگر دما (۱۷).

را کد می‌کند، که بیان آن‌ها ممکن است توسط OxyR سرکوب شود، زیرا بیان آنها در سویه جهش یافته ΔoxyR افزایش یافته است. علاوه بر این، القای برخی از ژن‌ها مستقل از OxyR بود که نشان‌دهنده وجود سایر حسگرها و تنظیم‌کننده‌های پراکسید در اشریشیا کلی است. به عنوان مثال، اپرون isc، که فعالیت‌های تشکیل و ترمیم خوشه Fe-S را مشخص می‌کند، توسط پراکسید هیدروژن در سویه‌های فاقد OxyR یا تنظیم‌کننده‌های پاسخ سوپراکسید SoxRS القا شد. این نتایج درک ما را از پاسخ استرس اکسیداتیو گسترش می‌دهد (۲۸).

پاسخ وابسته به OxyR

مشخصه پاسخ اشریشیا کلی به پراکسید هیدروژن، القای سریع و قوی مجموعه‌ای از ژن‌های تنظیم شده با OxyR از جمله *dps*، *katG*، *grxA* و *ahpCF* است. القای بیش از ۲۰ برابر مشاهده شده همه این ژن‌ها در سویه نوع وحشی در جدول ۳ نشان داده شده است.

تغییرات بیان ژن‌ها در شرایط استرسی در باکتری‌ها یکی از مهم‌ترین رویدادها در موجودات مختلف در مواجهه با شرایط حاد محیطی تغییرات بیان ژن‌ها برای مقابله و زنده ماندن در آن شرایط حاد می‌باشد که در ادامه به یکی از مهمترین تغییرات بیان ژن در شرایط استرس اکسیداتیو پرداخته می‌شود. مشخصات رونویسی ژنومی سلول‌های اشریشیا کلی تیمار شده با پراکسید هیدروژن با یک ریزآرایه DNA متشکل از ۴۱۶۹ فریم خواندن باز E. coli مورد بررسی قرار گرفت. با اندازه‌گیری بیان ژن در سویه‌های حذفی نوع وحشی و OxyR، تأیید شد که تنظیم‌کننده پاسخ پراکسید OxyR اکثر ژن‌های بسیار القایی با پراکسید هیدروژن را فعال می‌کند. اندازه‌گیری‌های میکروآرای DNA امکان شناسایی چندین ژن جدید فعال شده با OxyR از جمله ژن بیوسنتزی hemH هم را فراهم کرد. اپرون suf شش ژنی که ممکن است در مونتاژ یا تعمیر خوشه Fe-S و چهار ژن با عملکرد ناشناخته شرکت کند. ما هم‌چنین چندین ژن از جمله *uxuA* را شناسایی کردیم که هیدرولاز مانونات

جدول ۳-۳۰ ژن القا شده با پراکسید هیدروژن.

Gene	b no.	Induction ratio ^a	Function ^b
<i>dps</i>	b0812	180	Stress response DNA binding protein
<i>yaiA</i>	b0389	56	Function unknown
<i>katG</i>	b3942	44	Catalase hydrogen peroxidase I
<i>grxA</i>	b0849	37	Glutaredoxin I
<i>yfiA</i>	b2597	36	Function unknown
<i>ibpA</i>	b3687	29	Chaperone, heat-inducible protein of HSP20 family
<i>yjiD</i>	b4326	29	Function unknown
<i>ycfR</i>	b1112	26	Function unknown
<i>ahpF</i>	b0606	22	Alkyl hydroperoxide reductase large subunit
<i>trxC</i>	b2582	21	Thioredoxin 2
<i>sufA</i>	b1684	21	Homology with IscA
<i>ymgB</i>	b1166	20	Function unknown
<i>ahpC</i>	b0605	20	Alkyl hydroperoxide reductase small subunit
<i>ibpB</i>	b3686	18	Chaperone, heat-inducible protein of HSP20 family
<i>yaaA</i>	b0006	18	Function unknown
<i>tnaA</i>	b3708	18	Tryptophanase
<i>fpr</i>	b3924	17	Ferredoxin NADP ⁺ reductase
<i>cysK</i>	b2414	16	Cysteine synthase
<i>sufB</i>	b1683	16	Function unknown
<i>dsdX</i>	b2365	15	Homology with gluconate permease
<i>ybjM</i>	b0848	15	Function unknown
<i>yeeD</i>	b2012	14	Function unknown
<i>dsdA</i>	b2366	13	d-Serine deaminase
<i>soxS</i>	b4062	13	Regulatory protein of <i>soxRS</i> regulon
<i>sbp</i>	b3917	12	Periplasmic sulfate binding protein
<i>sufC</i>	b1682	12	Putative ABC transporter
<i>phoH</i>	b1020	12	Member of <i>pho</i> regulon
<i>hemH</i>	b0475	11	Ferrochelatase
<i>yljA</i>	b0881	11	Function unknown
<i>ycgZ</i>	b1164	11	Function unknown

hemH (i)

یک ژن، *hemH* (b0475)، که بیان آن ۱۱ برابر توسط پراکسید هیدروژن در سویه نوع وحشی القا شد، یک فروکلاتاز را کد می‌کند که ادغام یون آهن را در پروتوپورفیرین IX در نهایی کاتالیز می‌کند. مرحله در بیوسنتز پروتوهم جایگاه *hemH* نیز *visA* نامیده شد زیرا برخی از جهش‌های فروکلاتاز/شریشیا کلی به دلیل داشتن یک فنوتیپ حساس به نور شناسایی شدند. قبلاً مشخص شده بود که حساسیت به نور ناشی از افزایش سطوح پروتوپورفیرین IX است که در جهش‌های فاقد فروکلاتاز تجمع می‌یابد (۲۹).

(ii) اپرون suf

سه ژن *sufA/ydiC* (b1684)، *sufB/ynhE* (b1683) و *sufC/ynhD* (b1682) که بیان آن‌ها به شدت در سویه نوع وحشی القا شد. این ژن‌ها در یک جهت رونویسی می‌شوند و پتانسیل جفت شدن انتقالی را نشان می‌دهند. Patzer و Hantke پیشنهاد کردند که خوشه ژنی یک اپرون را تشکیل می‌دهد و به دلیل دخالت احتمالی در تجمع گوگرد، ژن‌ها را *sufA*، *sufB*، *sufC*، *sufD*، *sufE* و *sufS* نامیدند. از شش ORF، ژن *sufS* و محصول آن بهترین مشخصه‌ها هستند. این ژن یکی از سه همولوگ NifS در *شریشیا کلی* را کد می‌کند و هم‌چنین *csdB* نامیده شده است. هر سه همولوگ ژن NifS در *شریشیا کلی*، *IscS*، *CSD*، و *Sufs/CsdB* حذف گوگرد از ال-سیستئین و سلنیوم از ال-سلنوسیستئین را کاتالیز می‌کنند. با این حال، پروتئین SufS/CsdB 290 برابر بر ال-سلنوسیستئین فعال تر از ال-سیستئین است و بنابراین به عنوان همتای E. coli سلنوسیستئین لیاز پستانداران در نظر گرفته شد. محصولات ژنی پنج ژن باقیمانده *suf* کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، اما برخی مشابهت‌های جالبی را با سایر پروتئین‌های مشخص شده نشان می‌دهند. *sufA* یک همولوگ از *IscA* را کد می‌کند که همراه با محصولات ژن‌های *iscS* و *iscU* در تشکیل و ترمیم خوشه Fe-S نقش دارد. ژن‌های *sufB*، *sufC* و *sufD* اجزای یک انتقال دهنده کاست اتصال (ABC) ATP را رمزگذاری می‌کنند. هیچ داده بیوشیمیایی در رابطه با این سه ژن یافت نمی‌شود. با این حال، مطالعات ژنتیکی نشان داده‌اند که جهش‌یافته‌های E. coli *sufC* القای وابسته به *soxR* یک همجوشی ژن *soxS-lacZ* را به تاخیر انداخته‌اند، و پایداری پروتئین یون ردوکتاز [Fe-2S₂] که توسط *fhuF* کدگذاری می‌شود در *sufD* جهش یافته‌ها کاهش می‌یابد. ژن نهایی در اپرون،

sufE، یک اکسیدوردوکتاز حفاظت‌شده را کد می‌کند، که همولوگ آن در پایین دست ژن *csd* وجود دارد (۳۰). اگرچه فقط *sufA*، *sufB*، و *sufC* جزو ژن‌های بسیار القای شده هستند، *sufD* (b1681)، *sufS* (b1680) و *sufE* (b1679) نیز با نسبت‌های بالاتری در سویه نوع وحشی القا می‌شوند. برای تأیید تنظیم *OxyR* این اپرون و برای ترسیم شروع رونوشت *suf*، سنجش‌های گسترش پرایمر را انجام دادیم. مطابق با داده‌های ریزآرایه، القای *sufA* وابسته به *OxyR* را شناسایی کردیم. هنگامی که RNA جدا شده از سویه نوع وحشی به عنوان الگو استفاده شد، یک محصول گسترش پرایمر قوی که به یک باقیمانده T در موقعیت ۱۷۶۲۴۴۲، ۳۲ جفت باز در بالادست کدون شروع *sufA* در موقعیت ۱۷۶۲۴۱۰ ختم می‌شد، مشاهده شد. ردپای DNase I که با استفاده از یک قطعه ۳۷۸ جفت باز از ناحیه درون ژنی *sufA-ydiH* انجام شد، نشان داد که *OxyR* اکسید شده منحصراً به سایت پیش‌بینی شده متصل است. با این حال، این تک محل اتصال *OxyR* از انتهای محصول گسترش پرایمر در بالادست فاصله داشت، و در تمام پروموتورهای شناخته شده فعال شده با *OxyR*، فاکتور رونویسی در موقعیتی با هم‌همپوشانی یا مستقیماً در بالادست دنباله ۳۵- پروموتور متصل می‌شود. احتمالاً رونوشت اولیه *sufA* طولانی‌تر است و یا پردازش می‌شود یا به یک ساختار ثانویه پیچیده غیرقابل نفوذ نسبت به رونوشت معکوس تبدیل می‌شود. با توجه به حفاظت غیرمعمول بالای ناحیه درون ژنی *sufA-ydiH*، این احتمال وجود دارد که تنظیم بیان *sufA* پیچیده باشد. ما تنظیم قوی Fur بیان *sufA* را در شرایط مورد استفاده در آزمایش‌های خود مشاهده نشد. با این حال، دو محل اتصال Fur فرضی، در موقعیت‌های ۱۷۶۲۴۶۰ و ۱۷۶۲۴۶۶، در پروموتور *suf* پیش‌بینی شده‌اند، و بیان وابسته به Fur ترکیبات *sufD-lacZ* و *sufS-lacZ* قبلاً مشاهده شده است. برای درک کامل تنظیم اپرون *suf* به آزمایشات بیشتری نیاز است (۳۱).

(iii) ژن‌های با عملکرد ناشناخته.

چهار ORF با عملکرد ناشناخته، *yaiA*، *yaaA*، *yljA*، و *ybjM*، القای پراکسید بسیار قوی‌تری را در سویه نوع وحشی نسبت به سویه حذف *oxyR* نشان دادند. *yaaA* و *yljA* ORF‌های حفاظت شده هستند، اما داده‌های تجربی در مورد عملکرد پروتئین‌های مربوطه را نمی‌توان در مقالات یافت. سنجش گسترش پرایمر تأیید کرد که رونوشت‌هایی که مستقیماً در بالادست اولین کدون پیش‌بینی شده ORF‌های

yaiA, *yaaA* و *yljA* شروع می‌شوند، توسط پراکسید هیدروژن به روشی وابسته به *OxyR* القا می‌شوند. جستجوی محاسباتی برای مکان‌های اتصال *OxyR* یک سایت اتصال *OxyR* فرضی را در موقعیت ۹۲۲۰۲۶ در پروموتور *yljA* پیش‌بینی کرد. جالب اینجاست که ما قادر به شناسایی رونوشتی نبودیم که ۱۲۵ آمینو اسید (*aa*) *YbjM ORF* پیش‌بینی شده را رمزگذاری کند. در عوض، نورترن بلات و تجزیه و تحلیل گسترش آغازگر نشان داد که رونوشت *grxA* تنظیم شده با *OxyR* تقریباً ۶۰۰ نوکلئوتید طول دارد و به سمت رشته مقابل *ybjM* گسترش می‌یابد. بررسی توالی آنتی سنس *ybjM* نشان داد که این رشته مخالف نیز یک *ORF 81-aa* را کد می‌کند (۳۲).

(IV) ژن‌های احتمالی سرکوب شده با *OxyR*.

در مقایسه ژن‌های القا شده توسط پراکسید هیدروژن در نوع وحشی و جهش $\Delta oxyR$ ، تعدادی از ژن‌ها، *uxuA*، *ygaQ*، *ydch*، *ydkH*، *ydcH*، *yaeH* را که با شدت بیشتری در پس‌زمینه $\Delta oxyR$ القا می‌شوند، اشاره کردیم. *OxyR* هم یک فعال کننده و هم یک سرکوب کننده است. بنابراین، ممکن است *OxyR* این ژن‌ها را در پاسخ به استرس اکسیداتیو سرکوب کند. جستجوی محاسباتی ما یک محل اتصال *OxyR* را در موقعیت ۴۵۴۹۰۴۴ بین *uxuAB* (رمزکننده هیدرولاز مانوات و اکسیدوردوکتاز مانوات) و ژن *gntP* واگرا (که یک گلوکونات پرماز ممکن را کد می‌کند) پیش‌بینی کرد. از آنجایی که *uxuB* و *gntP* در غیاب *OxyR* نیز نسبت‌های القایی بالاتری را نشان دادند، جالب است که حدس بزنیم که دو پروموتور واگرا توسط *OxyR* اکسید شده سرکوب می‌شوند. به طور مشابه، دو محل اتصال *OxyR* پیش‌بینی شده در موقعیت‌های ۲۷۸۴۰۵۳ و ۲۷۸۴۲۷۶ بین *ygaQ* و یک ژن واگرای احتمالی به نام *b2653* وجود دارد، و هر دو *ygaQ* و *b2653* نسبت القای بالاتری را در سویه جهش یافته $\Delta oxyR$ نشان دادند.

پاسخ‌های مستقل از *OxyR*

تعدادی از ژن‌های شوک حرارتی (*groES*، *groEL*)، *grpE*، *dnaK*، *htpG*) از جمله ژن‌هایی که فعالیت‌های پروتئولیتیک را کد می‌کنند (*clpA*، *clpB*، *clpX*) بودند. و *clpP*، ژن‌های SOS (*recA*، *recN*، *lexA*) و

سیستئین را کاتالیز می‌کند. *sbp* و *cysP*، کد کننده پروتئین‌های اتصال سولفات پری پلاسمی. و *dsdA*،

ژن‌های متابولیسم سولفات و سیستئین (*cysKAUPNDHJ* و *sbp*)؛ ژن‌هایی که آنزیم‌های چرخه اسید تری کربوکسیلیک (*acnA* و *fumA*) را مشخص می‌کنند. اپرون *nrdHIEF* که سنتز دومین سیستم ردوکتاز ریبونوکلئوتیدی را هدایت می‌کند. و ژن استرس جهانی *uspA* نیز تا حدی در هر دو سویه نوع وحشی و سویه جهش یافته القا شد. در مقابل، بیان بسیاری از ژن‌های پروتئین ریبوزومی، ژن‌های شوک سرد، ژن‌های سنتاز *ATP* و ژن‌های ناقل سرکوب شد.

(i) رگولون *SoxRS*

رگولون *SoxRS* قبلاً گزارش شده بود که عمدتاً توسط ترکیبات مولد سوپراکسید القا می‌شود و نه توسط پراکسید هیدروژن. بنابراین، چندین عضو این رگولون مانند *fpr* (رمزکننده فردوکسین - فلاوودوکسین ردوکتاز) و *sodA* (با نسبت القایی ۸ و کدکننده سوپراکسید دیسموتاز منگنز)، و هم‌چنین خود *soxS*، از جمله ژن‌های هستند که به شدت توسط پراکسید هیدروژن ۱ میلی‌مولار القا می‌شود (۳۳).

(ii) اپرون *isc*

خوشه ژن *isc*، *iscS/yfhO*، *yfhP* (b2531)، *iscA/yfhF* (b2530)، *iscU/yfhN* (b2529)، *hscA* (b2528)، *hscB* (b2527)، *fd25* (b25) و *fd25* (b25) به دلیل نقش آن در تشکیل خوشه Fe-S و متابولیسم مرتبط با سیستئین مورد توجه قرار گرفته است. پروفایل بیان نشان داد که چهار ژن اول (*iscU*، *iscS*، *yfhP* و *iscA*) در خوشه به طور متوسط در هر دو سویه نوع وحشی و سویه حذف *oxyR* القا می‌شوند. نسبت القایی برای چهار ژن آخر (*hscA*، *hscB*)، *fdx* و *yfhJ*) در خطای آزمایش بود، که نشان می‌دهد این چهار ژن القا نشده‌اند و به‌طور متفاوتی تنظیم می‌شوند. این نتیجه با گزارشی مطابقت دارد که ژن‌های *hscBA* مستقل از ژن‌های *isc* رونویسی می‌شوند. سنجش گسترش پرایمر نشان داد که القای اپرون *isc* توسط پراکسید هیدروژن و پاراکوات مستقل از هر دو *OxyR* و *SoxRS* بود. این سنجش‌ها همچنین اجازه می‌دهند که شروع رونویسی به یک باقیمانده G در موقعیت ۲۶۶۰۲۱۹، ۶۸ جفت باز در بالادست کدون شروع *yfhP* نگاشت شود (۳۴).

(iii) القای ژن‌های دیگر.

در میان ژن‌های دیگری که بیان آن‌ها به‌شدت به شیوه‌ای مستقل از *OxyR* القا شد، *cysK* بود که سیستئین سنتاز را کد می‌کند، که آخرین مرحله سنتز

ibpA و ibpB که پروتئین‌های شوک حرارتی را کد می‌کنند نیز به شدت در هر دو سویه نوع وحشی و $\Delta oxyR$ القا شدند. القای مشاهده شده ژن‌های کدکننده‌های چاپرون HSP20 در پاسخ به استرس اکسیداتیو با گزارش اخیر مطابقت داشت

که سویه‌های -ibpA، -ibpB و -ibpAB بیان بیش از حد، نه تنها به گرما، بلکه در برابر درمان پاراکوات نیز مقاوم هستند (۳۵).

رمزگذاری دی-سرین دامیناز. ما هم‌چنین القای مختصری از ژن‌های دیگر را در مسیر بیوسنتز سیستئین مشاهده کردیم. القای این ژن‌ها تلاش هماهنگ برای تجمع سیستئین بیشتر در پاسخ به درمان پراکسید هیدروژن را پیشنهاد می‌کند. دو ژن دیگر، tnaA و tnaL، که به روشی مستقل از OxyR القا شده بودند، در کاتابولیسم اسید آمینه نقش دارند. ژن‌های



References

1. AlQuraishi MJC. (2019). End-to-end differentiable learning of protein structure. 8(4):292-301. e3.
2. Bartlett AI, Radford SEJNs, biology m. (1009). An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. 16(6):582-8.
3. Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FUJS. (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. 353(6294):aac4354.
4. Liutkute M, Samatova E, Rodnina MVJB. (2020). Cotranslational folding of proteins on the ribosome. 10(1):97.
5. Chaudhary R, Atamian HS, Shen Z, Briggs SP, (2014). Kaloshian IJPotNAoS. GroEL from the endosymbiont *Buchnera aphidicola* betrays the aphid by triggering plant defense. 111(24):8919-24.
6. Henderson B, Allan E, Coates ARJI. (2006). Immunity. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. 74(7):3693-706.
7. Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM, Tilly K, Dennis DT. (1988). Georgopoulos CP, et al. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. 333(6171):330-4.
8. Kaufman RJTiCB. (2004). A trip to the ER: coping with stress. 2004;14:20-8.
9. Rosenzweig R, Nillegoda NB, Mayer MP, Bukau BJNrmcb. The Hsp70 chaperone network. 2019;20(11):665-80.
10. Luengo TM, Kityk R, Mayer MP, Rüdiger SGJMc. Hsp90 breaks the deadlock of the Hsp70 chaperone system. 2018;70(3):545-52. e9.
11. Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FUJFl. (2020). Recent advances in understanding catalysis of protein folding by molecular chaperones. 594(17):2770-81.
12. Hayer-Hartl M, Bracher A. (2016). Hartl FUJTibs. The GroEL–GroES chaperonin machine: a nano-cage for protein folding. 41(1):62-76.
13. Cohen FE, Kelly JWJN.(2003). Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. 426(6968):905-9.
14. Schirmer EC, Glover JR, Singer MA. (1996). Lindquist SJTibs. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. 21(8):289-96.
15. Burrows JA, Willis LK. (2000). Perlmutter DHJPotNAoS. Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant α 1-antitrypsin (α 1-AT) Z: a potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in α 1-AT deficiency. 97(4):1796-801.
16. Yoshida H, Yoshizawa T, Shibasaki F. (2002). Kanazawa IJNod. Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado–Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. 10(2):88-99.
17. Roncarati D, Scarlato VJFmr (2017). Regulation of heat-shock genes in bacteria: from signal sensing to gene expression output. 41(4):549-74.
18. Slamti L, Livny J, Waldor MKJJob. (2007). Global gene expression and phenotypic analysis of a *Vibrio cholerae* rpoH deletion mutant. 189(2):351-62.
19. Kojima K, Nakamoto HJFl. (2007). A novel light-and heat-responsive regulation of the groE transcription in the absence of HrcA or CIRCE in cyanobacteria. 581(9):1871-80.
20. Shapiro RS, Cowen LEJM.(2012). Thermal control of microbial development and virulence: molecular mechanisms of microbial temperature sensing. 3(5):10.1128/mbio.00238-12.
21. Kortmann J, Narberhaus FJNrm. (2012). Bacterial RNA thermometers:

- molecular zippers and switches. 10(4): 255-65.
22. Waldminghaus T, Gaubig LC, Klinkert B, Narberhaus FJRb. (2009). The *Escherichia coli* *ibpA* thermometer is comprised of stable and unstable structural elements. 6(4):455-63.
23. Dorman CJ, Corcoran CPJNAR. (2009). Bacterial DNA topology and infectious disease. 37(3):672-8.
24. Colonna B, Casalino M, Fradiani PA, Zagaglia C, Naitza S, Leoni L, et al. (1995). H-NS regulation of virulence gene expression in enteroinvasive *Escherichia coli* harboring the virulence plasmid integrated into the host chromosome. 177(16):4703-12.
25. Duong N, Osborne S, Bustamante VH, Tomljenovic AM, Puente JL, Coombes BKJJoBC. (2007). Thermosensing coordinates a cis-regulatory module for transcriptional activation of the intracellular virulence system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. 282(47):34077-84.
26. Elsholz AK, Michalik S, Zühlke D, Hecker M. (2010). Gerth UJTEJ. CtsR, the Gram-positive master regulator of protein quality control, feels the heat. 29(21):3621-9.
27. Servant P, Grandvalet C, Mazodier PJPotNAoS. (2000). The RheA repressor is the thermosensor of the HSP18 heat shock response in *Streptomyces albus*. 2000;97(7):3538-43.
28. Zheng M, Wang X, Templeton LJ, Smulski DR, LaRossa RA, Storz GJJob. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. 2001;183(15):4562-70.
29. Bachmann BJJec, cellular St, biology m. Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. 1996:2460.
30. Nachin L, El Hassouni M, Loiseau L, Expert D, Barras FJMm. SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: the key role of SufC, an orphan ABC ATPase. 2001;39(4):960-72.
31. Patzer SI, Hantke KJJob. SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*. 1999;181(10):3307-9.
32. Zheng M, Wang X, Doan B, Lewis KA, Schneider TD, Storz GJJob. Computation-directed identification of OxyR DNA binding sites in *Escherichia coli*. 2001;183(15):4571-9.
33. Nunoshiba T, Hidalgo E, Amabile Cuevas C, Demple BJJJob. Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene. 1992;174(19):6054-60.
34. Kambampati R, Lauhon CTJB. IscS is a sulfurtransferase for the in vitro biosynthesis of 4-thiouridine in *Escherichia coli* tRNA. 1999;38(50):16561-8.
35. Maki Y, Yoshida H, Wada AJGtc. Two proteins, YfiA and YhbH, associated with resting ribosomes in stationary phase *Escherichia coli*. 2000;5(12):965-74.

Chaperones, vital molecules in microbes

Kimia Golestanfar^{*1}

Ph.D Student, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch,
Islamic Azad University, Shahrekord, Iran ^{1*}

***Corresponding author::** Golestanfark@gmail.com

Abstract

Molecular chaperones are highly conserved proteins that promote proper folding of other proteins inside the body. Diverse chaperone systems contribute to protein folding and translocation, assembly of oligomeric complexes, and recovery from stress-induced unfolding. A fundamental function of molecular chaperones is to inhibit nonproductive protein interactions by recognizing and protecting hydrophobic surfaces that are exposed during folding or following proteotoxic stress. Therefore, chaperones are of special importance in cellular systems, which are discussed in this review article about these molecules and their mechanisms of action. Also, changes in gene expression in oxidative conditions in bacteria will be discussed in order to tolerate environmental conditions.

Keywords: Chaperone, folding, temperature stress