Physical and Chemical Properties of DNA Ligases

Sara Abdolahi[1, 2], Maryam Borhani Haghighi[2, 3], Hadi Aligholi[4*]

[1]Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
[2]Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran
[3]Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4]Department of Neuroscience, School of Advanced Medical Sciences and Technologies, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Article Info:
Received: **4 Dec 2016** ***Accepted:*** **19 Feb 2017**

ABSTRACT

Introduction: DNA ligases as a particular type of enzyme which catalyze and facilitate the formation of a phosphodiester bond in duplex DNA are central enzymes in molecular biology. DNA ligase forms a bond between the end of a donor nucleotide and the end of an acceptor nucleotide. Reaction of DNA ligases is necessary for all organisms and serves as the fundamental step of DNA replication and repair. DNA ligase can play an important role in repairing single strand disruptions and fasten nicks in double-stranded DNA. It also connects Okazaki fragments during the replication of DNA. *T4* DNA ligase, E. coli DNA ligase, and thermostable DNA ligases are examples of DNA ligase enzyme family. These enzymes differ in their co-factor requirements, substrate specificity, and thermal stability. ***Conclusion:*** DNA ligase has the widespread use in laboratories of molecular biology for recombinant DNA experiments. Despite the existence and operation of the DNA ligases in all organisms, they show a vast variety of amino acid sequences, molecular sizes, and attributes.

Key words:

1. DNA Ligases
2. Zinc Fingers
3. Biology

Corresponding Author: Hadi Aligholi
E-mail: *hadialigholi@yahoo.com*

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.40]

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی DNA لیگازها

سارا عبدالهی[۱،۲]، مریم برهانی حقیقی[۲،۳]، هادی علیقلی[۴*]

[۱]گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
[۲]مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم‌الانبیاء، تهران، ایران
[۳]گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۴]گروه علوم اعصاب، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۴ آذر ۱۳۹۵
تاریخ پذیرش: ۱ اسفند ۱۳۹۵

چکیده

مقدمه: DNA لیگازها به‌عنوان نوع خاصی از آنزیم‌ها که تشکیل پیوند فسفودی استر در DNA دو رشته‌ای را تسریع و تسهیل می‌کنند، آنزیم‌های اصلی در زیست شناسی مولکولی هستند. DNA لیگاز بین انتهای یک نوکلئوتید دهنده و انتهای یک نوکلئوتید پذیرنده یک پیوند تشکیل می‌دهد. واکنش DNA لیگاز برای تمام موجودات زنده لازم است و به‌عنوان گام اساسی ترمیم و تکثیر DNA عمل می‌کند. DNA لیگاز می‌تواند نقش مهمی در ترمیم اختلالات DNA تک رشته و اتصال شکاف‌ها در DNA دو رشته بازی کند. همچنین قطعات اکازاکی در طی همانندسازی DNA را به یکدیگر متصل می‌کند. DNA لیگاز *T4*، DNA لیگاز *E. coli* و DNA لیگاز مقاوم به حرارت نمونه‌هایی از آنزیم‌های خانوادهٔ DNA لیگاز هستند. این آنزیم‌ها در کوفاکتور مورد نیاز خود، سوبسترای اختصاصی و پایداری حرارتی متفاوت هستند. **نتیجه‌گیری:** DNA لیگازها دارای استفادهٔ گسترده در آزمایشگاه‌های زیست شناسی مولکولی برای آزمایش‌های DNA نوترکیب می‌باشند. با وجود حضور و عملکرد DNA لیگازها در تمام موجودات، آن‌ها تنوع گسترده‌ای از توالی‌های اسیدآمینه، اندازه‌های مولکولی و خصوصیات را نشان می‌دهند.

کلید واژه‌ها:
۱. DNA لیگازها
۲. دمین زینک فینگر
۳. زیست شناسی

* **نویسنده مسئول:** هادی علیقلی
آدرس الکترونیکی: *hadialigholi@yahoo.com*

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-08]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.40]

مقدمه

نامگذاری و طبقه‌بندی آنزیم‌های خانوادهٔ لیگاز

مطابق با فهرست کمیتهٔ نامگذاری اتحادیهٔ بین‌المللی بیوشیمی و بیولوژی مولکولی[1]، آنزیم‌ها به شش کلاس اصلی تقسیم می‌شوند که هر کدام بر اساس نوع واکنشی که کاتالیز می‌کنند دارای زیر کلاس‌های مختلف می‌باشند (جدول ۱).

در این طبقه‌بندی آنزیم‌ها توسط چهار عدد و همچنین یک نام سیستماتیک که مشخص کنندهٔ نوع واکنش کاتالیز کننده می‌باشد، نامگذاری می‌شوند (۱). این عدد چهار رقمی عدد کمیسیون آنزیمی[2] می‌باشد. عدد اول مشخص کنندهٔ نام کلاس آنزیم، عدد دوم مربوط به زیرکلاس آنزیم و عدد سوم و چهارم اختصاصی آنزیم می‌باشد. به طور مثال عدد کمیسیون آنزیمی برای DNA لیگاز EC 6. 5. 1. 1 می‌باشد که عدد اول کلاس آنزیم (لیگاز)، عدد دوم زیر کلاس آنزیم (تشکیل باند فسفریک استر) و عدد سوم و چهارم اختصاصی آنزیم می‌باشند (۱). در جدول‌های ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ طبقه‌بندی زیر کلاس‌های مختلف خانوادهٔ لیگاز و زیر کلاس‌های لیگازها بر اساس نوع واکنش مشخص شده است (۱).

جدول ۱- طبقه‌بندی بین‌المللی آنزیم‌ها (۱).

عدد	کلاس	واکنش کاتالیزی
۱	اکسیدوردکتازها	انتقال الکترون‌ها (یون‌های هیدرید یا اتم‌های H)
۲	ترانسفرازها	واکنش‌های انتقال گروه
۳	هیدرولازها	واکنش‌های هیدرولیز (انتقال گروه‌های عامل به آب)
۴	لیازها	افزودن گروه‌ها به پیوندهای دوگانه یا ایجاد پیوندهای دوگانه با برداشت گروه‌ها
۵	ایزومرازها	انتقال گروه‌ها در داخل مولکول‌ها جهت ایجاد اشکال ایزومری
۶	لیگازها	تشکیل پیوند در طی واکنش‌های کندانسیون همراه با تجزیهٔ ATP

جدول ۲- زیر کلاس‌های خانوادهٔ لیگازها (۱).

شماره	نام
EC 6-1	تشکیل پیوند اکسیژن -کربن
EC 6-2	تشکیل پیوند کربن -سولفور
EC 6-3	تشکیل پیوند کربن -نیتروژن
EC 6-4	تشکیل پیوند کربن -کربن
EC 6-5	تشکیل پیوند فسفوریک استر
EC 6-6	تشکیل پیوند نیتروژن -فلز

جدول ۳- زیر کلاس‌های لیگازها بر اساس نوع واکنش (۱).

شماره	نوع واکنش
EC 6-1	تشکیل پیوند کربن -اکسیژن
EC 6-1-1	تشکیل آمینواسیل tRNA و ترکیبات وابسته
EC 6-2	تشکیل پیوند کربن -سولفور
EC 6-2-1	اسید -تیول لیگاز
EC 6.3	تشکیل پیوند کربن -نیتروژن
EC 6.3.1	اسید -آمین لیگاز (Amide Synthases)
EC 6.3.2	اسید -آمینواسید لیگاز (Peptide SynthaseS)
EC 6.3.3	سیکلو لیگاز
EC 6.3.4	کربن -نیتروژن لیگازهای دیگر
EC 6.3.5	لیگازهای کربن -نیتروژن با گلوتامین
EC 6.4	تشکیل پیوند کربن -کربن
EC 6.5	تشکیل پیوند فسفو دی استر
EC 6.6	تشکیل پیوند نیتروژن -فلز
EC 6.6.1	تشکیل کمپلکس کوئوردیناسیون

جدول ۴- زیرکلاس‌های EC 6.1 لیگازها (۱).

Number	Name
EC 6.1.1.1	tyrosine—tRNA ligase
EC 6.1.1.2	tryptophan—tRNA ligase
EC 6.1.1.3	threonine—tRNA ligase
EC 6.1.1.4	leucine—tRNA ligase
EC 6.1.1.5	isoleucine—tRNA ligase
EC 6.1.1.6	lysine—tRNA ligase
EC 6.1.1.7	alanine—tRNA ligase
EC 6.1.1.8	deleted
EC 6.1.1.9	valine—tRNA ligase
EC 6.1.1.10	methionine—tRNA ligase
EC 6.1.1.11	serine—tRNA ligase
EC 6.1.1.12	aspartate—tRNA ligase
EC 6.1.1.13	D-alanine—poly(phosphoribitol) ligase
EC 6.1.1.14	glycine—tRNA ligase
EC 6.1.1.15	proline—tRNA ligase
EC 6.1.1.16	cysteine—tRNA ligase
EC 6.1.1.17	glutamate—tRNA ligase
EC 6.1.1.18	glutamine—tRNA ligase
EC 6.1.1.19	arginine—tRNA ligase
EC 6.1.1.20	phenylalanine—tRNA ligase
EC 6.1.1.21	histidine—tRNA ligase
EC 6.1.1.22	asparagine—tRNA ligase
EC 6.1.1.23	aspartate—tRNAAsn ligase
EC 6.1.1.24	glutamate—tRNAGln ligase
EC 6.1.1.25	lysine—tRNAPyl ligase
EC 6.1.1.26	pyrrolysine—$tRNA^{Pyl}$ ligase

[1] Nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology
[2] Enzyme commission number

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-08]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.40]

جدول ۵- زیرکلاس‌های EC 6.2 لیگازها (۱).

Number	Name
EC 6.2.1.1	acetate—CoA ligase
EC 6.2.1.2	butyrate—CoA ligase
EC 6.2.1.3	long-chain-fatty-acid—CoA ligase
EC 6.2.1.4	succinate—CoA ligase (GDP-forming)
EC 6.2.1.5	succinate—CoA ligase (ADP-forming)
EC 6.2.1.6	glutarate—CoA ligase
EC 6.2.1.7	cholate—CoA ligase
EC 6.2.1.8	oxalate—CoA ligase
EC 6.2.1.9	malate—CoA ligase
EC 6.2.1.10	acid—CoA ligase (GDP-forming)
EC 6.2.1.11	biotin—CoA ligase
EC 6.2.1.12	4-coumarate—CoA ligase
EC 6.2.1.13	acetate—CoA ligase (ADP-forming)
EC 6.2.1.14	6-carboxyhexanoate—CoA ligase
EC 6.2.1.15	arachidonate—CoA ligase
EC 6.2.1.16	acetoacetate—CoA ligase
EC 6.2.1.17	propionate—CoA ligase
EC 6.2.1.18	citrate—CoA ligase
EC 6.2.1.19	long-chain-fatty-acid—luciferin-component ligase
EC 6.2.1.20	long-chain-fatty-acid—[acyl-carrier-protein] ligase
EC 6.2.1.21	covered by EC 6.2.1.30
EC 6.2.1.22	[citrate (pro-3S)-lyase] ligase
EC 6.2.1.23	dicarboxylate—CoA ligase
EC 6.2.1.24	phytanate—CoA ligase
EC 6.2.1.25	benzoate—CoA ligase
EC 6.2.1.26	o-succinylbenzoate—CoA ligase
EC 6.2.1.27	4-hydroxybenzoate—CoA ligase
EC 6.2.1.28	3α,7α-dihydroxy-5β-cholestanate—CoA ligase
EC 6.2.1.29	deleted now EC 6.2.1.7
EC 6.2.1.30	phenylacetate—CoA ligase
EC 6.2.1.31	2-furoate—CoA ligase
EC 6.2.1.32	anthranilate—CoA ligase
EC 6.2.1.33	4-chlorobenzoate—CoA ligase
EC 6.2.1.34	trans-feruloyl-CoA synthase
EC 6.2.1.35	ACP-SH:acetate ligase

جدول ۶- زیرکلاس‌های EC 6.3 لیگازها (۱).

Number	Name
EC 6.3.1.1	Aspartate-ammonia ligase
EC 6.3.1.2	Glutamate-ammonia ligase
EC 6.3.1.3	now EC 6.3.4.13
EC 6.3.1.4	Aspartate-ammonia ligase (ADP-forming)
EC 6.3.1.5	NAD+ synthase
EC 6.3.1.6	Glutamate-ethylamine ligase
EC 6.3.1.7	methyleneglutamate-ammonia ligase-4
EC 6.3.1.8	glutathionylspermidine synthase
EC 6.3.1.9	trypanothione synthase
EC 6.3.1.10	adenosylcobinamide-phosphate synthase
EC 6.3.1.11	Glutamate-putrescine ligase
EC 6.3.1.12	D-aspartate ligase
EC 6.3.1.13	L-cysteine:1D-*myo*-inositol 2-amino-2-deoxy-α-D-glucopyranoside ligase

جدول ۷- زیرکلاس های EC 6-4 لیگازها (۱).

Number	Name
EC 6.4.1.1	pyruvate carboxylase
EC 6.4.1.2	acetyl-CoA carboxylase
EC 6.4.1.3	propionyl-CoA carboxylase
EC 6.4.1.4	methylcrotonoyl-CoA carboxylase
EC 6.4.1.5	geranoyl-CoA carboxylase
EC 6.4.1.6	acetone carboxylase
EC 6.4.1.7	2-oxoglutarate carboxylase

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-08]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.40]

جدول ۸- زیرکلاس های EC 6-5 لیگازها (۱).

Number	Name
EC 6.5.1.1	DNA ligase (ATP)
EC 6.5.1.2	DNA ligase (NAD^+)
EC 6.5.1.3	RNA ligase (ATP)
EC 6.5.1.4	RNA-3'-phosphate cyclase

جدول ۹- زیرکلاس‌های EC 6-6 لیگازها (۱).

Number	Name
EC 6.6.1.1	magnesium chelatase
EC 6.6.1.2	cobaltochelatase

لیگازها خانواده‌ای از آنزیم‌ها می‌باشند که اتصال دو مولکول بزرگ را به وسیلهٔ تشکیل یک پیوند شیمیایی جدید کاتالیز می‌کنند که معمولاً همراه با هیدرولیز گروه شیمیایی کوچکی است که متصل به یکی از مولکول‌های بزرگ است. به طور معمول لیگازها واکنش زیر را کاتالیز می‌کنند ($Ab + C \rightarrow A–C + b$، $Ab + cD \rightarrow A–D + b + c$). لیگازها همچنین سینتتاز نیز نامیده می‌شوند زیرا برای ترکیب مولکول‌های جدید به کار می‌روند (۲).

DNA لیگازها یک نوع خاص از لیگازها (EC 6. 5. 1. 1) می‌باشند که می‌توانند دو رشتهٔ DNA را که هر دو رشته دچار بریدگی شده‌اند را به هم متصل نمایند. DNA لیگاز یک آنزیم سلولی حیاتی است که برای تعدادی از فرایندهای مهم از جمله رونویسی DNA، ترمیم DNA آسیب دیده، نوترکیبی DNA، بازآرایی ژن ایمونوگلوبولین، ویرایش RNA[3] و اتصال قطعات اکازاکی مورد نیاز می‌باشد. DNA لیگاز یک آنزیم ضروری برای همهٔ سلول‌ها است به طوری که شکاف‌های موجود در چهارچوب فسفات -قند DNA را به هم می‌چسباند (۴-۲). DNA لیگازها اتصال دهندهٔ قطعات اکازاکی اصلاح شده در طول رونویسی نیز بوده و سنتز DNA در طی فرایند ترمیم DNA را برای مدت کوتاهی کامل می‌کنند. DNA لیگاز دو رشتهٔ DNA را به صورت کووالانسی به هم متصل می‌کند (۴). DNA لیگازها همچنین به طور گسترده به‌عنوان ابزاری در دستکاری DNA و کلونینگ DNA در آزمایشات in vitro مورد استفاده قرار می‌گیرند. این آنزیم‌ها می‌توانند به دو کلاس تقسیم شوند، یک دسته آنزیم‌هایی که به کوفاکتور NAD^+ نیاز دارند و دستهٔ دیگر آنزیم‌هایی هستند که به کوفاکتور ATP نیاز دارند. DNA لیگازهای یوکاریوت‌ها، ویروس‌ها و آرکئی باکترها از کوفاکتور ATP استفاده می‌کنند و تنها در یوباکترها NAD^+ به‌عنوان کوفاکتور DNA لیگاز استفاده می‌شود (۲، ۵)

اتصال پایانه‌های DNA توسط DNA لیگاز

اتصال قطعات اکازاکی به آنزیمی احتیاج دارد که انتهای دو زنجیرهٔ DNA را به هم متصل کند، وجود مولکول‌های DNA حلقوی نیز دلیلی بر وجود این آنزیم است. در سال ۱۹۶۷ محققین چندین آزمایشگاه به طور همزمان، موفق به کشف DNA لیگاز شدند. این آنزیم ایجاد پیوند فسفو دی استر بین گروه هیدروکسیل ′۳ در انتهای یک زنجیره و گروه فسفات ′۵ در انتهای زنجیرهٔ دیگر را تسریع می‌کند. برای انجام این واکنش که از لحاظ ترمودینامیکی انرژی خواه می‌باشد یک منبع انرژی مورد نیاز است. در یوکاریوت‌ها و آرکئی باکتری‌ها ATP و در باکتری‌ها NAD^+ منبع انرژی می‌باشند (۵).

سایز لیگازهای وابسته به ATP در محدودهٔ بین ۳۰ kDa تا ۱۰۰ kDa < قرار دارد، اما لیگازهای وابسته به NAD^+ شباهت بسیار زیادی به یکدیگر دارند و از پروتئین‌های مونومریک ۸۰-۷۰ kDa تشکیل شده‌اند (۶). توالی‌های مشابهی بین دو کلاس DNA لیگازها مشاهده می‌شد تا اینکه اخیراً روی توالی موتیف KxDG متمرکز شده‌اند، این موتیف (I) حفاظت شده یکی از شش توالی co-linear موتیف‌های (I-VI) مشخص شده در جایگاه فعال آنزیم‌های زیر خانوادهٔ نوکلئوتیدیل ترانسفرازها از جمله DNA لیگازهای وابسته به ATP، RNA لیگازها، tRNA لیگازها و همچنین آنزیم‌های کلاهک گذار mRNA یوکاریوتی می‌باشد (۸، ۷). روش‌هایی که برای شناسایی توالی‌های تکراری جدید به کار گرفته شده است، نشان می‌دهد که ۵ موتیف از این ۶ موتیف در لیگازهای وابسته به NAD^+ نیز وجود دارد (۱۰، ۹). شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد تعدادی از ویروس‌ها حاوی ژنی هستند که DNA لیگاز خود را کد می‌کنند. این آنزیم‌ها به دو گروه ظاهر می‌شوند؛ یک گروه آنزیم‌هایی هستند که برای فعالیت به NAD^+ نیاز دارند و گروه دیگر به ATP نیاز دارند. این تفاوت در سوبسترای اختصاصی و ضرورت لیگاز وابسته به NAD^+ برای بقاء باکتری‌ها ضروری می‌باشد. در همهٔ آنزیم‌های یوکاریوتی منبع انرژی ATP می‌باشد. این آنزیم‌ها تنوع گسترده‌ای از حجم مولکولی را نشان می‌دهند، آنزیم نوع ۱ انسانی ۱۰۳ KDa و آنزیم‌های باکتریوفاژ *T7* ۴۱ kDa وزن مولکولی دارند. DNA لیگاز باکتریوفاژ T7 یکی از کوچکترین DNA لیگازهای شناخته شده است (۶).

DNA لیگازها نمی‌توانند دو مولکول DNA تک رشته‌ای را به هم متصل کرده یا DNA تک رشته‌ای را حلقوی کنند. در واقع لیگازها بریدگی‌های مولکول‌های DNA دو رشته‌ای را پر می‌کنند. این آنزیم در *E. coli* معمولاً یک پل فسفو دی استر را تنها زمانی به وجود می‌آورد که حداقل چندین باز از DNA تک رشته‌ای در انتهای قطعهٔ

[3] RNA editing

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-08]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.40]

دو رشته‌ای DNA وجود داشته باشد و در نزدیکی بازهای تک رشته‌ای قطعهٔ دیگر DNA قرار بگیرد تا تشکیل جفت باز را میسر سازد. لیگاز رمز شده به وسیلهٔ باکتریوفاژ *T4* می‌تواند دو قطعهٔ دو رشته‌ای مارپیچی را که دارای انتهای کور هستند را به هم متصل کند که این توانایی در فناوری DNA نوترکیب به کار گرفته شده است. لیگازها نقش اساسی در گسترش زیست مولکولی و بیوتکنولوژی ایفاء می‌کنند (۶، ۳، ۲).

واکنش DNA لیگاز

DNA لیگازها اتصال یک رشتهٔ DNA با گروه هیدروکسیل ′۳ آزاد را به رشتهٔ دیگر با گروه فسفات ′۵ آزاد کاتالیز می‌کنند. در یوکاریوت‌ها و آرکی باکترها، ATP به PPi و AMP تجزیه می‌شود تا این واکنش پیش رود. در باکتری‌ها، NAD^+ به AMP و نیکوتین آمید مونونوکلئوتید (NMN)[4] تجزیه می‌شود (۶).

مکانیسم واکنش لیگازها

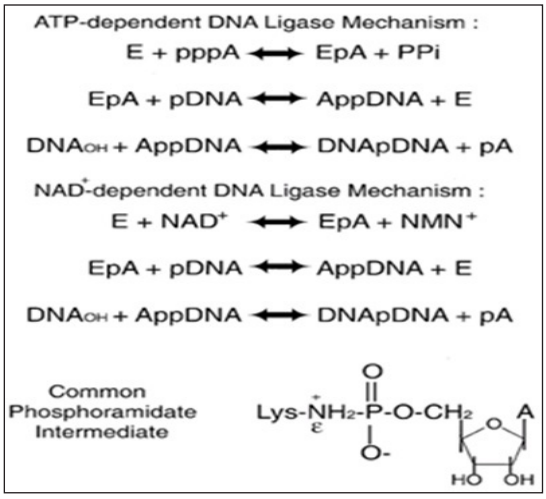
واکنش لیگازها در سه مرحله رخ می‌دهد (تصویر ۱).

مرحلهٔ ۱- ناحیهٔ فعال زنجیرهٔ جانبی لیزین به ATP یا NAD^+ حمله می‌کند (باند N-P)، واکنش حد واسط AMP لیگاز تشکیل می شود و PPi یا NMN آزاد می‌شود.

مرحلهٔ ۲- گروه AMP از لیگاز به گروه فسفات ′۵ متصل می‌شود و واکنش حد واسط AMP -نوکلئیک اسید (AMP-NA) تشکیل می‌شود.

مرحلهٔ ۳- گروه هیدروکسیل انتهای ′۳ به گروه فسفات انتهای ′۵ حمله می‌کند و AMP آزاد می‌شود.

در لیگازهای یوکاریوتی کمپلکس AMP -آنزیم پس از واکنش آنزیم و ATP با آزاد شدن پیروفسفات‌های آزاد شده تشکیل می‌شود. آدنیلاسیون لیگازهای باکتریایی نیز در واکنش‌های غیر معمولی که با تقسیم NAD^+ و آزاد شدن نیکوتین آمید مونونوکلئوتید شروع می‌شود صورت می‌گیرد (۱۰، ۶).



تصویر ۱- مکانیسم واکنش DNA لیگاز (۶).

تشکیل AMP لیگاز

DNA لیگازها حاوی یک دمین OB-fold[5] با ۵ رشتهٔ β-barrel می‌باشند که از امتداد یافتن C-ترمینال دمین NTase[6] به وجود آمده‌اند. در ساده‌ترین DNA لیگازها از جمله DNA لیگاز باکتریوفاژ *T7* و ویروس *Chlorella* دو دمین NTase و OB قادر به انجام همهٔ مراحل DNA لیگاز هستند (۱۲، ۱۱، ۳).

DNA لیگازهای وابسته به ATP از همکاری باقی‌مانده‌های حفاظت شده بر روی دمین OB در تشکیل حد واسط AMP لیگاز استفاده می‌کنند. در مقایسه با DNA لیگازهای وابسته به ATP، DNA لیگازهای وابسته به NAD^+ نمی‌توانند از همکاری دمین OB در تشکیل حد واسط AMP لیگاز استفاده کنند. DNA لیگازهای وابسته به NAD^+ از مکانیسم‌های مختلفی استفاده می‌کنند که در آن‌ها باقی‌مانده‌های مورد نیاز از امتداد یافتن N-ترمینال دمین NTase به وجود می‌آیند، که دمین Ia نامیده می‌شود (۱۴، ۱۳، ۶). بنابراین هردو دستهٔ DNA لیگازهای وابسته به ATP و NAD^+ از دمین‌های معینی برای تشکیل AMP لیگاز استفاده می‌کنند اما هرکدام از این دو دسته لیگازها از دمین‌ها و مکانیسم‌های کاملاً متفاوتی استفاده می‌کنند. بعد از تشکیل حد واسط AMP لیگاز، چرخش پیوستهٔ دمین‌های Ia و OB از ناحیهٔ فعال NTase اجازهٔ حمله به DNA وارد شده را می‌دهند. اخیراً ساختمان‌های کریستالی جدیدی که از DNA لیگازهای وابسته به ATP و NAD^+ به دست آمده است نشان می‌دهد که دمین OB می‌تواند یک موقعیت فعال ثانویه نیز در طی مرحلهٔ وابسته به ATP ایجاد نماید (۶). در مقایسه با DNA لیگازها، RNA لیگازها نمی‌توانند از دمین‌های معینی در تشکیل AMP لیگاز استفاده کنند، برای مثال RNA لیگاز ۱ و ۲ باکتریوفاژ *T4* در تشکیل حد واسط AMP لیگاز فقط از دمین NTase استفاده می‌کنند (۶).

شناسایی شکاف به وسیلهٔ DNA لیگاز

شکاف DNA به طور معمول دارای فسفات ′۵ و هیدروکسیل ′۳ در ضلع‌های مقابل هم در ناحیهٔ شکسته شده در چهار چوب DNA است. Shuman و همکارانش نشان دادند که گروه فسفات ′۵ برای شناسایی شکاف توسط لیگازهای وابسته به ATP کاملاً ضروری است اما گروه هیدروکسیل ′۳ ضروری نیست. در هنگام تشکیل کمپلکس شکاف، اگر شکاف فاقد گروه فسفات ′۵ باشد، کمپلکس شکاف دچار کاهش قابل توجهی می‌شود. لیگازها همچنین تفاوت بین شکاف و فاصله را تشخیص می‌دهند. فاصله‌های بیشتر از 1 nt < در ناحیهٔ شکاف را از بین می‌برند (تصویر ۲)-(۶، ۱۵).

[4] Nicotinamide mononucleotide
[5] Oligonucleotide/oligosaccharide-binding
[6] Nucleotidyl transferase domain

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-08]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.40]

مکانیسم شناسایی شکاف و عملکرد DNA لیگاز

۱- اتصال NAD^+ یا ATP در فرورفتگی نوکلئوتید که به دنبال بسته شدن دمین ۲ صورت می‌گیرد.

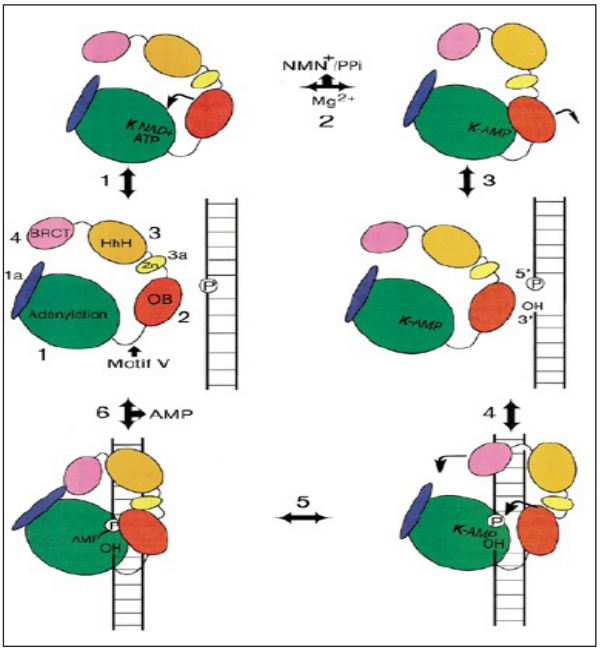
۲- با وارد شدن Mg و رها شدن NMN^+ یا PPi، در واکنش ترانس آدنیلاسیون، AMP به جایگاه فعال لیزین منتقل می‌شود.

۳- باز شدن دمین ۲ و آماده شدن آنزیم برای بستن شکاف.

۴- اتصال آنزیم آدنیله شده به شکاف DNA و بسته شدن دمین ۲ در ناحیهٔ شکاف (در لیگازهای بزرگ از جمله لیگاز *Tfi*[7]، علاوه بر این دمین‌ها ممکن است پیچ و تاپ‌هایی نیز در اطراف DNA وجود داشته باشد).

۵- انتقال AMP به ناحیهٔ فسفات ′۵ شکاف.

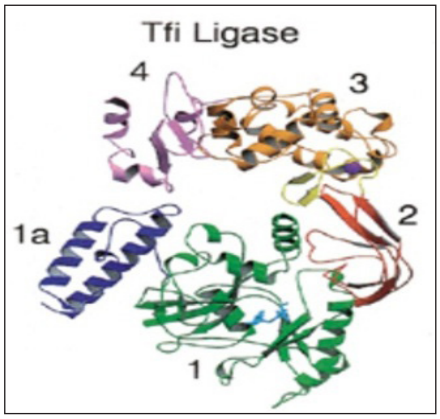
۶- گروه هیدروکسیل انتهای ′۳ به گروه فسفات انتهای ′۵ شکاف حمله می‌کند و یک باند فسفودی استر تشکیل می‌شود و شکاف همراه با آزادشدن AMP بسته می‌شود.



تصویر ۲- مکانیسم شناسایی شکاف به وسیلهٔ DNA لیگاز (۶).

ساختمان DNA لیگاز وابسته به NAD^+ در باکتری‌ها

ساختمان DNA لیگاز باکتری *Thermus filiformis* شامل یک بخش هسته مانند (nucleotide-binding-OB-fold) است که به دمین‌های zinc finger و دمین BRCA1 C-ترمینال متصل شده است (تصویر ۳). دو ساختمان کریستالی مشابه با ساختمان DNA لیگاز وابسته به NAD^+ در باکتری *Enterococcus faecalis* شناسایی شده است که تغییر قابل توجهی در ساختمان آن‌ها که در کمپلکس با سوبسترا (NAD^+) یا محصول (NMN) مرحلهٔ اول آدنیلاسیون هستند، وجود دارد. به طور قابل توجهی کمپلکس (NMN) کریستاله شده می‌تواند به کمپلکس NAD^+ تبدیل شود (۱۶).



تصویر ۳- DNA -لیگاز وابسته به NAD^+ در Thermus filiformis (۶).

DNA لیگاز وابسته به NAD^+ در *E. coli*

DNA لیگاز وابسته به NAD^+ در باکتری‌ها دارای ساختارهای چند دمینی هستند که دمین‌های OB و NTase هستهٔ این آنزیم‌ها را تشکیل می‌دهند ولی با این وجود ساختارهای کاملاً متفاوتی نسبت به DNA لیگاز وابسته به ATP در یوکاریوت‌ها دارند. در این دسته از آنزیم‌ها دمین N -ترمینالی Ia تشکیل AMP لیگاز را تحریک می‌کند، این آنزیم‌ها حاوی سه دمین C -ترمینالی هستند که از گسترش دمین OB به وجود آمده‌اند و شامل دمین‌های Zn، HhH[8] و BRCT هستند. آنالیزهای بیوشیمیایی که روی لیگاز *Drosera* filiformis انجام شده است نشان می‌دهد که دمین BRCT در آزمایشات in vitro برای واکنش لیگاز ضروری نیست، از طرفی عملکرد این دمین در آزمایشات in vivo نیز آشکار نشده است. دمین HhH در *E. coli* LigA[9] از امتداد یافتن دمین‌های OB و Zn به وجود آمده است و به دمین NTase متصل شده است، این دمین یک گیرهٔ[10] پروتئینی ایجاد می‌کند که DNA را در بر می‌گیرد. دمین Zn نیز سبب تشکیل یک پل بین دمین‌های OB و HhH در LigA می‌شود. دمین HhH در LigA، همچنین دمین DBD[11] در LIG1[12] با وجود اینکه فولدهای پروتئینی کاملاً متفاوتی دارند اما دارای نقش عملکردی مشابهی هستند (۱۸، ۱۷، ۳).

DNA لیگاز وابسته به ATP در ویروس *Chorella*

DNA لیگاز ویروس *Chlorella* دارای دو دمین ساختاری NTase و OB می‌باشد. ساختمان کریستالی حد واسط AMP لیگاز در این ویروس در ناحیهٔ شکاف DNA با

[7] Thermus filiformis
[8] Helix-hairpin-helix
[9] Ligase A
[10] Clamp
[11] DNA-binding domain
[12] LIG1 DNA ligase 1 (human)

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-08]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.40]

پایانه‌های فسفات ′۵ و هیدروکسیل ′۳ نشان داده شده است. در حالتی که لیگاز *Chlorella* با DNA کمپلکس تشکیل می‌دهد، گروه AMP و باقی‌مانده‌هایی از دمین NTase در محل فسفات انتهای ′۵ سوبسترا قرار دارند. این بر هم‌کنش‌ها یک اساس فیزیکی برای تعیین مولکول‌هایی است که به صورت طبیعی توانایی شناسایی شکاف در لیگاز *Chlorella* را دارند، این مولکول‌ها شامل حد واسط AMP لیگاز و گروه فسفات انتهای ′۵ هستند (۱۹، ۳). دمین‌های NTase و OB لیگاز *Chlorella* در حالتی مشابه با LIG1 و LigA سوبسترای DNA را در بر می‌گیرند و موقعیت دمین‌های NTase و OB را در یک حالت پایدار در طول مرحلهٔ ۲ و ۳ واکنش تعیین می‌کنند. دمین OB در لیگاز *Chlorella* حاوی ۳۰ باقی‌مانده در سطح لوپ می‌باشد که تعیین کنندهٔ محل بست[13] است. در انتهای محل بست دمین NTase قرار دارد (۱۳، ۳). در تصویر ۴ ساختمان کریستالی و کونفورماسیون فعال DAN و RNA لیگازها مشاهده می‌شود. در این تصویر (a): ساختمان کریستالی DNA لیگاز *s. solfatricus* دمین‌های DBD (بنفش)، NTase (سبز) و OB (زرد) در حالت باز، باعث رسیدن به کونفورمایسیون می‌شوند. (b): ساختمان کریستالی DNA لیگاز *P. furiosis* نشان داده شده است که کونفورماسیون OB فوراً به دنبال تشکیل ligase-AMP تشکیل می‌شود. در این ساختار اتصال AMP (آبی) با جایگاه فعال لیزین به صورت کووالان نیست. (c): ساختمان کریستالی LIG1 انسانی متصل شده به حد واسط AMP-DNA. تغییر وضعیت دمین OB بین سه حالت (a)،(b) و (c) وابسته به موقعیت دو هلیکس دومین OB است که با c و * مشخص شده‌اند. (d): ساختمان کریستالی دمین Ia (خاکستری) و دمین NTase (سبز) DNA لیگاز *E. facealis*. (e): ساختمان کریستالی حد واسط ligase-AMP، DNA لیگاز *T. filiformis* در کونفورماسیون باز، با جایگاه فعال آزاد NTase متصل شده به DNA. (f) ساختمان کریستالی LigA در *E.coli* با حد واسط AMP-DNA. تغییر در ترتیب دمین‌ها در بین دو حالت (e) و (f) وابسته به موقعیت دو هلیکس در دمین OB (۱ و ۲) و یک هلیکس در دمین HhH (۳) است. (g): ساختمان کریستالی RNA لیگاز ۱ باکتریوفاژ *T4*، AMPcPP (آنالوگ ATP: آبی) متصل شده به جایگاه فعال. تنها دمین c -ترمینال به رنگ آبی تیره. (h): ساختمان کریستالی RNA لیگاز ۲ باکتریوفاژ *T4* متصل شده به هیبرید RNA/DNA..

ساختمان لیگاز باکتریوفاژ *T7*

ساختمان لیگاز باکتریوفاژ *T7* نشان می‌دهد که این آنزیم حاوی دو دمین است (تصویر ۵)، دمین ۱؛ دمین بزرگ N- ترمینال (سبز) و دمین ۲؛ دمین کوچک C - ترمینال (قرمز). دمین ۱ (باقی‌مانده‌های ۲۴۰-۱) شامل سه β-sheet غیر موازی است که توسط ۶ α-helix احاطه شده‌اند. دمین ۱ همچنین دارای ناحیهٔ اتصالی برای ATP است که در زیر فرورفتگی یکی از β-sheet ها قرار گرفته است (تصویر ۵)-(۶).

Doherty و Wigley نشان دادند که دمین ۱ به طور ذاتی فعالیت آدنیلاسیون دارد، بنابراین این دمین را دمین آدنیلاسیون می‌نامند. همچنین در آنزیم‌های کلاهک گذار PBCV-1[14] و دمین‌های N- ترمینال لیگازهای *Bst*[15] و *Tfi* و در تعداد دیگری از آنزیم‌های که به ATP و GTP متصل می‌شوند نیز دمین ۱ مشاهده می‌شود. دمین ۱ لیگازهای وابسته به NAD^+ همچنین دارای زیر دمین ۱a (آبی) است که بیشتر در α-helix است. این ساختار در لیگاز *T7* مشاهده نمی‌شود (۲۱، ۲۰، ۶).

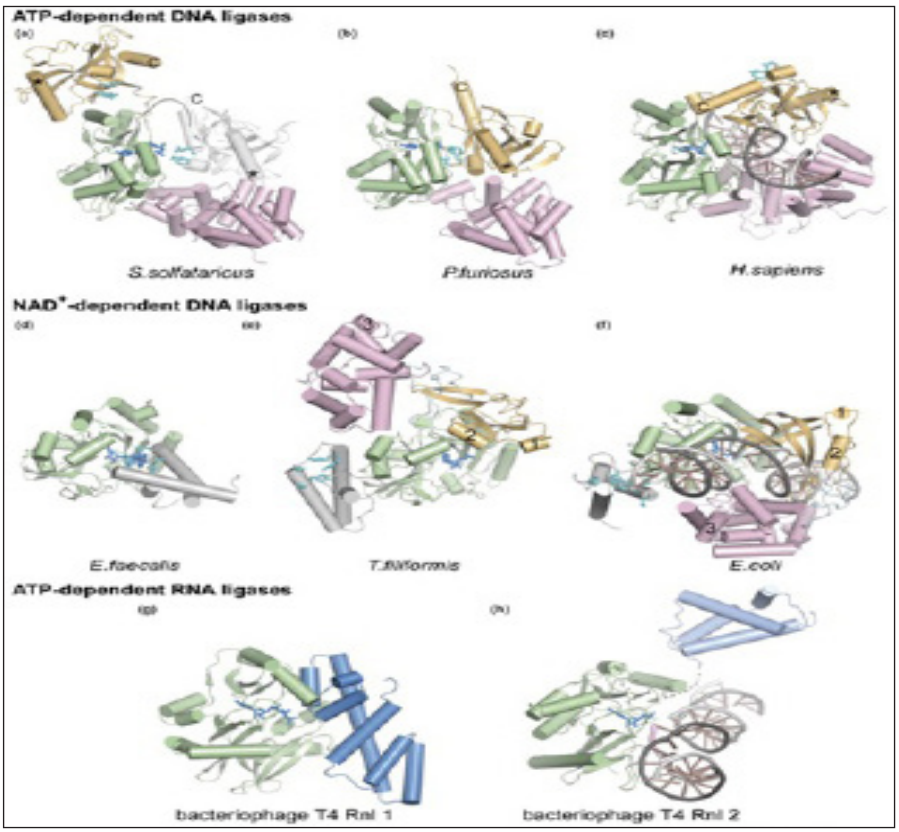
تعدادی از باقی‌مانده‌هایی که در فرورفتگی ناحیهٔ اتصالی دمین آدنیلاسیون لیگازهای *T7*، *Bst* و *Tfi* قرار دارند، متعلق به ۵ موتیف (موتیف‌های I-V) از ۶ توالی حفاظت شده در نوکلئوتیدیل ترانسفرازها هستند. این موتیف‌ها حاوی باقی‌مانده‌های شناخته شده‌ای هستند که برای کاتالیز ضروری می‌باشند. بررسی موقعیت این موتیف‌ها در داخل ساختمان DNA لیگازها نشان داد که این موتیف‌ها به‌صورت خوشه در اطراف ناحیهٔ اتصالی ATP قرار می‌گیرند. تعدادی از باقی‌مانده‌ها در داخل این موتیف‌ها بر هم‌کنش‌های خاصی با ATP ایجاد می‌کنند (۲۲، ۶).

لیگاز ۱ انسان (LIG1) , DNA لیگاز وابسته به ATP

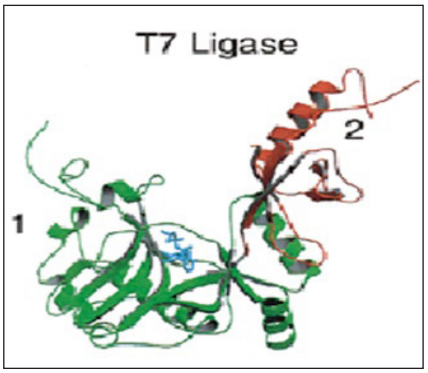
ساختمان کریستاله شدهٔ LIG1 اولین ساختمان لیگازهای پلی نوکلئوتیدی شناخته شده است که یک بینش جدیدی از عملکرد دمین‌های OB و NTase را ارائه می‌دهد. واحدهای کاتالیتیکی LIG1 انسان (باقی‌مانده‌های ۹۱۹-۲۳۳) در کمپلکس با حد واسط AMP-DNA هستند. در LIG1 که با DNA کمپلکس شده است، دمین‌های NTase و OB به پروتئین سطحی که نزدیک به شکاف DNA است و در شیار کوچک قرار دارد متصل شده است. دمین NTase به سمت ′۳ شکاف DNA متصل شده است و بین چهارچوب فسفو دی استر رشتهٔ شکسته شده و رشتهٔ DNA سالم ارتباط برقرار می‌کند، از طرفی باقی‌مانده‌های حفاظت شده در شیار کوچک نزدیک به شکاف DNA قرار می‌گیرند. این باقی‌مانده‌ها در موقعیت OH انتهای ′۳ سوبسترا در داخل جایگاه فعال قرار می‌گیرند. دمین NTase در موقعیت ′۵ شکاف قرار می‌گیرد و اصولاً به گروه AMP متصل شده است. دمین OB در LIG1 نیز با قرار گرفتن در انتهای ′۵ شکاف، به بسته شدن شیار کوچک منجر می‌شود و یک ارتباط وسیعی را بین چهارچوب فسفو دی استر رشتهٔ سالم و رشتهٔ شکسته شده DNA

[13] Latch
[14] Paramecium bursaria *chlorella* virus 1
[15] Bacillus stearothermophilus

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-08]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.40]



تصویر ۴- ساختمان کریستالی و کونفورماسیون فعال DAN و RNA لیگازها (۳).



تصویر ۵- DNA لیگاز وابسته به ATP در باکتریوفاژ *T7* (۶).

ایجاد می‌کند (۳). DNA لیگازهای وابسته به ATP در یوکاریوت‌ها، ساختمان چند دمینی دارند که علاوه بر هستهٔ کاتالیکی که حاوی دمین‌های NTase و OB است، یک α- هلیکس N- ترمینالی نیز دارند که از امتداد یافتن DBD به وجود آمده است. DBD در LIG1 انسان سبب تحریک دمین‌های NTase و OB جهت افزایش فعالیت کاتالیکی این دمین‌ها می‌شود (۲۳، ۳).

تغییر ساختار نوکلئوتیدیل ترانسفرازها

با وجود شباهت ساختمان هستهٔ DNA لیگازهای وابسته به NAD^+ و ATP و آنزیم‌های کلاهک گذار، این آنزیم‌ها طی واکنش دچار تغییر ساختار می‌شوند. DNA لیگازهای وابسته به ATP و آنزیم‌هایی که mRNA وابسته به GTP را کلاهک گذاری می‌کنند فاقد دمین ۱a ناحیهٔ اتصالی NMN هستند، در عوض مراحل ۱ و ۲ با چرخش دمین OB نسبت به دمین اتصالی نوکلئوتید، با هم جفت می‌شوند. این ساختار گذرا به خوبی با استفاده از ساختمان کریستالی آنزیم‌های کلاهک گذاری mRNA در ویروس *Chlorella* نشان داده شده است. دو مولکول از آنزیم‌های کلاهک گذار در ساختار متفاوت کریستاله شده‌اندکه به دو حالت فعال و غیر فعال دیده می‌شوند، در ساختار غیر فعال موتیف VI خارج از جایگاه فعال قرار دارد اما در ساختار فعال، دمین OB به موتیف VI اجازه می‌دهد که در جایگاه فعال قرار گیرد. موتیف VI که در نوکلئوتیدیل ترانسفرازها به صورت حفاظت شده است باعث هماهنگ کردن α و β فسفاتاز کوفاکتور GTP برای حملهٔ نوکلئوفیلی به وسیلهٔ جایگاه فعال لیزین و تشکیل حد واسط GMP -لیزین می‌شود. از طرفی باقی‌مانده‌های موتیف VI برای مرحلهٔ ۱ واکنش آنزیم‌های کلاهک گذار و لیگاز وابسته به ATP در ویروس *Chlorella* مورد نیاز می‌باشند (۲۴، ۲).

DNA لیگازهای چند دمینی

در ساختمان کریستالی به دست آمده از DNA لیگاز ۱ انسان علاوه بر اینکه دمین اتصالی DNA (DBD) جدیدی شناسایی شد، نشان داده شد که این آنزیم سوبستراهای DNA را نیز احاطه می‌کند. توالی آمینواسیدی ناحیهٔ DBD در DNA لیگازهای وابسته به ATP در یوکاریوت‌ها حفاظت شده است و این ناحیه برای فعالیت آنزیمی لیگازهای چند دمینی مورد نیاز است (۲۷-۲۵، ۲). شباهت ساختمانی بین DBD، DNA

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-08]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.40]

لیگاز ۱ انسان و دمین HhH لیگاز باکتریایی و همچنین ناحیهٔ فعال دمین HhH نشان می‌دهد که لیگازهای وابسته به NAD^+ می‌توانند سوبستراهای DNA را احاطه کنند (۱۸، ۲).

دمین OB-fold

در همهٔ DNA لیگازها دمین ۱ آدنیلاسیون به دمین ۲ حفاظت شده متصل شده است. دمین OB-fold علاوه بر اینکه در ساختمان DNA لیگاز *T7* و *Tfi* وجود دارد در ساختمان تعدادی از پروتئین‌ها که به DNA تک رشته‌ای و دو رشته‌ای و RNA متصل می‌شوند نیز وجود دارد. این دمین در انواع مختلف پروتئین‌ها نیز مشاهده شده است، از جمله در پروتئین‌های ریبوزومی باکتریایی S1 و S7، زیر واحدهای پروتئین رونویسی A، فاکتورهای آغازی رونویسی، پروتئین SSB، فاکتور IF1 ترجمه، پروتئین‌های CspA و CspB، انتهای تلومر پروتئین‌های اتصالی، پروتئین نوترکیب RuvA DNA و چندین tRNA سنتتاز مشاهده شده است (۳۱-۲۸، ۶). تعدادی از این دمین‌ها به لیگاندهای خود در سطح β-barrel متصل می‌شوند (۳۱). مطالعات بیوشیمیایی نشان می‌دهد که دمین OB لیگاز *T7* به DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود و باعث افزایش فعالیت آدنیلاسیون در دمین ۱ می‌شود. در ساختمان لیگاز *T7* دمین OB در فاصلهٔ نسبتاً دوری از دمین ۱ قرار دارد، بنابراین دمین ۲ OB برای تحریک فعالیت آدنیلاسیون دمین ۱ باید متحمل تغییرات ساختاری عمیقی شود. دو ساختمان کریستالی به دست آمده از آنزیم‌های کلاهک گذار mRNA، شواهد قطعی برای این قبیل تغییرات ساختاری هستند که در طول واکنش گوانیلاسیون در آنزیم‌های کلاهک گذار رخ می‌دهد. این واکنش معادل واکنش آدنیلاسیونی است که توسط DNA لیگازها کاتالیز می‌شود. در طی این تغییرات ساختاری که در آنزیم‌های کلاهک گذار PBCV-1 رخ می‌دهد، باقی‌مانده‌های حفاظت شده‌ای در موتیف‌های V و VI مشاهده می‌شود که در محل دمین OB قرار دارند. موتیف VI رشتهٔ انتهایی دمین ۲ را احاطه کرده است. دو باقی‌ماندهٔ (R295, R298) از موتیف‌های مشابه در آنزیم‌های کلاهک گذار به دم تری فسفات GTP متصل شده‌اند که این اتصال برای حملهٔ مستقیم به جایگاه فعال لیزین به کار می‌رود.

موتیف zinc finger

چهار باقی‌ماندهٔ حفاظت شدهٔ سیستئین (Cys406, Cys409, Cys422, Cys 427) در ناحیهٔ C -ترمینال لیگازهای وابسته به NAD^+ مشاهده شده است که بر اتصالات zinc و برهم‌کنش آن‌ها با DNA دلالت می‌کند. با استفاده از اسپکتروسکوپی[16] اتصالات zinc در لیگاز *Tfi* تأیید شده است. در ساختمان لیگاز *Tfi*، zinc با استفاده از چهار باقی‌ماندهٔ حفاظت شده سیستئین به صورت لیگاند چهار وجهی در آمده است. موتیف zinc finger، زیر دمینی (۳a) از دمین ۳ لیگاز *Tfi* است. این احتمال وجود دارد که همهٔ لیگازهای وابسته به NAD^+ دارای zinc finger های مشابه باشند. Zinc finger ها و موتیف‌های وابسته به آن‌ها در شناسایی DNA نقش دارند و اغلب توالی‌های خاص DNA را شناسایی می‌کنند (۳۲).

موتیف HhH

Doherty و همکارانش نشان دادند که چهار کپی حفاظت شده از موتیف HhH در C -ترمینال لیگازهای وابسته به NAD^+ حضور دارد. این موتیف حاوی دو هلیکس با طول حفاظت شده است که توسط β-turn نوع ۲ متصل می‌شود. موتیف‌های HhH در تعداد زیادی از آنزیم‌هایی که در ترمیم DNA شرکت می‌کنند حضور دارند، از جمله در آنزیم‌های اندونوکلئوس III، A1kA، MutY، DNA پلی مراز β و RuvA مشاهده می‌شود. اخیراً تعیین ساختار لیگازهای *Tfi* که لیگازهای وابسته به NAD^+ هستند وجود چهار موتیف HhH را در این ساختارها تأیید می‌کند (۳۵-۳۳).

دمین BRCT

اخیراً یک موتیف نهایی در هر دو نوع DNA لیگاز (هم وابسته به ATP و هم وابسته به NAD^+) شناسایی شده است که جزئی از زیر خانوادهٔ دمین BRCT است. دمین‌های BRCT در لیگازهای وابسته به NAD^+ و لیگاز III و IV یوکاریوتی حضور دارند. دمین BRCT اولین بار در ساختمان لیگاز *Tfi* شناسایی شده است و به نظر می‌رسد که بخشی از پروتئین‌های چند دمینی باشد. دمین BRCT لیگاز *Tfi* حاوی چهار β-sheet موازی است که توسط سه α-helix احاطه شده است. این دمین مشابه دمین BRCT در C -ترمینال پروتئین XRCC1 [17] است. XRCC1 یک پروتئین چند دمینی است که در ترمیم شکست‌های تک رشتهٔ DNA نقش دارد. دمین BRCT پروتئین XRCC1 با دمین‌های BRCT در C-ترمینال DNA لیگاز III پستانداران کمپلکس تشکیل می‌دهد. لیگازهایی که در ترمیم DNA نقش دارند از جمله لیگاز IV، با پروتئین XRCC4 که از جمله پروتئین‌های است که در فرایند ترمیم DNA نقش دارد، بر هم‌کنش دارد که این بر هم‌کنش از طریق تکرارهای مکرر موتیف BRCT صورت می‌گیرد. این بر هم‌کنش‌ها به صورت ساختمانی ظاهر می‌شوند و احتمالاً کمپلکس‌های DNA لیگاز نواحی از DNA آسیب دیده را به وسیلهٔ بر هم‌کنش پروتئین -پروتئین به کار می‌گیرند. همچنین ممکن است دمین‌های BRCT باعث انتقال سیگنال‌های پیدا شده در DNA آسیب دیده به دیگر اجزاء مکانیسم‌های ترمیم DNA شود که از طریق بر هم‌کنش‌های پروتئین -پروتئین خاصی صورت می‌گیرد. ساختمان کریستالی لیگاز *Tfi* نشان می‌دهد

[16] Spectroscopy
[17] X-ray repair cross-complementing protein 1

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-08]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.40]

که دمین BRCT در کونفورماسیون باز بسیار متحرک می‌باشد در حالی که این تحرک در کونفورماسیون بسته وجود ندارد (۳۷، ۳۶، ۶).

در لیگاز *Bst*، موقعیت زیر دمین ۱a وابسته به زیردمین ۱b در N -ترمینال است. زیردمین ۱a لیگاز *Bst* با زاویهٔ ۹۰ درجه اطراف Pro68 می‌چرخد که این حالت در لیگاز *Tfi* هم دیده شده است. Lee و همکارانش نشان دادند که زیر دمین ۱a در لیگاز *Tfi* موقعیتی مشابه به لیگاز *Bst* اتخاذ می‌کند و سپس با دمین BRCT بر هم‌کنش می‌دهد. همچنین ممکن است دمین BRCT در حالتی که با helix B در دمین ۱a در تماس است ساختار مارپیچ شکلی را تشکیل می‌دهد (۳۷).

مکانیسم کاتالیتیکی حفاظت شده برای DNA لیگازها و نوکلئوتیدیل ترانسفراز

DNA لیگازها مشابه آنزیم‌های خانوادهٔ نوکلئوتیدیل ترانسفرازها از حد واسطهای کووالان AMP -آنزیم تشکیل شده‌اند که در آن‌ها AMP از طریق لیزین به آنزیم متصل می‌شود. این لیزین قسمتی از موتیف ۱ حفاظت شده است که در آنزیم‌های کلاهک گذار، RNA لیگازها و tRNA لیگازها نیز پیدا شده است.

Shuman و Schwer پیشنهاد کردند که این آنزیم‌ها بخش معمول مکانیسم نوکلئوتیدیل ترانسفرازها هستند و احتمالاً ساختمان‌های مشابهی نیز دارند (۶). این مسئله از طریق آنالیزهای بیوشیمیایی آنزیم‌های موتاسیون یافته نیز تأیید شده است و اخیراً با استفاده از ساختمان DNA لیگاز *T7* و آنزیم‌های کلاهک گذار RNA ویروس *Chlorella* و همینطور دمین ۱ در N -ترمینال لیگاز *Bst* و لیگاز *Tfi* نیز این مسئله تأیید شده است. بررسی موقعیت توالی‌های حفاظت شدهٔ موتیف در ساختمان DNA لیگاز و آنزیم‌های کلاهک گذار نشان داد که این آنزیم‌ها به صورت خوشه اطراف نواحی اتصالی NTP قرار گرفته‌اند، از طرفی فرم جانبی شیار بین دمین I و II را نیز تشکیل می‌دهند. ساختمان کریستالی لیگازهای *Tfi* و *T7* نقش حفاظت شده‌ای را برای تعدادی از این باقی‌مانده‌ها در این موتیف‌ها نشان داده‌اند. بررسی توالی‌های حفاظت شده بین DNA لیگازها و آنزیم‌های کلاهک گذار و جفت شدن این آزمایشات با ساختمان‌های کریستالی اطلاعاتی راجع به چگونگی دست یافتن به نوکلئوتیدهای اختصاصی را نشان می‌دهد (۳۹). دو بر هم‌کنش مهم بین گروه 6-amino حلقهٔ آدنین و لیگازها وجود دارد؛ یکی از طریق زنجیرهٔ اصلی کربونیل I133/H115 و دیگری از طریق زنجیرهٔ جانبی E32/E114 صورت می‌گیرد. باقی‌ماندهٔ آخر معمولاً Glu است ولی گاهی اوقات در لیگازهای وابسته به ATP، Asp یا Gln نیز می‌تواند حضور داشته باشد. اما در مقایسه با این‌ها این باقی‌مانده‌ها در آنزیم‌های کلاهک گذار متنوع هستند اما هیچ گاه Glu، Asp و Gln نیستند (۳۸، ۶).

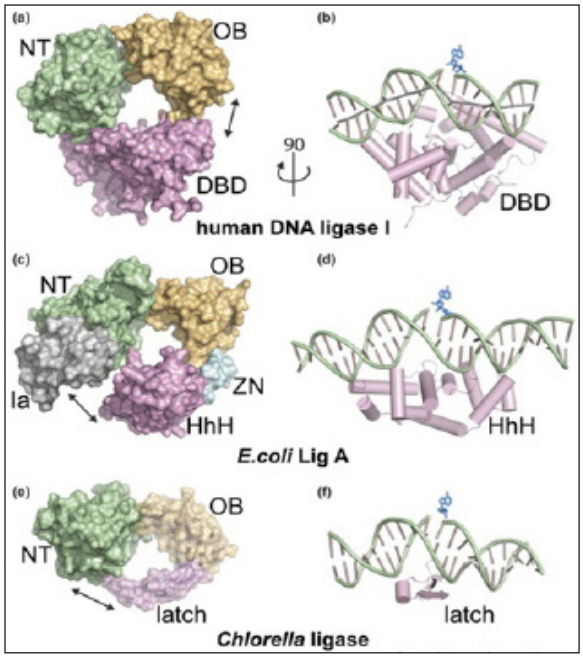
Ho و Shuman پیشنهاد کردند که همهٔ نوکلئوتیدیل ترانسفرازها از یک جد مشترک منشأ گرفته‌اند، و احتمالاً آنزیم‌های متصل کنندهٔ RNA های قدیمی هستند. بیشتر مطالعاتی که بر روی RNA لیگازها صورت گرفته است به RNA لیگاز ۱ در باکتریوفاژ(*T4* Rnl1) متمرکز شده است، که یک خانوادهٔ کوچکی از RNA لیگازها است که در برخی یوکاریوت‌ها و ویروس‌های یوکاریوت تقسیمات نزدیک به هم دارد. اگرچه Rnl1 نمونهٔ ضعیفی برای نوکلئوتیدیل ترانسفرازهای اجدادی است اما بخش کوچکی از توالی‌های آن با DNA لیگازها و آنزیم‌های کلاهک گذار RNA همولوژی دارد و تنها موتیف‌های I، IV، V نوکلئوتیدیل ترانسفرازها محفوظ مانده است. اخیراً نیز RNA لیگاز ۲ (Rnl2)، لیگاز دیگری است که از باکتریوفاژ *T4* به دست آمده است. بر خلاف Rnl1، Rnl2 توالی‌های مشابهی با DNA لیگاز و آنزیم‌های کلاهک گذار RNA دارد که شامل موتیف‌های حفاظت شدهٔ I، III، IIIa، IV، V نوکلئوتیدیل ترانسفرازها است (۳۹، ۶).

نوکلئوتیدیل ترانسفرازها مکانیسم‌های پایه‌ای مشابهی دارند که در مورد RNA لیگاز وقتی شروع می‌شود که مولکول ATP به وسیلهٔ گروه نوکلئوفیل لیزین متصل می‌شود و آدنیلاسیون آنزیم و رها شدن پیروفسفات اتفاق می‌افتد. آنزیم بارگذاری شده سپس نیمی از AMP را به انتهای فسفات ′۵ منتقل می‌کند و پس از آن پیوند فسفو آن هیدرید تشکیل می‌شود (۳۹، ۶).

گیره‌های پروتئینی لیگاز

گیره‌های پروتئینی در طی چندین مکانیسم به وسیلهٔ DNA لیگازها شکل می‌گیرند و با استفاده از دمین‌های مختلف و اجسام ساختمانی که از امتداد یافتن نواحی مختلف NTase و OB به وجود آمده‌اند، DNA را احاطه می‌کنند. در لیگاز *Chlorella*، در حالتی که بست شده است، برآمدگی‌های دمین OB با سوبسترای DNA بر هم‌کنش دارد و دمین OB به دمین NTase متصل شده است. دمین HhH باکتری‌ها از امتداد یافتن C -ترمینال دمین‌های NTase و OB به وجود آمده است، در حالی که DBD یوکاریوت‌ها از امتداد یافتن N -ترمینال دمین‌های NTase و OB به وجود آمده است (۴۱، ۴۰، ۱۸، ۳). در تصویر ۶ گیره‌های پروتئینی DNA لیگازهای مختلف نشان داده شده است. در این تصویر (a) DNA لیگاز ۱ انسان، (c) *E. coli* LigA، (e) لیگاز *Chlorella* پیکان دو سر نشان دهندهٔ نقطه انفصال در گیره‌های لیگاز است. (b) سوبستراهای DNA را در مجاورت DBD لیگاز ۱ انسان نشان می‌دهد. (d) دمین HhH لیگاز A در *E. coli* و (f) قفل شدن لیگاز *Chlorella*.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-08]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.40]



تصویر ۶- گیره‌های پروتئین DNA لیگاز (۳).

واکنش زنجیره‌ای لیگاز (LCR)

واکنش زنجیره‌ای لیگاز (LCR)[18]، یکی از روش‌های گسترش DNA است. در این روش از دو جفت اولیگو نوکلئوتید استفاده می‌شود، که یکی مکمل با رشتهٔ الگو بالا و دیگری مکمل با رشتهٔ الگو پائین است، سپس گروه فسفات ۵′ یک رشته با گروه ۳′ رشتهٔ مجاور با هم جفت می‌شوند. LCR هم در آنزیم‌های DNA پلی مراز و هم DNA لیگاز جهت پیش بردن واکنش استفاده می‌شود. LCR همانند PCR به یک سیکل دمایی جهت پیش رفتن واکنش نیاز دارد. LCR روشی است جهت سنجش و شناسایی موتاسیون‌های تک بازی، با استفاده از روش LCR می‌توان تعداد زیادی از موتاسیون‌های انسانی را شناسایی کرد که از جملهٔ این موتاسیون‌ها بیماری سایکل سل است که در اثر موتاسیون در یک باز از ژن β-globin به وجود می‌آید (۴۲، ۴۳).

کاربرد DNA لیگاز در زیست مولکولی

DNA لیگاز ابزار مناسبی در زیست مولکولی برای تولید DNA های نوترکیب است، برای مثال DNA لیگازها همراه با آنزیم‌های محدود کننده برای انتقال یک قطعهٔ DNA (اغلب ژن) به درون پلاسمید به کار می‌روند. DNA لیگاز در فرایندهای مهم از جمله رونویسی DNA، ترمیم DNA آسیب دیده، نوترکیبی DNA، بازآرایی ژن ایمونوگلوبولین، RNA editing و اتصال قطعات اکازاکی مورد نیاز است (۴۴).

نتیجه‌گیری

DNA لیگازها یک کاندید ایده‌آل برای مطالعات ساختاری همهٔ حد واسطها در مسیر اتصال پایدار هستند. در این مقاله تصاویری از ساختمان DNA لیگازهای وابسته به ATP و NAD^+ و آنزیم‌های وابسته به آن‌ها در کنفورماسیون‌های کاتالیکی مختلف نشان داده شده است که بیانگر نقش این خانواده از آنزیم‌ها در مکانیسم‌های کاتالیزوری حفاظت شده است. با وجود داشتن توالی‌های آمینواسیدی متفاوت، به نظر می‌رسد که DNA لیگازهای وابسته به ATP و NAD^+ هر دو یک هستهٔ ساختمانی مشترکی دارند که مسئول شناسایی شکاف هستند. ساختمان کریستالی نقش کاتالیزوری توالی‌های حفاظت شده را روشن و تأیید می‌کند. آنزیم‌های ویروسی از جمله *T7* و *Chlorella* برخی از خواص کاتالیتیکی لیگازهای باکتریایی و یوکاریوتی را دارا می‌باشند. لیگازهای بزرگ‌تر دومین‌های اضافی دارند که به احتمال زیاد به منظور افزایش خواص معینی از این آنزیم‌ها از جمله اتصال DNA، شناسایی شکاف و هدف قرار دادن آنزیم، همانندسازی و نوترکیبی در ناحیهٔ آسیب دیده DNA می‌باشد. اما این دومین‌های اضافی به نظر نمی‌رسد که مستقیماً در کاتالیز نقش داشته باشند.

منابع

1. International union of biochemistry and molecular biology. www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/.

2. Alan ET, Sangeetha V, John MP, Tom E. DNA ligases: structure, mechanism, and function. Chem Rev. 2006; 106(2): 687-99.

3. John MP. DNA and RNA ligases: structural variations and shared mechanisms. Curr Opin Struc Biol. 2008; 18(1): 96-105.

4. Lehman IR. DNA ligase: structure, mechanism, and function. Science. 1974; 186(4166): 790-7.

5. Shuman S, Lima CD. The polynucleotide ligase and RNA capping enzyme superfamily of covalent nucleotidyltransferase. Curr Opin Struct Biol. 2004; 14(6): 747-64.

6. Aidan JD, Se WS. Structural and mechanistic conservation in DNA ligases. Nucleic Acids Res. 2000; 28(21): 4051-8.

7. Shaun H, Mohinder S, Michael JG. Cloning and expression in E.coli of a synthetic gene for the bacteriocidal protein caltrin/seminalplasmin. Protein Enz. 1987; 5(1): 425-31.

[18] Ligase chain reaction

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.40]

8. Jayakrishnan N, Kiong CH, Christopher DL, Stewart Sh. RNA substrate specificity and structure-guided mutational analysis of bacteriophage t4 rna ligase 2. Gene. 2004; 142: 129-34.

9. Aravind L, Koonin EV. Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches. J Mol Biol. 1999; 287(5): 1023-40.

10. Montecucco A, Fontana M, Focher F, Lestingi M, Spadari S, Ciarrocchi G. Specific inhibition of human DNA ligase adenylation by a distamycin derivative possessing antitumor activity. Nucleic Acids Res. 1991; 19(5): 1067-72.

11. Akey D, Martins A, Aniukwu J, Glickman MS, Shuman S, Berger JM. Crystal structure and nonhomologous end-joining function of the ligase component of Mycobacterium DNA ligase D. J Biol Chem. 2006; 281(19): 13412-23.

12. Pascal JM, Tsodikov OV, Hura GL, Song W, Cotner EA, Classen S, et al. A flexible interface between DNA ligase and PCNA supports conformational switching and efficient ligation of DNA. Mol Cell. 2006; 24(2): 279-91.

13. Odell M, Sriskanda V, Shuman S, Nikolov DB. Crystal structure of eukaryotic DNA ligase-adenylate illuminates the mechanism of nick sensing and strand joining. Moll cell. 2000; 6(5): 1183-93.

14. Sriskanda V, Shuman S. Mutational analysis of Chlorella virus DNA ligase: catalytic roles of domain I and motif VI. Nucleic Acids Res. 1998; 26(20): 4618-25.

15. Sriskanda V, Shuman S. Specificity and fidelity of strand joining by Chlorella virus DNA ligase. Nucleic Acids Res. 1998; 26(15): 3536-41.

16. Gajiwala KS, Pinko C. Structural rearrangement accompanying NAD+ synthesis within a bacterial DNA ligase crystal. Structure. 2004; 12(8): 1449-59.

17. Tomkinson AE, Tappe NJ, Friedberg EC. DNA ligase I from Saccharomyces cerevisiae: physical and biochemical characterization of the CDC9 gene product. Biochemistry. 1992; 31(47): 11762-71.

18. Jeon HJ, Shin HJ, Choi JJ, Hoe HS, Kim HK, Suh SW, et al. Mutational analyses of the thermostable NAD+-dependent DNA ligase from Thermus filiformis. FEMS Microbiol Lett. 2004; 237(1): 111-8.

19. Sriskanda V, Shuman S. Chlorella virus DNA ligase: nick recognition and mutational analysis. Nucleic Acids Res. 1998; 26(2): 525-53.

20. Hakansson K, Doherty AJ, Shuman S, Wigley DB. X-ray crystallography reveals a large conformational change during guanyl transfer by mRNA capping enzymes. Cell. 1997; 89(4): 545-53.

21. Singleton MR, Håkansson K, Timson DJ, Wigley DB. Structure of the adenylation domain of an NAD-dependent DNA ligase. Structure. 1999; 7(1): 35-42.

22. Shuman S, Schwer B. RNA capping enzyme and DNA ligase: a superfamily of covalent nucleotidyl transferases. Mol Microbiol. 1995; 17(3): 405-10.

23. Pascal JM, O'Brien PJ, Tomkinson AE, Ellenberger T. Human DNA ligase I completely encircles and partially unwinds nicked DNA. Nature. 2004; 432(7016): 473-8.

24. Hakansson K, Doherty AJ, Shuman S, Wigley DB. X-ray crystallography reveals a large conformational change during guanyl transfer by mRNA capping enzymes. Cell. 1997; 89(4): 545-53.

25. Tomkinson AE, Tappe NJ, Friedberg EC. DNA ligase I from saccharomyces cerevisiae: physical and biochemical characterization of the CDC9 gene product. Biochemistry. 1992; 31(47): 11762-171.

26. Sriskanda V, Schwer B, Ho CK, Shuman S. Mutational analysis of Escherichia coli DNA ligase identifies amino acids required for nick-ligation in vitro and for in vivo complementation of the growth of yeast cells deleted for CDC9 and LIG4. Nucleic Acids Res. 1999; 27(20): 3953-63.

27. Grawunder U, Zimmer D, Leiber MR. DNA ligase IV binds to XRCC4 via a motif located between rather than within its BRCT domains. Curr Biol. 1998; 8(15): 873-6.

28. Bycroft M, Hubbard JP, Proctor M, Freund MV, Murzin AG. The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. Cell. 1997; 88: 235-42.

29. Horvath MP, Schweiker VL, Bevilacqua JM, Ruggles JA, Schultz SC. Crystal structure of the oxytricha nova telomere end binding protein complexed with single strand DNA. Cell. 1998; 95(7): 963-74.

30. Schindler T, Perl D, Graumann P, Sieber V, Marahiel MA, Schmid FX. Surface-exposed phenylalanines in the RNP1/RNP2 motif stabilize the cold-shock protein CspB from Bacillus subtilis. Proteins. 1998; 30(4): 401-6.

31. Murzin AG. OB (oligonucleotide oligosaccharide binding)-fold-common structural and functional solution for nonhomologous sequences. EMBO J. 1993;

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.40]

12(3): 861-7.

32. Klug A, Schwabe JW. Protein motifs 5. Zinc fingers. FASEB J. 1995; 9(8): 597-604.

33. Rafferty JB, Sedelnikova SE, Hargreaves D, Artymiuk PJ, Baker PJ, Sharples GJ, et al. Crystal structure of DNA recombination protein RuvA and a model for its binding to the holliday junction. Science. 1996; 274: 415-21.

34. Roe SM, Barlow T, Brown T, Oram M, Keeley A, Tsaneva IR, et al. Crystal structure of an octameric RuvA-holliday junction complex. Mol Cell. 1998; 2(3): 361-72.

35. Doherty AJ, Serpell LC, Ponting CP. The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. Nucleic Acids Res. 1996; 24(13): 2488-97.

36. Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald AF, Altschul SF, Koonin EV. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. FASEB J.1997; 11(1): 68-76.

37. Callebaut I, Mornon JP. From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. FEBS let. 1997; 400(1): 25-30.

38. Steitz TA, Smerdon SJ, Jäger J, Joyce CM. A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. Science. 1994; 266(5193): 2022-5.

39. Kletzin A. Molecular characterisation of a DNA ligase gene of the extremely thermophilic archaeon desulfurolobus ambivalens showes close phylogenetic relationship to eukaryotic ligases. Nucl. Acids Res. 1992; 20(20): 5389-96.

40. Nair PA, Nan dJ, Smith P, Odell M, Lima CD, Shuman S. Structural basis for nick recognition by a minimal pluripotent DNA ligase. Nat Struct Mol Biol. 2007; 14(8): 770-8.

41. Nandakuma RJ, Nair PA, Shuman S. Last stop on the road to repair: structure of E. coli DNA ligase bound to nicked DNA- adenylate. Mol Cell. 2007; 26(2): 257-71.

42. Wiedmann M, Wilson WJ, Czajka J, Luo J, Barany F, Batt CA. Ligase chain reaction (LCR) overview and applications. PCR Methods Appl. 1994; 3(4): 51-64.

43. Xiangxian M, Xiaohai Y, Kemin W, Qiuping G, Yongjun T, Qiuhua M, et al. Direct fluorescence detection of point mutations in human genomic DNA using microbead-based ligase chain reaction. Talanta. 2010; 80(5): 1725-9.

44. Rittié L, Perbal B. Enzymes used in molecular biology: a useful guide. J Cell Commun Signal. 2008; 2(1-2): 25-45.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.40]