



PD 15039



003099753

COBISS •

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOSKI FAKULTET, PMF, BEOGRAD

MILORAD O. KOJIC

ANALIZA REGULATORNIH REGIONA I EKSPRESIJA *sgm*
GENA BAKTERIJE *Micromonospora zionensis*

DOKTORSKA DISEPTACIJA

BEOGRAD, 1994.

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOSKI FAKULTET, PMF, BEOGRAD

MILORAD O. KOJIC

ANALIZA REGULATORNIH REGIONA I EKSPRESIJA *sgm*
GENA BAKTERIJE *Micromonospora zionensis*

DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD, 1994.

MENTOR: dr Ljubisa Topisirovic, redovni profesor, Bioloski fakultet, PMF, Beograd.

KOMENTOR: dr Branka Vasiljevic, naucni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i geneticko inzenjerstvo, Beograd.

CLANOVI KOMISIJE: dr Ljubisa Topisirovic, redovni profesor, Bioloski fakultet, PMF, Beograd.

dr Branka Vasiljevic, naucni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i geneticko inzenjerstvo, Beograd.

dr Jelena Knezevic, docent, Bioloski fakultet, PMF, Beograd.

DATUM ODBRANE: _____

DATUM PROMOCIJE: _____

DOKTORAT NAUKA _____

ANALIZA REGULATORNIH REGIONA I EKSPRESIJA *sgm* GENA BAKTERIJE *Micromonospora zionensis*

A P S T R A K T

Proizvodjac aminoglikozidnog antibiotika G-52, *Micromonospora zionensis*, poseduje *sgm* gen koji kodira 16S rRNK metilazu cijom se aktivnoscu ostvaruje rezistencija na 4,6-disupstituisane dezoksistreptaminske aminoglikozide.

Identifikovana su dva promotora uzvodno od kodirajuce sekvence *sgm* gena. Jedan promotor je relativno slab i on otpocinje transkripciju od G nukleotida koji se nalazi 72 bp uzvodno od translacionog start kodona (ATG). Drugi promotor je mnogo jaci i lociran je na vecoj udaljenosti od ATG kodona (~250 nukleotida). Postojanje ovih tandemskih promotora bi moglo da omoguci diferencijalnu gensku ekspresiju pa je postulirana njihova razlicita funkcija kod proizvođača. Tako je predloženo da je slabiji P1 promotor odgovoran za konstitutivnu transkripciju *sgm* gena, dok je P2 zaduzen za ekspresiju nizvodnih (biosintetskih) gena u vreme kada otpocinje sinteza antibiotika. Prema tome, P2 promotor bi mogao biti potencijalno koristan za favorizovanu ekspresiju kloniranih gena u stacionarnoj fazi rasta *micromonospora*.

Konstruisana je serija transkripcionih i translacionih *sgm-lacZ* genskih fuzija na plazmidu pP_L17G. Transkripcija obe vrste fuzija se odvija pod kontrolom snaznog P_L1 promotora, posto promotori *sgm* gena nisu funkcionalni u bakteriji *E. coli*. Nivo ekspresije *lacZ* gena u pojedinim transformantima sa transkripcionim ili translacionim fuzijama odredjivan je merenjem β-galaktozidazne aktivnosti. Transformanti sa translacionom fuzijom koji imaju i ekstra kopiju *sgm* gena bilo u *cis* ili u *trans* poziciji, pokazuju izrazit pad β-galaktozidazne aktivnosti. U slicnim eksperimentima sa transkripcionim fuzijama nije uocen znacajan efekat ekstra kopije *sgm* gena. Ovi rezultati su pokazali da je ekspresija *sgm* gena autoregulisana translacionom represijom, najverovatnije zbog vezivanja metilaze za sopstvenu iRNK.

Ekspresijom *sgm* gena u razlicitim sojevima aktinomiceta utvrdjeno je da je visok nivo rezistencije na higromicin B zaista determinisan *sgm* genom, ali da je ispoljavanje ove rezistencije zavisno od soja u kome se *sgm* gen ekspimira. Ovaj podatak sugerira na zakljucak da ispitivani sojevi *micromonospora* poseduju identican mehanizam rezistencije na higromicin. Iz toga se moze zakljuciti da *micromonospora* najverovatnije poseduju odredjenu specificnost u gradji male subjedinice ribozoma koja je konzervirana medju sojevima ovog roda.

Kljucne reci: *sgm* gen, higromicin B, transkripcija, promotori, translacija, ekspresija gena, *lacZ* fuzije, autoregulacija, *Micromonospora*.

ANALYSIS OF REGULATORY REGIONS AND EXPRESSION OF THE *sgm* GENE FROM *Micromonospora zionensis*

A B S T R A C T

The sisomicin-gentamicin resistance methylase (*sgm*) gene from *Micromonospora zionensis* (producer of G-52 antibiotic), encodes an enzyme that modifies 16S rRNA, and thereby conferring resistance to 4,6-disubstituted deoxystreptamine aminoglycosides.

Two promoters were identified upstream of the *sgm* coding sequence. One promoter (P1) is relatively weak and initiates transcription at the G which is 72 nucleotides upstream of the translational initiation codon (ATG). A second (P2) promoter is much stronger and is located more upstream from the ATG codon (~250 nucleotides). These tandem promoters could enable differential gene expression of the *sgm* gene, and it has been postulated that promoters have specialized functions in the producing organism. The apparent weak P1 promoter is probably responsible for constitutive transcription of the *sgm* gene, whereas the P2 promoter may play a specialized role in expression of the downstream (biosynthetic) genes, during the time that the antibiotic G-52 is produced. Therefore, P2 promoter could be potentially used in expressing cloned genes especially during the stationary growth phase of micromonospora.

A set of transcriptional and translational fusions of the *sgm* gene and the *lacZ* reporter gene have been constructed by using the pP_Lt17G plasmid. Both transcriptional and translational fusions were transcribed under the strong P_Lt1 promoter, since it has been shown that the *sgm* promoters are non-functional in *E. coli*. Transformants harbouring either the transcriptional and translational fusions were assayed for β-galactosidase activity. Translational fusion transformants which also carried an extra copy of *sgm* gene either in *cis* or in *trans* position, exhibited a substantial decrease in β-galactosidase activity. No significant effect was observed in comparable experiments with the transcriptional fusions. These results demonstrate that the expression of the *sgm* gene is regulated by translational autorepression, presumably due to methylase binding to the specific site/s on its own mRNA. The translational repression model is discussed in light of overall control of the *sgm* gene expression.

The expression of the *sgm* gene in various actinomycetes strains revealed that expression of high-level resistance to hygromycin B, determined by *sgm* gene, is background dependent. This evidence suggests that it may well be that all tested micromonospora strains share a common mode of hygromycin B resistance. Factors that might be contributed to background-dependent expression of hygromycin B resistance are discussed.

Key words: *sgm* gene, hygromycin B, transcription, promoters, translation, gene expression, *lacZ* fusions, autogenous regulation, *Micromonospora*.

*Mojim roditeljima, koji su mi dali prve pouke iz
biologije i svima onima koji su na bilo koji
način doprineli mom napretku.*

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, pod neposrednim rukovodstvom dr Ljubise Topisirovica i dr Branke Vasiljevic.

Ovom prilikom zeleo bih da se zahvalim:

Dr Ljubisi Topisirovicu, za pocetno pobudjivanje interesovanja prema znanjima i radu u ovoj oblasti, za poverenje i podsticanje u radu, za korisne diskusije i sugestije. Premda je vrlo zaokupljen mnogobrojnim vlastitim obavezama nalazio je energije i vremena za mnogobrojne diskusije pa cak i za ucesvovanje u pojedinim glomaznim eksperimentima ovog rada. Njegov sud mi je cesto bio vrlo dragocen. Moj napredak u naucnom smislu duguje njemu vise nego sto to mogu reci. Na kraju, dugujem mu zahvalnost sto je i ovoga puta kriticki procitao celokupnu preliminarnu verziju rukopisa i strpljivo korigovao leksicke i druge nepravilnosti.

Dr Branki Vasiljevic, za aktivan i ohrabrujuci interes za ovaj rad, za pomoc u koncipiranju, izmenama i popravkama pisanog dela ovog rada. Posebno bih hteo da naglasim da mi je pomagala i savetom i delom. Nije zalila truda narocito kad mi je licno pomagala u merenju β -gal aktivnosti. Sa velikom paznjom je vise puta citala preliminarnu verziju rukopisa i vrednim kritickim i konstruktivnim sugestijama pridonela njegovom sustinskom i stilistickom poboljsanju. Ona je osoba sa kojom sam najpre delio radost svih nasih otkrica, kao jedinog podsticaja na izdrzljivost u ovom zaista teskom poslu.

Dr Jeleni Knezevic sam zahvalan za prihvatanje uloge clana komisije i svih obaveza koje sa tim idu. Njen lik me prijatno seca na studentske dane kad sam se prvi put sreo sa eksperimentima iz mikrobiologije. Kasnije, dok sam radio diplomski rad, isto sam od nje ucio. Sa osecajem posebne zahvalnosti secam se nje kao deo onih koji su prozivali sve moje pocetnicke greske uz nastojanje da mi prelaz sa knjiskog znanja (gde sve lepo uspeva) na istrazivacko-eksperimentalni rad bude sto bezbolniji.

Mnoge kolege iz struke su mi nesebicno pomagali ne samo savetima; zahvalan sam im na tome. Zahvalan sam i najblizim saradnicima koji su strpljivo i s razumevanjem podnosili moje neumereno eksploatisanje prostora, aparatura i posudja nase laboratorije. Zahvalan sam i na svim nastojanjima da razvijamo radostnu i drugarsku atmosferu. Moram posebno da se zahvalim mom bratu koji je, zalaganjem koje nije uobicajeno, i u laboratoriji i van laboratorije, sa svojom brigom, podrskom i znanjima uvek bio uz mene.

Na kraju, zahvalan sam za pomoc svojim roditeljima, prijateljima, bivsim nastavnicima i drugima koji su na brojne nacine doprineli mom napretku.

SADRZAJ

I UVOD

1.	Regulacija genske ekspresije kod bakterija	1
1.1.	Regulacija genske ekspresije na transkripcionom nivou	2
1. 1. 1.	Regulacija specifičnosti inicijacije transkripcije sigma faktorima	2
1. 1. 2.	Negativna regulacija-represori	4
1. 1. 3.	Pozitivna regulacija-aktivatori	5
1. 1. 4.	Regulacija na nivou elongacije transkripta	6
1. 1. 4. 1.	Transkripciona atenuacija	6
1. 1. 4. 2.	Antiterminacija transkripcije	7
1. 2.	Regulacija genske ekspresije na translacionom nivou	8
1. 2 . 1.	Regulacija proteinskim faktorima	9
1. 2. 2.	Translaciona atenuacija	9
1. 2. 3.	Negativna regulacija genske ekspresije upotrebom antisens RNK	9
1. 2. 4.	Elongacija polipeptida i upotreba kodona	10
1. 3.	Autoregulacija genske ekspresije	11
1. 3. 1.	Autoregulacija na transkripcionom nivou (DNK-vezujući proteini)	11
1. 3. 2.	Autoregulacija na translacionom nivou (RNK-vezujući proteini)	11
1. 3. 3.	Autoregulacija na translacionom i transkripcionom nivou	12
2.	Mehanizmi rezistencije organizama koji proizvode antibiotike na sopstveni toksični proizvod	13
2. 1.	Modifikacija antibiotika kod proizvođača	14
2. 2.	Rezistencija usled promene mesta vezivanja antibiotika	17
2. 2. 1.	Promena neribozomalnih targeta	18
2. 2. 2.	Modifikacija ribozomalnih targeta	18
2. 3.	Specavanje kontakta antibiotika i njegovog targeta	19
3.	Regulacija ekspresije rezistencije kod proizvođača antib.	21

4.	Cilj istraživanja	23
----	-------------------	----

II MATERIJAL I METODE

1.	Eksperimentalni materijal	24
1. 1.	Bioloski materijal-bakterijski sojevi i plazmidi	24
1. 2.	Medijumi za rast bakterija i regeneraciju protoplasta	25
2.	Odredjivanje minimalne inhibitorne koncentracije	25
3.	Metode za izolovanje DNK	25
3. 1.	Mini-metoda izolacije plazmidne DNK iz <i>E. coli</i>	25
3. 2.	Mini-metoda izolacije plazmidne DNK iz streptomiceta	26
3. 3.	Izolovanje plazmidne DNK na velikoj skali	27
4.	Enzimske reakcije sa DNK	27
4. 1.	Digestije DNK restrikcijom enzimima	27
4. 2.	Popunjavanje DNK krajeva Klenow fragmentom	28
4. 3.	Ligiranje DNK	28
5.	Izolovanje ukupne RNK iz streptomiceta i mikromonospora	28
6.	Elektroforeza nukleinskih kiselina	29
6. 1.	Elektroforeza DNK	29
6. 2.	Elektroforeza RNK	29
7.	Elucija DNK fragmenata	30
7. 1.	Elektroelucija DNK fragmenata	30
7. 2.	Elucija DNK fragmenata iz agaroze niske tacke topljenja	30
8.	Transformacija bakterija	31
8. 1.	Transformacija <i>E. coli</i> kompetentnih celija	31
8. 2.	Pripremanje i transformacija <i>S. lividans</i> protoplasta	31
9.	Skvenciranje DNK	32
10.	Odredjivanje starta transkripcije gena ("Primer extension")	33
11.	Test β -galaktozidaze	33

III REZULTATI

1.	Analiza transkripcione regulacije <i>sgm</i> gena	34
1. 1.	Odredjivanje starta transkripcije <i>sgm</i> gena	34
1. 2.	Subkloniranje P1 i P2 promotora	36
1. 3.	Odredjivanje <i>in vivo</i> aktivnosti subkloniranih promotora	38
2.	Konstruisanje <i>lacZ</i> fuzija	39
2. 1.	<i>In vitro</i> konstruisanje <i>sgm-lacZ</i> genske fuzije	39
2. 2.	Ugradnja <i>sgm</i> gena u plazmid pF6	41
2. 3.	Inaktivacija <i>sgm</i> gena u pF6S2	43
2. 4.	Aktivnost β -galaktozidaze u proteinskim fuzijama sa <i>in cis</i> pozicijom <i>sgm</i> gena	43
2. 5.	Konstruisanje operonske <i>sgm-lacZ</i> fuzije sa <i>in cis</i> pozicijom <i>sgm</i> gena	44
2. 6.	Aktivnost β -galaktozidaze u operonskim fuzijama	46
2. 7.	Konstruisanje genskih <i>sgm-lacZ</i> fuzije sa <i>in trans</i> pozicijom <i>sgm</i> gena	47
2. 8.	Aktivnost β -galaktozidaze u proteinskim fuzijama sa <i>in trans</i> pozicijom <i>sgm</i> gena	47
2. 9.	Konstruisanje i karakterizacija F6 genske fuzije sa <i>in cis</i> pozicijom 3'-kraja <i>sgm</i> gena	50
2. 10.	Poredjenje β -galaktozidazne aktivnosti <i>E. coli</i> NM522 sojeva sa pF6 i pF6 Δ S1	52
3.	Rezistencija na higromicin B	52

IV DISKUSIJA

1.	Transkripciona regulacija ekspresije <i>sgm</i> gena	55
2.	Translaciona regulacija ekspresije <i>sgm</i> gena	61
3.	Rezistencija na higromicin B	68

V ZAKLJUCCI

VI LITERATURA

VII DODATAK

I UVOD

1. REGULACIJA GENSKE EKSPRESIJE KOD BAKTERIJA

Bakterije imaju vrlo preciznu regulaciju genske ekspresije. Zahvaljujući tome one predstavljaju izuzetno efikasan i ekonomičan sistem. U bakterijskoj celiji raspoloživa genetička informacija se sastoji od aproksimativno 2500-3000 gena. Međutim, samo mali deo od raspoložive genetičke informacije se eksprimira u svakom trenutku njenog životnog ciklusa. Pojedine vrste poseduju zadivljujuću sposobnost da u minimalnom medijumu sa prostim izvorom ugljenika i jona kroz složene metaboličke puteve sintetisuje oko 20 aminokiselina za proteine, dezoksi i ribonukleotide za sintezu DNK i svih vrsta RNK, različite lipide, polisaharide i sve to u optimalnim količinama i proporcijama koje će celiji omogućiti rast i deobu u relativno kratkom životnom ciklusu. Fluktuacije u spoljashnoj sredini obezbeđuju celiji signale koji u krajnoj konsekvenci vode ka modulaciji genske ekspresije. Tako na primer, promena sastava medijuma biva odmah registrovana što dovodi, u zavisnosti od prisustva ili nedostatka potrebnog jedinjenja, do vrlo brzog prestanka ili aktiviranja sinteze tog jedinjenja u celiji. Ovakva zapanjujuća fleksibilnost celijskog odgovora mikroorganizama, koja sa energetskog stanovista rezultuje u racionalnom metabolizmu, zasnovana je na postojanju preciznih regulatornih mehanizama kojima ekstracelularni signali uz generisanje intracelularnih signala (sekundarnih mesendzera) uticu na ekspresiju ciljnih gena (Botsford and Harman, 1992). Rezultat ovog uticaja je kordinativna sinteza i kvantitativno doziranje odgovarajućih enzima i reprimiranje drugih čije prisustvo nije potrebno u datom momentu, te je sa energetskog stanovista neprihvatljivo za celiju. Pored mehanizama koji funkcionisu na nivou gena i zahtevaju *de novo* sintezu proteina, postoje i oni čija se operativnost ostvaruje interakcijama gotovih celijskih konstituenata (postranskripciona regulacija).

Do pre dvadesetak godina smatralo se da je inicijacija transkripcije jedini korak na kome se donosi odluka da li će se neki gen finalno eksprimirati ili ne. Genetička i biohemijska proučavanja su najpre dovela do otkrića transkripcione kontrole za koju se misli da dominira i kod bakterija i visih organizama i koja izgleda najsvrsishodnija postoje ne dolazi do beskorisnog rasipanja energije. Bile su uspesno proučene i rastumacene osnove regulatornih sistema *lac* i *trp* operona i pokazano je, prema delovanju regulatorne molekule, postojanje negativne i, kasnije utvrđene i prihvacene, pozitivne genske regulacije. Međutim, daljim izučavanjem mnogobrojnih operonskih i genskih sistema različitih bakterija otkriveni su i novi kontrolni mehanizmi fine ekspresije gena. Pokazano je da sve faze genske ekspresije mogu da podležu regulaciji, čak da jedan isti operon može biti istovremeno regulisan na više nivoa ili da jedan te isti korak u ekspresiji gena može biti prostor za delovanje različitih regulatornih molekula. Pored toga, i tvrdnja da su svi regulatorni signali koji kontrolisu



inicijaciju transkripcije bakterijskih gena pozicionirani na 5' kraju datog operona, kako su postulirali pionirski radovi u ovoj oblasti, se pokazalo kao preterano pojednostavljenje (Gralla, 1989). Inicijacioni kontrolni signali su nadjeni unutar gena (intermedijerno), nizvodno ili uzvodno distancirani od gena koga kontrolisu. Najzad, poznato je da proces vezivanja ribozoma za vec sintetisanu iRNK moze biti regulisan, pa cak pojedini autori predviđaju da ce se pokazati kako je translacioni nivo genske regulacije mnogo zastupljeniji nego sto se mislilo. Ovaj tip regulacije bi posebno dolazio do izrazaja u sistemima gde je potrebna brza i vrlo precizna promena u genskoj ekspresiji.

Generalno, genska ekspresija moze biti regulisana na:

- 1) transkripcionim i 2) translacionom nivou.

U ovom uvodnom delu ucinjen je pokusaj da se u osnovnim crtama prezentuju razliciti vidovi regulacije genske ekspresije. Neki modeli regulacije su relevantniji za razumevanje regulacije *sgm* gena i oni su obradjeni sa vise detalja dok su drugi samo spomenuti u cilju kompletiranja slike postojećih mehanizama regulacije genske ekspresije u bakterija.

1. 1 REGULACIJA GENSKE EKSPRESIJE NA TRANSKRIPCIONOM NIVOU

Prvi prirodni korak kojim zapocinje ekspresija gena je proces transkripcije, pa samim tim regulacija ovog procesa predstavlja najlogičnije mesto direkne, efikasne i u mnogim slucajevima bioloski najsvrsishodnije regulacije genske ekspresije. Selektivna kontrola genske ekspresije ostvaruje se kako na nivou inicijacije transkripcije tako i u kasnijim dogadjajima transkripcionog procesa i ukljucuje:

1. modulaciju inicijacije transkripcije u zavisnosti od dostupnosti odgovarajucih sigma faktora RNK polimeraze,
2. inhibiciju inicijacije transkripcije vezivanjem represora za operator (negativna regulacija),
3. stimulaciju inicijacije transkripcije vezivanjem aktivatora (pozitivna regulacija),
4. kontrolu elongacije.

1. 1. 1. Regulacija specificnosti inicijacije transkripcije sigma faktorima

Jezgro RNK polimeraze ima vrlo visok afinitet za DNK. Sigma subjedinica holoenzima smanjuje njegov generalni afinitet za DNK, ali povecava afinitet vezivanja za specificne, promotorske sekvence. Dakle sigma subjedinica vrši kontrolu promotorske specificnosti i prema tome mesto odakle transkript odpocinje. Dugo se smatralo da je σ^{70} -holoenzim RNK polimeraza odgovorna za sve transkripcije kod *E. coli*. Kasnija istrazivanja su pokazala da je σ^{70} -holoenzim u stvari samo predominantna forma RNK polimeraze i da kod gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija, postoje alternativne σ -subjedinice koje odredjuju specificnost RNK polimeraze za

promotore određenih gena. Tako, tek postoje otkriveni alternativni sigma faktori kod Gram-pozitivnih bakterija, (σ -faktor neophodan za sporulaciju kod *B. subtilis*), pokazano je da i kod *E. coli* postoji grupa gena koja se ne transkribuje pod normalnim uslovima, već samo u prisustvu posebnog proteina, produkta *htrR* (*rpoH*) gena iz "heat-shock" regulona. Za ovaj protein je pokazano da funkcioniše kao sigma faktor koji diktira sintezu iRNK samo sa specifičnih promotora i to u uslovima toplotnog stresa (Grossman *et al.* 1984). Ovaj sigma faktor označen kao σ^{32} (molekulske mase 32 kDa) je minorni protein i zadužen je za striktno delovanje na "heat-shock", a ne i na "standardnim" promotorima.

Kontrola gena koji su uključeni u asimilaciju i metabolizam azota vrši se drugim tipom sigma faktora (σ^{54}) koji je kodiran *ntrA* genom (Hirschman *et al.* 1985). Kasnije je utvrđeno da je σ^{54} -holoenzim prisutan kod većeg broja eubakterija i da učestvuje u ekspresiji gena čiji produkti imaju različitu fiziološku ulogu, odnosno ne jedinstvenu kao što je slučaj kod temperaturnog stresa (Kustu *et al.* 1989). Karakteristično je da inicijacija transkripcije sa σ^{54} -zavisnih gena zahteva i aktivatorni protein. Za veći broj ovih gena je pokazano da je zatvoreni kompleks σ^{54} -holoenzima i promotora neproduktivan bez delovanja aktivatora koji katalizuje izomerizaciju zatvorenog kompleksa u transkripciono aktivan otvoreni kompleks (Kustu *et al.* 1989; Kustu *et al.* 1991). Konzistentno sa ovim činjenicama je i podatak da σ^{54} -faktor nije homolog familiji σ^{70} -faktora, već se pretpostavlja da ima vrlo različitu domensku strukturu (Sasse-Dwight and Gralla, 1990).

Molekularni mehanizmi odgovorni za vijabilnost, metaboličku aktivnost i ekspresiju rastuće rezistencije na različite sredinske stresove posle ekspanzionalnog rasta nesporulisucih Gram-negativnih bakterija i ulaska u stacionarnu fazu, uključuju indukciju najmanje jednog regulona koji je definisan genima čija je ekspresija zavisna od sigma σ^S faktora (Lange and Hengge-Aronis, 1991; Hengge-Aronis, 1993). Ovaj σ -faktor je determinisan *rpoS* (*katF*) genom. Indikativno je da je svojom sekvencom σ^S faktor srodniji vegetativnim σ -faktorima nego alternativnima (Lonetto *et al.* 1992). Dedukovana amino kiselinska sekvenca produkta ovog gena pokazuje impresivnu homologiju (85%) sa σ^{70} -subjedinicom uključujući segment koji učestvuje u prepoznavanju jezgra RNK polimeraze (Mulvey and Loewen, 1989). Intenzivnim proučavanjima se utvrđuje da broj gena koji cine *rpoS* regulon rapidno raste (Hengge-Aronis, 1993). Sasvim je moguće da postoje i neki još neotkriveni geni *E. coli* koji podležu kontroli ovim ili čak i novim sigma faktorima.

Što se tiče aktinomiceta kod njih je utvrđeno prisustvo još većeg broja različitih sigma faktora što je u korelaciji sa njihovim kompleksnijim životnim ciklusom koji uključuje izraženu morfološku diferencijaciju i produkciju sekundarnih metabolita. Najmanje sedam različitih holoenzima RNK polimeraze je detektovano kod streptomiceta (Buttner 1989), što sugerira da različite sigma subjedinice zaista igraju aktivnu ulogu u regulaciji genske ekspresije ovih kompleksnih mikroorganizama. Svaki od ovih σ -faktora se može vezivati za jezgro RNK polimeraze čime se determinise njen afinitet za određeni set promotora. Na taj način vremenski različito ekspimirani sigma faktori omogućuju sintezu iRNK specifičnih za određene stadijume diferencijacije. Pokazano je da je

sporulacija kod *S. coelicolor* A3(2) esencijalno povezana sa pojavom nove sigma subjedinice RNK polimeraze koja je kodirana *whiG* genom (Chater *et al.* 1989). Ovaj sigma faktor je nebitan za vegetativni rast hifa, ali je neophodan vec u prvim stadijumima formiranja spora u vazdusnom micelijumu. Povecanje broja kopija ovog gena dovodi do sporogeneze cak i u vegetativnim hifama koje su inace normalno predeterminisane da budu lizirane (Chater *et al.* 1989). Pored *whiG* gena ova bakterija sadrzi najmanje jos cetiri gena (*hrdA*, *hrdB*, *hrdC*, *hrdD*) koji kodiraju 4 razlicite sigma subjedinice, a koje su sve po aminokiselinskoj sekvenci homologe produktu *rpoD* gena *E. coli* (Tanaka *et al.* 1988; Buttner 1989; Shiina *et al.* 1992; Tanaka *et al.* 1991). Iako su svi eubakterijski sigma faktori medjusobno homologi (sa jasnim izuzetkom σ^{54}) stepen slicnosti izmedju dedukovane aminokiselinske sekvence *hrd* genskih produkata i produkta *rpoD* gena *E. coli* daleko nadmasuje medjusobnu homologiju sigma faktora za razlicite promotorske klase. Za sada je najbolje okarakterisana priroda i fizioloska uloga *hrdB* gena. Eksperimentima sa inaktivacijom ovoga gena pokazano je da je njegov produkt esencijalan za prezivljavanje (Buttner *et al.* 1990). Nasuprot tome *hrdA*, *hrdC* i *hrdD* mogu biti inaktivirani (zasebno ili skupno) bez ikakvih ociglednih fenotipskih konsekvenci (Buttner *et al.* 1990; Buttner and Lewis 1992). Produkt *hrdB* gena (66kDa) je najzastupljeniji sigma faktor asociran za jezgro RNK polimeraze izolovane iz logaritamske faze rasta bakterija (Brown *et al.* 1992). Rekonstruisana RNK polimeraza koja sadrzi ovaj sigma faktor ima specificnost za promotore streptomiceta koji mogu da se ekspimiraju u *E. coli*. Sve ove cinjenice sugeriraju da je σ^{hrdB} funkcionalni homolog σ^{70} bakterije *E. coli* (Brown *et al.* 1992).

Priroda ostala tri *hrd* gena i moguće uloge koje njihovi produkti igraju u okviru fizioloskih i/ili razvojnih procesa ostaju za sada nepoznate.

Na kraju treba pomenuti da je eksperimentalno pokazana diferencijalna ekspresija σ faktora u korelaciji sa razvojnim stadijumima aktinomiceta (Lin and Rothstein 1992; Kormanec and Farkasovsky 1993).

1. 1. 2. Negativna regulacija-represori

Negativna regulacija podrazumeva prisustvo i delovanje nekog faktora, najcesce regulatornog molekula (represor) koji smanjuje aktivnost promotora. Ovo je prvi od mehanizama regulacije koji je otkriven. Represori su proteinski regulatori koji se vezuju za DNK sekvence (operator) i ometaju ili sprecajavu interakciju RNK polimeraze i doticnog promotora. Polozaj operatora u odnosu na promotor cija je transkripcija regulisana odredjenim represorom moze biti razlicit i uglavnom predodredjuje mehanizam delovanja represora i specifican korak u inicijaciji transkripcije koji dati represor modulira. Vecina mesta za vezivanje represora su locirana izmedju -40 i +1 u odnosu na mesto odpocinjanja transkripcije (Collado-vides *et al.* 1991). Ovo deluje logicno posto represor mora da kompetira za vezivanje sa RNK polimerazom. Najilustrativniji je primer *lexA* represora koji interaguje sa operatorima citavog seta promotora SOS regulona vezujuci se na razlicitim pozicijama u okviru njih. To se za razlicite gene desava od polozaja uzvodno od -35 pa sve do mesta cak nizvodno od tacke otpocinjanja transkripcije, ali istovremeno preklapajuci to mesto (Hoopes and McClure 1987).

Da bi bila fizioloski efikasna, funkcija represora mora biti podložna modulaciji. Mnogi represori su alosterični proteini koji u prisustvu ili odsustvu indukujuće molekule zauzimaju različite konformacije, a čime se obezbeđuje nizak ili visok afinitet vezivanja za sopstvene operatore. Regulatori mogu takodje biti kovalentno modifikovani. Članovi regulatorne superfamilije za PhoB/OmpR odgovor, koja uključuje represore i aktivatore konvertuju se od aktivne u neaktivnu formu reverzibilnom fosforilacijom (Stock *et al.* 1989). Još drastičniju modifikaciju prezivljava LexA represor koji se ireverzibilno proteolitički hidrolizuje u blizini središnjeg dela proteina (Brent and Ptashne, 1981; Horii *et al.* 1981). Za ovu proteolizu je odgovoran reverzibilno aktiviran RecA protein.

Veliki broj DNK vezujućih proteina (represori i aktivatori) pokazuju amino kiselinu homologiju u domenu koji je odgovoran za prepoznavanje DNK. To prepoznavanje se ostvaruje strukturnim arazmanom nazvanim "helix-turn-helix" motiv.

U određenim slučajevima čak i sama RNK polimeraza može da odigra ulogu represora na promotoru preferencijalnim vezivanjem za jedan od preklapajućih promotora (Goodrich and McClure, 1991). Blisko locirani promotori mogu biti aranzirani u tri orijentacije: tandemske (transkribuju isti gen ili operon), divergentne (suprotne su orijentacije i transkribuju dva različita gena) i konvergentne (transkribuju oba lanca istog regiona DNK) (McClure, 1985). Do danas su kompetirajući promotori nadjeni samo u tandemske i divergentne orijentacije (Goodrich and McClure, 1991). Primer kompeticije dva tandemska preklapajuća promotora za istu RNK polimerazu nalazi se u galaktoznom operonu *E. coli*. Divergentni kompetitivni promotori su otkriveni u *imm1* (immunity) regionu bakteriofaga P22 (Sauer *et al.* 1983) i kod *merR/merTPAD* sistema odgovornog za rezistenciju na jone zive (O'Halloran *et al.* 1989). Treba napomenuti da je *in vivo* situacija takva da je kompeticija ovih proteina za RNK polimerazu modulirana dodatnim faktorima (Goodrich and McClure, 1991).

Metilacija adenina u okviru specifične sekvence na DNK takodje može da bude uključena u negativnu kontrolu transkripcije. Time se postiže konstantno smanjenje ekspresije gena čiji su produkti štetni za ćeliju kada se nalaze u većem broju kopija. Tipični primeri su regulacija IS10 transpozaze Tn10 transpozona (ima mesto za *dam* metilaciju u -10 regionu promotora) i ekspresija *dnaA* gena (poseduje dva mesta *dam* metilacije u okviru -35 regiona (Roberts *et al.* 1985; Braun and Wright, 1986). Ekspresija prvog gena je 10-300 puta, a drugog 2-3 puta veća u *dam*⁻ soju. Ukoliko se pretpostavi da i hemimetilovana DNK (novosintetisana) ima dereprimiranu inicijaciju transkripcije u odnosu na potpuno metilovanu DNK, metilacija se može posmatrati kao mehanizam koji omogućava da se ekspresija specifičnih gena efikasno vremenski regulise, odnosno koordinise sa replikacijom ili sintezom vezanom za reparaciju DNK.

1. 1. 3. Pozitivna regulacija-aktivatori

U nekim genskim/operonskim sistemima samo postojanje promotorske sekvence nije dovoljno da rezultira u efikasnoj inicijaciji transkripcije. Postoji zahtev za dodatnim faktorima koji će omogućiti ili

stimulisati produktivno vezivanje RNK polimeraze za promotor. Dakle, o pozitivno kontrolisanoj inicijaciji transkripcije govorimo kada je potrebno ucesce proteinskog faktora (aktivatora) koji ili nije uvek prisutan, ili nije uvek aktivan (Raibaud and Schwattz, 1984).

Aktivatori mogu biti: a) pomocni faktori koji daju mogucnost RNK polimerazi da inicira transkripciju sa specificnog promotora; b) σ -faktori koji se vezuju za RNK polimerazu i menjaju njenu specificnost u prepoznavanju promotora.

Za vecinu pozitivno regulisanih promotora Gram-negativnih bakterija i njihovih bakteriofaga, zakljuceno je poredjenjem njihovih sekvenci da se signifikantno razlikuju od konsenzus sekvence za tipicne promotore. Ova cinjenica se smatra kao dovoljno objasnjenje zasto su ovi promotori slabo prepoznatljivi od strane same RNK polimeraze. Razlike su najizrazenije u -35 regionu i za prvi T nukleotid u konsenzusu TATAAT, - 10 regiona (Raibaud and Schwattz, 1984). Treba napomenuti da je stimulaciju inicijacije transkripcije ponekad, na genetickom nivou vrlo tesko razlikovati od fenomena antiterminacije transkripcije. Zato je sasvim moguće da se za pojedine genske sisteme, za koje se smatra da su pozitivno regulisani na kraju ipak utvrdi da se radilo o antiterminaciji.

1. 1. 4. Regulacija na nivou elongacije transkripta.

Inicijacija transkripcije se završava formiranjem otvorenog kompleksa DNK-RNK polimeraze, u okviru koga je parcijalno denaturisani region DNK od oko 12 bp duzine. Zatim sledi faza formiranja ternarnog kompleksa (DNK+RNK+prva dva nukleotida povezana fosfodiestarskom vezom). Ovaj kompleks je nestabilan, ali nakon sto se polimerizacija nastavi, odnosno posto nascentni transkript dostigne duzinu od 8 ili 9 nukleotida iz transkripcionog kompleksa se odbacuje sigma faktor i gubi se tendencija RNK polimeraze da prekine transkripciju. Time se uspostavlja stabilna elongacija RNK lanca. Sto se tice kontrolnih mehanizama koji su povezani sa ovim nivoom ekspresije geneticke informacije opisana su dva glavna regulatorna mehanizma: 1) transkripciona atenuacija i 2) anti-terminacija transkripcije.

1. 1. 4. 1. Transkripciona atenuacija

Veci broj biosintetskih operona je regulisan transkripcionom atenuacijom (Yanofsky and Kolter 1982). Regulacija je zasnovana na postojanju lider sekvence koja se nalazi na 5' kraju iRNK i ima 3 specificne karakteristike. Prvo, moze da formira vise alternativnih sekundarnih struktura tipa ukosnice od kojih je jedna moze da bude transkripcioni terminator. Drugo, formiranje medjusobno iskljucujucih sruktura u okviru lider sekvence zavisi od progresije ribozoma duz kodirajuće sekvence lider peptida. Treće, nukleotidna sekvenca koja kodira lider peptid je karakteristicna po postojanju dva ili vise uzastopnih kodona za amino kiselinu ciji se operon regulise. Kada u celiji postoji oskudica molekula

odgovarajuće amino kiseline, ribozom prekida sintezu lider peptida čime dovodi do linearizacije odredjenih sekvenci. Na taj način dolazi do pregrupisanja petlji i formiranja sekundarne strukture lider regiona bez transkripcionog terminatora (transkripciono aktivna konformacija). Ako sa druge strane, postoji dovoljna količina molekula amino kiseline, sinteza lider peptida se kompletira, što favorizuje stvaranje terminatora i prekid transkripcije na kraju lider sekvence.

Nedavno je otkriveno da je ovaj način regulacije zastupljen i kod *ermK* gena (gen za 23S rRNK metiltransferazu iz bakterije *Bacillus licheniformis*) (Kwak *et al.* 1991). "Northern" analizom i mapiranjem transkripcije reverznom transkriptazom (uz upotrebu oligonukleotida koji je komplementaran sekvenci gena nizvodno od lider regiona) je pokazano da je sinteza celokupne iRNK za ovu metilazu zavisna od rasta celija u prisustvu eritromicina. Ovo je interesantan primer jer je poznato da su svi do sada proučene *erm* geni regulisani translacionom atenuacijom (videti kasnije).

Može se argumentisati da je transkripciona i translaciona atenuacija preferencijalno prilagodjena odredjenim klasama gena. Geni koji su regulisani translacionom atenuacijom (uglavnom geni za rezistenciju na antibiotike) se transkribuju i u odsustvu indukcije i prema tome su u slučaju potrebe sposobni za brzu aktivaciju. Nasuprot tome geni čija je ekspresija regulisana transkripcionom atenuacijom (kao što je slučaj sa operonima za biosintezu amino kiselina) imaju abortivnu transkripciju, pa sledstveno tome se aktiviraju sporije. U ovom svetlu preferencijalna upotreba jednog ili drugog modela regulacije može se objasniti razlikom u relativnoj opasnosti koju predstavlja prisustvo toksičnog metabolita (antibiotika) ili postepeno smanjenje koncentracije amino kiseline. Pored toga sinteza celokupne (neaktivne) iRNK je manje prihvatljivo za biosintetske gene zbog toga što su oni organizovani u operone, dok se kod gena za rezistenciju radi o jednom genu.

1. 1. 4. 2. Antiterminacija transkripcije

Dobro izučeni antiterminacioni sistem je *bglGFB* operon *E. coli* koji je uključen u metabolizam aromatičnih β -glukozida. Transkripcija sa *bgl* promotora u odsustvu inducera, u većini slučajeva terminira na p -nezavisnom terminatoru koji je lociran u lider sekvenci neposredno ispred prvog gena (*bglG*). Drugi terminator se nalazi u intercistronskom regionu između prvog i drugog gena, odnosno ova dva terminatora uokviruju *bglG* gen (Mahadevan and Wright, 1987; Schnetz *et al.* 1987). BglG protein vrši antiterminaciju na oba ova mesta, a ova antiterminacija transkripcije je kontrolisana produktom *bglF*, koji igra direktnu ulogu u unosu β -glukozida u celiju (Mahadevan and Wright, 1987; Schnetz and Rak, 1988). U odsustvu β -glukozida u celiji, dolazi do vrlo niske produkcije BglG i BglF genskih produkata. Pod ovim uslovima BglF funkcioniše kao negativni regulator ekspresije operona tako što fosforilise BglG (Amster-Choder *et al.* 1989) čineći ga tako neaktivnim u antiterminaciji. U prisustvu β -glukozida BglF defosforilise BglG i tako ga osposobljava za funkciju antiterminatora (Amster-Choder *et al.* 1989; Schnetz and Rak, 1988). Dalje je pokazano da je RNK-vezujući BglG protein prepoznaje sekvencu u prednjem delu oba terminatora (Houman *et al.* 1990).



Mutagenezom je pokazano da BglG prepoznaje sekundarnu strukturu koja se formira na nascentnom lancu RNK, cime blokira formiranje terminatora i spreca terminaciju transkripcije.

Protein N λ -bakteriofaga je takodje antiterminacioni faktor. On promovise formiranje ribonukleoproteinskog kompleksa sastavljenog od N i nekoliko celijskih proteina (najvazniji je NusA) asebliranih oko specificne sekundarne strukture iRNK, omogucavajući RNK polimerazi da ignorise multipne terminatore (Roberts, 1988; Lazinski *et al.* 1989). U ovom procesu je esencijalan NusA protein koji i sam ima sposobnost da vezan za RNK polimerazu u procesu elongacije vrsi prolongiranje njenog zastoja na mestima gde nascentni lanac RNK formira sekundarne strukture (petlju, ukosnicu) i u zavisnosti od sistema vrsi povecanje ili smanjenje terminacije (Roberts, 1988).

Pokazano je da i sami ribozomi mogu da funkcionisu kao transkripcioni antiterminatori (Roland, *et al.* 1988). *E. coli*, *pyrBI* operon kodira kataliticku (*pyrB*) i regulatornu (*pyrI*) subjedinicu aspartat karboksilaze (enzim koji ucestvuje u biosintezi pirimidina). Ekspresija ovog operona je negativno regulisana prisustvom pirimidina. Ovaj operon ima UTP-senzitivan atenuator, koji je ρ -nezavisan i lociran 23 bp ispred *pyrB* strukturnog gena. Nizak nivo UTP-a u celiji uzrokuje zastoj RNK polimeraze na UTP-senzitivnom mestu (uridinom bogato mesto u lider sekvenci) koje predhodi atenuatoru (Navre and Schachman, 1983; Roland *et al.* 1985). Ovaj zastoj omogucava ribozomima da iniciraju translaciju lider peptida i da sustignu zastalu transkripciju. Ako je RNK polimeraza vec transkribovala terminatorsku sekvencu ribozomi sprecajaju formiranje terminatorske petlje, cime se omogucava RNK polimerazi da nastavi elongaciju kroz strukturne gene (Roland *et al.* 1988). Kada je, s druge strane, nivo UTP-a u celiji visok ne dolazi do zastoja u transkripciji, a bez tog zastoja ribozomi ne mogu da sustignu transkripciju i sprece formiranje terminatora.

Dakle, s jedne strane postoje proteini koji moduliraju terminacioni dogadjaj direktnom interakcijom sa RNK polimerazom, dok drugi proteini i sami ribozomi ispoljavaju svoj efekat na terminaciju tako sto uticu na formiranje sekundarnih struktura u okviru nascentnog lanca iRNK.

1. 2. REGULACIJA GENSKE EKSPRESIJE NA TRANSLACIONOM NIVOU

Proces sinteze proteina je kod prokariota direktno povezan sa transkripcijom. Ovaj proces moze biti regulisan na razlicitim nivoima i na razlicite nacine. Najcesce je to inicijacija translacije, ali u nekim slucajevima to moze biti i elongacija (upotrebom retkih kodona u specificnom sistemu, zdruzena translacija i dr.).

Konrola inicijacije translacije moze biti modulirana na tri glavna nacina: 1) proteinskim faktorom, 2) translacionom atenuacijom i 3) anti-sens RNK.

1. 2. 1. Regulacija proteinskim faktorima.

Postoji dosta primera gde proteinski faktori regulisu proces translacije. Radi se uglavnom o negativno delujucim proteinima koji vrse translacionu regulaciju sopstvene sinteze. Nacin njihovog delovanja bice opisan u poglavlju o autoregulaciji genske ekspresije.

1. 2. 2. Translaciona atenuacija.

Bez sumnje je prihvaceno da mesto vezivanja ribozoma (RBS), njegova sekvenca i pozicija ispred start kodona gena koji ce biti transliran, igra glavnu ulogu u determinaciji nivoa sinteze proteina. Medjutim, mesto vezivanja ribozoma moze biti "zarobljeno" u okviru sekundarne strukture koju formira jednolancana molekula iRNK. U takvim slucajevima inicijacija translacije je neostvariva bez konformacione promene u iRNK. Najcesce progresija ribozoma duz kratke uzvodne kodirajuce sekvence je povezana sa kontrolnim signalom koji modulira ekspresiju. Primeri za ovaj tip regulacije su geni za rezistenciju na antibiotike. (Horinouchi and Weisblum 1981; Kamimiya and Weisblum 1988; Mayford and Weisblum 1989; Lovett, 1990; Hue and Bechhofer 1992).

Sekvenca analiza ovih gena je pokazala da iRNK ima specificnu strukturu koja joj omogucuje da zauzima alternativne konformacije i da genu za rezistenciju predhodi kodirajuca sekvenca lider peptida. "Reprimirana" konformacija, pri kojoj se neometano sintetise lider peptid, sprecava inicijaciju sinteze proteina usled nedostupnosti RBS-a smestenog u okviru sekundarne strukture koja se ovakvom situacijom favorizuje. Medjutim, kada se doda antibiotik (ili pocne njegova autogena sinteza kod proizvođača antibiotika) dolazi do blokiranja progresije ribozoma duz lider sekvence sto dovodi do konformacione promene u strukturi iRNK cime se eksponira RBS ovih gena i vrsi sinteza njegovog produkta.

1. 2. 3. Negativna regulacija genske ekspresije upotrebom antisens RNK

Relativno nedavno je otkriveno da je komplementarna RNK sposobna da modulira ekspresiju pojedinih gena. Ovo je prvenstveno pokazano za gene koji su vezani za ekstrahromozomske elemente (plazmide, fage). Pokazano je da antisens RNK (RNK suprotnog smera ili komplementarne inhibitorne RNK) moze da funkcioniše kao prirodni represor na translacionom nivou. Poznat primer ovog modela regulacije je opisan za Tn10 transpozazu, u *E.coli*.

Translacija *E.coli* Tn10 transpozaze je inhibirana sa antisens RNK (RNK-OUT), koja je komplementarna 5' kraju RNK za transpozazu (RNK-IN). Znacaj ove kontrole, preko difuzibilne antisens RNK se povecava sa porastom broja kopija transpozona. Tako je ovaj fenomen odgovoran za sprecavanje nagomilavanja mobilnih elemenata iznad nivoa koji bi bio poguban za celiju.

1. 2. 4. Elongacija polipeptida i upotreba kodona

Vec je naglaseno da predominantnu ulogu u determinaciji nivoa sinteze proteina igra sekvenca i pozicija mesta vezivanja ribozoma za iRNK. Medjutim, analiza DNK sekvenci velikog broja gena pokazala je da se u njihovim kodirajucim regionima alternativni kodoni za iste aminokiseline ne javljaju sa istom, uniformnom ucestaloscju. Za nekoliko organizama je pokazano da postoji korelacija izmedju stepena upotrebe kodona i nivoa ekspresije gena (de Boer and Kastelein 1986). Visoko ekspimirani geni selektivno koriste one kodone koji se citaju sa najucestalijom tRNK. Ovde se postavlja vrlo vazno diskutabilno pitanje, da li su minorne tRNK limitirajuce za sintezu proteina zbog obaranja brzine elongacije polipeptidnog lanca? Ako je tako, onda bi upotreba retkih kodona bila odgovorna za nivo, a time i za regulaciju, ekspresije odredenog gena.

Pokazano je da translacija nije uniforman proces, u smislu da ribozomi ne transliraju sve kodone istim tempom (Varenne *et al.* 1984; Pedersen 1984). Lokacija zastoja je u gruboj korelaciji sa pozicijom kodona koji se dekodiraju nisko zastupljenim tRNK (Varenne *et al.* 1984). Pored toga, retko upotrebljavani kodoni CUA (Leu) i AGG (Arg) izgleda da se transliraju daleko sporije nego zastupljeniji sinonimni kodoni CUG i CGU (Bonekamp *et al.* 1985; Carter *et al.* 1986; Harms and Umbarger 1987). Ovi rezultati ukazuju da preferencija odredenih kodona moze imati regulatornu ulogu. Izgleda sasvim logicno da bi trebalo da postoji mehanizam koji bi omogucavao razlicit tempo citanja duz policistranske RNK. Iako je ocigledno da je koordinisana pojava biohemijski povezanih enzima velika prednost za celiju, ipak ne postoji definitivni razlog zasto bi bili produkovani u ekvimolarnom odnosu.

Kod *Streptomyces* sp. je karakteristicna povezanost upotrebe retkih kodona sa ekspresijom gena koji su neophodni u procesu diferencijacije (Leskiw *et al.* 1991a). Naime, sve do nedavno relativno mala paznja je bila obracana na regulatorne mehanizme diferencijacije, a koji operisu na translacionom nivou. Analiziranje sekvenci gena streptomiceta pokazalo je da su geni sa TTA kodonom (za leucin) vrlo retki i da su uglavnom prisutni u sekvenci gena koji kodiraju proteine neophodne za vreme morfoloske i fizioloske diferencijacije ovih bakterija. Tako, mutacija u *bldA*, strukturnom genu za tRNK_{TTA}, ne retardira vegetativni rast, ali sprecava normalno formiranje arealnog micelijuma i proizvodnju antibiotika. Geni koji sadrze TTA kodon su ili regulatorni ili geni za rezistenciju. Ukoliko se ovi geni mutiraju tako da se TTA izmeni u druge kodone za leucin, dolazi do *bldA*-nezavisne ekspresije (Leskiw *et al.* 1991b; Fernandez-Moreno *et al.* 1991). Inicijacija biosinteze aktinorodina preko transkripcionog aktivatora (*actII-orf4*) i finalni korak njegove produkcije (eksport), su determinisani genima koji sadrze TTA i preko njih *bldA* vrsi vremenski regulisanu kontrolu sinteze ovog antibiotika (Fernandez-Moreno *et al.* 1991). Nedavno je pokazano da se rapidna akumulacija procesovane tRNK_{TTA} vrsi u kasnijim fazama rasta kulture (Leskiw *et al.* 1993). Prema tome kodon moze igrati ulogu u regulaciji procesa diferencijacije.

1. 3. AUTOREGULACIJA GENSKE EKSPRESIJE

Pod autoregulacijom se podrazumeva regulacija ekspresije nekog gena njegovim produktom. Prema tome autoregulisani proteini kontrolisu nivo sopstvene sinteze. Ekspresija autoregulisanih gena nije proporcionalna broju njihovih kopija po celiji niti snazi promotora pod kojim se oni eksprimiraju. Autoregulacija se moze ostvarivati na transkripcionom, translacionom ili na oba nivoa.

1. 3. 1. Autoregulacija na transkripcionom nivou (DNK-vezujuci proteini)

Geni za mnoge transkripcione faktore i prokariota i eukariota su autoregulisani. Paradigma za ovaj tip regulacije je autoregulacija sinteze λ represora. U zavisnosti od kolicine ovog represora on deluje kao pozitivni regulator (vezujuci se za O_{R2} stimulise vezivanje RNK polimeraze i transkripciju cl gena) ili kao represor sopstvene sinteze (kada je prisutna tolika kolicina cl proteina da popunjava i O_{R3}). Na taj nacin se vrlo precizno dozira kolicina cl represora u celiji. Zahvaljujuci ovom finom mehanizmu regulacije njegova koncentracija fluktuirala izmedju dovoljne za sprecavanje indukcije profaga za vreme normalnog rasta, i nesuvisne koja bi onemogucila rapidnu indukciju u odgovarajucim uslovima.

Autoregulacija ovog tipa je utvrdjena za jos nekoliko DNK-vezujucih proteina medju kojima su *E. coli* Arg represor, Trp represor, Met represor, Pur represor, Cyt represor, protein za terminaciju replikacije i dr. (Maloy and Stewart 1993).

1. 3. 2. Autoregulacija na translacionom nivou (RNK-vezujuci proteini).

Geni koji imaju ovaj modus autoregulacije kontrolisu nivo sopstvene sinteze represijom translacije putem vezivanja vec sintetisanog produkta za sopstvenu iRNK. Ovo su uglavnom geni koji svoju funkciju ispunjavaju preko produkata koji prepoznaju rRNK ili tRNK. Medju gene koji vrse translacionu represiju sopstvene sinteze spadaju:

1) geni za sintezu **ribozomalnih proteina** *E. coli* (Nomura *et al.* 1980; Baughman and Nomura 1983; Baughman *et al.* 1984) i *B. subtilis* (Grundy and Henkin 1991; Grundy and Henkin 1992),

2) geni za **rRNK metiltransferaze**; *ksg* (gen za 16S rRNK adenzin dimetiltransferazu) (van Gemen *et al.* 1989) i *ermC* (gen za 23S rRNK adenzin dimetiltransferazu) (Denoya *et al.* 1986; Breidt and Dubnau 1990)

3) gen za **treonil-tRNK sintetazu** (*thrS*) (Springer *et al.* 1986; Springer *et al.* 1989).



4) gen za β subjedinicu RNK polimeraze (*rpoB*) (Passador and Linn 1989).

Ovde se postavlja pitanje kako jedan te isti protein može da izvršava "inicijalnu" funkciju i da funkcioniše kao represor sopstvene sinteze. Za neke od navedenih gena pokazano je sekvenciranjem i poredjenjem sekvenci da region iRNK koji je uključen u autoregulaciju formira strukturu koja zapanjuje oponasa (molekularna mimikrija) ciljnu strukturu za koju je i vezana uloga određenog gena. Ovo poredjenje i "footprint" eksterimenti sugeriraju precizan mehanizam regulacije. Posto mesto vezivanja autoregulatornog proteina u okviru iRNK, uključuje translacione regulatorne elemente (RBS, AUG), vezani autoregulatorni protein sprečava vezivanje ribozoma i inicijaciju sinteze proteina. Na ovaj način se produkti ovih gena proizvode samo u onoj meri koliko je potrebno za izvršenje njihove funkcije.

1. 3. 3. Autoregulacija na translacionom i transkripcionom nivou (RNK-vezujući proteini).

Ribozomalni protein L4 funkcioniše ne samo kao komponenta 50S subjedinice ribozoma već i kao regulatorni protein sopstvenog S10 operona koji sadrži 11 gena. Protein L4 ovu regulaciju ostvaruje putem dva različita mehanizma: inhibicijom elongacije transkripcije i inhibicijom inicijacije translacije (Freedman *et al.* 1987). Od svih operona samo S10 operon pokazuje ovakvu duplu regulaciju indukovanu u trenutku kada sinteza L4 ribozomalnog proteina premaša sintezu njegovog "normalnog" targeta, 23S rRNK. Sto se tiče translacione kontrole L4 protein blokira inicijaciju sinteze proteina najproksimalnijeg gena S10 operona, a budući da je translacija nizvodnog/ih gena pridružena to ima reperkusije i na njihovu translaciju (Lindahl *et al.* 1989).

Posebna pažnja je obracena na transkripcionu autoregulaciju ovog operona. Utvrđeno je da L4 vrsi regulaciju tako što uzrokuje prevremenu terminaciju transkripcije u netranslatirajućem delu lider sekvence S10 operona. Ova lider sekvenca sadrži ρ -nezavisan terminator na oko 120 nukleotida od starta transkripcije (Shen *et al.* 1988). Na njemu se vrsi terminacija transkripcije samo u prisustvu L4 proteina (Zengel and Lindahl 1990). Međutim RNK polimeraza ignorise terminator bez obzira na prisustvo L4 proteina ako nije prisutan i NusA protein (Zengel and Lindahl 1990). Dalje je pokazano da je ustvari NusA protein potreban da promovise zastoj RNK polimeraze na terminatorskoj sekvenci, a da se tek taj "zadržani" kompleks dodatno stabilise L4 proteinom, što rezultira u efiktnijoj terminaciji transkripcije (Zengel and Lindahl 1992). Terminaciona petlja je dovoljna za NusA-zavisni zastoj, ali su za efikasno prolongiranje zastoja od strane L4 proteina potrebne i sekvence koje se nalaze uzvodno od atenuatora (Zengel and Lindahl 1992).

2. MEHANIZMI REZISTENCIJE ORGANIZAMA KOJI PROIZVODE ANTIBIOTIKE NA SOPSTVENI TOKSICNI PROIZVOD

Antibiotici su prirodne organske supstance, metaboliti izvesnih organizama, koje su aktivne protiv mikroorganizama. Proizvodnja antibiotika je relativno cesta pojava u prirodi, pri cemu je najzastupljenija medju aktinomicetama.

Mikroorganizmi koji proizvode antibiotike susrecu se sa vrlo teskim biohemijskim izazovom, tj. da ostanu metabolicki aktivni u prisustvu sopstvenog toksicnog proizvoda. Ili obrnuto posmatrano, jasno je da je sposobnost tolerancije sopstvenog antibiotika esencijalni preduslov za njegovu biosintezu. Dakle, pored toga sto je potrebno da se sintetisu enzimi koji ce ucestvovati u biosintezi antibiotika, ove bakterije su morale da razviju i sisteme kojima se ostvaruju strategije prezivljavanja. Prema tome jedan deo celijskog metabolizma je angazovan u ove dve uzrocno povezane funkcije. Buduci da je ogromna vecina antibiotika sintetisana od strane aktinomiceta, sasvim je razumljivo da je najveći broj mehanizama rezistencije na autogene antibiotike detaljno proučen kod ovih bakterija posebno kod roda *Streptomyces*.

Ranije se mislilo da se biosinteza sekundarnih metabolita u koje spadaju i antibiotici desava samo u idiofazi (kraj logaritamske i pocetak stacionarne faze), posto su enzimi ukljuceni u ove biosintetske puteve katabolicki reprimirani u ekspanzionalnoj fazi rasta (trofofaza) (Demain, 1974). Medjutim, ne sintetisu se svi antibiotici ili sekundarni metaboliti iskljucivo za vreme jasno odvojene idiofaze vec se ona delimicno preklapa sa trofofazom. Zbog toga neki organizmi imaju potrebu za konstitutivnom ekspresijom gena za rezistenciju na svoje toksicne metabolite. Moglo bi se cak reci da neki mehanizmi rezistencije svojom prirodom diktiraju model njihove ekspresije. Na primer, razlicite aktinomicete koje proizvode inhibitore sinteze proteina stite sebe modifikacijom ribozoma. Ova modifikacija se ostvaruje specifičnom metilacijom rRNK, koja se u znatnom broju slucajeva ostvaruje samo u ranim stadijumima biosinteze ribozoma, a ne i na kompletiranim ribozomima. Prema tome, a imajući u vidu i dugovecnost ribozoma *in vivo*, geni koji kodiraju rRNK metilaze moraju biti konstitutivno eksprimirani ili se njihova indukcija mora dogoditi dosta pre proizvodnje antibiotika. Za proizvodjace, koji primenjuju druge mehanizme rezistencije (modifikacija antibiotika) metabolicki je povoljnije da se geni odgovorni za rezistenciju ekspimiraju inducibilno, odnosno da njihova ekspresija koincidira sa proizvodnjom antibiotika, ili da cak bude indukovana subletalnim koncentracijama antibiotika.

Sto se tice strategija prezivljavanja koje su proizvodjaci antibiotika razvili u cilju izbegavanja samointoksikacije, uopsteno govoreci postoje tri mehanizma koji pojedinačno ili kooperativno obezbeduju efektanu samozastitu:

1. Enzimaska modifikacija antibiotika;

2. Rezistencija usled promene mesta vezivanja antibiotika;
3. Sprečavanje kontakta antibiotika i njegovog targeta.

U izboru mehanizma rezistencije relevantna je priroda delovanja i biosintetski put određenog antibiotika, posto se neki antibiotici proizvode kao bioaktivni još dok su unutar ćelije, dok se drugi sintetisu kao inertni derivati koji će biti aktivirani za vreme ili nakon eksporta iz ćelije (npr. streptomycin). Prema tome jedni proizvođači treba da minimiziraju nepoželjnu interakciju između intracelularnog antibiotika i njegovog targeta, dok organizmi koji aktiviraju prekursore za vreme ili nakon eksporta iz ćelije treba da se odbrane od ekstracelularnog antibiotika, što se postiže uspostavljanjem barijere na nivou transporta antibiotika u ćeliju. Međutim, ova barijera nije apsolutno savršena pa je obično suplementirana intracelularnom inaktivacijom ili efluks sistemom. Sa druge strane, nije za očekivati da proizvođači antibiotika sprečavaju samointoksikaciju enzimskom inaktivacijom antibiotika koja ne bi bila povezana sa barijerom na nivou njegovog ponovnog transporta u ćeliju. Odsustvom takve barijere bio bi uspostavljen jedan uzaludan ciklus uzimanja, inaktivacije, izbacivanja i reaktivacije antibiotika koji bi sa energetskog stanovista bio nedopustiv za ćeliju.

Radikalna alternativa spomenutim mehanizmima je sprečavanje inhibitornog delovanja antibiotika na nivou njegovog targeta. Interesantno je, međutim, da ona nije ostvarena do ekstrema. Naime, do sada niko nije dokumentovao primer proizvođača antibiotika koji bi imao najjednostavniji (i efikasan) mehanizam rezistencije, a koji bi podrazumevao biosintezu rezistentnog targeta konstitutivnom ekspresijom jednog gena. Ova alternativa bi bila zadovoljena kada bi, recimo, proizvođači novobiocina imali samo jedan konstitutivno eksprimiran *girB^R* gen, što nije slučaj (Thiara and Cundliffe, 1988). Objašnjenje ovog fenomena verovatno leži u činjenici da antibiotik isključuje funkciju određene (vitalne) ćelijske komponente interagujući sa domenom koji je esencijalan za njenu efikasnu funkciju. Međutim, posto je poznato da je rezistencija na rifamicin (vezana za β subjedinicu RNK polimeraze) recesivno svojstvo u odnosu na senzitivnost, ipak postoji mogućnost da se rezistencija kod proizvođača antibiotika koji inhibiraju RNK polimerazu ostvaruje ekspresijom samo jednog gena, odnosno sintezom targeta koji unutar ćelije, bez dodatnih modifikacija, egzistira samo u rezistentnoj formi.

2. 1. MODIFIKACIJA ANTIBIOTIKA KOD PROIZVOĐJACA

Posedovanje enzima koji su sposobni da modifikuju i time inaktiviraju autogeno sintetisani antibiotik je ključalni momenat u preživljavanju većeg broja proizvođača antibiotika. Uprkos velikoj raznolikosti u hemiskoj strukturi antibiotika, prevladaju dva tipa modifikacija, označenih kao N-acetilacija amino grupa i O-fosforilacija hidroksilnih grupa, pri čemu su donori acetilne i fosforne grupe acetil-CoA, odnosno ATP. Nedavno je utvrđeno da proizvođač hloramfenikola

Streptomyces venezuele obezbedjuje rezistenciju na sopstveni antibiotik ekspresijom gena za hloramfenikol hidrolazu (uklanja dihloracetatni supstituent sa molekule antibiotika) (Mosher et al. 1990) i da proizvodjac oleandomicina *Streptomyces antibioticus*, inaktivira sopstveni antibiotik glikozilacijom (Vilches et al. 1992).

Modifikacija strukture sopstvenog antibiotika acetilacijom zastupljena je kod veceg broja proizvodaca: proizvodjaca **kanamicina**, *Streptomyces kanamyceticus* (Matsushashi et al. 1985), proizvodjaca **nebramicinskog kompleksa** *Streptomyces tenebrarius* (Yamamoto et al. 1982), proizvodjaca **puromicina** *Streptomyces alboniger* (Vara et al. 1985a; Vara et al.1985b; Vara et al. 1986; Vara et al. 1988), proizvodjaca **streptotricina** *Streptomyces* V-13-1 (Keeratipibul et al. 1983.), proizvodjaca **blasticidina S** *Streptoverticillium* spJCM4673 (Sigiyaama et al. 1986) i drugi.

Medju proizvodjace antibiotika koji vrse inaktivaciju sopstvenog toksicnog proizvoda fosforilacijom spadaju: proizvodjaci **streptomicina** *Streptomyces griseus* i *Streptomyces bikiniensis* (Piwowarski and Shaw 1979; Hotta et al. 1981), proizvodjac **higromicina** *Streptomyces hygrosopicus* (Leboul and Davies, 1982; Pardo et al. 1985; Zalacain et al 1986), proizvodjac **viomicina** *Streptomyces vinaceus* (Skinner and Cundliffe, 1980; Thompson et al 1982 b) i dr.

Veci broj proizvodjaca antibiotika visok nivo rezistencije postize kombinovanom aktivnoscju enzima koji vrse acetilaciju i fosforilaciju. To su: proizvodjaci **neomicina** *Streptomyces fradiae* (Thompson et al. 1980; Thompson et al. 1982 a) i *Micromonospora chalcea* (Wagman end Weistein, 1980; Salauze et al, 1991), proizvodjac **paromomicina** *Streptomyces rimosus* (Perez-Gonzales et al.1989; Lopez-Cabrera et al. 1989), proizvodjac **kapreomicina** *Streptomyces capreolus* (Skinner and Cundliffe, 1980), proizvodjac **lividomicina** *Streptomyces lividus* (Davies et al. 1979) i dr. Interesantno je da su eksperimenti u kojima su dobijeni i kasnije u genetickoj i biohemijskoj karakterizaciji korisceni *aph* i *aac* klonovi pokazali da visok nivo rezistencije zaista zahteva kombinovanu aktivnost produkata oba gena (Thompson et al. 1980; Thompson et al. 1982 b). Naime, kada se *aph* i *aac* geni odvojeno kloniraju u *S. lividans*, svaki od njih obezbedjuje nizak nivo rezistencije na neomicin. Visok nivo rezistencije, odnosno nivo rezistencije koji je identican kao kod proizvodjaca dobijen je kada su oba gena ekspimirana u istom domacinu (Thompson et al. 1982 b). Slicni rezultati su dobijeni kada su geni koji kodiraju APH(3') i AAC(3) enzime klonirani iz proizvodjaca paromomicina, *Streptomyces rimosus*, u *S. lividans* (Perez-Gonzales et al.1989; Lopez-Cabrera et al. 1989). Potpune implikacije ovih rezultata su nejasne. Fosforilisane ili acetilovane forme oba antibiotika su bioloski neaktivne, a pored toga zna se da nivo rezistencije nije redukovan smanjenim nivoom ekspresije kloniranih gena. Moguce je da ovako dvostruko modifikovani antibiotici efikasnije blokiraju mehanizam kojim bi se ekstracelularni antibiotik ponovo unosio u celiju (Thompson et al. 1982 b; Perez-Gonzales et al. 1989).

Enzimi koji vrse inaktivaciju antibiotika modifikacijom imaju pored ove ocigledne uloge u mehanizmu rezistencije, najverovatnije i ulogu u biosintezi antibiotika, a mozda i u regulaciji njegove sinteze. Geni koji su

odgovorni za rezistenciju u bakterijama koje proizvode antibiotike najcesce su fizicki povezani sa genima ukljucenim u biosintezu antibiotika (Ohnuki *et al.* 1985 a; Vara *et al.* 1988; Chater, 1990). Proucavanjem biosinteze puromicina dovelo je do razvoja interesantnog modela koji pokazuje kako se primenom metabolicke zastite jos za vreme biosinteze antibiotika omogucava produkcija ovog toksicnog metabolita. Naime, proizvođač puromicina *Streptomyces alboniger* poseduje puromicin N-acetiltransferazu (PAC) kojom se inhibira antibiotik (Sugiyama *et al.* 1985). Produkcija enzima je inducibilna, i njegova aktivnost se pojavljuje za vreme logaritamske faze rasta. PAC enzim je kodiran genom (*pac*) koji je fizicki vezan za *dmpM*-gen koji kodira O-demetilpuromicin-O-metil transferazu (Vara *et al.* 1988). Ovaj enzim katalizuje poslednji korak u biosintezi puromicina, pri cemu metiluje N-acetil-O-demetil-puromicin u N-acetil-puromicin (Vara *et al.* 1985 b). PAC protein vrsi acetilaciju O-demetil-puromicina, tako da postaje preferabilan supstrat za DMPM enzim (Vara *et al.* 1985 b).

Nivo ekspresije gena ciji produkti inaktiviraju autogeno proizvedeni antibiotik izgleda da ne omogucava maksimalnu produkciju antibiotika. Naime, ukoliko se geni odgovorni za rezistenciju kloniraju na plazmide sa velikim brojem kopija i ako se bakterije koje proizvode antibiotike transformisu takvim plazmidima dolazi ne samo do povecanja rezistencije vec i do povecanja proizvodnje antibiotika (Crameri and Davies 1986). Ovo povecanje proizvodnje antibiotika moze biti posledica uklanjanja limitirajućeg faktora, odnosno povecanja rezistencije na sopstveni toksicni proizvod, ali ovakvi eksperimentalni rezultati mogu ukazivati i na mogucnost ucesca proizvoda gena odgovornih za rezistenciju u regulaciji biosintetskih gena.

Mehanizmi rezistencije modifikacijom antibiotika veoma su zastupljeni i kod klinickih izolata, mada kod njih (za sada) nisu pronadjeni paralelni nacini inaktivacije antibiotika za sve modele koje primenjuju proizvodjaci (Cundliffe, 1989 a). Geni odgovorni za sintezu ovih enzima (oznaceni kao R-faktor-"resistance factor") najcesce su locirani na plazmidima i pretpostavlja se da vode poreklo od bakterija koje proizvode antibiotike. Medjutim, neki enzimi koji modifikuju antibiotike nadjeni su u klinickim izolatima, ali ne i kod proizvodjaca. Takav je slucaj sa enzimima koji vrse O-adenilaciju. Naime, O-adenilacija je relativno cest nacin modifikacije antibiotika kod klinickih izolata, ali ni jedan enzim takve funkcije nije do sada pronadjen kod proizvodjaca antibiotika (Cundliffe, 1989 b). Njihovo postojanje nije nepoznato kod streptomiceta koje nisu proizvodjaci (Agroudelis, 1977). Pored toga, iako je O-acetilacija hloramfenikola siroko rasprostranjena medju gram-negativnim i gram-pozitivnim bakterijama (uklucujuci i nekoliko vrsta streptomiceta), ona nije detektovana kod proizvodjaca hloramfenikola (Nakano *et al.* 1977; Shaw and Hopwood 1976; Mosher *et al.* 1990) kod kojih se inace antibiotik vezuje istim afinitetom za izolovane ribosome kao i kod neproizvodjaca. Prema tome, pitanje odakle poticu enzimi koji kod klinickih izolata obezbeduju rezistenciju ne moze se generalno razresiti vezivanjem njihovog porekla za bakterije koje proizvode antibiotike.

2. 2. REZISTENCIJA USLED PROMENE MESTA VEZIVANJA ANTIBIOTIKA

Inhibitorno delovanje antibiotika zasniva se na interakciji antibiotika sa nekom komponentom bakterijske celije koja je neophodna za njeno pravilno funkcionisanje sto dovodi do usporenog rasta ili smrti celije. Antibiotik se vezuje za specificne receptore unutar celije ili na njenoj površini sto zavisi on nacina njegovog delovanja. Rezistencija ili cak nesenzitivnost na specificni antibiotik, a koja se ostvaruje na nivou mesta vezivanja moze se postici modifikacijom targeta (Cundliffe, 1978; Thompson et al., 1982 c) ili zamenom mesta vezivanja formom na koju antibiotik ne deluje (Thiara and Cundliffe, 1988, 1989). Na ovakve nacine izmenjeni targeti vise ne interaguju sa antibiotikom, ali zadržavaju normalno funkcionisanje u celiji.

Geni ciji produkti vrse modifikaciju mesta vezivanja antibiotika retko imaju fenotipsku ekspresiju nizu od maksimalne. Naime delovanjem produkata ovih gena proizvodjac postaje visoko rezistentan ili potpuno neosetljiv na delovanje proizvedenog antibiotika, tako da je ovaj mehanizam zastite ubedljivo najbolja alternativa. Na primer, ribozomi *Streptomyces azureus* (proizvodjac tiostreptona) perfektno funkcionisu u saturisanom vodenom rastvoru tiostreptona sto ovu bakteriju cini potpuno neosetljivom na njegovo delovanje (Cundliffe, 1989 b). Visoka rezistencija proizvodjaca koji izbegavaju autoinhibiciju promenom targeta, moze biti lako objasnjena poredjenjem tipicnog "turnover"-a enzima (10^3 - 10^4 /s) sa verovatnim brojem intracelijskih mesta vezivanja antibiotika (broj ribozoma po celiji je izmedju 10^4 - 10^5) (Cundliffe, 1989 a).

Postoji kuriozno "kokoska ili jaje" pitanje u pogledu modifikacije targeta kod proizvodjaca jer se to vrsi genskim produktima (enzimima) koji uopste ne prepoznaju molekule antibiotika, niti ucestvuju u njihovoj biosintezi. Naprimera, metilaza iz *S. azureus* koja metiluje 23S rRNK i tako stiti ovog proizvodjaca, najverovatnije nije neposredno ukljucena u biosintetski put tiostreptona, niti postoji bilo kakav razlog da se ovaj enzim i tiostrepton medjusobno prepoznaju (Thompson et al., 1982 c; Cundliffe, 1984). Pored toga nije evidentno da bi *S. azureus* imao neke koristi, selektivne prednosti, zahvaljujuci konstitutivnoj ekspresiji metilaznog gena u slucaju da nije proizvodjac tiostreptona. Dakle, ako proizvodjaci antibiotika ne dobijaju ovim mehanizmom nista osim rezistencije postavlja se pitanje kako su se geni za rezistenciju nasli blisko vezani uz gene za biosintezu bas odgovarajuceg antibiotika (Chater, 1990). Sa druge strane ekspresija biosintetskih gena je neostvariva bez zastite proizvodjaca. Sugestija da su se ovi geni mogli steci zajedno na plazmidu u sustini ne resava problem, vec samo pobudjuje na dodatna pitanja u vezi sa ulogama plazmida u tada neophodnim procesima. Uzimajuci u obzir ova razmatranja, poreklo gena koji kodiraju enzime za modifikaciju targeta i sled dogadjaja kojim su ovi geni asocirani sa genima za biosintezu odgovarajuceg antibiotika ostaje opskuran. Zbog toga razresenje pitanja-mogu li enzimi koji ucestvuju u modifikaciji targeta imati ulogu (bilo direktno ili u regulatornom smislu) u biosintezi odgovarajuceg antibiotika dalo bi izvesne smernice u resavanju postavljenih dilema.

Brojni proizvođači različitih antibiotika koriste ove mehanizme i mogu se podeliti, prema vezanosti za ribosome, na dve grupe .

2. 2. 1. PROMENA NERIBOZOMALNIH TARGETA

Različiti enzimi koji su uključeni u sintezu nukleinskih kiselina, proteina ili masnih kiselina interaguju sa specifičnim antibiotikom (Cundliffe, 1989). Iako se znaju targeti preko kojih antibiotici ostvaruju svoje inhibitorno dejstvo, molekularno-biološka osnova rezistencije njihovih proizvođača detaljno je izučena samo kod proizvođača novobiocina. Proizvođač novobiocina *Streptomyces sphaeroides* ostvaruje rezistenciju promenom targeta, tj ekspresijom *gyrB^R* gena koji kodira novobiocin-rezistentnu varijantu B subjedinice giraze (Thiara and Cundliffe, 1988). Kod drugih mikroorganizama proizvođača antibiotika, a koji se štite promenom neribozomalnog targeta (RNA polimeraza, ile-tRNA sintaza, elongacioni faktor Tu i dr.) još se ne zna da li je prepoznavanje i vezivanje antibiotika za target redukovano postranslacionom modifikacijom inace senzitivnog enzima ili se rezistentna verzija enzima sintetise *de novo*.

2. 2. 2. MODIFIKACIJA RIBOZOMALNIH TARGETA

Veliki broj antibiotika svoje inhibitorno dejstvo ostvaruje na nivou sinteze proteina. To su hloramfenikol, tetraciklini, makrolidi, linkozamidi, aminoglikozidi, eritromicin (Matković i Topisirović, 1986).

Medju aktinomicetama koje proizvode inhibitore ribozomalnih funkcija većina poseduje modifikaciju ribozomalnog targeta na definisanom mestu što obezbeđuje visok nivo rezistencije na sopstveni toksični proizvod. Iako kompleksnost gradnje ribozoma i etape u kojima se odvija sinteza proteina pružaju veliki broj mogućnosti za delovanje antibiotika rezultati ovakvih analiza na sistemima koji su do sada proučavani su pokazali da je rezistencija u svim slučajevima vezana za modifikaciju 23S rRNK (Thompson et al., 1982; Cundliffe, 1984; Zalacain and Cundliffe, 1991) ili 16S rRNK (Beaucklerk and Cundliffe, 1987; Vasiljević and Cundliffe, 1990), što implicira izuzetnu važnost ribozomalnih RNK u sintezi proteina. Kod svih studiranih proizvođača antibiotika, a koji poseduju rezistentne ribosome utvrđeno je da je glavni parametar odgovoran za modifikaciju metilacija rRNK i da se ona ostvaruje delovanjem produkta jednog gena na tačno definisanom rRNK mestu. Ovo uopštenje vazi i za slučajeve multipne rezistencije, npr. na aminoglikozide (Skeggs et al., 1985; Kelemen et al. 1991) ili makrolide, linkozamine i streptogramin B (MLS) (Thompson et al. 1982b). Medjutim, postoje i izuzeci kao recimo *Streptomyces tenebrarius* koji poseduje dva gena čiji produkti metiluju rRNK i koji je rezistentan na izuzetno širok opseg aminoglikozida (Cundliffe, 1989 b). Pored toga, proizvođači se razlikuju i po regulaciji ekspresije gena za rezistenciju, kod nekih sojeva ekspresija je konstitutivna, a kod drugih inducibilna (Bibb et al. 1986; Kamimiya and Weisblum, 1988).

Kauzalna vezanost rezistencije proizvođača za modifikaciju 50S ribozomalne subjedinice, odnosno modifikaciju 23S rRNK metiltransferazama

je utvrđena za veći broj proizvođača. Među njih spadaju: proizvođač **tiostreptona** *Streptomyces azureus* (Cundliffe, 1978; Cundliffe, 1989 b; Thompson and Cundliffe, 1980; Thompson et al, 1982), proizvođač **eritromicina** *Sacharopolyspora erythraea*, (prvobitno *Streptomyces erythreus*) (Skinner and Cundliffe, 1982; Thompson et al. 1982; Skinner et al. 1983), proizvođač **tilozina** *Streptomyces fradiae* (Birmingham et al. 1986; Zalacain and Cundliffe, 1989; Zalacain and Cundliffe, 1991), proizvođač **karbomicina** *Streptomyces thermotolerans* (Uchiyama and Weisblum, 1985; Epp et al. 1987; Zalacain and Cundliffe 1990). proizvođač **celesticetina** *Streptomyces caelestis* (Calcutt and Cundliffe, 1990).

Medju proizvođače koji blokiraju delovanje antibiotika metilacijom specifičnih nukleotida na 16S rRNK spadaju: proizvođač **istamicina** *Streptomyces tenjimariensis* (Skeggs et al. 1985; Skeggs et al. 1987; Piendl et al. 1984; Beaucklerk and Cundliffe, 1987), proizvođač **nebraminskog kompleksa** *S. tenebrarius* (Skeggs et al. 1987; Holmes and Cundliffe 1991), proizvođač **sporaricina** *Saccharopolyspora hirsuta* (Holmes et al. 1991), proizvođač **gentamicina**, *Micromonospora purpurea* (Piendl and Bock, 1982; Piendl et al. 1984; Vasiljevic and Cundliffe, 1990; Kelemen et al. 1991), proizvođači **sisomicina** *M. rosea* (Kelemen et al. 1991) i *M. inyoensis* (Goldberg et al. 1990), proizvođač **G-52 aminoglikozida** *M. zionensis* (Kojic et al. 1992) proizvođač **fortimicina A** (astromicin) *M. olivasrerospora* (Ohta and Hasegava 1993; Ohta et al. 1993), proizvođač **paktamicina** *Streptomyces pactum* (Calcutt and Cundliffe 1990; Ballesta and Cundliffe 1991) i dr.

Iz svih ovih istraživanja koja uključuju različite vrste aktinomiceta, postalo je jasno da proizvođači različitih antibiotika koriste više, u osnovi srodnih mehanizama rezistencije. Postignuta rezistencija može biti rezultat konstitutivne ili inducibilne ekspresije jednog ili više gena i može pokrivati različite kombinacije antibiotika. Tipična razlika između metiltransferaza koje modifikuju rRNK velike ili male subjedinice ribozoma je ta što prve vrste metilaciju određenog nukleotida (A-1067, A-2058) samo slobodne rRNK, a ne i u okviru intaktne 50S ribozomalne subjedinice. Sledstveno tome, ako se neki od *erm*-grupe gena u proizvođaču eksprimira inducibilno ne bi mogao da ostvari rezistenciju ako se indukcija ne desi dovoljno pre proizvodnje antibiotika. U ovom svetlu se može razmatrati istovremeno postojanje konstitutivno (nizi nivo ekspresije) i inducibilno ekspimiranog gena (visi nivo rezistencije) kod proizvođača vrlo snažnog antibiotika kao što je tilozin. Za razliku od *trs* i *erm*-grupe metilaza, koje deluju samo na slobodnoj 23S rRNK, metilaze koje obezbeđuju rezistenciju metilovanjem 16S rRNK (G-1405; A-1408) ostvaruju svoje delovanje samo na intaktnim 30S ribozomalnim subjedinicama. Proizvođači antibiotika koji izbegavaju autoinhibiciju modifikacijom targeta imaju veću adaptivnu prednost u odnosu na proizvođače koji enzimima modifikuju sopstvene antibiotike, zato što uglavnom poseduju širok spektar i više nivoa rezistencije.

2. 3. SPRECAVANJE KONTAKTA ANTIBIOTIKA I NJEGOVOG TARGETA

Ovaj tip rezistencije se ostvaruje na nivou transporta

antibiotika u celiju. Svaki soj koji proizvodi antibiotik mora posedovati mehanizam kojim se novosintetisani produkt izbacuje iz celije. Ovaj mehanizam moze funkcionisati i u spreccavanju ponovnog ulaska vec izbacenog antibiotika. Na primer, kod bakterija koje proizvode streptomycin, *Streptomyces griseus* i *Streptomyces bikiniensis* za vreme biosinteze antibiotika dolazi pored indukcije enzima koji inaktivira intracelularni antibiotik (SPH) i do promene, odnosno do smanjenja permeabilnosti celijske membrane za ekstracelularni antibiotik (Piwowarski end Shaw, 1979). Geni ciji produkti doprinose rezistenciji mehanizmom vezanim za transport antibiotika prisutni su i kod proizvodjaca koji autointoksikaciju prvenstveno izbegavaju modifikacijom targeta. Tako, proizvodjac tilozina, *Streptomyces fradiae*, pored *ttrA* i *ttrD* gena ciji produkti metiluju 23S rRNK, poseduje i *ttrC* gen ciji produkt funkcionise kao deo multikomponentnog, ATP-zavisnog transportnog sistema za aktivno izbacivanje antibiotika iz celije (Rosteck et al. 1991). Za razliku od multipne (MLS) rezistencije koja se ostvaruje na nivou targeta, rezistencija determinisana *ttrC* genom je nizeg nivoa i specifična samo za tilozin.

Pored ovih primera gde je rezistencija na nivou transporta kombinovana sa modifikacijom antibiotika ili mesta njegovog vezivanja, postoje proizvodjaci antibiotika sa senzitivnim targetom i bez detektabilnog prisustva enzima koji inhibiraju antibiotik, odnosno koji svoju rezistenciju zasnivaju samo na efikasnom efluks sistemu. Primer ovakve rezistencije je rezistencija na metilenomicin i tetracikline. Kloniranjem iz *Streptomyces coelicolor* (odnosno sa njegovog linearnog gigantskog SCP1 plazmida) *mmr* gena i njegovom analizom je utvrđeno da determinise hidrofobni membranski protein koji je homolog TetB genskom produktu i da najverovatnije ucestvuje u kontroli efluksa metilenomicina iz celije (Neal and Chater, 1987). Efluks antibiotika takodje je ukljucen u rezistenciju kod *Streptomyces aureofaciens* (proizvodjac tetraciklina) i *Streptomyces rimosus* (proizvodjac oksitetraciklina), (iz kojih su izolovana dva razlicita tipa gena odgovornih za rezistenciju (Ohnuki et al. 1985 a; Ohnuki et al. 1985 b; Reynes et al. 1988). Geni su kod proizvodjaca oksitetraciklina (OTC) locirani na rastojanju od oko 30 kbp i uokviruju OTC biosintetske gene (Butler et al. 1989). Ovaj lokus sadrzi celokupnu geneticku informaciju potrebnu za biosintezu OTC u heterologom domacin (Binie et al. 1989). Ova dva tipa gena determinisu dva biohemijski razlicita mehanizma rezistencije na tetraciklin. Jedan od njih (*tetB*, *otrB*) pripada familiji Tc^R gena nadjenih u klinickim izolatima, a kod kojih se rezistencija na tetraciklin postize ATP-zavisnim efluksom antibiotika iz celije. *S. lividans tetB* klonovi pokazivali su karakteristike slicne klinickim izolatima. Produkt drugog (*tetA*, *otrA*) gena nije potpuno okarakterisan, ali se zna da je povezan sa rezistencijom na nivou translacionog aparata, medjutim, ne preko kovalentne modifikacije ribozoma, posto oprani ribozomi postaju senzitivni (Ohnuki et al. 1985 a). Dedukovana aminokiselinska sekvenca pokazuje visoku homologiju sa aminokiselinskim sekvencama gena za rezistenciju drugih bakterija na tetraciklin, a koji to ostvaruju nekovalentnom modifikacijom ribozoma (Doyle et al. 1991). N-terminalni domen ovog proteina pokazuje, takodje, ekstenzivnu homologiju sa GTP-vezujucim mestom kod elongacionih faktora EF-G i EF-Tu, sto ukazuje da je vezivanje i hidroliza GTP-a relevantna za funkciju ovog proteina. Znacajna homologija je prisutna duz celog EF-G polipeptida (Doyle et al.

1991). Iz ovih činjenica je izveden zaključak da bi produkt *otrB* gena mogao biti alternativni EF-G, ali način njegovog funkcionisanja, odnosno potpuno razumevanje mehanizma rezistencije, zahteva dalja istraživanja.

3. REGULACIJA EKSPRESIJE REZISTENCIJE KOD PROIZVODJACA ANTIBIOTIKA

Jedna od karakteristika genoma aktinomiceta je upotreba multipnih promotora, čak i za gene koji se ekspimiraju konstitutivno (Baum *et al.* 1988; Janssen and Bibb, 1990; Neal and Chater, 1991). Produkcija alternativnih transkripata reflektuje specifičnosti različitih sigma faktora koji funkcionisu u različitim stadijumima diferencijacije ili u odgovoru na nutritivne i druge sredinske stimuluse. Geni koji determinisu rezistenciju kod proizvođača antibiotika su fizički vezani uz gene za biosintezu, a u nekim slučajevima njihova ekspresija je koregulisana (Chater, 1990; Neal and Chater, 1991; Dairi *et al.* 1992). Koregulacija može uključivati divergentne promotore, preklapajuće transkripte, i/ili policistranske transkripte kao i dejstvo pozitivnih i negativnih kontrolnih faktora. U sojevima koji pokazuju ove karakteristike regulacija gena za rezistenciju je neodvojiva od regulacije gena za proizvodnju dotičnog antibiotika, na primer kod proizvođača streptomicina (videti kasnije). Druga značajna varijabla je apsolutni nivo genske ekspresije postojeći geni koji determinisu različite mehanizme rezistencije na autogene antibiotike ne trebaju da budu ekspimirani sa promotora iste jačine. Na primer, geni čiji produkti modifikuju mesto vezivanja antibiotika (najdemonstrativnije primer su rRNK metiltransferaze) trebalo bi da budu ekonomično regulisani slabim promotorom jer je u svakom trenutku dovoljna mala količina njihovih produkata.

Sto se tiče regulacije ekspresije gena za rezistenciju, iako ne postoji više detaljno okarakterisanih primera, mogu se razlikovati tri konceptualno različita modela regulacije.

U genomu *Streptomyces griseus*, geni za biosintezu streptomicina su locirani zajedno sa genom za rezistenciju (*aphD* gen). Neposredno ispred *aphD* gena nalazi se pozitivni regulator (*strR*) čiji produkt je neophodan za ekspresiju *strB* gena, biosintetskog gena koji se nalazi neposredno iza *aphD* gena (Ohnuki *et al.* 1985 a; Distler *et al.* 1987). Pored toga produkt *strR* gena učestvuje u pozitivnoj regulaciji i samog *aphD* gena (Ohnuki *et al.* 1985 a). Kada je izvršena analiza transkripata koji mapiraju u blizini *aphD* gena utvrđeno je da se alternativni promotori sukcesivno koriste u različitim fazama ćelijskog ciklusa (Distler *et al.* 1987). U logaritamskoj fazi vrsi se transkripcija *strR* i *aphD* gena sa zajedničkog promotora lociranog uzvodno od *strR* gena, dok se za vreme stacionarne faze ekspresija *aphD* gena vrsi sa promotora koji se nalazi u okviru *strR* gena.

Dodatnu složenost ovom sistemu daje učesce regulatorne kaskade A-faktora. A-faktor (2-izokaprilolil-3R-hidroksimetil- γ -butirolakton) je mikrobijalni hormon koji predstavlja autoregulatorni faktor uključen u kontrolu sekundarnog metabolizma (produkcija streptomicina, rezistencija na streptomycin) i ćelijske diferencijacije (formiranje vazdušnog micelijuma i spora). A-faktor se proizvodi neposredno pre nego što otpocinje proizvodnja

streptomicina i sporulacija (Hara and Beppu 1982). Koriscenjem radioaktivnog A-faktora utvrdjeno je da u citoplazmi *S. griseus* postoji A-faktor vezujuci protein (26kDa; 37 kopija po genomu) (Miyake *et al.* 1989), a izolovanjem mutanata za ovaj receptorni protein pokazano je da on vrshi ulogu kao represor proizvodnje streptomicina i sporulacije (Miyake *et al.* 1990). Kao rani dogadjaj u A-faktor regulatornoj kaskadi, vremenski regulisana sinteza A-faktora, dovodi do njegovog vezivanja za A-faktor vezujuci protein sto rezultira u derepresiji (jos nepoznatih) kljucnih gena za sekundarni metabolizam i celijsku diferencijaciju. Mutanti deficijentni za A-faktor vezujuci protein (izolovani mutagenезom sojeva koji su vec bili deficijentni za produkciju A-faktora) produkuju streptomycin i sporulisu na ranijim stadijumima nego sojevi divljeg tipa (Miyake *et al.* 1990). Iako slika jos nije kompletirana utvrdjeno je da je promotor odgovoran za kotranskripciju *strR* i *aphD* gena A-faktor zavisni promotor (Vujaklija *et al.* 1991) i da se uzvodno od njegovog starta transkripcije vezuje DNK vezujuci faktor koji nastaje kao odgovor na prisustvo A-faktora (Vujaklija *et al.* 1993). Iako njegova funkcija jos nije u potpunosti poznata pretpostavlja se da sluзи kao transkripcioni aktivator. Ista istrazivanja su pokazala da se za navedeni region vezuju jos dva proteina koji nisu zavisni od prisustva A-faktora i cija je verovatna uloga da moduliraju vezivanje A-faktor-zavisnog proteina, a time i transkripciju sa *strR* promotora (Vujaklija *et al.* 1993).

Kod proizvodjaca tilozina, *Streptomyces fradiae*, *tlrA* (*ermSF*) gen se ekspirira inducibilno, pri cemu indukcija ukljucuje translacionu atenuaciju. Informaciona RNK koja se transkribuje sa inducibilnog *tlrA* gena moze da zauzme alternativne konformacije koje determinisu razlicitu dostupnost za njenu translaciju. Indukcija ukljucuje aktivaciju neaktivne iRNK u prisustvu indukujuceg antibiotika koji vrshi blokiranje progresije ribozoma duz regulatornih (lider) sekvenci *tlrA* gena. Ovaj dogadjaj destabilizuje neaktivnu konformaciju iRNK i favorizuje konformacionu promenu iRNK u alternativno stanje pri kojem je kodirajuci deo *tlrA* gena dostupan za translaciju (Kamimiya and Weisblum, 1988). Medjutim, pitanje sta je stvarni inducer *tlrA* gena jos nije razjasnjeno posto se klonirani gen (u *Streptomyces griseofuscus*) indukuje eritromicinom ali ne i tilozinom. Moguce je da jedan ili vise biosintetskih prekursora tilozina poseduje inducibilnu aktivnost koja je oponasana eritromicinom. Postoji mogucnost da je u *Streptomyces fradiae* i sam tilozin indukujući agens imajući u vidu da su ribozomi pre ekspresije *tlrA* gena vec modifikovani (delovanjem konstitutivno ekspimirane *tlrD*-metilaze) u svom odgovoru na prisustvo antibiotika (Zalacain and Cundliffe, 1991).

Rezistencija na novobiocin kod *Streptomyces sphaeroides* je determinisana *gyrB^R* genom ciji je produkt rezistentan na delovanje antibiotika (Thiara and Cundliffe, 1988). Ekspresija *gyrB^R* gena se u bakteriji *Streptomyces sphaeroides* indukuje novobiocinom, ali i inhibitorima koji deluju na A subjedinicu DNK giraze, iz cega je postalo jasno da oni ne deluju kao indukujući agensi ili pozitivni regulatori u klasicnom smislu. U stvari, kontrola ekspresije *gyrB^R* gena se vrshi njegovim promotorom koji je visoko osetljiv na promene u topologiji DNK. Promotor *gyrB^R* gena se aktivira relaksiranom DNK, koja nastaje inhibicijom DNK-girazne aktivnosti. Dakle, novobiocin i kumarini vrse indirektnu indukciju *gyrB^R* gena inhibirajući aktivnost senzitivne DNK giraze, cime se smanjuje nivo negativne

superspiralizacije i vrši aktiviranje promotora *gyrB^R* gena (Thiara and Cundliffe, 1989).

4. CILJ ISTRAZIVANJA

Cilj ovoga rada bio je izučavanje molekularno-bioloških mehanizama kojima se regulise ekspresija *sgm* gena bakterije *Micromonospora zionensis*. Ovaj gen je kloniran u *Streptomyces lividans* i uspesno eksprimiran u *M. melanospora* i *E. coli*. Ekspresija *sgm* gena u *S. lividans* i *M. melanospora* se vrši sa sopstvenih regulatornih sekvenci, dok je u *E. coli* zavisna od transkripcionih signala ove bakterije. Ranije je bila odredjena lokalizacija i smer ovog gena na kloniranom DNK fragmentu kao i njegova sekvenca. Sgm protein (dedukovano na osnovu nukleotidne sekvence) sadrži 274 amino kiseline i pokazano je da vrši metilaciju 16S rRNK u okviru 30S ribozomalne subjedinice, čime se ostvaruje visoka rezistencija na gentamicin i druge 4,6 disupstituisane dezoksistreptaminske antibiotike. Još uvek se ne zna tačno mesto delovanja Sgm metilaze, ali je utvrđeno da ona deli isto mesto metilacije sa Grm metilazom iz *M. purpurea*. Upoređivanje aminokiselinskih sekvenci Sgm metilaze sa drugim metilazama 16S rRNK pokazalo je da je ekstenzivno homologa Grm metilazi iz *M. purpurea*, vrlo homologa KgmB, ali ne i KamB metilazi iz *S. tenebrarius* (Kojic *et al.* 1992). U cilju daljeg razumevanja prirode i funkcije *sgm* gena krenulo se prvenstveno sa istraživanjima koja su trebala da pokazu kakva je njegova transkripciona i postranskripciona regulacija. Deo dobijenih rezultata je prezentovan u ovom radu.

Znacaj izučavanja regulacije ekspresije gena za rezistenciju kod proizvođača antibiotika je sirenog značaja zbog činjenice da su geni odgovorni za rezistenciju na antibiotike blisko locirani genima za biosintezu dotičnog antibiotika, i često su koregulisani ili čak i kotranskribovani sa nekim od njih. Pored toga poznavanje regulatornih domena gena za rezistenciju, uz njihovo poredjenje sa već poznatim za homologe gene, može doprineti razresavanju pitanja njihove distribucije u mikrobijalnom svetu. Na kraju izučavanje regulacije ekspresije gena za rezistenciju, ima i svoje praktično opravdanje, jer omogućuje procenu njegovog ponasanja, kao potencijalnog selektabilnog markera za novokonstruisane vektore. Najzad, ako bi se pokazalo da je *sgm* gen vremenski regulisan, onda bi se njegovi transkripcioni signali mogli koristiti za ekspresiju kloniranih gena u tačno određenoj fazi životnog ciklusa mikromonospora.

Pored izučavanja koja su neposredno vezana za regulatorne domene *sgm* gena i molekularno-biološke mehanizme njegove ekspresije izučavana je i ekspresija ovoga gena u različitim sojevima aktinomiceta. Cilj ovog dela istraživanja bio je da se utvrdi da li je rezistencija na higromicin B kod ishodnog soja, relevantno povezana sa prisustvom i ekspresijom *sgm* gena.

II MATERIJAL I METODE

1. EKSPERIMENTALNI MATERIJAL

1. 1. Biološki materijal-bakterijski sojevi i plazmidi

U ovom radu su korisni sledeći sojevi aktinomiceta: *Micromonospora melanosporea* DSM43126, *Micromonospora zionensis* NRRL5466, *Sreptomycetes lividans* TK 21, *Sreptomycetes coelicolor* A3(2) i *Sreptomycetes griseofuscus*.

Pored ovih sojeva koriscen je i soj *Escherichia coli* NM522: *supE*, *thi*, $\Delta(\text{hsdMS-mcrB})5$, $\Delta(\text{lac-proAB})$, F' [*proAB*⁺, *lacI*^q, *lacZ* Δ M15]

Plazmidi korisceni u ovom radu prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Plazmidi korisceni u radu.

PLAZMID	KARAKTERISTIKE	IZVOR/REFERENCA
pUC19	Ap ^r , <i>lacZ</i> , 2,7kbp	Yanish-Perron <i>et al.</i> (1984)
pIJ702	Ts ^r , mel, 5,8kbp	Katz <i>et al.</i> (1983)
pP _L tl7G	Ap ^r , 2,5kbp	Konstantinovic <i>et al.</i> (1991)
pMC1871	Tc ^r / <i>lacZ</i> , 7,5kbp	Shapira <i>et al.</i> (1983)
pCON4	Ap ^r , <i>lacZ</i> , 5,8kbp	de Lorenzo <i>et al.</i> (1988)
pKlink2	Ap ^r , Km ^r , 3,9kbp	Amersham
pMK3	Ts ^r , Gm ^r izvorni klon u pIJ702, 10,3kbp	Kojic (1991)
pMK12-27	Ap ^r , Gm ^r , SphI/KpnI fragment iz pMK3 ukloniran u pUC19, 5,4 kbp	Kojic (1991)
pMK31	Ts ^r , Gm ^r , SphI/KpnI fragment iz pMK3 ukloniran u pIJ702, 8,5 kbp	Kojic (1991)
pMK32-26	Ap ^r , Gm ^r , SphI/BglII/BglIII fragment iz pMK3 ukloniran u pUC19, 4,8 kbp	Kojic (1991)
pMK62-89	Ap ^r , Gm ^r , Sall/Sall fragment iz pMK3 ukloniran u pUC19, 3,7 kbp	Kojic (1991)
pMK33	Ts ^r , Gm ^r , Sall/Sall fragment iz pMK3 ukloniran u pIJ702, 6,5 kbp	Kojic (1991)

1. 2. Medijumi za rast bakterija i regeneraciju protoplasta

Medijum koji je koriscen za rast mikromonospora sadrzi skrob (24g) , mesni ekstrakt (3g), tripton (5g), glukozu (1g), ekstrakt kvasca (5g), CaCO_3 (6g) i KCl (4g) na 1l destilovane vode. Da bi se dobila cvrsta podloga u ovaj medijum se dodaje agar (1.5%).

Za rast streptomiceta na cvstoj podlozi koriscena je NE podloga koja sadrzi glukozu (10g), ekstrakt kvasca (2g), mesni ekstrakt (1g) , kazamino kiseline (2g) i 20g agara na 1l destilovane vode. Kultivisanje tecne kulture vrseno je u YEME medijumu (0,3% ekstrakt kvasca, 0,5% pepton, 0,1% maltoza, 34% saharoza, 1% glukozu, 5mM MgCl_2 , 0,5% glicin.)

Regeneracija protoplasta vrsena je na R2YE podlozi koja sadrzi: saharozu (103g), K_2SO_4 (0,25g), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10,12g), glukozu (10g), kazamino kiseline (0,1g), ekstrakt kvasca (5g), oligoelemente (2ml), N-tris[hidroksimetil]-metil-2-aminoetan-sulfonska kiselina [TES] (100ml), 5,73%, pH 7,2), KH_2PO_4 (10ml, 0,5%), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4ml, 5M), L-Prolin (15ml, 20%) i NaOH (7ml, 1M) na 1l destilovane vode. Rastvor oligoelemenata sadrzi: $[\text{ZnCl}_2$ (40mg), FeCl_3 (200mg), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10mg), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (10mg), $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (10mg), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (10mg) na 1l bidestilovane vode].

Sojevi *E. coli* su gajeni u LB bogatom medijumu (ekstrakt kvasca 5g, tripton 10g, NaCl 5g na 1l destilovane vode) ili na istoj podlozi, na petri soljama uz dodatak 1,5% agara.

2. ODREDJIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE (MIC)

Spore bakterija su sterilno nanosene na podlogu za rast streptomiceta i mikromonospora, koja je sadrzala razlicite koncentracije antibiotika. Ovakve podloge su inkubirane na 30°C i pracen je rast u periodu od 3-6 dana. Lista antibiotika i njihove koncentracije se mogu videti u Tabeli 3 (Poglavlje rezultati).

3. METODE ZA IZOLOVANJE DNK

3. 1. Mini-metoda izolacije plazmidne DNK iz *E. coli*

Za brzu izolaciju plazmida iz *E. coli* koriscena je metoda alkalne lize. Pojedinačne bakterijske kolonije zasejavane su u po 5ml LB medijuma u koga je dodat odgovarajuci antibiotik. Talog dobijen centrifugiranjem nocne kulture opran je u TEN puferu (50mM Tris HCl pH 8,0; 10mM EDTA pH 8; 50mM

NaCl) i resuspendovan u 100 μ l STE pufera (20% saharoza; 0,1M Tris pH 8,0; 20mM EDTA) sa 2mg/ml lizozima. Posle inkubacije od 5 min na sobnoj temperaturi dodavano je 200 μ l sveze pripremljene smese 1% SDS u 0,2M NaOH. Nakon laganog mesanja u dobijeni lizat je dodavan 3M NaAc pH 4.5 (150 μ l), smesa je inkubirana 10 min na -20°C i zatim centrifugirana 20 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na 4°C, pri cemu su istalozeni ostaci bakterijskih celija i visokomolekularna DNK. Dobijeni supernatant u kome se nalazi plazmidna DNK, prebacivan je u ciste Eppendorf epruvete. Ostaci proteina estrahovani su dodavanjem 200 μ l neutralnog fenol-hloroforma, vorteksovanjem i centrifugiranjem (10 min. na sobnoj temperaturi; 13000 obrt/min). Vodena-gornja faza je pazljivo prebacivana u ciste Eppendorf epruvete i zatim je vrsena precipitacija dodavanjem 2 volumena hladnog apsolutnog etanola (-20). Precipitat je prikupljan u talogu posle centrifugiranja u trajanju od 20 min na 13000 obrt/min na 4°C (BiofugaA, Heraeus). Dobijeni talog je ispiran hladnim 75% etanolom (1ml;-20°C), zatim osusen u "Speed vac"-u, resuspendovan u 50 μ l TE pufera (10mM Tris pH 7,5 i 1mM EDTA pH 7,5) koji sadrzi 20 μ l/ml RNazeA. RNK je odsranjivana inkubacijom uzoraka na 37°C u trajanju od 15-30 min. Na ovaj nacin izolovana i preciscena DNK mogla je da se koristi za digestije restrikcionim enzimima, za ligacije, transformacije itd.

3. 2. Mini-metoda izolacije plazmidne DNK iz streptomiceta i mikromonospora

Za izolovanje malih kolicina plazmidne DNA za potrebe identifikacije klonova restrikcionom analizom koriscena je metoda Kieser-a (1984).

Bakterije iz 4,5 ml kulture koja je rasla 2-3 dana na temperaturi od 28°C uz aeraciju (250 obrt/min) prikupljane su centrifugiranjem 15 min na 3800 obrt/min u klinickoj centrifugi. Talog je ispiran sa 1 ml rastvora za lizozim (0,3M saharoza; 25mM Tris pH 8; 25mM EDTA pH 8) intenzivnim mesanjem na vorteksu nakon cega su resuspendovane bakterije prebacene u ciste Eppendorf epruvete i istalozene centrifugiranjem 5 min na 13000 obrt/min (BiofugeA, Heraeus). Posle odlivanja supernatanta talog je resuspendovan automatskom pipetom u 0,5 ml rastvora za lizozim koji je sadrzao 2 mg/ml lizozima i 50 μ g/ml RNazeA. Nakon prebacivanja 0,5 ml smese u nove Eppendorf epruvete vrsena je inkubacija 30 min na 37°C u vodenom kupatilu. U toku inkubacije suspenzija je povremeno mesana invertovanjem epruveta, a posle inkubacije dodavan je rastvor 2% SDS u 0,3M NaOH. Odmah po dodavanju smesa je dobro izmesana visestrukim provlacenjem kroz Pasterovu pipetu, a zatim inkubirana 15 min u vodenom kupatilu na 70°C. Posle hladjenja na sobnoj temperaturi dodavano je 80 μ l kiselog fenol-hloroforma (voda: fenol: hloroform=1: 5: 5) i sve intenzivno izmesano na vibracionoj mesalici. Nakon centrifugiranja (10 min na 13000 obrt/min, BiofugeA, Heraeus) gornja faza je pazljivo prikupljana i prenosena u ciste Eppendorf epruvete. Ostaci proteina estrahovani su uzastopnim dodavanjem 200 μ l neutralnog fenol-hloroforma (kiseli fenol-hloroform

ekvilibrisan prvo sa 0,5 volumena 1M Tris pH 8,8 i zatim sa 0,5 volumena 0,1M Tris pH 8) do potpunog odstranjivanja medjufaze. Precipitacija plazmidne DNK vrsena je dodavanjem 1/10 volumena 3M NaAc i 1 volumena izopropanola uz lagano mesanje i inkubacijom 5 min na sobnoj temperaturi. Posle centrifugiranja (5 min na 13000 Obrt/min, BiofugeA, Heraeus) talozi su suseni pod vakuumom i resuspendovani u 50 μ l TE pufera.

3. 3. Izolovanje plazmidne DNK na velikoj skali

Bakterije su talozene centrifugiranjem 15 min na 6000 obrt/min u Sorval GSA ili GS3 rotoru. Talog iz 500 ml bakterijske kulture rastvaran je u 10 ml 50mM glukoze, 25mM Tris-HCl pH8,0 i 10mM EDTA, sa sveze rastvorenim lizozimom u koncentraciji 5mg/ml. Ova suspenzija inkubirana je 5 min na sobnoj temperaturi. Zatim je kap po kap dodavano 20 ml rastvora 0,2N NaOH, 1% SDS. Posle inkubacije od 10 min na ledu, dodavano je 15ml ledenog 5M rastvora KOAc pH4,8 i inkubirano na ledu 10-60 minuta. Bakterijski lizat centrifugiran je 30 min na 18000 obrt/min u Sorval SS34 rotoru na hladnom. Plazmidna DNK precipitirana je iz supernatanta dodavanjem 0,6 volumena izopropanola. Nakon inkubacije 15 min na sobnoj temperaturi DNK je talozena centrifugiranjem 10 min na 10000 obrt/min u Sorval SS34 rotoru. Talog je ispiran 70% etanolom, susen i resuspendovan u odgovarajucoj zapremini TE pufera.

Izopiknicko centrifugiranje u gradijentu gustine CsCl-etidijum bromida radjeno je na sledeci nacin. Po svakom mililitru dobijenog rastvora nepreciscene plazmidne DNK dodavano je 1g CsCl i 0,05ml rastvora etidijum bromida (10mg/ml). Ovaj rastvor prenosen je u epruvete za Beckman rotore Ti50, SW50.1 ili VTi65. U slucajevima kada epruvete nisu zatopljavane rastvor plazmidne DNK prekrivan je slojem parafinskog ulja. Centrifugiranje u VTi65 rotoru trajalo je 18 sati na 45000 obrt/min, a u drugim rotorima 36 sati na istoj brzini, na temperaturi od 20°C.

Posle završenog centrifugiranja sadrzaj donje fluorescirajuće, plazmidne trake izvlacen je bocnom punkcijom i prebacivan u Eppendorf epruvete. Ekstrakcija etidijum bromida vrsena je izoamilalkoholom zasicenim TE puferom 6-10 puta u zapreminskom odnosu 1:1. Posle ekstrakcije vodena faza je prebacivana u creva za dijalizu i dijaliza je vrsena u TE puferu sa 7-8 promena pufera. Koncentracija izolovane plazmidne DNK merena je spektrofotometrijski.

4. ENZIMSKE REAKCIJE SA DNK

4.1. Digestije DNK restrikcionim enzimima

Za digestije DNK restrikcionim endonukleazama koriscen je "One-Phor-All Buffer PLUS" sastava: 10mM Tris-acetat, 10mM

magnezijum-acetat, 50 mM kalijum-acetat

4. 2. Popunjavanje DNK krajeva Klenow fragmentom DNK polimeraze I

Za popunjavanje uvucenih 3' OH krajeva DNK, nastalih nakon asimetričnog preseka restrikcijom enzimima, koriscen je Klenow fragment DNK polimeraze I. Ovaj enzim ima 5'-3' polimeraznu, i 3'-5' egzonukleaznu aktivnost, sto omogucava generisanje ravnih krajeva pogodnih za ligiranje DNK molekula, ciji lepljivi krajevi nisu komplementarni. 60 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM β-merkaptotanol, 0,2 mM dNTP miks, 2,5 jedinica DNK polimeraze 1h na 12°C.

Reakciona smesa, pored 0,1-1μg DNK predhodno obradjene restrikcijom enzimom sadrzavala je 60mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM MgCl₂, 10 mM β-merkaptotanol, 0,2 mM dNTP miks, 2,5 jedinica Klenow polimeraze. Reakcija se odvijala 1h na 12°C i zaustavljala inkubacijom na 68°C (10 minuta). Zatim je reakcionoj smesi dodavana voda do 200μl, Na-acetata do koncentracije 0,3M i 2 volumena etanola. Nakon inkubacije 10 min na -70°C, rastvor je centrifugiran 10 min na 12000 obrt/min i DNK dobijena u talogu rastvorena u TE puferu.

4. 3. Ligiranje DNK

Za ligiranje i komplementarnih (lepljivih) i ravnih krajeva DNK koriscen je pufer sastava 50mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM ATP i 5% PEG 8000. Koncentracija DNK u reakcionoj smesi bila je oko 1 μg/ml i dodavana je 1 jedinica T4 DNK ligaze. Inkubacija je vrsena preko noci na 15°C.

5. IZOLOVANJE UKUPNE RNK IZ STREPTOMICETA I MIKROMONOSPORA

Za izolovanje ukupne RNK korisceno je 30 ml sveze kulture. Bakterije su prikupljane centrifugiranjem 10 min na 4000 obrt/min u Sorval SS34 rotoru na 4°C, a zatim su dva puta prane u ohladjenom 20% glicerolu. Posle resuspendovanja u 5 ml P-pufera sa 2 mg/ml lizozima vrseno je protoplastiranje bakterijskih celija na 37°C u trajanju od 10-15 minuta. Suspenziji sa protoplastima je dodavano: SDS (finalno 1%); 0,5M EDTA pH 8 (1/3 volumena) i isti volumen neutralnog fenol-hloroforma nakon cega je intenzivno promesana na vorteksu (2 min). Dobijeni lizat je centrifugiran 5 min na 7000 obrt/min u Sorval SS34 rotoru na 2°C, a onda je gornja faza pazljivo Pasterovom pipetom prebacivana u nove sterilne staklene epruvete (Correx). Ostaci proteina ekstrahovani su ponovljenim dodavanjem iste kolicine neutralnog fenol-hloroforma do potpunog odstranjenja interfaze.

RNK je precipitirana dodavanjem 1/10 volumena 3M NaAc pH6,0 i istog volumena izopropanola uz inkubiranje na sobnoj temperaturi (10 min). Posle talozenja RNK 10 minutnim centrifugiranjem na 8000 obrt/min u Sorval SS34 rotoru na 2°C, supernatant je pažljivo odlivan, a talog pran sa apsolutnim etanolom (-20°C). Zastim je talog susen tacno 2 min pod vakuumom i resuspendovan u 1ml vode. Rastvoru RNK dodavano je 3 volumena 4M NaAc pH 6, pa je prebacivan u Eppendorf epruvete (po 1 ml) i inkubiran preko noci na -20°C. Posle centrifugiranja (20 min, 4°C, 10000 obrt/min, BiofugeA, Heraeus), talog RNK je pran sa 80% etanolom, susen pod vakuumom i rastvaran u 50 µl vode. Koncentracija i cistoca izolovane RNK odredjivana je spektrofotometrijski.

6. ELEKTROFOREZA NUKLEINSKIH KISELINA

6. 1. Elektroforeza DNK

Elektroforeza DNK je radjena na horizontalnim agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani otapanjem agaroze u TBE puferu (89mM Tris, 89mM borna kiselina, 2mM EDTA, finalno pH 8,3) i dodavanjem etidium bromida (0,5 mg/ml). Kao pufer za elektroforezu korisćen je TBE pufer sa 0,5 mg/ml etidium bromida. Agarozni gelovi razlicitog procenta (0,7, 1, ili 1,4) korisćeni su u zavisnosti od toga koje velicine DNK molekula je trebalo razdvojiti. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela.

Velicina fragmenata DNK dobijenih posle digestije restrikcionim enzimima odredjivane su na agaroznim gelovima uporedjivanjem migracija DNK trake koja se ispituje u odnosu na duzinu puta koju su presli DNK fragmenti poznate velicine. U eksperimentalnom radu su korisćeni sledeći standardi:

-λ DNK digerirana *HindIII* i *EcoRI* restrikcionim enzimima pri cemu su dobijani fragmenti DNK duzine 21400 bp, 5370 bp, 5170 bp, 4310 bp, 3530 bp, 2020 bp, 1940 bp, 1610 bp, 1360 bp, 940 bp, 860 bp, 580 bp i 150bp.

Za citanje DNK sekvenci i analizu produkata reakcije sa reverznom transkriptazom korisćeni su 5 i 8% poliakrilamidni gelovi (PAG). Za 100 ml 8% gela korisćeno je 42 grama uree, 20 ml 40% akrilamida (38 g akrilamida i 2 g bisakrilamida na 100 ml), 10 ml 10X TBE pufera, 35 ml vode, 0,8 ml 10% amonium persulfata, i 40 µl TEMED-a. Elektroforeza je izvodjena pri konstantnoj snazi od 60 W, pri cemu je voltaza bila 1500-1900 V, a jacina struje 30-50 mA.

6. 2. Elektroforeza RNK

Elektroforeza RNK radjena je na agaroznim gelovima sa formaldehidom i fosfatni puferom. Pravljani su 1% gelovi u puferu koji je sadržavao 16% formaldehid i fosfatni pufer (0,5M Na₂HPO₄; 0,055M

NaH₂PO₄). Uzorci RNK su pripremani kao smesa 0,5 µg RNK (rastvorene u vodi) i cetiri volumena pufera za uzorak (17,8% formaldehid; 4% fosfatni pufer; 55,5% formamid; 22,2% glicerol i bromfenol plavo u tragovima). Pre nanosenja na gel ovako pripremljeni uzorci su inkubirani 2 min na 60°C. Kao pufer za elektroforezu koriscen je 16% formaldehid u 3,6% fosfatnom puferu, a elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 10 V/cm gela. Pri ovakvim uslovima elektroforeze 5S rRNK je blago zaostajala za bromfenol plavom bojom. Pufer za elektroforezu, pufer za uzorke i gelovi uvek su korisceni sveze napravljeni.

Posle završene elektroforeze vrseno je fiksiranje i bojenje gelova. Fiksiranje gelova je izvodjeno u 10% TCA (3 X 20 min), a onda su gelovi prani u vodi. Gelovi su bojani etidium bromidom u 0,5M amonijum acetatu (1 µg/ml), a zatim osvetljavani UV svetlom i fotografisani.

7. ELUCIJA DNK FRAGMENTATA

7. 1. Elektroelucija DNK fragmenata

Za izolaciju plazmidnih restrikcionih fragmenata zeljena traka je isecana iz preparativnog gela za elektroforezu i elektroeluirana. Elektroelucija je radjena u specijalnim kadicama za elektroeluciju. Posle eluiranja DNK iz gela (60 min pri konstantnom naponu od 100 V), promenom smeru struje (15 sec) DNK je oslobadjana u rastvor, a zatim je pufer sa rastvorenom DNK prebacivan u Eppendorf epruvete. Ekstrakcija etidium bromida iz uzoraka vrsena je izoamil alkoholom saturisanim sa TE puferom (pH 7,5) i preciscavana PCI metodom. Na ovakav nacin izolovani i precisceni DNK restrikcioni fragmenti korisceni su za ligacije i za obelezavanje kao proba za hibridizaciju.

7. 2. Elucija DNK fragmenata iz agaroze niske tacke topljenja

Nakon preparativne elektroforeze, fluorescirajuće DNK trake koje sadrže zeljene restrikcione fragmente su isecane sa gelova koji su pravljani od agaroze niske tacke topljenja. Isecene trake su stavljane u Eppendorf epruvete i otapane 20-30 min u vodenom kupatilu na 70°C. U otopljenu agarozu dodavan je na 37°C isti volumen 0,5% rastvora cetiltrimetil-amonijum bromida (CTAB) u vodi predhodno saturisanoj butanolom i isti volumen 0,5% CTAB-a rastvorenog u butanolu predhodno saturisanog vodom. Posle mesanja rastvor je centrifugiran 1 min na 13000 obrt/min (BiofugeA, Heraeus). Gornja faza koja sadrži DNK vezanu za jone CTAB-a je prebacivana u nove Eppendorf epruvete i rastvoru je dodavan 0,3M NaAc pH 7 (1/4 volumena). Nakon mesanja i centrifugiranja (1 min; 13000 obrt/min), pazljivo je sakupljana donja faza i prebacivana u nove Eppendorf epruvete. Posle dodavanja 2-4 % 3M NaAc i 3 volumena hladnog (-20°C) apsolutnog alkohola uzorci su inkubirani 10 min na

-80°C, a zatim centrifugirani 20 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na 4°C. Posle pranja sa 75% etanolom (-20°) DNK je susena pod vakumom i rastvarana u vodi.

8. TRANSFORMACIJA BAKTERIJA

8. 1. Transformacija *E. coli* kompetentnih celija

Kompetentne celije *E. coli* (NM522) pripremane su na sledeci nacin. Pojedinačna bakterijska kolonija je zasejavana u 5ml LB medijuma . Nakon prekonocne inkubacije kultura je razblazivana 20 puta u svezem LB medijumu i inkubirana na 37°C uz aeraciju do srednje logaritamske faze rasta ($OD_{620}=0,3-0,4$). Zatim je tako izrasla kultura razblazivana 10 puta u 20 ml LB medijuma i ponovo inkubirana do srednje logaritamske faze rasta. Rast celija je zaustavljan inkubacijom kulture 10 min na ledu. Posle centrifugiranja talog celija je resuspendovan u 10 ml na ledu ohladjenog 0,1M $CaCl_2$. Suspenzija je inkubirana 10 min na ledu i posle centrifugiranja (10 min na 4°C na 5000obrt/min; Sorval SS34 rotor) dobijeni talog je pazljivo resuspendovan u 2 ml hladnog 0,1M $CaCl_2$ sa 15% glicerolom. Na ovakav nacin pripremljene kompetentne celije su deljene u alikvote od po 250 μ l i koriscene odmah ili su zamrzavane u suvom ledu i cuvane na -80°C do koriscenja.

Transformacija kompetentnih celija je radjena tako sto je u rastvor plazmidne DNK ili u ligacionu smesu dodavano 20 μ l hladnog 5X TNE pufera (50mM Tris pH 7,5; 5mM EDTA pH 7,5; 50mM NaCl) i dopunjavano do 100 μ l hladnom sterilnom bidestilovanom vodom. Zatim je u tu smesu dodavano 3,2 μ l 1M $CaCl_2$ i 200 μ l neposredno pripremljenih ili sa -80°C odmrznutih kompetentnih celija. Posle inkubacije na ledu (60 min) i povremenog blagog mesanja, zatim inkubacije 2 min na 42°C i 5 min na ledu, transformaciona smesa je prebacivana u 2 ml LB medijuma i inkubirana bez aeracije 30 min na 37°C i uz aeraciju (sledecih 30 min).

8. 2. Pripremanje i transformacija protoplasta streptomiceta i mikromonospora

Za pripremanje i transformaciju protoplasta streptomiceta koriscena je metoda Hopwood-a (1985). Za pripremanje protoplasta uvek je zasejavana bakterijska kulturta sa sporama sveze sporulisalih micelijuma i inkubirana 36 h uz intenzivnu aeraciju na 250 obrt/min u posudama sa metalnom spiralom. Posle prikupljanja micelijuma centrifugiranjem na 3000 obrt/min u Sorval SS34 rotoru talog je pran u 10,3% saharozi, pa zatim u P-puferu. Liziranje bakterijskog zida radjeno je u P-puferu koji je sadrzao 1

mg/ml lizozima na 30°C u trajanju od 60 min stim da je nakon 30 min inkubacije vrseno provlacenje suspenzije micelijuma 3 puta kroz pipetu od 10 ml. Posle filtriranja protoplasti su taloženi centrifugiranjem na 4000g. Talog protoplasta je rastvaran u P-puferu sa 20% saharozom, deljen u alikvote i brzo zamrzavan u suvom ledu. Protoplasti su do upotrebe cuvani na - 80°C.

Alikvoti protoplasta su po potrebi naglo odmrzavani i dodavana im je plazmidna DNK ili ligaciona smesa. Posle laganog muckanja smesi je dodavano 0,5 ml T-pufera i sve je provlaceno 3-4 puta kroz pipetu. Transformaciona smesa je inkubirana 2 min na sobnoj temperaturi, a zatim je razmazivana na R2YE regeneracionu podlogu. Posle inkubacije od 14-20 h na 30°C kulture su prelivane rastvorom odgovarajuceg antibiotika.

Pripremanje i transformacija protoplasta bakterije *Micromonospora melanospora* vrsena je po proceduri razvijenoj u nasoj laboratoriji (Kojic et al. 1991).

9. SEKVENCIRANJE DNK

Redosled nukleotida u DNK odredjivan je metodom Sanger et al. (1977). Metoda se zasniva na sposobnosti Klenovog fragmenta DNK polimeraze I, odnosno T7 polimeraze, da, nastavljajuci "primer" sintetise komplementarni lanac DNK koristeći jednolancanu hibridnu DNK kao matricu. Reakcija sinteze komplementarnog lanca se zaustavlja ugradjivanjem dideoksinukleozidtrifosfata (ddNTP) koji nemaju 3'-OH grupu neophodnu za elongaciju. Protokol i reagensi za sekvenciranje korisceni su od proizvođača (US Biochemicals). Sekvenciranje je radjeno sa jednolancanom DNK ili sa denaturisanim plazmidima kao matricom. Plazmidi su denaturisani alkalijama pre reakcije sekvenciranja i to na sledeci nacin.

a) Denaturisanje plazmidne DNK

Oko 2 µg plazmidne DNK (izolovane na CsCl-EtBr gradijentu) rastvarano je u 20µl vode. Dodavano je 2µl 2M NaOH, 2mM EDTA i inkubirano 25 min na 37°C. Zatim je rastvor DNK neutralisan dodavanjem 3µl 3M NaAc pH4,5. Posle dodavanja 7 µl vode, DNK je precipitirana sa 75µl apsolutnog etanola 5 min na -70°C i centrifugirana 10 min u mikrocentrifugi. Denaturisana plazmidna DNK resuspendovana je u 7µl vode.

b) Vezivanje matrice i "primer"-a i reakcije sekvenciranja

Ovako pripremljena dvolancana ili jednolancana DNK ulazile su u reakciju spajanja sa odgovarajucim oligonukleotidnim "primer"-om, koji je komplementaran odredjenoj sekvenci na vektorskoj DNK. Oko 1µg DNK mesano je sa 2-5 ng prajmera u odgovarajucem puferu, inkubirano 2 min na 65°C, a zatim sporo hladjeno do ispod 35°C. U reakciju je dodavana smesa nukleotida i 0,6 µl ³⁵S tio-dATP (Amersham) (spec. akt. >1000Ci/mmol) i Klenow polimeraza (1u). Reakciona smesa razdvajana je u 4 Eppendorf epruvete u koje su dodavani razliciti dideoksinukleotidi, iza cije ugradnje se zaustavlja

proces sinteze DNK. Reakcije su zaustavljane dodavanjem pufera za nanosenje na elektroforezu (formamid, EDTA, bromfenol plavo i ksilen cijanol). Uzorci su kuvani 2 minuta na 75°C i cuvani do elektroforeze na -20°C.

10. ODREDJIVANJE STARTA TRANSKRIPCIJE GENA ("PRIMER EXTENSION")

Mapiranje starta transkripcije ili 5' kraja informacione RNK vrseno je na sledeci nacin. RNK (oko 40-80 µg) je anilirana 2 min na 95°C sa 8 pmol prajmera, u 6 µl aniling pufera (10mM Hepes-KOH, pH7; 50mM KCl), a zatim je smesa polako ohladjena na 37°C. Koncentracija magnezijumovih jona je povecana dodavanjem 1/2 volumena anealing M pufera (10mM Hepes-KOH, pH7; 50mM KCl; 30mM MgCl₂), nakon cega je smesa inkubirana 20 min na sobnoj temperaturi. U 4,5µl aniling smese dodavano je 4,5µl RT smese (50mM Tris-HCl, pH8,3; 50mM KCl; 10mM MgCl₂; 20mM DTT; 0,25mM dNTP (dTTP, dGTP, dCTP); 3,2µCi [α^{35} S]dATP; 1u AMV reverzne transkriptaze (Anglian Biotechnology Ltd), i sve zajedno inkubirano 15 min na 42°C. Posle dodavanja 2µl "chase" smese [50mM Tris-HCl, pH8,3; 50mM KCl; 10mM MgCl₂; 20mM DTT, 1mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)], reakciona smesa je dodatno inkubirana u trajanju od 20 min. Reakcije su zaustavljane dodavanjem pufera za nanosenje na elektroforezu (formamid, EDTA, bromfenol plavo i ksilen cijanol). Uzorci su denaturisani 3 min na 75°C i do elektroforeze su cuvani na -20°C.

Za analizu reakcija sa reverznom transkriptazom korisceni su 5 i 8% poliakrilamidni gelovi na koje su paralelno nanoseni uzorci iz reakcija sekvenciranja DNK sa istim prajmerom koji je koriscen i za "primer extension".

11. TEST β -GALAKTOZIDAZE

Aktivnost enzima β -galaktozidaze merena je u soju *E. coli* NM522, koji je sadrzavao razlicite plazmide sa *lacZ* reporter genom. Ekspresija sa p_ltl promotora je bila indukovana 1mM IPTG-om. Sam esej je radjen po Miller-u (1972), a konacne tabelarne vrednosti dobijene su kao srednja vrednost od najmanje 6 eksperimenata.

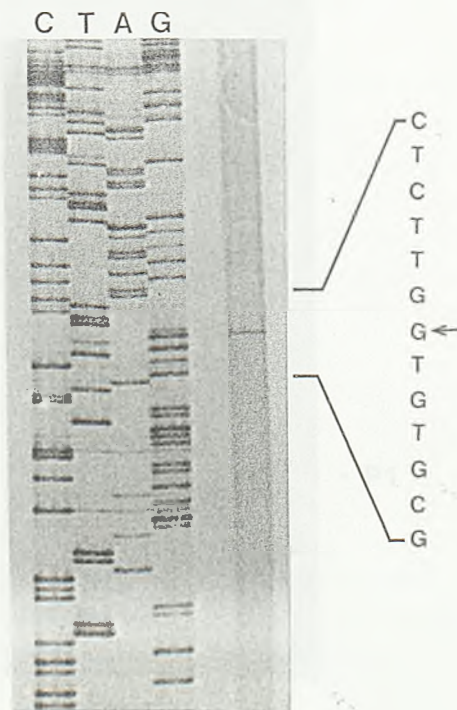
III REZULTATI

1. ANALIZA TRANSKRIPCIONE REGULACIJE *sgm* GENA

Jedan od prevashodnih ciljeva ovoga rada bio je određivanje nivoa na kome deluju regulatorni mehanizmi koji kontrolisu ekspresiju *sgm* gena. Po sledu događaja u toku ekspresije bilo kog gena primarni, najdirektniji, najekonomičniji i najcesci nivo na kome se regulacija može ostvarivati je inicijacija transkripcije. U slučaju *sgm* gena, ranijim eksperimentima je utvrđeno da se on uspesno eksprimira u *S. lividans*, *M. melanosporea* i *E. coli*, s tim da se u prva dva soja ekspresija vrši sa sopstvenih regulatornih sekvenci dok je u *E. coli* zavisna od transkripcionih signala ove bakterije (Kojic *et al.* 1992). Prvi korak u detaljnijoj analizi transkripcione regulacije bio je određivanja starta transkripcije *sgm* gena.

1. 1. ODREĐIVANJE STARTA TRANSKRIPCIJE *sgm* GENA

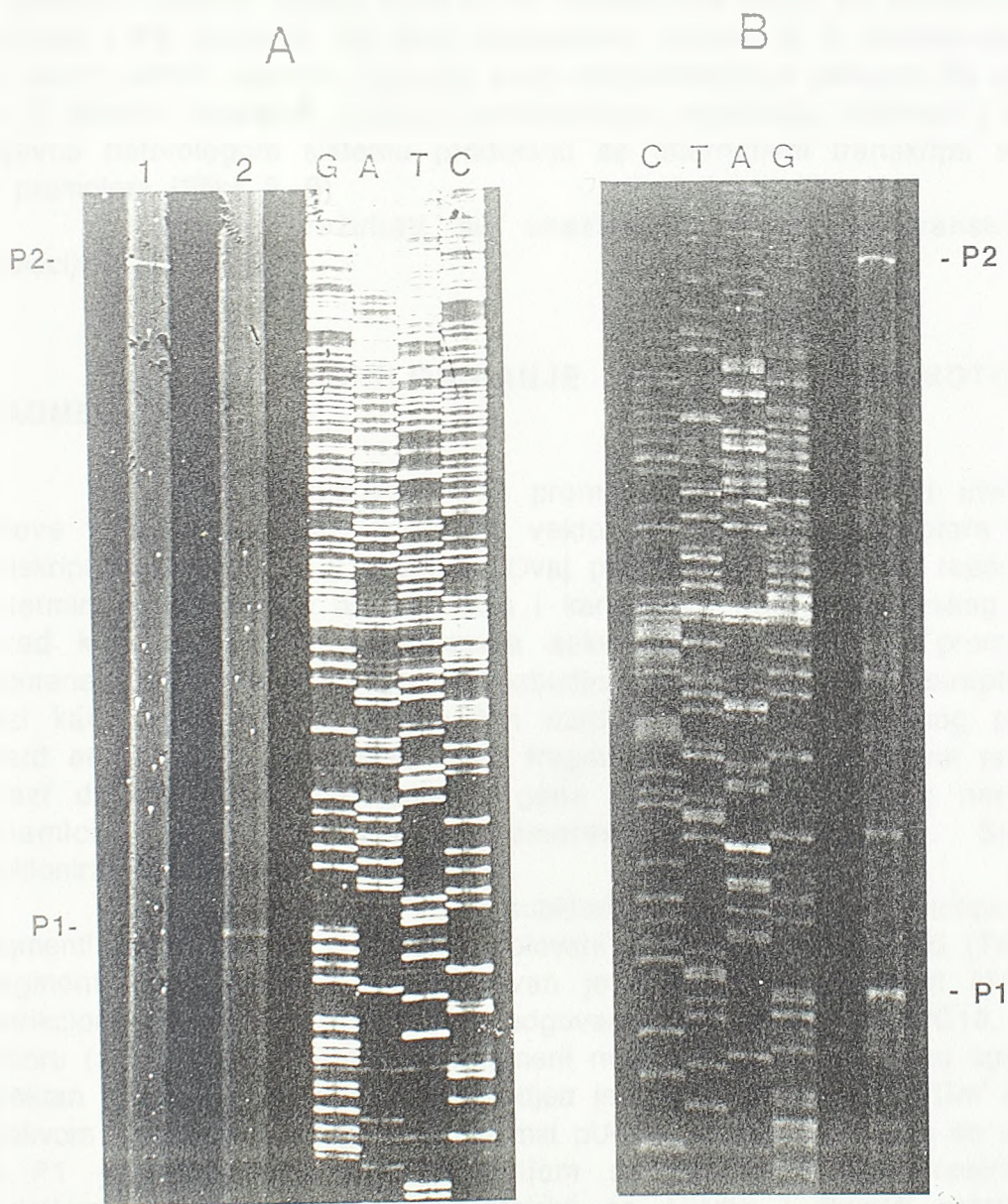
U cilju utvrđivanja tačnog mesta otpocinjavanja transkripcije *sgm* gena izolovana je ukupna RNK iz *S. lividans-sgm* klonu koji sadrži pMK33 plazmid (Slika 12; Dodatak). Ovaj plazmid sadrži *Sa*II-*Sa*II DNK fragment (1122bp) na kome se nalazi celokupna (kodirajuća i regulatorna) genetska informacija za ekspresiju gentamicinske rezistencije u *S. lividans* i *M. melanosporea*, a dobijen je sukcesivnim subkloniranjem iz ishodnog plazmida koji sadrži 4,5 kbp primarno klonirane hromozomalne DNK *M. zionensis* (pMK3). Da se na ovom fragmentu nalaze promotorska sekvenca potvrđeno je njegovom ugradnjom u vektor pIJ702 i transformacijom *S. lividans* i *M. melanosporea* protoplasta pri čemu su dobijeni transformanti rezistentni na gentamicin. Za reakciju sa reverznom transkriptazom koriscen je kao "primer" 24-merni oligonukleotid čija je pozicija oznacena na sekvenci (Slika 13, Dodatak). Nakon izvršene reakcije sa reverznom transkriptazom i analizom njenih produkata dobijen je rezultat prikazan na Slici 1.



Slika 1. Određivanje starta transkripcije *sgm* gena u *S. lividans-sgm* klonu (sa plazmidom pMK33). G, A, T, C- reakcije sekvenciranja koje sadrže komplementarne dideoksinukleotide. Na delu sekvence prikazane sa strane oznacen je nukleotid (*) koji odgovara startu transkripcije.

Kao što se može videti transkripcija *sgm* gena počinje od G nukleotida koji se nalazi 72 bp uzvodno od ATG kodona.

U sledecem eksperimentu zeledo se utvrditi da li se transkripcija *sgm* gena i u *M. zionensis* vrsti sa iste tacke, odnosno da li je transkripcija u ishodnom soju promovisana istim promotorom. Da bi se to ostvarilo izolovana je totalna RNK iz *S. lividans-sgm* klonu koji sadrzi pMK33 i iz *M. zionensis*. RNK je izolovana iz kultura koje su bile u stacionarnoj fazi rasta, a za reakciju sa reverznom transkriptazom koriscen je isti, vec opisani 24-mer. Rezultati ovog eksperimenta su prikazani na Slici 2 pod A.



Slika 2. Odredjivanje starta transkripcije *sgm* gena. A: 1) u *M. zionensis*; 2) u *S. lividans-sgm* klonu (sa plazmidom pMK33). B: u *S. lividans-sgm* klonu (sa plazmidom pMK31). G, A, T, C-reakcije sekvenciranja koje sadrže komplementarne dideksinukleotide. P1-mesto inicijacije transkripcije sa P1 promotora. P2-mesto inicijacije transkripcije sa P2 promotora.

Sa prikazane autoradiografije uocljivo je da je dobijen interesantan rezultat. Transkripcija *sgm* gena pocinje od razlicitih nukleotida u *M. zionensis* i *S. lividans*-*sgm* klonu koji sadrzi pMK33. U *S. lividans*-*sgm* klonu start transkripcije *sgm* gena mapira na mestu utvrdjenom predhodnim eksperimentom, dok je pocetak njegove transkripcije u *M. zionensis* udaljen oko 250 nukleotida uzvodno od starta translacije. Promotor blizi ATG kodonu oznacen je kao P1, a udaljeniji kao P2 (Slika 2, A)

Iz vec opisanih rezultata prirodno se nametnulo pitanje da li se *sgm* gen i u *S. lividans* eksprimira i sa P2 promotora. Da bi se to utvrdilo bilo je potrebno izolovati totalnu RNK iz *S. lividans*-*sgm* klona sa sekvencom koja obuhvata i P2 promotor. Za ovaj eksperiment izabran je *S. lividans*-*sgm* klon koji sadrzi pMK31 plazmid. Rezultat ovog eksperimenta je pokazao da *sgm* gen i u *S. lividans* zadrzava slozenu transkripcionu regulaciju, odnosno i u ovom relativno heterologom sistemu produkuju se alternativni transkripti sa P1 i P2 promotora (Slika 2, B)

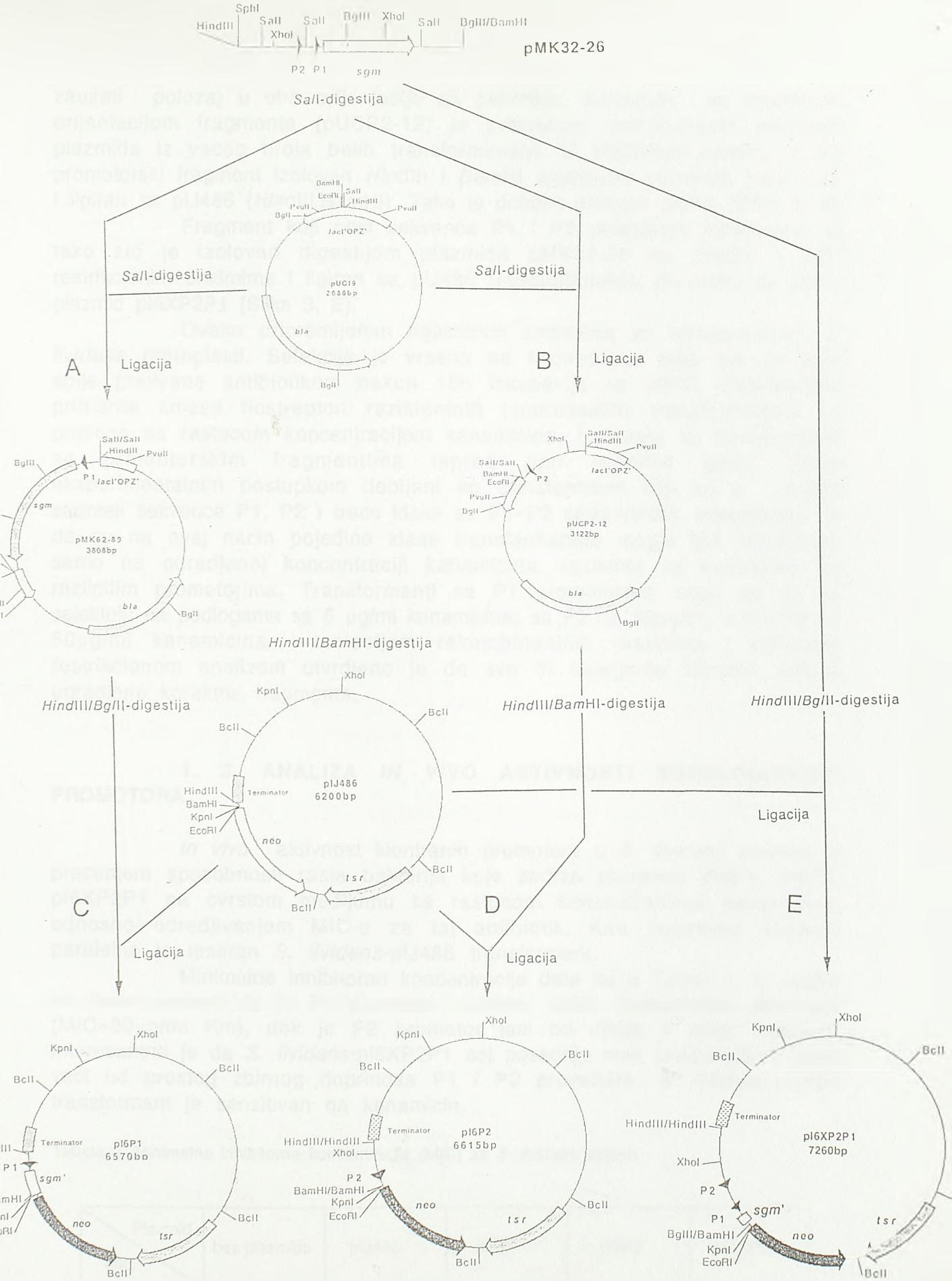
Svi ovi rezultati su ukazivali na slozenu transkripcionu regulaciju *sgm* gena.

1. 2. SUBKLONIRANJE P1 I P2 PROMOTORSKIH FRAGMENTATA

Za kloniranje P1 i P2 promotorskih fragmenata i utvrdjivanje njihove jacine koriscen je pIJ486 vektor za selekciju promotora koji su transkripciono aktivni u *S. lividans*. Ovaj plazmid poseduje *nph* reporter gen (determinise rezistenciju na neomicin i kanamicin) bez promotorskog regiona ispred koga se nalazi polilinkerska sekvenca za kloniranje promotorskih fragmenata i poseduje *tsr* gen (obezbedjuje rezistenciju na tiostrepton) koji sluzi kao primarni lako selektabilan marker za selekciju samog plazmida (Ward *et al.* 1986). Insercijom DNK fragmenata koji nose aktivne promotore dolazi do aktivacije *nph* reporter gena i do rezistencije na neomicin i kanamicin, a ciji je nivo srazmeran jacini promotora. Strategija subkloniranja prikazana je na Slici 3.

Promotori P1 i P2 su subklonirani tako sto su restrikcioni DNK fragmenti koji nose ove promotore izolovani iz plazmida pMK32-26 (Tabela 1). Fragment sa P1 promotorom izolovan je najpre kao *Sa*II-*Sa*II (1122 bp) restrikcioni fragment i usmeren u odgovarajucem smeru u pUC19, *E. coli* vektoru (Slika 3, A). Posto ovaj fragment nosi celokupnu sekvencu *sgm* gena, korektan smer njegove ugradnje odredjen je samom selekcijom Gm^r fenotipa. Ovakvom ugradnjom *sgm* gena u plazmid pUC19, omoguceno je da se sekvenca sa P1 promotorom izoluje digestijom sa *H*indIII i *B*g/II restrikcionim enzimima. Plazmid pIJ486 je digeriran sa *H*indIII i *B*amHI restrikcionim enzimima i ligiran sa, na vec opisani nacin pripremljenim DNK fragmentom koji nosi sekvence P1 promotora. Na taj nacin je dobijen plazmid pl6P1 (Slika 3, C).

Promotor P2 subkloniran je kao *Sa*II-*Sa*II (435bp). Ovaj DNK fragment nosi izolovanu sekvencu P2 promotora, ali pIJ486 vektor u svojoj polilinkerskoj sekvenci ne poseduje jedinstveno *Sa*II restrikciono mesto, pa je i ovaj DNK fragment morao biti prvo kloniran u pUC19 selekcijom za prisustvo fragmenta (Slika 3, B). Posto subklonirani DNK fragment moze



Slika 3. Strategija subkloniranja P1 i P2 promotora. Detalji ove strategije su opisani u tekstu.

zauzeti položaj u obe orijentacije na plazmidu, konstrukt sa korektnom orijentacijom fragmenta (pUCP2-12) je pronađen restrikcijom analizom plazmida iz većeg broja belih transformanata. U sledecem koraku je P2 promotorski fragment izolovan *HindIII* i *BamHI* digestijom plazmida pUCP2-12 i ligiran sa pJ486 (*HindIII/BamHI*). Tako je dobijen plazmid p6P2 (Slika 3, D)

Fragment koji nosi sekvence P1 i P2 promotora subkloniran je tako sto je izolovan digestijom plazmida pMK32-26 sa *HindIII* i *BglII* restrikcijom i ligiran sa pJ486 (*HindIII/BamHI*), pri čemu se dobio plazmid p6XP2P1 (Slika 3, E).

Ovako pripremljenim ligacionim smesama su transformisani *S. lividans* protoplasti. Selekcija je vršena na tiostreptonu tako sto su petri solje prelivane antibiotikom nakon 18h inkubacije na 30°C. Otiskivanjem primarne smese tiostrepton rezistentnih (sporulisalih) transformanata na podloge sa rastucom koncentracijom kanamicina, izolovani su transformanti sa promotorskim fragmentima ispred *nph* reporter gena. Ovim eksperimentalnim postupkom dobijeni su transformanti koji su u pJ486 sadržali sekvence P1, P2 i treće klase sa P1+P2 promotorom. Interesantno je da su na ovaj način pojedine klase transformanata mogle biti selektirane samo na određenoj koncentraciji kanamicina, različitoj za konstrukte sa različitim promotorima. Transformanti sa P1 promotorom mogli su da se selektuju na podlogama sa 5 µg/ml kanamicina; sa P2 na 30µg/ml, a P1+P2 na 50µg/ml kanamicina. Izolacijom rekombinantnih plazmida i njihovom restrikcijom analizom utvrđeno je da sve tri kategorije klonova sadrže ugrađene korektne fragmente.

1. 3. ANALIZA IN VIVO AKTIVNOSTI SUBKLONIRANIH PROMOTORA

In vivo aktivnost kloniranih promotora u *S. lividans* merena je praćenjem sposobnosti rasta bakterija koje sadrže plazmide p6P1, p6P2, p6XP2P1 na čvrstom medijumu sa rastucom koncentracijom kanamicina, odnosno određivanjem MIC-a za taj antibiotik. Kao negativna kontrola paralelno je testiran *S. lividans*-pJ486 transformant.

Minimalne inhibitorne koncentracije date su u Tabeli 1. Iz tabele se jasno uočava da je P1 promotor relativno slabe promotorske aktivnosti (MIC=30µg/ml Km), dok je P2 promotor jači od njega 4 puta. Posebno interesantno je da *S. lividans*-p6XP2P1 soj poseduje nivo rezistencije 2 puta veći od prostog zbirnog doprinosa P1 i P2 promotora. *S. lividans*-pJ486 transformant je senzitivn na kanamicin.

Tabela 2. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za *S. lividans* sojeve.

Plazmid MIC	bez plazmida	pJ486	p6P1	p6P2	p6XP2P1
Kanamicin (µg/ml)	<1	<1	30	120	300

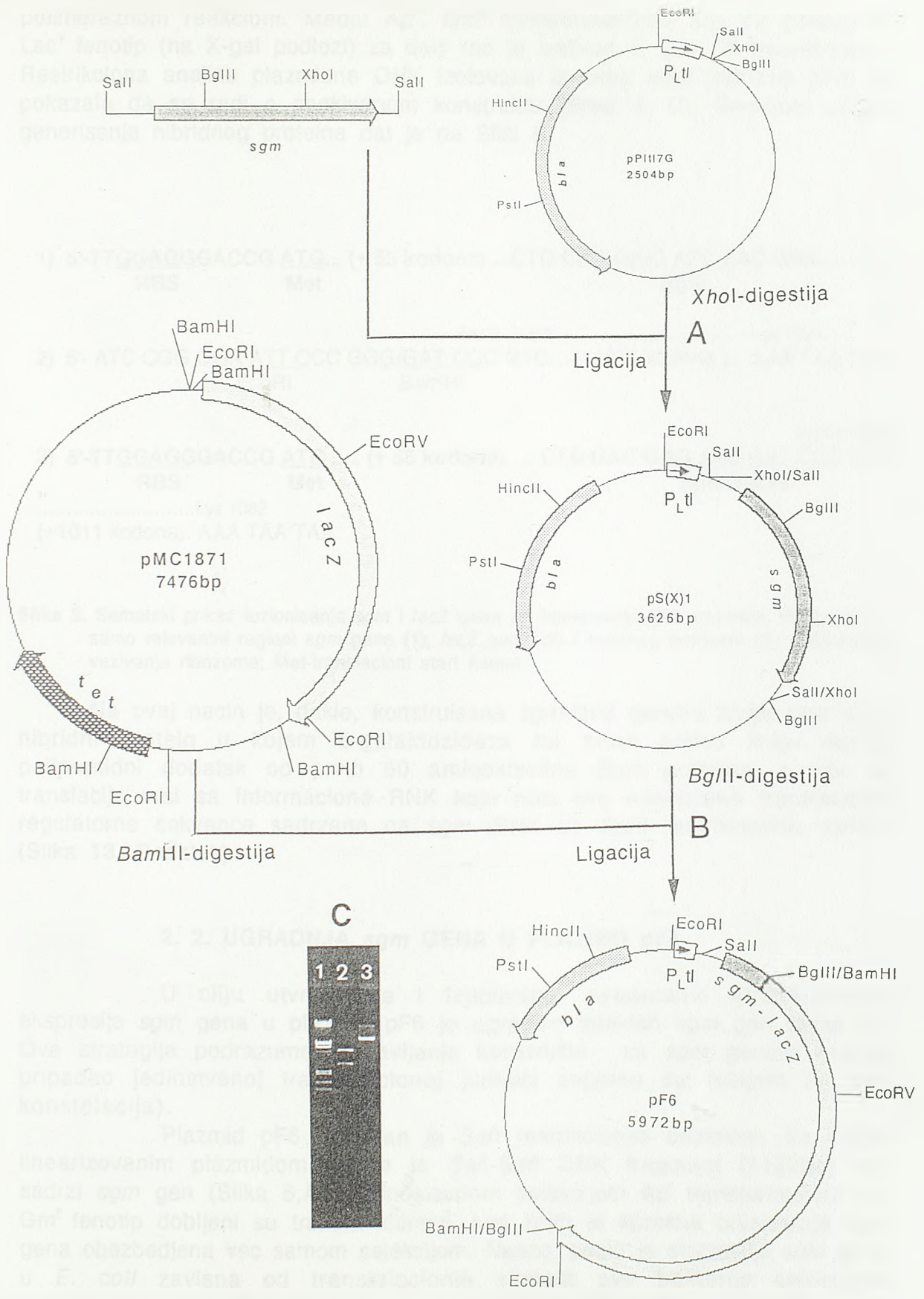
2. KONSTRUISANJE *lacZ* FUZIJA

Analiza specifičnih bioloških problema impresivno je ubrzana razvojem novih genetičkih pristupa, prvenstveno rekombinantne DNK metodologije. Ovom, bukvalno eksplozivnom nagomilavanju bioloških znanja sigurno je doprinela i upotreba genetičkih fuzija. Korisnost ovog pristupa demonstrirana je od relativno jednostavnih analiza regulacije ekspresije gena kod bakterija pa do studija kompleksnih procesa diferencijacije eukariota. Za sada su u proučavanju bioloških fenomena, ovim pristupom, najintenzivnije korišćene *lacZ* fuzije. Razlozi tome počivaju na činjenicama da je: 1) *lac* operon jedan od najproučenijih genetičkih sistema, tako da su brojni genetički i biohemijski aspekti ovog sistema poznati, 2) da postoji veći broj indikatorskih medijuma preko kojih se direktno može pratiti različit nivo ekspresije *lacZ* gena, 3) mogućnost vrlo preciznog kvantifikovanja nivoa ekspresije preko hidrolize funkcionalnih analoga laktoze, 4) sama priroda β -galaktozidaze (molekulska masa subjedinice je 116 kDa; β -galaktozidaze pri konstruisanju proteinskih fuzija trpi na amino terminusu dodavanje preko 500 amino kiselina, bez većeg efekta na specifičnu aktivnost enzima) itd. (Silhavy and Beckwith, 1985). U ovom radu *lacZ* fuzije su korišćene za utvrđivanje i karakterizaciju regulacije ekspresije *sgm* gena. Distinkcija između dva moguća nivoa kontrole genske ekspresije, transkripcionog i translacionog vršena je konstruisanjem operonskih i genskih *lacZ* fuzija. Ukoliko se regulacija odvija na transkripcionom nivou i operonska i genska fuzija će pokazati jednako ponašanje, a ukoliko se regulacija ostvaruje na nekom od kasnijih koraka, biće identifikovane razlike u aktivnosti između konstrukata operonskih i genskih fuzija.

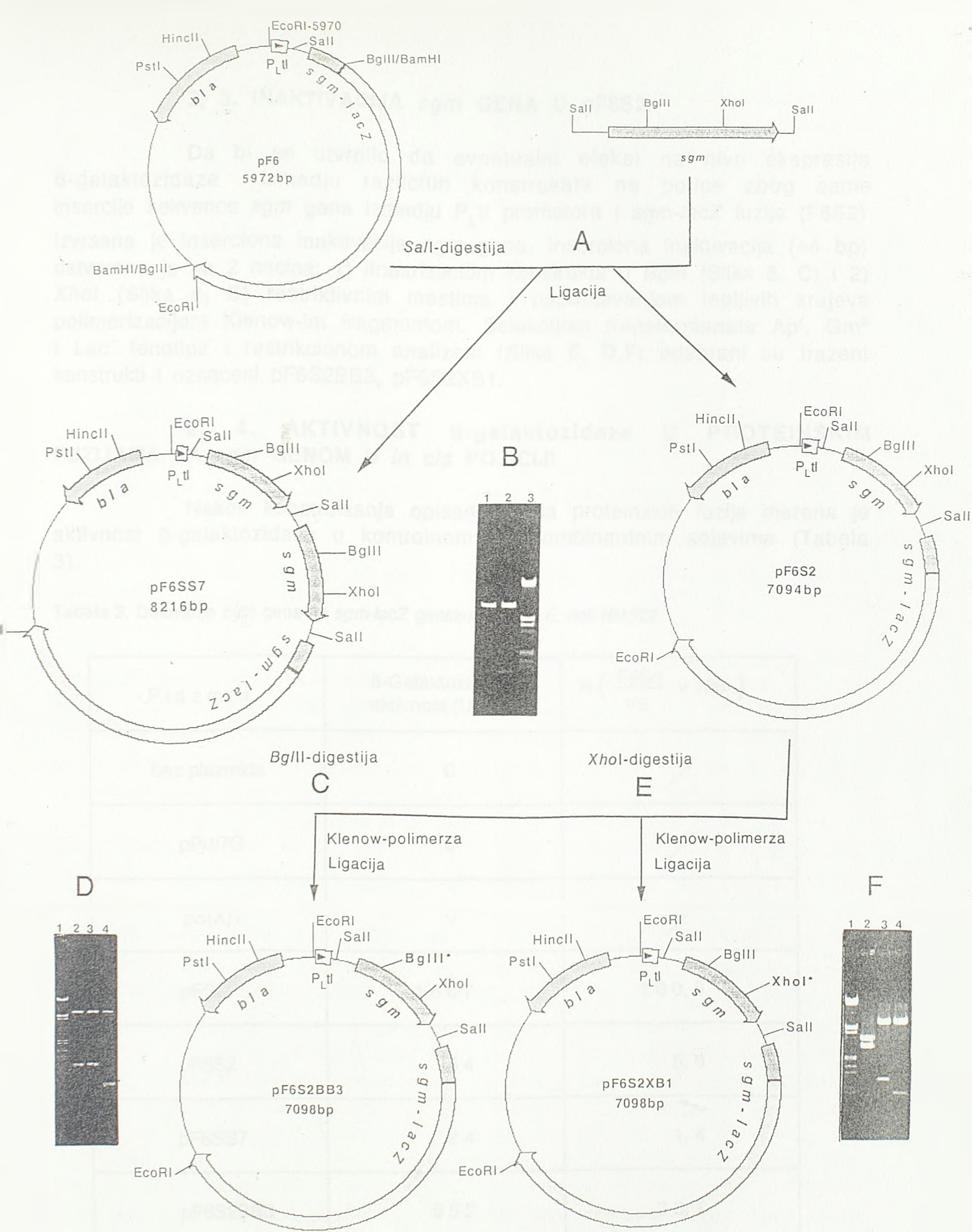
2. 1. *IN VITRO* KONSTRUISANJE *sgm-lacZ* GENSKE FUZIJE

Osnovni preduslov za *in vitro* konstruisanje genskih fuzija jeste poznavanje nukleotidne sekvence kodirajućeg dela gena čiji će aminokiselinski deo biti fuzionisan sa amino terminusom β -galaktozidaze. Polazeći od već poznate sekvence *sgm* gena (Slika 13) i koristeći plazmid pP_Ltl7G (Konstantinovic *et al.* 1991) kao i *lacZ* gen izolovan iz pMC1871 (Shapira *et al.* 1983) *sgm-lacZ* genska fuzija je napravljena u više sukcesivnih koraka (Slika 4). Budući da ekspresija *sgm* gena u *E. coli* zavisi od transkripcionih signala ove bakterije (Kojic *et al.* 1992) pri konstrukcijama ovaj gen je uvek pozicioniran nizvodno i u smeru transkripcije sa P_Ltl promotora.

Najpre je *sgm* gen (kao *SalI-SalI* fragment) ugrađen u *XhoI* linearizovan pP_Ltl7G plazmid (Slika 4, A). Među ampicilin rezistentnim transformantima selektirani su gentamicin rezistentni transformanti, a za dalju analizu i rad izabran je jedan koji je označen kao S(X)1. U drugom koraku, *BglII* digestijom i elucijom, iz plazmida pS(X)1 je odstranjeno dve trećine 3' kraja *sgm* gena. Preostali, linearni deo pS(X)1 plazmida je ligan sa *lacZ* genom (*BamHI-BamHI* fragment) iz pMC1871 plazmida (Slika 4, B). Da bi se dobio hibridni protein, odnosno da bi translaciono dekodiranje *sgm* i *lacZ* gena bilo u istoj fazi, generisani *BglII* i *BamHI* krajevi su morali biti (izračunato na osnovu poznatih sekvenci jednog i drugog gena) popunjeni



Slika 4. Strategija konstruiranja pF6 (A, B) i restrikciona analiza ovog konstrukta (C). 1) λ *HindIII/EcoRI* standard; 2) pF6 digeriran sa *EcoRI*; 3) pF6 digeriran sa *Sall*. Detalji su opisani u tekstu.



Slika 6. Sematski prikaz ugradnje *sgm* gena u plazmid pF6 (A) i njegove inaktivacije u *Bgl*III (C) i *Xho*I (E) restrikcionim mestima. B: 1) pF6S2-*Xho*I dig.; 2) pF6SS7-*Xho*I dig.; 3) λ *Hind*III/*Eco*RI standard. D: 1) λ *Hind*III/*Eco*RI standard; 2) pF6S2BB3-*Sa*II dig.; 3) pF6S2BB3-*Sa*II/*Bgl*III dig.; 4) pF6S2-*Sa*II/*Bgl*III dig.; F: 1) λ *Hind*III/*Eco*RI standard; 2) pF6S2XB1-*Eco*RI/*Xho*I dig. ; 3) pF6S2XB1-*Sa*II/*Xho*I dig.; 4) pF6S2-*Sa*II/*Xho*I dig.

2, 3. INAKTIVACIJA *sgm* GENA U pF6S2

Da bi se utvrdilo da eventualni efekat na nivo ekspresije β -galaktozidaze izmedju razlicitih konstrukata ne potice zbog same insercije sekvence *sgm* gena izmedju P_{Ltl} promotora i *sgm-lacZ* fuzije (F6S2) izvršena je inserciona inaktivacija *sgm* gena. Inserciona inaktivacija (+4 bp) ostvarena je na 2 nacina; 1) linearizacijom konstrukta u *Bgl*II (Slika 6, C) i 2) *Xho*I (Slika 6, E) restriktivnim mestima i popunjavanjem lepljivih krajeva polimerizacijom Klenow-im fragmentom. Selekcijom transformanata Ap^r , Gm^s i Lac^+ fenotipa i restrikcionom analizom (Slika 6, D,F) odabrani su trazeni konstrukti i oznaceni pF6S2BB3, pF6S2XB1.

2. 4. AKTIVNOST β -galaktozidaze U PROTEINSKIM FUZIJAMA SA *sgm* GENOM U *in cis* POZICIJI

Nakon konstruisanja opisanog seta proteinskih fuzija merena je aktivnost β -galaktozidaze u kontrolnom i rekombinantnim sojevima (Tabela 3).

Tabela 3. Delovanje *sgm* gena na *sgm-lacZ* gensku fuziju u *E. coli* NM522.

Plazmid	β -Galaktozidazna aktivnost (U)*	$R \left(\frac{F6Sn}{F6} \times 100 \right)$
bez plazmida	0	/
pLtl7G	0	/
pS(X)1	0	/
pF6	1667	100,0
pF6S2	84	5,0
pF6SS7	24	1,4
pF6S2BB3	552	33,1
pF6S2XB1	1695	101,7

* -Aktivnost β -galaktozidaze je izrazena u jedinicama po Miller-u (1972)

R-Odnos β -galaktozidazne aktivnosti u *E. coli* NM522 koja sadrzi pF6 sa aktivnim ili neaktivnim *sgm* genom (pF6Sn) i soka koji je transformisan pF6 plazmidom.

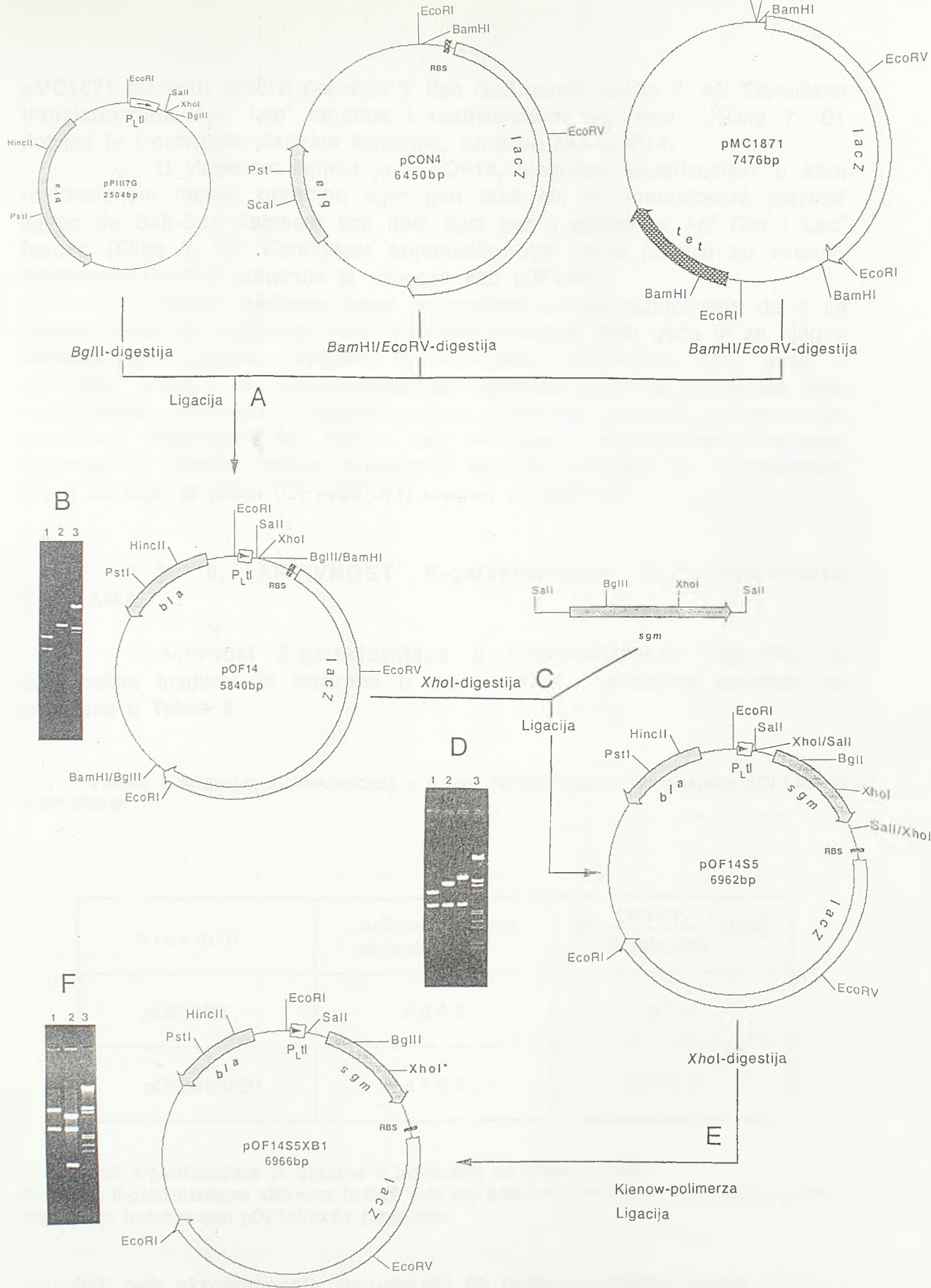
Sa gornje tabele se moze videti da prisustvo jedne kopije *sgm* gena vrsi (u odnosu na samu fuziju) redukovanje β -galaktozidazne aktivnosti 20 puta. Pored toga, u ovom sistemu je ocigledan efekat genske doze. Naime, kada su na jedinstvenom transkriptu sa fuzijom prisutne dve kopije *sgm* gena (pF6SS7) β -galaktozidazna aktivnost se redukuje oko 70 puta. Uocljivo je takodje da dupla doza *sgm* gena ne vrsi represiju u linearnom odnosu. Aktivnost β -galaktozidaze u F6SS7 soju je 3.57 puta manja nego u soju F6S2. Inaktivacija *sgm* gena u *XhoI* restrikcionom mestu potpuno eliminise represivno delovanje Sgm proteina, dok inaktivacija u *BglII* restrikcionom mestu ne dovodi do istog fenomena, vec se zadrzava ~67% represivnog delovanja odnosno 33,1% vrednosti β -galaktozidazne aktivnosti.

Ovi podaci snazno ukazuju na to da se represija aktivnosti β -galaktozidaze odvija posredstvom translacionog produkta *sgm* gena. Inaktivacija *sgm* gena u *XhoI* pokazuje da samo prisustvo njegove sekvence na jedinstvenoj transkripcionoj jedinici uzvodno od *sgm-lacZ* fuzije, najverovatnije ne utice bitno na nivo ekspresije β -galaktozidaze.

2. 5. KONSTRUISANJE OPERONSKE *sgm-lacZ* FUZIJE SA *in cis* POZICIJOM *sgm* GENA

U predhodnom delu Rezultata opisano je konstruisanje proteinske *sgm-lacZ* fuzije kojoj je u *cis* poloazaju dodavana jedna ili dve kopije *sgm* gena. U opisanim konstruktima aktivnost β -galaktozidaze nalazi se pod kontrolom transkripcionih signala P_{Ltl} promotora i translacionih signala *sgm* gena. Dalji cilj je bio konstruisanje operonske fuzije. U stvari, klasicna operonska fuzija *sgm* i *lacZ* ne moze da se konstruise tako da ima ekspresiju u *E. coli* domacinu. Fuzija koja je u ovom radu konstruisana moze se oznaciti kao pseudo-*sgm-lacZ* operonska fuzija, u kojoj je funkcionalan P_{Ltl} promotor, odgovoran za transkripciju *sgm* i *lacZ* gena, pri cemu oba gena sadrze sopstvene translacione signale (SD-sekvencu, ATG kodon). Posto promotor *sgm* gena ne funkcionise u *E. coli* jasno je da ce LacZ aktivnost p $P_{Ltl}7G$ konstrukata koji imaju samo *lacZ* gen biti, ustvari, mera aktivnosti, jacine P_{Ltl} promotora. Konstruisanje ovakve fuzije je imalo za cilj da pokaze, ne klasicnu identifikaciju nivoa regulacije i domena odgovornih za regulatorne dogadjaje na nivou transkripcije, vec da omoguci pracenje prisustva ili odsustva transkripcione regulacije usled vezivanja Sgm proteina za sopstvenu iRNK, (transkripciona atenuacija ili terminacija). Efekat toga bi se sigurno odrazio na Lac aktivnost. Buduci da je pretpostavljeno da Sgm protein ne vrsi selektivnu kontrolu sopstvene ekspresije na nivou inicijacije transkripcije, vec da eventualno deluje u kasnijim dogadjajima transkripcionog procesa (spreccavanje kompletnog izduzivanja transkripta), opisana operonska fuzija je zadovoljavajuce dobara da testira tacnost naznacene hipoteze. Konstrukti su pravljani po strategiji prikazanoj na (Slici 7).

Najpre je *lacZ* gen ugradjen u *BglII* linearizovani p $P_{Ltl}7G$ plazmid. To je ostvareno tripartitnom ligacijom sledecih fragmenata: 1) *BglII* linearizovani p $P_{Ltl}7G$ plazmid, 2) *BamHI-EcoRV* DNK fragment izolovan iz plazmida pCON4 (deLorenzo et al. 1988) (sadrzi RBS, ATG i ~1120 nukleotida sa 5' kraja *lacZ* gena) i 3) *EcoRV-BamHI* restrikcioni fragment eluiran iz



Slika 7. Strategija konstruisanja operonske *sgm-lacZ* fuzije sa *sgm* genom u *cis* poziciji (A, C). E-inaktivacija *sgm* gena u *Xho*I restrikcijomnom mestu. B, D, F-restricijona analiza klonova. B: 1) pOF14-*Eco*RI dig.; 2) pOF14-*Xho*I dig.; 3) λ *Hind*III/*Eco*RI standard. D: 1) pOF14-*Eco*RI dig.; 2) pOF14S5-*Eco*RI dig.; 3) λ *Hind*III/*Eco*RI standard. F: 1) pOF14S5XB1-*Eco*RI/*Xho*I dig.; 2) pOF14S5-*Eco*RI/*Xho*I dig.; 3) λ *Hind*III/*Eco*RI standard. Detalji konstrukcije su dati u tekstu.

pMC1871 plazmida (sadrži preostali 3' deo *lacZ* gena) (Slika 7, A). Selekcijom transformanata Ap^r, Lac⁺ fenotipa i restrikcionom analizom (Slika 7, B) dobijen je i potvrđen planirani konstrukt, označen kao pOF14.

U sledecem koraku je u pOF14, njegovom linearizacijom u *Xho*I restrikcionom mestu, ugradjen *sgm* gen tako sto je linearizovani plazmid ligiran sa *Sal*I-*Sal*I fragment koji nosi *sgm* gen i selektiran Ap^r Gm^r i Lac⁺ fenotip (Slika 7, C). Korektnost orijentacije *sgm* gena postize se samom selekcijom. Dobijeni konstrukt je označen kao pOF14S5.

Nakon dobijanja ovog konstrukata u cilju razlucivanja da li ce buduci efekat biti vezan za samo prisustvo sekvence *sgm* gena ili za njegov transkripcioni produkt, izvršena je inserciona inaktivacija *sgm* gena u pOF14S5 (Slika 7, E). Ovo je ostvareno digestijom pOF14S5 konstrukta *Xho*I restrikcionim enzimom i popunjavanjem slobodnih krajeva polimeraznom reakcijom. Selekcijom Ap^r Gm^s i Lac⁺ fenotipa i restrikcionom analizom plazmida iz transformanata navedenog fenotipa izolovani su odgovarajući sojevi od kojih je jedan (OF14S5XB1) izabran za dalji rad.

2. 6. AKTIVNOST β-galaktozidaze U OPERONSKIM FUZIJAMA

Aktivnost β-galaktozidaze u rekombinantnim sojevima sa operonskim fuzijama je testirana u više navrata i prosečne vrednosti su prikazane u Tabeli 4.

Tabela 4. Aktivnost β-galaktozidaze u *E. coli* NM522 koja sadrži plazmide pOF14S5 ili pOF14S5XB1.

Plazmid	β-Galaktozidazna aktivnost (U)*	$R\left(\frac{\text{OF14S5}}{\text{OF14S5XB1}} \times 100\right)$
pOF14S5	4 0 9 2	9 7, 5
pOF14S5XB1	4 1 9 7	1 0 0, 0

* -Aktivnost β-galaktozidaze je izražena u jedinicama po Miller-u (1972).

R -Odnos β-galaktozidazne aktivnosti NM522 soja koji sadrži pOF14S5 sa aktivnim *sgm* genom i soja koji je transformisan pOF14S5XB1 plazmidom.

Rezultati ovih eksperimenata su pokazali da postoji neznatna razlika (2,5%) u nivou β-galaktozidazne aktivnosti između sojeva sa aktivnim i inaktiviranim *sgm* genom (Tabela 4). Poredjenjem ovih rezultata sa rezultatima dobijenim za proteinske fuzije može se sa priličnom sigurnošću zaključiti da se autoregulatorna aktivnost *sgm* gena ostvaruje na translacionom nivou.

2.7. KONSTRUISANJE GENSKIH *sgm-lacZ* FUZIJA SA *in trans* POZICIJOM *sgm* GENA

U cilju testiranja da li *sgm* genski produkt reprimira sopstvenu translaciju i kada je u *in trans* konstelaciji, napravljen je set plazmidnih konstrukata (Slika 8).

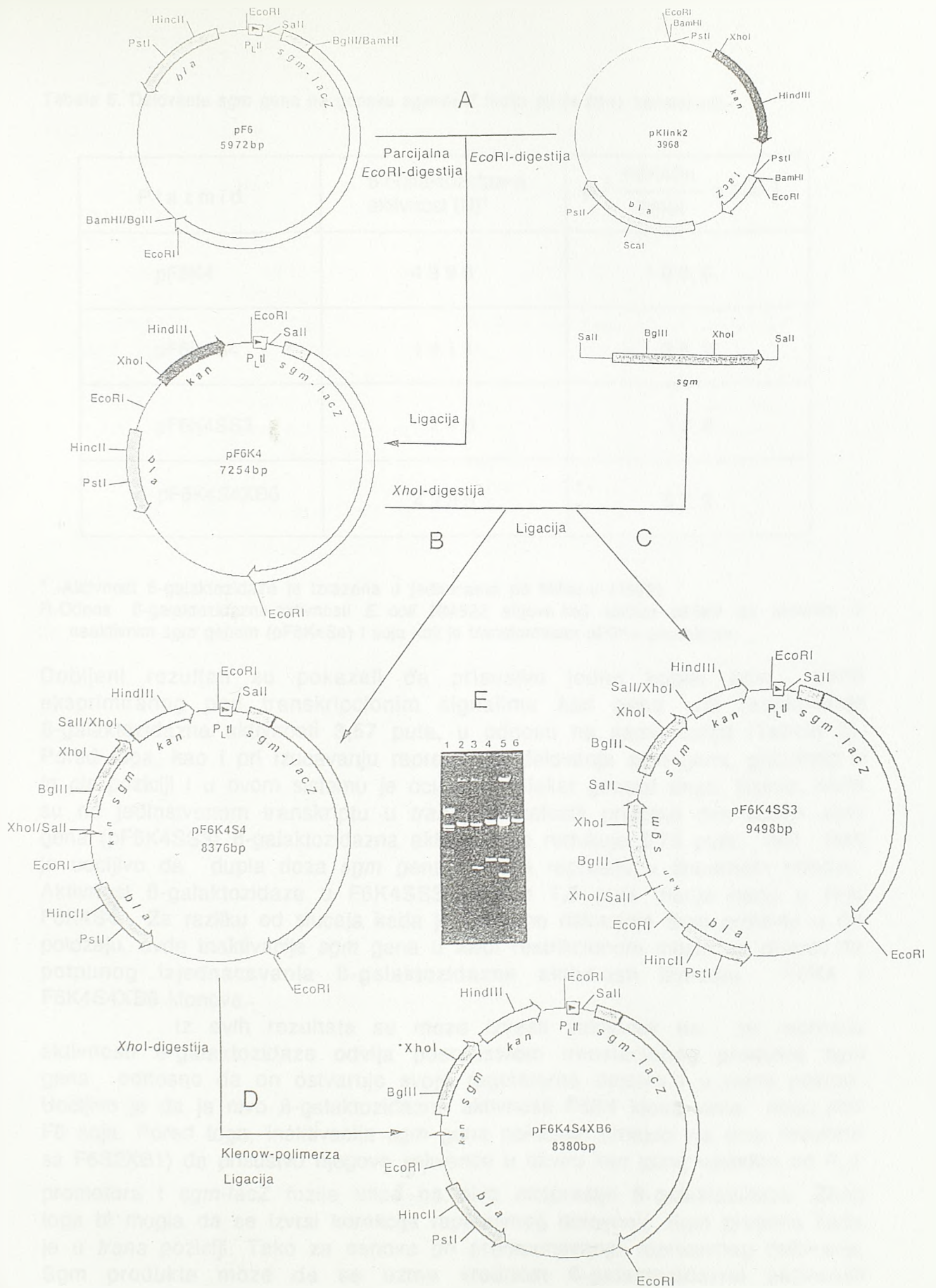
Plazmid pF6 parcijalno je digeriran *EcoRI* restriktivnim enzimom tako da je dobijena smesa linearizovanih molekula; jednih secenih ispred P_{Ltl} promotora (bitnih za konstrukciju) i drugih digeriranih u 3' kraju β -galaktozidaze. U ovako pripremljen pF6 plazmid ugradjen je *kan* gen koji je prethodno izolovan iz plazmida pKlink2 (Amersham) digestijom sa *EcoRI* (Slika 8, A). Selekcijom Km^r i Lac^+ fenotipa, kao i uporednom restrikcijom analizom novodobijenih konstrukata sa restrikcijom profilom pF6 plazmida, dobijeni su plazmidi koji su ispred P_{Ltl} promotora imali ugradjen *kan* gen u istoj ili suprotnoj orijentaciji u odnosu na ovaj promotor. Za dalji rad je izabran pF6K4 konstrukt koji ima *kan* gen u istoj orijentaciji u odnosu na P_{Ltl} promotor.

Konstruisanjem pF6K4 plazmida ostvarena je mogucnost da se u okviru *kan* gena ugradi *sgm* gen. Plazmid pF6K4 je digeriran sa *XhoI* restrikcijom enzimom i ligiran sa *sgm* genom (*Sall-Sall* fragment) (Slika 8, B,C). Selekcijom Ap^r Gm^r transformanata dobijeni su klonovi koji su sadrzavali jednu ili dve kopije *sgm* gena (F6K4S4, F6K4SS3). Pri ovoj konstrukciji, buduci da je ekspresija *sgm* gena zavisna od promotorske aktivnosti *kan* gena, obezbedjuje se *in trans* prisustvo *Sgm* produkta ali ne i u ekvimolarnoj kolicini kao i fuzionog produkta.

Za korektnu komparativnu analizu *in trans* delovanja produkta *sgm* gena bilo je potrebno dobiti i klon koji je identican sa F6K4S4 samo sa inaktiviranim *sgm* genom. Zbog toga je pripremljen pF6K4S4XB6 konstrukt koji ima inaktiviran *sgm* gen digestijom i popunjavanjem *XhoI* restrikcijom mesta u okviru *sgm* gena (Slika 8, D). Izabrana je inaktivacija u *XhoI* restrikcijom mestu, zbog toga sto se pri analizi *in cis* delovanja *Sgm* proteina, pokazalo da *XhoI* inaktivirani *sgm* gen daje produkt koji ne vrši autorepresivno delovanje.

2. 8. AKTIVNOST β -galaktozidaze U PROTEINSKIM FUZIJAMA SA *in trans* POZICIJOM *sgm* GENA.

Rzultati β -galaktozidazne aktivnosti za sojeve sa proteinskom fuzijom i ekstra kopijom *sgm* gena u *in trans* poziciji su prikazani u Tabeli 5.



Slika 8. Strategija konstruisanja genskih *sgm-lacZ* fuzija sa *in trans* pozicijom *sgm* gena (A, B, C, D)restrikciona analiza (*NcoI/XhoI* dig.) klonova (E). 1) λ *HindIII/EcoRI* standard; 2) pF6; 3) pF6K4; 4) pF6K4S4; 5) pF6K4SS3; 6) pF6K4S4XB6. Detalji su opisani u tekstu.

Tabela 5. Delovanje *sgm* gena na gensku *sgm-lacZ* fuziju pri *in trans* konstelaciji.

Plazmid	β -Galaktozidazna aktivnost (U)*	R ($\frac{F6K4Sn}{F6K4} \times 100$)
pF6K4	4996	100,0
pF6K4S4	1411	28,2
pF6K4SS3	740	14,8
pF6K4S4XB6	4385	87,8

* -Aktivnost β -galaktozidaze je izražena u jedinicama po Miller-u (1972)

R-Odnos β -galaktozidazne aktivnosti *E. coli* NM522 sojeva koji sadrže pF6K4 sa aktivnim ili neaktivnim *sgm* genom (pF6K4Sn) i soja koji je transformisan pF6K4 plazmidom.

Dobijeni rezultati su pokazali da prisustvo jedne kopije *sgm* gena eksprimiranog pod transkripcionim signalima *kan* gena vrši redukovanje β -galaktozidazne aktivnosti 3,57 puta, u odnosu na samu fuziju (Tabela 5). Pored toga, kao i pri izučavanju represivnog delovanja *sgm* gena, prisutnog u *in cis* poziciji i u ovom sistemu je očigledan efekat genske doze. Naime, kada su na jedinstvenom transkriptu u *trans* konstelaciji prisutne dve kopije *sgm* gena (pF6K4SS3) β -galaktozidazna aktivnost se redukuje 6,75 puta. Isto tako je uočljivo da dupla doza *sgm* gena ne vrši represiju u linearnom odnosu. Aktivnost β -galaktozidaze u F6K4SS3 soju je 1,9 puta manja nego u soju F6K4S4. Za razliku od slučaja kada je testirano delovanje Sgm proteina u *cis* položaju, ovde inaktivacija *sgm* gena u *Xho*I restrikcionom mestu ne dovodi do potpunog izjednačavanja β -galaktozidazne aktivnosti između F6K4 i F6K4S4XB6 klonova.

Iz ovih rezultata se može izvesti zaključak da se represija aktivnosti β -galaktozidaze odvija posredstvom translacionog produkta *sgm* gena odnosno da on ostvaruje svoje regulatorno dejstvo i u *trans* poziciji. Uočljivo je da je nivo β -galaktozidazne aktivnosti F6K4 klona veća nego kod F6 soja. Pored toga, inaktivacija *sgm* gena pokazuje (imajući na umu rezultate sa F6S2XB1) da prisustvo njegove sekvence u okviru *kan* gena uzvodno od P_{L1} promotora i *sgm-lacZ* fuzije utiče na nivo ekspresije β -galaktozidaze. Zbog toga bi mogla da se izvrši korekcija represivnog delovanja Sgm proteina kada je u *trans* poziciji. Tako za osnovu pri preračunavanju represivnog delovanja Sgm produkta može da se uzme vrednost β -galaktozidazne aktivnosti F6K4S4XB6 transformanta. Prema ovom preračunavanju dobije se redukcija β -galaktozidazne aktivnosti u F6K4S4 klonu u odnosu na F6K4S4XB6 klon na 32%. Sto se tiče korekcije β -galaktozidazne aktivnosti F6K4SS3 klona ona nije moguća bez inaktiviranja oba *sgm* gena u njihovim *Xho*I restrikcionim mestima.

2. 9. KONSTRUISANJE I KARAKTERIZACIJA F6 GENске FUZIJE SA *in cis* pozicijom 3'-KRAJa *sgm* GENA

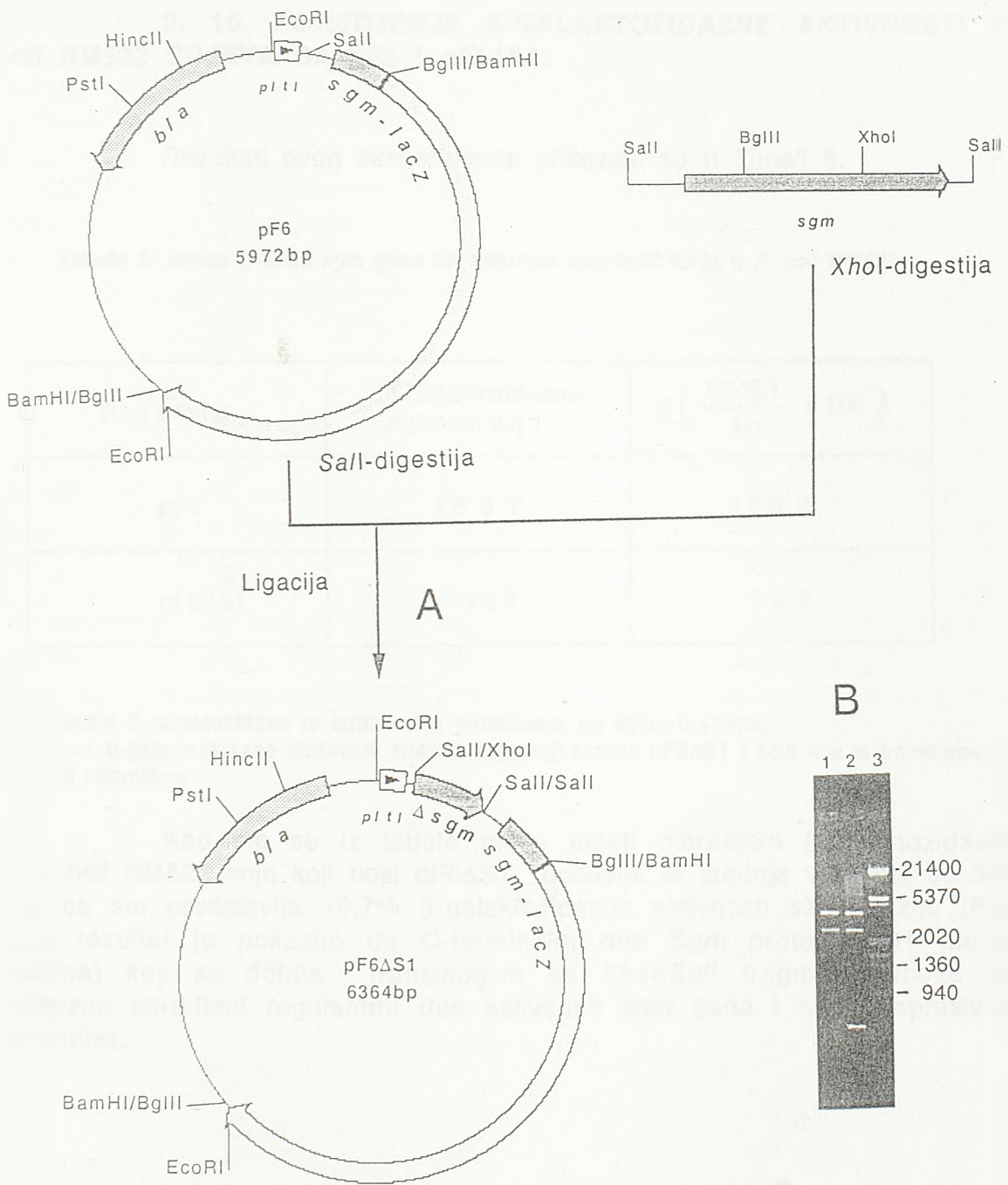
Predhodni eksperimenti su pokazali da skraceni genski produkt koji se dobija inaktiviranjem *sgm* gena u *Bgl*I restrikcionom mestu pokazuje represivno delovanje. Kada se translacija *sgm* gena produzi do *Xho*I restrikcionog mesta dobija se protein koji gubi represivno svojstvo. U cilju testiranja da li translacioni produkt samog 3'-kraja *sgm* gena ima ulogu u prepoznavanju regulatornih sekvenci, odnosno u represivnom delovanju *Sgm* proteina, napravljen je konstrukt koji sadrzi samo 3'-kraj *sgm* gena.

Za ovu analizu je uzet DNK fragment od *Xho*I do *Sal*I restrikcionih mesta koji sadrzi kodirajuci deo za 91 aminokiselinu 3'-kraja *sgm* gena (Slika 13 Dodatak). Da bi se postigla korektna translacija ovog dela sekvence bilo je potrebno napraviti konstrukt koji bi zadovoljio sledece uslove: da ovaj segment *sgm* gena bude u adekvatnoj transkripcionoj orijentaciji u odnosu na P_{L1} promotor i da bude korektno slozen u odnosu na fazu citanja (dekodiranja) sa RBS-a i ATG-a koji se nalaze ispred polilinkera $pP_{L1}7G$ plazmida. Ova dva zahteva su ispunjena strategijom koja je prikazana na Slici 9 i Slici 10.

Plazmid pF6 je linearizovan *Sal*I restrikcionim enzimom i preko tog mesta u njega je ugradjen *Xho*I/*Sal*I fragment (360 bp) (Slika 9, A). Posto nikakva selekcija za ugradnju ovog fragmenta nije moguca, transformanti su analizirani digesijom njihove plazmidne DNK sa *Eco*RI i *Sal*I restrikcionim enzimima. Ovom digestijom se odredjuju konstrukti koji su primili ponudjeni fragment i to u pravoj orijentaciji buduci da se pri korektnoj orijentaciji generise *Sal*I restrikciono mesto na 3'-kraju ovog fragmenta. Drugim recima, ova digestija izjednacava pF6 i, za dalji rad irelevantne konstrukte, jer ligiranje ponudjenog fragmenta u neadekvatnoj poziciji generise *Sal*I restrikciono mesto na istoj distanci od *Eco*RI restrikcionog mesta kao kod pF6. Od jedanaest, na opisani nacin testiranih transformanata, dva su imala korektno ugradjen *Xho*I/*Sal*I fragment. Za dalji rad je izabran jedan koji je oznacen kao pF6 Δ S1.

- 1) TAACAATTTCACACAGGAAACAGACC ATG G/TC GAC TCG AGA TCT CAG-3'.....
RBS Met *Sal*I
- 2) 5'-AAC GTG GCC GAC CTG C/TC GAG CGT CTT GAG CCG GCC...(+330 bp)...GTCGAC-3'
*Xho*I *Sal*I
- 3) CACAGGAAACAGACC ATG GTC GAG CGT CTT GAG CCG GCC...(+330 bp)...GTCGAC-3'
RBS Met *Sal*I/*Xho*I *Sal*I

Slika 9. Sematski prikaz ligiranja $pP_{L1}7G$ regulatornih elemenata sa *Xho*I/*Sal*I fragmentom *sgm* gena. Prikazani su samo relevantni regioni $pP_{L1}7G$ plazmida (1), *sgm* gena u okolini *Xho*I restrikcionog mesta (2) i fuzionog produkta (3). RBS-mesto vezivanja ribozoma; Met-translacioni start kodon.



Slika 10. Konstrukcija pF6ΔS1 (A) i njegova restrikciona analiza (B). 1) pF6-EcoRI/Sall dig.; 2) pF6ΔS1-EcoRI/Sall dig.; 3) λ HindIII/EcoRI standard. Detalji konstrukcije su dati u tekstu.

2. 10. POREDZENJE β -GALAKTOZIDAZNE AKTIVNOSTI *E. coli* NM522 SOJEVA SA pF6 I pF6 Δ S1.

Rezultati ovog eksperimenta prikazani su u Tabeli 6.

Tabela 6. Efekat 3'-kraja *sgm* gena na aktivnost *sgm-lacZ* fuzije u *E. coli* NM522.

Plazmid	β -Galaktozidazna aktivnost (U)*	R ($\frac{F6\Delta S1}{F6} \times 100$)
pF6	1667	100,0
pF6 Δ S1	330	19,7

* -Aktivnost β -galaktozidaze je izrazena u jedinicama po Miller-u (1972)

R -Odnos β -galaktozidazne aktivnosti NM522 soja koji sadrže pF6 Δ S1 i soja koji je transformisan pF6 plazmidom

Kao sto se iz tabele moze videti merenjem β -galaktozidazne aktivnosti NM522 soja koji nosi pF6 Δ S1 dobijena je srednja vrednost od 330 jedinica sto predstavlja 19,7% β -galaktozidazne aktivnosti same fuzije (F6). Ovaj rezultat je pokazao da C-terminalni deo Sgm proteina (91 amino kiselina) koji se dobija translacijom sa *Xho*I/*Sal*I fragmenta moze da prepozna odredjeni regulatorni deo sekvence *sgm* gena i izvrši represivnu aktivnost.

3. REZISTENCIJA NA HIGROMICIN B

Istrazivanja koja su izvedena u cilju odredjivanja bitnosti prisustva i ekspresije *sgm* gena za ispoljavanje rezistencije na higromicin B su relativno nezavisna od onih koja su do sada izlozena u ovom radu. Eksperimenti ciji opis sledi govore o ekspresiji *sgm* gena u heterologim sojevima razlicite srodnosti u odnosu na ishodni soj *M. zionensis* i trebalo je da pokazu da li je rezistencija ovog soja na higromicin B bitno vezana sa ekspresijom *sgm* gena.

Vec su ranije studije (Matkovic et al. 1984; Kojic 1991) pokazale da su *Micromonospora zionensis* kao i *S. lividans*-*sgm* klonovi rezistentni na

vecinu 4,6-, a senzitivni na 4,5-disupstituisane dezoksistreptaminske aminoglikozide. Ista istrazivanja su pokazala da se uporedjeni spektri rezistencije ovih sojeva razlikuju po rezistenciji na higromicin B. Naime, bakterija *M. zionensis* je visoko rezistentna na higromicin B, dok su *S. lividans-sgm* klonovi senzitivni na ovaj aminoglikozidni antibiotik. Iz ovih podataka izveden je zakljucak da se visoka rezistencija na aminoglikozide po strukturi slicne gentamicinu kod proizvođača *M. zionensis* ostvaruje delovanjem produkta *sgm* gena, a da rezistencija na higromicin B nije determinisana ovim genom vec da je za nju verovatno odgovoran neki drugi mehanizam rezistencije-na primer razlicita propustljivost membrane ispitivanih sojeva. Medjutim, ranije je bilo primeceno da veci broj (ako ne i svi) proizvođači gentamicinu slicnih antibiotika su rezistentni na higromicin B, a da je predstavnik istog roda (*M. melanospora*), koji ne proizvodi antibiotike, senzitivn na sve testirane aminoglikozide ukljucujuci i higromicin B (Piendl *et al.* 1984; Matkovic *et al.* 1984). Iz ovih rezultata se moglo pretpostaviti da je rezistencija na higromicin B ipak, povezana sa mehanizmom rezistencije na aminoglikozide slicne gentamicinu. Prema tome hipoteze od kojih bi jedna rezistenciju na higromicin potpuno odvajala, a druga vezivala za mehanizam rezistencije za antibiotike slicne gentamicinu, mogle su biti testirane ekspresijom *sgm* gena u soju *M. melanospora*. Ovakav eksperimenat je bio moguc posto je vec bila razvijena efikasna transformacija *M. melanospora* protoplasta (Kojic *et al.* 1991). Dodatna potvrda eventualnog postojanja neke specifičnosti mikromonospora koja je bitna za ispoljavanje rezistencije na higromicin B mogla je biti obezbedjena ekspresijom *sgm* gena manje srodnim bakterijama. U tom cilju su pored *S. lividans* izabrani i *S. coelicolor* i *S. ariseofuscus*.

Rezultati su pokazali (Tabela 7) da jedino *M. melanospora-sgm* klon pokazuje (kao i *M. zionensis*) pored rezistencije na gentamicin isti nivo rezistencije na higromicin B. Iz rezultata ovog eksperimenta postalo je ocigledno da je visok nivo rezistencije na higromicin B zaista determinisan *sgm* genom, ali da je izrazainost ove rezistencije zavisna od soja u kome se *sgm* gen eksprimira, odnosno da je od svih testiranih sojeva odranicena samo na mikromonospore.

Tabela 7. Efekat *sgm* gena na minimalne inhibitorne koncentracije za gentamicin i higromicin B za sojeve aktinomiceta.

Antibiotik Soj/plazmid	Gentamicin ($\mu\text{g/ml}$)	Higromicin B ($\mu\text{g/ml}$)
<i>S. lividans</i> pIJ702	2	2
<i>S. lividans</i> pMK33	>500	10
<i>S. coelicolor</i> pIJ702	<1	8
<i>S. coelicolor</i> pMK33	>500	15
<i>S. griseofuscus</i> pIJ702	<1	<2
<i>S. griseofuscus</i> pMK33	>500	<2
<i>M. melanospora</i> pIJ702	3	5
<i>M. melanospora</i> pMK33	>500	>500
<i>M. zionensis</i>	>500	>500

IV DISKUSIJA

Rezultati ovog rada odnose se na analizu transkripcione i translacione regulacije *sgm* gena bakterije *Micromonospora zionensis*. Analiza ova dva generalna nivoa ekspresije gena, je preduslov za upoznavanje same ekspresije, a i kompletnije razumevanje uloge *sgm* gena kod ovog proizvodjaca antibiotika.

Poseban intelektualni izazov ili naucno interesovanje za izucavanje regulacije ekspresije *sgm* gena proistice iz nekoliko cinjenica. Najpre, nivo rezistencije determinisan enzimima koji modifikuju rRNK, a kojima pripada i Sgm metiltransferaza, nije u relaciji sa genskom dozom, posto je kolicina supstrata (tj. rRNK) takva da je, relativno mali broj molekula enzima dovoljan za kompletnu modifikaciju. Prema tome, sa energetskog stanovista, ocigledno je da bi regulacija *sgm* gena bila korisna. Korisnost postojanja odredjenih regulatornih mehanizama kojima se kontrolise nivo ekspresije *sgm* gena, jos se jasnije uvidja ako se iznese cinjenica da se ovaj gen konstitutivno transkribuje. Pored toga, sire znacenje regulacije *sgm* gena proistice iz cinjenice da je ovaj gen najverovatnije klasterovan sa genima za proizvodnju antibiotika, te bi mogla da postoji mogucnost njegove koregulacije sa odredjenim biosintetskim genima.

1 TRANSKRIPCIONA REGULACIJA EKSPRESIJE *sgm* GENA

Primarni, najdirektniji i najekonomičniji nivo na kome može da se vrši regulacija ekspresije pojedinog gena je inicijacija transkripcije. Sto se tice *sgm* gena, prvi koraci u detaljnijoj analizi njegovih transkripcionih regulatornih sekvenci, bili su usmereni u cilju odredjivanja njegovog starta transkripcije i determinisanja jacine njegovih promotora.

Ispitivanjem starta transkripcije *sgm* gena u ishodnom soju i u *S. lividans-sgm* (pMK33) klonu dobijen je interesantan rezultat. Naime, dobijeno je da se transkripcija najverovatnije vrši sa razlicitih mesta, odnosno da je promovisana razlicitim promotorima. U *S. lividans-sgm* (pMK33), klonu transkripcija pocinje od G nukleotida koji se nalazi 72bp uzvodno od ATG kodona (promotor P1), dok je kod *M. zionensis* start transkripcije udaljen oko 250 nukleotida od starta translacije (promotor P2). Promotor sa koga se vrši transkripcija u *M. zionensis* ne mapira u okviru *Sall-Sall* (1122bp) restriktionog fragmenta, odnosno nije prisutan na pMK33 plazmidu. Prirodno se odmah nametnulo pitanje: da li se *sgm* gen i u *S. lividans* eksprimira i sa P2 promotora. Dodatni eksperimenti su pokazali da *sgm* gen, zaista i u *S. lividans* zadržava slozenu transkripcionu regulaciju, odnosno i u ovom relativno heterologom sistemu se produkuju alternativni transkripti sa P1 i P2 promotora. Subkloniranjem P1 i P2 promotorskih fragmenata i odredjivanjem njihove relativne jacine pokazano je da je P1

promotor relativno slab, dok je P2 najmanje 4 puta jaci od njega. Za dalju diskusiju je znacajno podsetiti da *S. lividans*-pl6XP2P1 soj pokazuje nivo rezistencije koji je dva puta veci od prostog aditivnog doprinosa P1 i P2 promotora. Prema tome, rezultati pokazuju da je ekspresija *sgm* gena najverovatnije regulisana tandemskim promotorskim sistemom.

U prilog naznacenom zakljucku govore i skorasnje studije, koje su pokazale da aktinomicete pokazuju izuzetan stepen transkripcione kompleksnosti. Pojava tandemskih promotora je karakteristicna za veliki broj gena ovih bakterija (Bibb *et al.* 1986; Baylis and Bibb 1988; Janssen *et al.* 1989; Janssen and Bibb 1990; Baum *et al.* 1988; Holmes *et al.* 1991; Kormanec and Farkasovsky 1993). Pored toga ove bakterije u toku zivotnog ciklusa ekspimiraju veci broj (*S. coelicolor* najmanje 7) razlicitih sigma faktora za RNK polimerazu (Buttner 1989; Buttner and Lewis 1992). Gen za ekstracelularnu agarazu (*dagA*), prvi gen u katabolickom putu koji bakteriji *S. coelicolor* A3(2) omogucuje da koristi agar kao jedini izvor ugljenika, ima cak 4 promotora koje prepoznaju 4 razlicite forme RNK holoenzima (Buttner 1989, Buttner and Lewis 1992).

Izgleda, da je bitna karakteristika P1 i P2 promotora da su vremenski regulisani. Za sada je ovo pretpostavka koja proizlazi iz jedne znacajne cinjenice, da nije detektovan P1 transkripcioni produkt kada je RNK izolovana iz stacionarne faze rasta bakterije *M. zionensis*. Sasvim je realno ocekivati da se ekspresija *sgm* gena u *M. zionensis* vrsi i sa blizeg P1 promotora, odnosno da se u razlicitim fazama gen ekspimirira sa razlicitih promotora. Produkcija alternativnih transkripata moze reflektovati razlicitost promotorskih sekvenci kao i specificnost sigma faktora koji funkcionisu u razlicitim stadijumima slozenog zivotnog ciklusa ove aktinomicete, a koji ukljucuje i biosintezu antibiotika. Moguce je pretpostaviti da je P1 promotor i u *M. zionensis* relativno slab promotor cijom se ekspresijom obezbedjuje konstitutivna rezistencija na gentamicin. Sa ulaskom kulture u stacionarnu fazu kada pocinje ekspresija biosintetskih gena dolazi do ekspresije sa P2 promotora. Iz literature je poznato da su u vecini, ako ne i u svim slucajevima, geni za rezistenciju klasterovani sa genima za biosintezu, da su cesto koregulisani, pa cak i kotranskribovani (Ohnuki *et al.* 1985; Vara *et al.* 1988; Butler *et al.* 1989; Binnie *et al.* 1989; Chater, 1990; Neal and Chater, 1991; Fernandez-Moreno *et al.* 1991; Doyle *et al.* 1991; Dairi *et al.* 1992). Prema tome, svakako, nije isklucena mogucnost da P2 promotor promovise transkripciju veceg dela operona za rezistenciju na i biosintezu antibiotika cime bi ovi geni imali koordinativnu ekspresiju. Smisao ove koregulacije bio bi u obezbedjivanju ekvimolarne kolicine genskih produkata sifrovanih na zajednickoj policistronskej RNK. Konstitutivna ekspresija *sgm* gena, kojom se ribozomi pripremaju za kasniju sintezu antibiotika, verovatno zavisi samo od snage P1 promotora dok se u ovom hipoteticnom modelu moze pretpostaviti zavisnost ekspresije sa P2 promotora od pojave novog tipa σ subjediniice RNK polimeraze. Nije isklucena i uloga dodatnih regulatornih molekula. Dakle, u najgrubljim crtama model transkripcione regulacije *sgm* gena podrazumeva da se transkripcija vrsi diferencijalno sa alternativnih promotora, odnosno da je blizi (P1) promotor aktivan za vreme vegetativne, a P2 maksimalno aktivan za vreme stacionarne faze rasta, cime bi bio koordinisan sa proizvodnjom antibiotika.

Samo posedovanje tandemskih promotora daje mogucnost za

postizanje diferencijalne genske ekspresije, ali odgovor na pitanje da li se to stvarno i desava, zahteva dodatna istraživanja i testiranja. Za sada u prilog priloženom modelu govore i literaturni podaci. Naime, egzistencija tandemskih promotora je česta pojava kod aktinomiceta. Međutim, diferencijalna ekspresija je demonstrirana samo kod nekih. Vecina za koje se ne zna da li podlezu vremenskoj regulaciji, nisu ni testirani u tom smislu. Ono što je ovde važno i što podržava naš model, je činjenica da su pronađeni promotori aktinomiceta za koje je nedvosmisleno utvrđeno da su vremenski regulisani, odnosno za koje je pokazano da im je ekspresija direktno povezana sa pojavom određenog tipa σ subjedinice RNK polimeraze (Baum *et al.* 1988; Lin and Rothstein 1992; Kormanec and Farkasovsky 1993; Tan and Chater 1993). Kod multipnih tandemskih promotora izolovanih iz bakterije *Micromonospora echinospora* se pokazalo da je njihova najstriktnija karakteristika razlicit patern vremenske regulacije (Baum *et al.* 1988). Promotor blizu startu translacije je maksimalno aktivan za vreme vegetativne faze rasta, dok je udaljeniji visestruko jaci i eksprimiran samo za vreme stacionarne faze. Izolovanjem RNK polimeraze (holoenzima) iz razlicitih faza rasta kulture ovog organizma i ekspresijom ovih promotora u *in vitro* sistemu, dobijen je istoznacac rezultat (Lin and Rothstein 1992). Izabran je ovaj primer zato sto je, od malobrojnih testiranih, neodoljivo slican onome sto je eksperimentalno nagovesteno kod *sgm* sistema. Sto se tice cinjenice da je kod tandemskih promotora udaljeniji jaci, ona je demonstrirana i kod drugih testiranih sistema (Kormanec and Farkasovsky 1993).

Snaga P1 i P2 promotora, za sada je odredjena njihovim subkloniranjem i ispitivanjem ekspresije samo u soju *S. lividans*. Dobijeni rezultati su ocigledno u saglasnosti sa gore iznetim modelom, mada se opet mora upozoriti da je ekspresija testirana u heterologom sistemu. Ono sto istovremeno treba imati na umu je cinjenica da pri odredjivanju starta transkripcije *sgm* gena u *M. zionensis* je dobijen rezultat koji ukazuje da je aktivan samo P2 promotor. Jasno je da nije iskljucena mogucnost da je i P1 aktivan u ovoj fazi, ali da je njegova aktivnost jednostavno nedetektabilna ovom metodom. U stvari, najbolja provera snage i diferencijalne ekspresije bi bila ostvorena "Northern" analizom RNK izolovane iz razlicitih faza rasta ishodnog soja. Ono sto bi svakako dalo doprinos kompletiranju slike bi bilo testiranje aktivnosti ovih promotora transformacijom *M. zionensis* protoplasta sa vec konstruisanim plazmidima i merenjem nivoa rezistencije na neomicin (4,5-disupstituisani aminoglikozid). Međutim, jos nije razvijena procedura za uspesno protoplastiranje, regeneraciju i efikasnu transformaciju ovog soja. Ekspresija u samom *S. lividans* zaista nije potpuno adekvatna. Naime, pokazalo se i za druge promotore mikromonospora, koji se eksprimiraju u razlicitim fazama slozenog zivotnog ciklusa ovih bakterija, da u *S. lividans* poprimaju konstitutivnu ekspresiju (Baum *et al.* 1988). Buduci da se ovo najvaznije svojstvo (vremenska regulacija) gubi, potrebno je preduzeti eksperimente na endogenom soju. Međutim, izgleda da je uticaj heterologog sistema na relativnu jacinu promotora daleko manje izrazen (Lin and Rothstein 1992; Kormanec and Farkasovsky 1993). Tako je sasvim realno pretpostaviti da i u ishodnom soju relativan odnos snage P1 i P2 promotora ostaje isti, stin sto razlika moze biti manje ili vise izrazena. Dalja istrazivanja bi trebalo da pokazu da li je, i do koje mere, ova hipoteza validna. Uz put, treba napomenuti da bi transformacija *M. zionensis*

protoplasta pl6P2 plazmidom (nosi samo P2 promotor) mogla da ima iznenedjujuce fenotipske efekte u odnosu na sporulaciju i/ili sintezu antibiotika. Ova pretpostavka je stimulisana primerima iz literature. Naime, kod *S. coellcolor* A3(2) je pokazano da kad se u njega unese promotorski fragment na plazmidu koji ima veliki broj kopija, a cija je ekspresija (promotora) zavisna od produkta *whiG* gena (kodira σ subjedinicu potrebnu za sporulaciju) dolazi do inhibicije sporulacije. S druge strane, pri ovom eksperimentalnom postupku ne uocavaju se efekti ovakvih promotora na vegetativni rast hifa (Tan and Chater 1993). Ovaj fenomen se jednostavno objasnjava time sto limitirana kolicina WhiG genskog produkta biva efektivno odstranjena sa svojih prirodnih targeta, tj promotora gena odgovornih za sporulaciju. Inhibicija sporulacije kod bakterije *Bacillus subtilis*, je postignuta i objasnjena na slican nacin (Zuber *et al.* 1987).

Kao i vecina drugih aktinomiceta *M. zionensis* formira multicelularni micelijum i nakon vegetativne faze rasta sposobna je da produkuje spore (Kawamoto, 1989). Pored toga, kao finalni produkt sekundarnog metabolizma ova bakterija proizvodi aminoglikozidni antibiotik G-52 (Wagman and Weistein, 1980; Berdy and Jarai, 1986). Prema tome, bilo bi vrlo interesantno transformisati *M. zionensis* plazmidom pl6P2, koji sadrzi oridzin replikacije kao i plJ702, a za koga se zna da se u srodnim bakterijama (*M. purpurea* i *M. melanosporea*) replikuje u velikom broju kopija. Eventualni uticaj ovog plazmida na proizvodnju antibiotika i/ili sporulaciju bi bio indirektan dokaz da je za njegovu aktivnost zaduzena specificka RNK polimeraza cija se sigma subjedinica sintetise u stacionarnoj fazi rasta. Pored toga, eventualni efekat ovog plazmida na oba fenotipa, znacajno bi ukazao na zajednicku regulaciju morfoloske i fizioloske diferencijacije ove bakterije, a u kojoj bi σ faktor RNK polimeraze igrao bitnu ulogu.

Lako se zapaza da je celokupna ova analiza dobijenih rezultata izvrшена pod pretpostavkom da se *sgm* gen nalazi u operonskoj konstelaciji, pri cemu bi P1 promotor bio promotor *sgm* gena, a P2 promotor kompletnog operona, u koji su ukljuceni i biosintetski geni za G-52 antibiotik. Iako ova pretpostavka nije potpuno potkrepljena eksperimentalnim rezultatima, ona je usvojena kao verovatna na osnovu analogije sa drugim operonskim sistemima kod proizvođača antibiotika. Premda je jasno da na osnovu analogija nije moguće izvoditi precizne zaključke o opstoj organizaciji biosintetskog lokusa, a još manje o stvarnoj poziciji *sgm* gena u okviru takvog operona, ipak nam one mogu koristiti u maksimalnom eksploatisanju dobijenih rezultata i koncipiranju najadekvatnijih eksperimenata. Prednost usvajanja hipoteze o operonskoj konstelaciji *sgm* gena, a ne striktno usredsredjenje na njega samog, kao izolovan entitet, bice posebno ocigledna kada se budu tumacili rezultati vezani za translacionu regulaciju *sgm* gena. Medjutim, ova hipoteza moze vec sada, jasnije da se oceni ako se izlozi ili podseti da je produkt *sgm* gena 16S metiltransferaza, i da je relativno mali broj molekula enzima potreban za kompletnu modifikaciju targeta. Prema tome, a imajući u vidu i dugovecnost ribozoma *in vivo*, prirodno se nameće pitanje potrebe ovog gena za tandemskim promotorom. Svrha postojanje tandemskih promotora kod gena ciji produkti obezbedjuju rezistenciju modifikacijom samog antibiotika (Bibb *et al.* 1986; Janssen and Bibb 1989; Janssen *et al.* 1989) je ociglena. Time je, naime, omogucen potencijalan nacin kojim se moze povisiti nivo rezistencije paralelno sa produkcijom antibiotika; fenomen koji je opisan i

koji je neophodan za samoprotekciju (Martin and Demain 1980). Medjutim, analogna argumentacija je u slucaju *sgm* gena neadekvatna. Pored toga, uz realnu pretpostavku da je P2 promotor iste snage ili relativno jos jaci u ishodnom soju, ta bi cinjenica jos jasnije reflektovala specificnu potrebu da se za vreme stacionarne faze vrsi mnogo jaca ekspresija. Medjutim ne vidi se razlog zasto bi *sgm* gen trebao da poveca svoju sintezu. Sa energetskog stanovista to je jos besmislenije imajući u vidu da *sgm* gen ima vrlo preciznu translacionu autoregulaciju. Upravo zbog ovih cinjenica je smisleno tvrditi da je *sgm* verovatno u operonskoj konstelaciji, odnosno da se sa P2 promotora vrsi biosinteza policistranske iRNK koja pored informacije *sgm* gena sadrzi i informaciju za gene ciji produkti ucestvuju u regulaciji ili direktno u biosintezi antibiotika. Najzad, i sam mehanizam translacione autoregulacije (kao sto ce detaljnije biti diskutovano kasnije) ukazuje na mogucnost da je *sgm* gen sastavni deo operona u kojem bi on bio prvi gen. Naime, i drugim modelima (naprimer transkripcionom autoregulacijom) bi, u principu, mogla da se obezbedi adekvatna ekspresija *sgm* gena, a samim tim i rezistencija ishodnog soja. Medjutim, ona bi adekvatno funkcionisala samo u slucaju ako je *sgm* gen izolovan. Ako je, s druge strane, *sgm* gen u operonskoj konstelaciji onda bi autoregulacijom na transkripcionom nivou, bili kontrolisani ne samo vreme vec i nivoi ekspresije svih nizvodnih gena. Prema tome i sam mehanizam translacione autoregulacije u izvesnom stepenu potkrepljuje navedenu hipotezu operonske pozicije *sgm* gena.

Medjutim, stvari nisu tako jednostavne. Prihvatanje gornje hipoteze otvara prostor za dalja pitanja. Prvo medju njima bi svakako moglo biti pitanje duzine transkripta sa P1 promotora. Naime, ako je pretpostavka da transkripcija sa P2 promotora prelazi sa *sgm* na nizvodne (biosintetske) gene tacna, onda se postavlja pitanje zasto se to ne bi desavalo kada se transkripcija odvija sa P1 promotora? Jasno je da definitivni odgovor na ova pitanja moze dati samo jedna iscrpna analiza. Za sada se moze predloziti nekoliko alternativnih odgovora. Pre nego se oni izloze potrebno je izneti sledece cinjenice. Analiza procitane sekvence iza translacionog stop kodona *sgm* gena (83bp) ne pokazuje prisustvo sekvence koja bi omogucila, pri transkripciji, formiranje ρ -nezavisne terminatorске strukture. Pored toga ugradnja *sgm* gena, (*Sall*-*Sall*-1122 bp fragmenta) u operonsku konstelaciju i njegovom inaktivacijom pokazano je da samo prisustvo njegove sekvence nema reperkusije na transkripciju tog vestackog operona. Cini se da ovi rezultati skrecu paznju na to da ne postoji terminaciono mesto izmedju *sgm* gena i prvog nizvodnog. Medjutim, oni nisu dovoljni za jedan cvrst zakljucak. Naime, ovi rezultati apsolutno ne iskljucuju mogucnost da stvarno postoji terminator koji bi jednostavno bio pozicioniran iza procitanih 83bp.

U cilju kompletnije, a samim tim i objektivnije diskusije naznacenog pitanja, potrebno je razmotriti i jednu cinjenicu dobijenu analizom 3'-kraja *grm* iRNK. Ovaj gen je izolovan iz srodne bakterije (*M. purpurea*) i vrlo je homolog (~90%) *sgm* genu. Eksperimentalno je utvrdjeno da se terminacija *grm* iRNK ne vrsi neposredno iza kodirajuceg regiona ovog gena (Kelemen *et al.* 1991). Medjutim, sama cinjenica koja je dobijena za *grm* gen, uprkos njegovoj visokoj homologiji sa *sgm* genom ne osporava predhodnu tvrdnju iz prostog razloga zato sto je *sgm* iRNK izolovana iz heterologog sistema (*S. lividans*) u kojem jednostavno ne postoje dodatni terminacioni faktori. Dakle, nije potpuno izvesno da li se u *M. purpurea*, *grm* gen transkribuje kao i u *S.*

lividans. Sasvim je moguće da njegova ekspresija u heterologom sistemu gubi svoje specifičnosti. Pored toga nepostojanje terminacije kod *grm* gena ne treba bezrezervno usvojiti i preslikati na *sgm* sistem iz razloga što je pokazano da *M. purpurea* ima ekspresiju samo sa jednog promotora i verovatno drugaciju regulaciju. Prema tome, za sada ne postoje jasni eksperimentalni rezultati koji bi govorili protiv hipoteze po kojoj bi transkripcija sa P1 promotora zaista terminirala iza *sgm* gena pre nego bi usla u nizvodne gene. Ako je P2 promotor zaista zadužen za operonsku transkripciju onda bi se produženje transkripta preko eventualnih terminacionih sekvenci moglo objasniti delovanjem sinhrono produkovanog antiterminacionog faktora koji bi modifikovao transkripciju ovog operona omogućujući RNK polimerazi da ignorise eventualne terminatore. Pored toga ne treba zanemariti ni činjenicu da iRNK, koja se dobija transkripcijom sa udaljenijeg P2 promotora, sadrži dodatne sekvence koje bi, možda, mogle imati uticaja na produženje transkripcije nizvodno od *sgm* gena. Testiranje ovih hipoteza svakako zahteva akumulaciju brojnih eksperimentalnih podataka. Verovatno ključni eksperiment koji bi u mnogome doprineo razrešenju pitanja zavisnosti proizvodnje antibiotika od transkripcije sa P2 promotora i eventualne uloge dodatnih faktora, bio bi eksperiment sa genskom zamenom, dizajniran tako da se iz hromozoma *M. zionensis* duplim rekombinacionim događajem, sa specifično pripremljenim plazmidom, deletira samo sekvenca P2 promotora.

Treba svakako podsetiti na jednu još nediskutovanu činjenicu. Naime, kloniranjem i određivanjem relativne jačine promotora dobijeno je da *S. lividans*-pl6XP2P1 soj poseduje nivo rezistencije dva puta veći od prostog zbirnog doprinosa P1 i P2 promotara. Moguće objašnjenje ovog fenomena može biti najpre u tome što pl6XP2P1 i nije prost zbir sekvenci jednog i drugog promotora nego ima još uzvodnih sekvenci (pogledati strategiju konstruisanja) za koje je kompjuterska analiza pokazala da sadrži otvorene okvire citanja. Za jednog od njih je, opet kompjuterskom analizom, utvrđeno da ima strukturni arazman nazvan "helix-turn-helix" motiv, koji je odgovoran za prepoznavanje DNK (podaci nisu prikazani). Pored toga njegova sekvenca je značajno homologa većem broju regulatornih molekula aktinomiceta. Uz prihvatanje pretpostavke da naznačeni ORF zaista kodira regulatorni protein koji bi delovao kao transkripcioni aktivator P2 i/ili P1 promotora, nije tesko objasniti povećanu rezistenciju *S. lividans*-pl6XP2P1 soja. Pored toga, stoji na raspolaganju još jedno alternativno objašnjenje. Ono se lako zapaza kad se detaljnije pogleda shema koja prikazuje strategiju subkloniranja promotora (Slika 3). Dakle, povećana rezistencija kada je u pitanju transformant sa pl6XP2P1 plazmidom mogla bi da bude jednostavno rezultat povećane stabilnosti hibridne iRNK koja se sintetise sa P2 promotora i u slučaju ovog konstrukta sadrži sekvencu P1 promotora i samog *sgm* gena do *Bgl*II restrikcionog mesta. Transkript sa P2 promotora u slučaju pl6P2 konstrukta pre samog neomicinskog gena sadrži daleko manje nukleotida. Ako je ova pretpostavka tačna onda bi uklanjanje sekvence uzvodno od P2 promotora u pl6P2P1 bilo bez vidnog efekta na nivo rezistencije. Time bi se definitivno pokazalo da uzvodni ORF ne kodira relevantni aktivator, i u sustini potvrdilo da je P2 promotor ne četiri već devet puta jači od P1 promotora.

Iako su mnoge karakteristike P2 promotora još nedovoljno verifikovane, vidi se da je on potencijalno koristan za ekspresiju kloniranih gena u *M. zionensis*, za vreme kada se produkuje antibiotik (G-52). Tako bi

kloniranjem gena koji kodiraju enzime iz biosintetskog puta za slican antibiotik i njihovom ekspresijom pod P2 promotorom bi mogao da se dobije novi antibiotik. Ako je P2 promotor vremenski regulisan i u *M. melanospora* onda bi imao jos vecu upotrebnu vrednost jer bi mogao da posluži za konstruisanje vremenski regulisanog ekspresionog sistema i u ovoj bakteriji koja ne proizvodi antibiotike i za koju je razvijen efikasan sistem za transformaciju (Kojic *et al.* 1991).

Jasno je da, precizno odredjivanje stepena regulacije ekspresije *sgm* gena i njegove eventualne koregulacije sa biosintetskim genima zahteva intenzivna istrazivanja. Neophodan preduslov iscrpne analize je sigurno razvijanje transformacije *M. zionensis* protoplasta. Rigorozna potvrda pojedinih hipoteza, iznetih u dosadasnjem delu diskusije, podrazumeva i *in vitro* eksperimente. Ova istrazivanja prirodno bi trebalo da se prosire i na izucavanje samih biosintetskih gena u cemu se za njihovu izolaciju moze kao specificka proba koristiti klonirani *sgm* gen.

2. TRANSLACIONA REGULACIJA EKSPRESIJE *sgm* GENA

Kao sto je u uvodnom delu ovog rada delimicno eksplicirano, svaka specificka molekularno-bioloska situacija (zasnovana na aktivnosti produkata odredjenih gena) namece i specifikan nacin regulacije i medjusobnu igru manjeg ili veceg broja ucesnika. Sto se tice specifickosti *sgm* gena ona je vec naglasena. Pre svega, za ovaj deo diskusije je vazna cinjenica da on kodira enzim koji u odnosu na kolicinu supstrata (tj. rRNK) moze sa relativno malim brojem molekula da izvrši kompletnu modifikaciju. Prema tome, vec sama ova cinjenica moze da sugerira svrsishodnost regulacije ekspresije *sgm* gena. Medjutim, sam ovaj podatak ne daje nikakvo obavestenje kojim bi to mehanizmom regulacija ovog gena bila ostvarivana. Pored toga zapazena je jos jedna cinjenica koja je bila od neposrednijeg znacaja. U nasim eksperimentalnim uslovima nije bila moguca detekcija sinteze Sgm proteina u *E. coli* mini-celijama i *In vitro* sistemu koriscenjem pUC19 plazmida (tj. ekspresijom *sgm* gena pod *lacZ* promotorom), niti postizanje overprodukcije ovog proteina pod kontrolom snaznog (P_{L1}) promotora, uprkos cinjenici da je uvek dobijana modifikacija ribozoma, odnosno korektan Gm^f fenotip (podaci nisu prikazani). Ovi podaci su bili od velikog znacaja jer su implicirali mogucnost autoregulacije ekspresije *sgm* gena. Naime, cinjenica da izolovana sekvenca *sgm* gena u heterologom sistemu, gde su redukovane sve eventualne interakcije koje koegzistiraju u homologom genetskom i biohemijskom kontekstu, pokazuje kontrolu ekspresije, omogucila je ogranicenje mogucih mehanizama i usmerila dalja istrazivanja. Svakako, iz navedenih cinjenica se najubedljivije nametala hipoteza o autoregulaciji *sgm* gena. Medjutim i sama hipoteza o autoregulaciji ima u okviru sebe bar tri alternative (Poglavlje: Uvod).

Nakon formulisanja ovih hipoteza, postavilo se pitanje njihove eksperimentalne razrade. Opredefljenje je bilo za konstrukciju genskih i

operonskih *sgm-lacZ* fuzija. Možda nije izlišno odmah napomenuti da je opredeljenje za konstruisanje operonske fuzije, a ne testiranje količine iRNK kod transformanata sa pF6 i pF6S2, opravdanije iz razloga što represivno delovanje na nivou inicijacije translacije dovodi do brze degradacije mesenzera. To bi u ispitivanom slučaju dovelo do pogresnog zaključka da se radi o transkripcionoj regulaciji. Serija eksperimenata sa genskim i operonskim *sgm-lacZ* fuzijama dala je rezultate iz kojih se može zaključiti da Sgm protein vrši autoregulaciju sopstvene sinteze delujući samo kao translacioni represor. Ovaj zaključak je nesumnjiv. Međutim, pre nego se pređe na detaljniju diskusiju ovog fenomena bilo bi poželjno podsetiti da regulacija *sgm* gena treba da se posmatra u kontekstu činjenice da je ovaj gen izolovan iz proizvođača antibiotika i da je najverovatnije član operona za biosintezu antibiotika. Pojedine činjenice do kojih se doslo ovim radom drugacije se razumeju ako se *sgm* gen posmatra kao izolovan entitet.

Zbog toga bi se na samom početku moglo postaviti pitanje izbora domaćina i vektora u analizi *sgm-lacZ* fuzija. Što se tiče izbora domaćina razlog je vrlo jednostavan. On leži u činjenici da je arsenal tehnika primenljivih za *E. coli*, a koje omogućuju mnogobrojne pristupe u analizi pojedinih gena, gotovo u potpunosti nerazvijen za mikromonospore. Naime, još uvek nije razvijena ni transformacija *M. zionensis* protoplasta. Pored toga, ako je u pitanju autoregulacija na translacionom nivou, što je u sustini pravilno i anticipirano bas iz eksperimenata sa *E. coli*, onda pitanje domaćina nije neposredno relevantno. Zbog svoje prirode, ova regulacija mora zasigurno funkcionisati u svim sistemima u kojima je obezbedjena ekspresija autoregulisueg gena. Nemogućnost dobijanja detektabilne količine Sgm proteina u *in vitro* sistemu je očigledan pokazatelj da ova regulacija funkcionise bez ucesca specijalnih dodatnih faktora. Međutim, dobijeni rezultati (znacajna represija genske i zanemarljivo mala represija operonske *sgm-lacZ* fuzije), ipak ne dopustaju mogućnost da se sa apsolutnom sigurnoscu tvrdi da i u ishodnom soju translaciona represija funkcionise kao jedini model regulacije *sgm* gena. Naime, utvrđeno je za sistem kod koga jedan te isti produkt vrši autoregulaciju na transkripcionom i translacionom nivou, da za autoregulaciju na transkripcionom nivou je neophodno potreban dodatni celijski faktor (Lindahl *et al.* 1989; Zengel and Lindahl 1990). Prema tome, realno je i očekivati da ako uopšte i postoji autoregulacija *sgm* gena na transkripcionom nivou, da bude neispoljena u heterologom sistemu kakav je *E. coli*. Pored toga dužina dela iRNK koji prethodi RBS-u *sgm* gena je mnogo veća kada transkripcija startuje sa P_Ltl promotora. To svakako utice na strukturu eventualne lider sekvence, a zna se da je intaktnost ove strukture krucijalno vazna za mehanizme kontrole genske ekspresije. Prema tome tvrdnja, koju dopustaju eksperimenti sa *E. coli*, da je *sgm* gen isključivo translaciono autoregulisan, je, za sada, samo vrlo verovatna. Njena verovatnost bice tretirana i kasnije u diskusiji.

Buduci da ekspresija *sgm* gena u *E. coli* zavisi od transkripcionih signala ove bakterije pri konstrukcijama *sgm-lacZ* fuzija ovaj gen je pozicioniran uvek nizvodno i u smeru transkripcije sa P_Ltl promotora. U ovom sistemu smo zeleli da maksimiziramo gensku ekspresiju kako bi što preciznije kvantifikovali eventualno auto-represivno dejstvo Sgm proteina. Pokazalo se da *sgm* gen ima vrlo izrazenu autoregulatornu ulogu. Naime, jedna kopija *sgm* gena u *cis* konstelaciji vrši represiju β-galaktozidazne aktivnosti

na 5%. (Napomenimo usput da ta cinjenica objasjava nemogucnost dobijanja overprodukcije Sgm produkta). Efekat je istoznacac, ali ne i u numerickom smislu, kada se *sgm* ekspirira u *in trans* poziciji. Moguce objasnjenje manje izrasenog (ali jos uvek visokog) represivnog delovanja Sgm produkta (pad na 28,5%), verovatno lezi u cinjenici da se u ovom slucaju njegova ekspresija vrsi sa slabijeg (*kan*) promotora. Ovde je pogodno spomenuti da se konstrukti sa inaktiviranim *sgm* genom u *in cis* i *in trans* poziciji ponasaju u obrnutom smislu. Promena β -galaktozidazne aktivnosti u odnosu na kontrolni soj je daleko veća u slucaju kada je *sgm* gen u *in trans* poziciji, odnosno kad se ekspirira sa slabijeg promotora. Na osnovu kompletnih rezultata jasno je da za ovaj fenomen nije odgovoran skraceni Sgm produkt jer bi inace odnos bio u istoj srazmeri kao i za kompletne Sgm produkte. Korisno je podsetiti da pF6K4 obezbedjuje ~3 puta vecu β -galaktozidaznu aktivnost u odnosu na pF6. Moguce je da se to desava zbog transkripcione aktivnosti *kan* gena koji se nalazi u istoj orijentaciji. Na osnovu toga jedno od objasnjenja za smanjenje β -galaktozidazne aktivnosti u pF6K4S4XB6 u odnosu na kontrolni soj (pF6K4) bi uzrok videlo u delimicnom smanjenju (12,2%) transkripcione aktivnosti sa P_Ltl promotora zbog ugradnje *sgm* gena izmedju *kan* i P_Ltl promotora. Medjutim, o cemu se zapravo radi ne moze se sa preciznoscu reci bez da se konstruise i ispita ista konstelacija sa genskom fuzijom *lacZ* i nekog drugog (nesrodnog) gena. Obrnuto, ugradnja nekog DNK fragmenta priblizne duzine *sgm* genu, ne zadovoljava proveru. Na kraju, strogo govoreci, same ove cinjenice, kao i cinjenica da operonska fuzija ima visi nivo ekspresije od genske su sporedne, irelevantne za fenomen koji je u fokusu ovog rada. Zbog toga su sira razmatranja u vezi sa njima sustinski nebitna.

Ono sto je od neposrednijeg znacaja je razmatranje autoregulatornog dejstva Sgm proteina u kontekstu njegovog ishodnog genetskog okruzenja. Naime, vec je vise puta naglasena potreba da se fenomeni vezani za regulaciju *sgm* gena posmatraju u odnosu na njegovu specifcnu ulogu. Buduci da je Sgm produkt transmetilaza, koja se konstitutivno ekspirira, i da je za efikasno obavljanje njene funkcije u celiji potrebno prisustvo malog broja molekula ovog enzima, sasvim je razumljivo da on ima autoregulaciju. Prema tome, *sgm* gen bi kontrolisao nivo sopstvene sinteze represijom translacije putem vezivanja vec sintetisanog produkta za sopstvenu iRNK. Prepoznavanje i vezivanje za 16S rRNK je verovatno efikasnije nego za sopstvenu iRNK tako da je translacija reprimirana samo u slucaju kad su sve 16S rRNK metilovane. Sposobnost da se na jedinstvenom molekulu objedini kataliticka (enzimska) i regulatorna funkcija je konstatovana za veci broj enzima koji imaju ovaj tip regulacije (van Gemen *et al.* 1989; Denoya *et al.* 1986; Breidt and Dubnau 1990; Springer *et al.* 1986; Springer *et al.* 1989). Podesno je sada istaci da je faktor smanjenja ekspresije usled autorepresije Sgm produktom vrlo znacajan (20X). Ova cinjenica dobija jos veci znacaj ako se podseti da *sgm* gen ima pored konstitutivne ekspresije sa slabog (P1) promotora i verovatnu, vremenski regulisanu, ekspresiju sa jakog (P2) promotora. Imajuci u vidu samu ulogu Sgm gena, ovakva situacija bi bila necelishodna. Medjutim, posto je sasvim verovatno da se transkripcija sa P2 promotora prolongira i na nizvodne (biosintetske) gene postaje ocigledna celishodnost i polozaja i transkripcione i translacione regulacije. Naime, uprkos tome sto se povecava kolicina iRNK koja sadrzi kodirajuci deo za Sgm protein, usled vrlo izrasene autorepresije,

ne dolazi do nagomilavanja nepotrebne količine njegovog produkta u celiji. Dakle, čini se da posebnu očiglednost postojanju autoregulacije daje činjenica da *sgm* gen ima jaku transkripciju sa P2 promotora. Pri tome translacija nizvodnih gena koji su transkripciono ujedinjeni, verovatno nije povezana sa translacijom samog *sgm* gena. Dodatna pogodnost ovakvog sistema leži u činjenici da uvek postoji raspoloživa kopija transkribovane *sgm* sekvence koja se može, u slučaju potrebe, dereprimirati. Kompletiranjem ove slike postaje očiglednije zašto se *sgm* gen između mogućih mehanizama "opredelio" za translacionu autoregulaciju. Naime, ako bi *sgm* gen u konstelaciji koju smo anticipirali imao transkripcionu regulaciju onda bi njegovim autoregulatornim delovanjem bili kontrolisani i nivoi ekspresije svih gena koji se nalaze nizvodno na policistronskoj iRNK. Time bi ekspresija nizvodnih (biosintetskih) gena bila determinisana celijskom potrebom za Sgm produktom, što je u sustini nelogično jer se zna da vrlo mala količina Sgm proteina može da ostvari njegovu funkciju. Podsetimo, da je pojava produkata nizvodnih gena verovatno vremenski regulisana na transkripcionom nivou. U svakom slučaju, tek dalja istraživanja bi trebalo da pokazu da li je, i do koje mere, predloženi model validan.

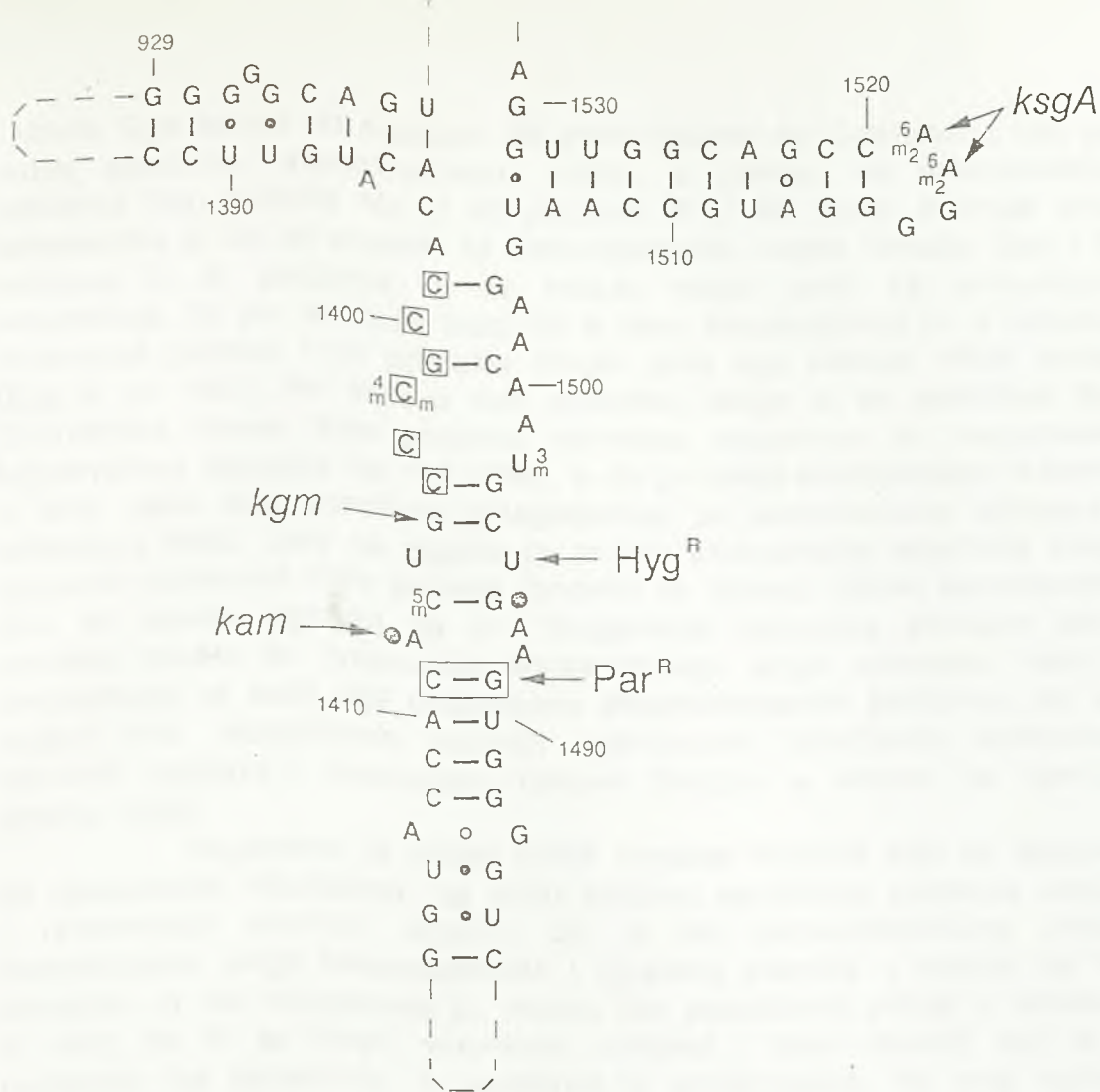
Ukazivanja koja su izložena, stimulisu razmatranja u filogenetskom smislu. Nepotrebno je napominjati koliko bi za razumevanje distribucije gena za rezistenciju i biosintezu antibiotika bilo značajno uporediti regulatorne mehanizme za gene homologe *sgm* genu (*grm*, *kgm*), kao i njihove operonske pozicije. Iz oskudnih podataka koji su za sada na raspolaganju moglo bi se zaključiti da, po nukleotidnoj sekvenci najhomologiji gen (~90%) *grm*, nema isti model regulacije. Naime, u istim eksperimentalnim uslovima (tj. *E. coli* mini-celijama) pri kojima nije bila moguća detekcija sinteze Sgm proteina, dobijena je uspešna produkcija Grm produkta (rezultati nisu prikazani). Sasvim je verovatno da je *grm* regulisan, ali je sa filogenetskog stanovišta vrlo značajna različitost njegove regulacije u odnosu na vrlo homologe *sgm* gen. Pored toga što *grm* gen iz *M. purpurea* nema regulaciju na translacionom nivou, potrebno je ovde napomenuti da *grm* gen ima i drugacije transkripcione signale. Ovaj gen ima samo jedan promotor koji inicira transkripciju na samo 11 bp od ATG kodona. Prema tome on nema ni izraženu uzvodnu sekvencu (od RBS-a) kao *sgm* gen. Međutim, jasno je da se cvrsci zaključci ne mogu donositi bez obimnijih analiza. U svakom slučaju postojanje ili nepostojanje autoregulacije može se testirati po principu koji je razradjen za *sgm* gen. Povezanost autoregulacije sa specifičnim "lider" sekvencama za svaki gen ponaosob, moglo bi biti testirano pravljenjem hibridnih konstrukata. Za sada je, uprkos malom broju podataka, ipak dopusten zaključak da je hipoteza po kojoj su geni za rezistenciju, zajedno sa genima za biosintezu, dobijeni od zajedničke predacke forme, a da je svaki proizvođač razvio svoje specifične regulatorne elemente, sasvim verovatna.

Merenje aktivnosti β-galaktozidaze u *E. coli* NM522 koja nosi različite *sgm-lacZ* fuzije omogućilo nam je nepobitnu konstataciju da je *sgm* gen autoregulisan. Kao i u slučaju drugih gena koji su translaciono autoregulisani, i ovde se postavlja pitanje kako jedan te isti protein može da izvršava "osnovnu" funkciju i da funkcionise kao represor sopstvene sinteze. Za neke od autoregulatornih gena je sekvenciranjem i poredjenjem sekvenci pokazano da region iRNK koji je uključen u autoregulaciju formira strukturu koja

zapanjuje oponasa (molekularna mimikrija) ciljnu strukturu kojom je i definisana ulogu odredjenog gena (Nomura *et al.* 1980; Grundy and Henkin1991; Grundy and Henkin1992; van Gemen *et al.* 1989; Denoya *et al.*1986; Springer *et al.* 1989). Ova poredjenja i "footprint" eksterimenti su sugerirali precizan mehanizam regulacije. Posto mesta vezivanja u okviru iRNK ukljucuju translacione regulatorne elemente (RBS, AUG) vezani autoregulatorni proteini sprecavaju vezivanje ribozoma i inicijaciju sinteze proteina. Prema tome, postavlja se pitanje koja je to strukturalna slicnost izmedju 16S rRNK i operativnog mesta na iRNK *sgm* gena koja omogucuje RNK-protein interakciju i samim tim autoregulaciju. Ono sto posebno otezava analizu kod *sgm* gena je cinjenica da se ne zna ni tacno mesto delovanja ove transmetilaze. Ipak, buduci da se zna da ona metiluje samo vec konstituisane 30S ribozomalne subjedinice, a ne slobodnu 16S rRNK ili 70S ribozome, moglo bi se pretpostaviti da je za ovo prepoznavanje pre odgovorna odredjena sekvenca nukleotida nego izvesna sekundarna struktura. Pretrazivanje iRNK *sgm* gena od 5'-kraja nizvodno do *Bgl*II restriktivnog mesta otkrilo je dve medjusobno izmenljive strukture ukosnice iza RBS-a i jedan heksanukleotid koji se nalazi 14 bp ispred RBS-a (Slika 11 B). Naznaceni heksanukleotid ima identicnu sekvencu u C-1400 regionu 16S rRNK, tj. u regionu gde se ostvaruje delovanje 16S rRNK metilaza. Znacaj pojedinih od ovih struktura tek treba da se odredi.

Slozenost delovanja Sgm proteina se jos vise povecava (a i tumacenje rezultata) kada se u vec opisanoj slici ukljuci i podatak o represivnom delovanju C-terminalnog dela proteina. Ono sto odmah treba uciniti jasnim jeste cinjenica da, zbog odsustva pretpostavljenih regulatornih sekvenci, ovaj deo Sgm proteina nema mogucnost da sam sebe reprimira. U tom svetlu treba posmatrati nivo njegovog represivnog delovanja. Medjutim, uprkos tome sasvim je jasno da tog delovanja ne bi bilo da ne postoji sposobnost ovog skracenog proteina da prepozna regulatornu sekvencu. Ovaj podatak, ukomponovan sa cinjenicom da i prva trecina proteina nezavisno moze da vrsi odredjeni stepen represije (pad na 33,1%; pF6S2BB3), daje mogucnost da se iz ovih preliminarnih rezultata otvori novi prostor za dalju spekulaciju, odnosno pokusaj objasnjenja dobijenih rezultata i naravno kasniju eksperimentalnu potvrdu. Naime, na osnovu ove dve cinjenice, moguće je postaviti novu hipotezu koja pretpostavlja domensku strukturu Sgm proteina gde bi razliciti domeni bili odgovorni za prepoznavanje 16S rRNK i sopstvene iRNK. Drugim recima, mozda, Sgm protein imajući dva "lica" moze precizno da testira status 16S rRNK i istovremeno prepoznajući iRNK, vrsi represiju sopstvene translacije. U ovom modelu bi se dalje moglo spekulirati da u situaciji kada 16S rRNK nije metilovana, dolazi do katalitickog angazovanja Sgm proteina cime se oslobadja njegova iRNK za translaciju. Hipoteza, naravno, nije narocito detaljna, ali ukazuje na jedan vrlo atraktivan model precizne genske regulacije, koji sigurno zavredjuje dalje razvijanje i testiranje.

U svetlu navedenih eksperimentalnih rezultata treba napomenuti da je indikativno, ako skraceni protein zaista prepoznaje regulatorne sekvence, da se to prepoznavanje vrsi delom Sgm proteina koji mu je uporedjen sa produktima slicnih gena ekstremno konzervativan.



B



Slika 11. A. Pozicije modifikovanih ili mutiranih nukleotida u okviru 16S rRNK odgovornih za rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike. (*) nukleotidi zasticeni aminoglikozidima od delovanja hemijskim agensima. Sekundarna struktura 16S rRNK je preuzeta od Cunningham *et al.* 1993. B. 5' kraj iRNK *sgm* gena. RBS-mesto vezivanja ribozoma; Met-translacioni start kodon. Sekvenca identicna na iRNK *sgm* gena i u okviru 16S rRNK je prikazana uokvirenim nukleotidima. Nukleotidi koji mogu da grade sekundarne strukture u u okviru iRNK *sgm* gena su oznaceni strelicama.

Naime, Sgm protein od poslednje 93 amino kiseline na C-terminusu, ima samo jednu specifičnu aminokiselinsku razliku u odnosu na aminokiselinsku sekvencu Grm proteina bilo iz *M. purpurea* ili iz *M. rosea*. S druge strane, interesantno je da od ukupnih 19 aminokiselinskih razlika između Sgm i Grm metilaze iz *M. purpurea*, 5 se nalaze među prvih 15 aminokiselina N-terminusa. Uz put se može istaći da je veća konzerviranost C- u odnosu na N-terminus poznata i za produkte drugih gena koji kodiraju rRNK metilaze (Epp et al. 1987). Na osnovu ovih podataka, moglo bi se spekulirati da je C-terminalni domen Sgm proteina, verovatno odgovoran za prepoznavanje konzervativne sekvence na 16S rRNK, a da je manje konzervativan N-terminus u stvari takav zbog specifične prilagodjenosti za prepoznavanje sekvence na sopstvenoj iRNK. Iako se zapaza da je ovo pridruživanje određene funkcije pojedinim domenima Sgm proteina izvršeno na osnovu njihove konzerviranosti. Čini se sasvim logičnim da bi filogenetski očuvanija struktura jednog proteina trebalo da prepozna konzervativniju target sekvencu. Iako ova pretpostavka za sada nije potkrepljena eksperimentalnim podacima, nju je u sustini vrlo jednostavno testirati pravljjenjem određenih kombinacija hibridnih metilaza i testiranjem njihove funkcije u odnosu na *sgm-lacZ* gensku fuziju.

Nepotrebno je isticati koliko pojedine hipoteze koje su zasnovane na dosadašnjim rezultatima, za svoju potpunu verifikaciju potrebuju detaljnih i raznovrsnih analiza. Sigurno da je od najneposrednijeg značaja determinisanje uloge heksanukleotida i njegovog položaja u odnosu na RBS sekvencu. *In vivo* mutagenaza bi, možda, bila produktivniji pristup u odnosu na *in vitro*, jer bi se mogli, verovatno, izolovati i takvi mutanti koji bi bili rezistentni na gentamicin, a neefikasni u autoregulaciji. Na ovaj način bi istraživanje bilo prošireno i na strukturno-regulatorne domene samog Sgm proteina. Usmeren pristup bi za sada bio moguć samo u odnosu na heksanukleotid. Što se tiče samog Sgm proteina, njegovi funkcionalni domeni nisu poznati, a u ovom radu učinjeni su tek početni napor da se grubo lociraju domeni relevantni za funkciju prepoznavanja target sekvence bitne za ispoljavanje njegove autoregulatorne uloge. Međutim, izolovanje i analiza dereprimiranih mutanta različitih fenotipskih klasa u odnosu na stepen derepresije i rezistenciju na gentamicin, poslužili bi kao dragocena baza podataka za postepeno upoznavanje strukture Sgm proteina. Najvažniji momenat u izolovanju mutanata svakako je sistem za njihovu selekciju. U ovom radu opisana je konstrukcija serije *sgm-lacZ* fuzija, od kojih neke mogu da posluže kao target za mutagenazu. Pogodnost njihovog korišćenja pre svega leži u mogućnosti za selekciju željenog fenotipa korišćenjem neke od mnogobrojnih indikatorskih podloga koje mogu da detektuju razliku u nivou ekspresije *lacZ* gena.

3. REZISTENCIJA NA HIGROMICIN B

Eksperimenti čije razmatranje sledi govore o ekspresiji *sgm* gena u heterologim sojevima različite srodnosti u odnosu na ishodni soj *M. zionensis* i trebali su da pokazu da li je rezistencija ovog soja na higromicin B bitno vezana sa ekspresijom *sgm* gena.

Kao što je već naglaseno dobijen je iznenadjujuci rezultat. Od svih ispitivanih aktinomiceta jedino *M. melanospora-sgm* klon pokazuje (kao i *M. zionensis*) pored rezistencije na gentamicin, isti nivo rezistencije na higromicin B. Iz rezultata ovog eksperimenta postalo je očigledno da je visok nivo rezistencije na higromicin B zaista determinisan *sgm* genom, ali da je izrazajnost ove rezistencije zavisna od soja u kome se *sgm* gen ekspirira, odnosno da je od svih testiranih sojeva ogranicena samo na mikromonospore. Ovaj podatak sugerira zakljucak da svi sojevi mikromonospora koji proizvode antibiotike slicne gentamicinu, poseduju identican model rezistencije na higromicin. Dalje je iz ovoga jasno da mikromonospore poseduju odredjenu specifičnost u gradnji male subjedinice ribozoma koja je najverovatnije konzervirana medju svim sojevima ovog roda.

Pitanje koje se svakako nameće je pitanje relevantne razlike izmedju mikromonospora i drugih aktinomiceta, a koja je odgovorna za ispoljavanje rezistencije na higromicin B. Posebno otežava diskusiju cinjenica da se ne zna ni sekvenca 16S rRNK mikromonospora ni tacno mesto delovanja Sgm metilaze. Medjutim, iako tacno mesto delovanja Sgm metilaze nije utvrdjeno, cinjenica da se njenom aktivnoscu obezbedjuje rezistencija u *M. zionensis*, *S. lividans* i *E. coli* navodi na zakljucak da se radi o nekom filogenetski konzerviranom mestu, a koje je bitno za funkciju ribozoma. Kod proizvodjaca aminoglikozida, antibiotika koji indukuju povećano gresenje u translaciji ("misreading"), utvrdjeno je da se rezistencija postize modifikacijama u konzervativnom 3' regionu 16S RNK. Za ovaj region je pokazano da sadrzi modifikovane nukleotide (razlicito rasporedjene kod razlicitih organizama) i da može da interaguje sa iRNK ili tRNK te da na neki nacín učestvuje u procesu prepoznavanja kodona i antikodona. Zbog toga je realno pretpostviti da aminoglikozidi ostvaruju svoje delovanje, dovodeci do povećanog gresenja u transkripciji tako što se vezuju za ovaj region. Znacaj pojedinih nukleotida u okviru ovog regiona 16S RNK može se videti iz sledećih primera. Tako, samozastita proizvodjaca se ostvaruje modifikacijom G-1405 i/ili A-1408, pri čemu se postize rezistencija na kanamicin+gentamicin odnosno kanamicin+apramicin. Interesantno je da nijedna od ovih modifikacija ne daje rezistenciju na neomicin (antibiotik od 4 prstena), mada metilacija adenina na poziciji 1408 dovodi do rezistencije na slicne antibiotike, neamin (prsten 1 i 2) i ribostamicin (prstenovi 1 do 3) (Skeggs *et al.* 1987). Da bi se dobila rezistencija na neomicin (ili paromomicin) potrebno je ukinuti sparivanje 1409 i 1491 baznog para kojim pocinje 82 nukleotida duga petlja (Slika 11 A). Mesto-dirigovanom mutagenezom bilo kog od ova dva nukleotida dolazi do rezistencije na neomicin-paromomicinsku grupu aminoglikozida, ali ne i na higromicin B (Li *et al.* 1982; Spangler and Blackburn, 1985). Ono što je od neposrednijeg znacaja za ovu diskusiju je cinjenica da je rezistencija na

higromicin B dobijena tranzicijom (U u C) u 17S rRNK (*Tetrahymena thermofila*) na poziciji koja je ekvivalentna U-1495 u 16S rRNK *E. coli* (Spangler and Blackburn,1985). Ovi rezultati su ukazali da aminoglikozidi ostvaruju bitan kontakt sa 16S rRNK u domenu od 1400-1500-og nukleotida, sto je potvrđeno i eksperimentima protekcije ovog regiona aminoglikozidima na delovanje reagensima (dimetil sulfat, ketoksal) i enzimima (kolicin E3). Interesantno je da, iako metilacija adenina 1408 na poziciji N1, ne dovodi do rezistencije na gentamicin, ovaj antibiotik stiti N1 atom A-1408 od delovanja dimetil sulfata (Moazed and Noller, 1987). Imajuci u vidu sve ove cinjenice, veoma je interesantno desifrovati mesto delovanja Sgm metilaze i sekvencirati 16S rRNK mikromonospora jer bi to bio preduslov razumevanju prirode rezistencije na higromicin, a svakako i doprinos kompletiranju funkcionalne slike ovog vrlo znacajnog regiona 16S rRNK.

Za sada ne postoji dovoljno podataka na osnovu kojih bi se precizno razresilo pitanje higromicinske rezistencije, ali je sasvim ocigledno da njeno ispoljavanje zavisi od soja u kome se *sgm* ekspirira. Moze se spekulirati da je rezistencija na higromicin B rezultat razlicite strukture 16S rRNK kod mikromonospora, tako da metilacija na jedinstvenom mestu samo kod njih dovodi do ispoljavanja ovog fenotipa. Buduci da se mutacijom U-1495 kod *Tetrahymena thermofila* dobija rezistencija na higromicin (Spangler and Blackburn,1985) izazovno je zakljuciti da se U-1495 region u mikromonosporama razlikuje od istog regiona u drugim aktinomicetama. Nalazi se da je ova razlika od jos veceg znacaja ako se podseti da je ovo filogenetski vrlo konzerviran region. U svakom slucaju, metilacija jednog nukleotida u okviru 16S rRNK mikromonospora, zbog drugacijeg konteksta U-1495 regiona, dovodi do rezistencije na gentamicin i na higromicin B. Da bi se gornja tvrdnja lakse razumela, mora se pri razmatranju imati u vidu cinjenica da je region u okviru koga se modifikacijom pojedinih nukleotida ostvaruje rezistencija na aminoglikozide je, prema modelu sekundarne strukture 16S rRNK, blisko lociran U-1495 regionu. Ustvari, prema najnovijim istrazivanjima koja su postulirala interakcije nukleotida u okviru tercijarne strukture 16S rRNK, naznaceni regioni bi bili jedan naspram drugog (Cunningham *et al.* 1993).

Usvajanjem pretpostavke o odredjenoj razlici u 16S rRNK, a koja bi bila odgovorna za ispoljavanje rezistencije na higromicin B, moglo bi se predloziti jedno alternativno objasnjenje. Naime moguće je da relevantna razlika u sekvenci odredjenog regiona kod mikromonospora, u odnosu na druge aktinomicete, u stvari dovodi, kod ovih bakterija, do metilacije na razlicitim mestima. Prema tome, kao primarna posledica razlicite sekvence, bilo bi razlicito mesto delovanja Sgm metilaze, a tek sekundarno bi se to odrazilo na ispoljavanje higromicinske rezistencije. U svakom slucaju takva razlika je filogenetski konzervirana u rodu mikromonospora. U tom kontekstu bi bilo znacajno sekvencirati relevantni region 16S rRNK veceg broja vrsta ovog roda. Dodatna potvrda pretpostavci da je razlika u strukturi 16S rRNK mikromonospora konzervirana mogla bi biti ispitana transformacijom sojeva koji proizvode antibiotike nesrodne gentamicinu i koji su senzitivni na njega.

V. ZAKLJUCCI

Na osnovu rezultata iznetih u ovom radu mogu se izvesti sledeci zakljucci:

1. Analiza pocetka transkripcije *sgm* gena pokazuje da ovaj gen ima slozenu transkripcionu regulaciju koja podrazumeva produkciju alternativnih transkripata sa P1 i P2 promotora. Inicijacija transkripcije sa P1 se desava 72 bazna para, a sa P2 promotora oko 250 nukleotida uzvodno od translacionog start kodona. Pokazano je da je P2 promotor cetiri puta jaci od P1 promotora.

2. Konstruisana je i okarakterisana serija plazmida sa transkripcionim i translacionim *sgm-lacZ* fuzijama. Transformanti sa translacionom fuzijom, koji imaju i ekstra kopiju *sgm* gena bilo u *cis* ili u *trans* poziciji, pokazuju izrazit pad β -galaktozidazne aktivnosti. U slicnim eksperimentima sa transkripcionim fuzijama nije uocen znacajan efekat ekstra kopije *sgm* gena. Ovi rezultati su pokazali da je ekspresija *sgm* gena autoregulisana translacionom represijom, najverovatnije zbog vezivanja metilaze za sopstvenu iRNK. Prema tome, Sgm protein na jedinstvenom molekulu objedinjuje kataliticka (enzimska) i regulatorna svojstva.

3. Utvrđeno je da je visok nivo rezistencije na higromicin B kod *M. zionensis* zaista determinisan *sgm* genom, ali da je ispoljavanje ove rezistencije zavisno od soja u kome se *sgm* gen eksprimira, odnosno da je najverovatnije ogranicena samo na mikromonospore. Prema tome, veoma je moguće da mikromonospore poseduju odredjenu specificnost u gradnji male subjedinice ribozoma, koja je najverovatnije konzervirana medju svim sojevima ovog roda.

VI LITERATURA

- Amster-Choder, O., Houman, F., Wright, A. (1989) Protein phosphorylation regulates transcription of the β -glucoside utilization operon in *E. coli*. *Cell* 58, 847-855
- Argoudelis, A. D. , Coates, J. H. , Mizsak, S. A. (1977). Microbial transformation of antibiotics: clindamycin ribonucleotides. *J. Antibiot.* 24,206-208
- Ballesta, J. P. G., Cundliffe, E. (1991) Site-specific methylation of 16S rRNA caused by *pct*, a pactamycin resistance determinant from the producing organism, *Streptomyces pactum*. *J. Bacteriol.* 173, 7213-7218
- Baughman, G., Nomura, M., (1983) Localization of the target site for translational regulation of the L11 operon and direct evidence for translational coupling in *Escherichia coli*. *Cell* 34: 979-988
- Baughman, G., Gourse, R., Nomura, M., (1984) Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 75-117
- Baum, E. Z. , Love, S. F. , Rothstein, D. M. (1988). Temporally regulated tandem promoters in *Micromonospora echinospora*. *J. Bacteriol.* 170, 71-77
- Baylis, H. A., Bibb, M. J. (1988) Transcriptional analysis of the 16S rRNA gene of the *rrnD* gene set of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 2, 569-579
- Beauclerk, A. A. D. , Cundliffe, E. (1987). Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides. *J. Mol. Biol.* 193, 661-671
- Berdy, J. , Jarai, M. (1986). *Micromonospora* produced aminoglycoside antibiotics: chemistry and microbiology. *Process Biochem.* Jun, 93-100
- Bibb, M. J. , Janssen, G. R. , Ward, J. M. (1986) Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin-resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus* . *Gene* 41, 357- 368
- Binnie, C. , Warren, M. , Butler, M. J. (1989). Cloning and heterologous expression in *Streptomyces lividans* of *Streptomyces rimosus* genes involved in oxytetracycline biosynthesis. *J. Bacteriol.* 171, 887-895
- Birmingham, V. A. , Cox, K. L. , Larson, J. L. , Fishman, S. E. , Hershberger, C. L. , Seno, E. T. (1986). Cloning and expression of a tylosin resistance gene from a tylosin-producing strain of *Streptomyces fradiae* . *Mol. Gen. Genet.* 204, 532-539
- de Boer, H. A., Kastelein, R. A. (1986) Biased codon usage: an exploration of its role in optimization of translation. In: Reznicoff, W., Gold, L. (eds), *Maximizing gene expression*. Butterworth, Stoneham, MA, p 225-285
- Bonekamp, F., Andersen, H. D., Christensen, T., Jensen, K. F. (1985) Codon-defined ribosomal pausing in *Escherichia coli* detected by using

- the *pyrE* attenuator to probe coupling between transcription and translation. *Nucleic Acids Res* 13, 4113-4123
- Botsford, J. L., Harman, J.G. (1992) Cyclic AMP in procaryotes. *Microbiol. Rev.* 56, 100-122
- Braun, R., Wright, A. (1986) DNA methylation differentially enhances the expression of one of the two *E. coli dnaA* promoters *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Gen. Genet.* 202, 246-250
- Breidt, F., Dubnau, D. (1990) Identification of *cis*-acting sequences required for translational autoregulation of the *ermC* methylase. *J. Bacteriol.* 172, 3661-3668
- Brent, R., Ptashne, M. (1981). Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4204-4208
- Brown, K. L., Wood, S., Buttner. M. J., (1992) Isolation and characterisation of the major vegetative RNA polymerase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): renaturation of sigma subunit using GroEL. *Mol. Microbiol.* 6, 1133-1139
- Butler, M. J., Friend, E. J., Hunter, I. S., Kaczmarek, F. S., Sugden, D. A., Warren, M. (1989) Molecular cloning of resistance genes and architecture of a linked gene cluster involved in biosynthesis of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. *Mol. Gen. Genet.* 215, 231-238
- Buttner, M. J. (1989) RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 3, 1653-1139
- Buttner, M. J., Chater, K. F., Bibb, M. J. (1990) Cloning, disruption and transcriptional analysis of three RNA polymerase sigma factor genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 172, 3367-3378
- Buttner, M. J., Lewis, C. G. (1992) Construction and characterization of *Streptomyces coelicolor* A3(2) mutants that are multiply deficient in the nonessential *hrd*-encoded RNA polymerase sigma factors. *J. Bacterol.* 174, 5165-5167.
- Calcutt, J. M. , Cundliffe, E. (1990). Cloning of a lincosamide resistance determinant from *Streptomyces caelestis*, the producer of celesticetin, and characterization of the resistance mechanism. *J. Bacteriol.* 172, 4710-4714
- Carter, P. W., Bartkus, J. M., Calvo, J. M. (1986) Transcription attenuation in *Salmonella typhimurium*: the significance of rare leucine codons in the *leu* leader. *Proc. Acad. Sci. USA* 83, 8127-8131
- Chater, K. F., Bruton, C. J., Plaskitt, K. A., Buttner, M. J., Mendez, C., Helmann, J. D. (1989) The developmental fate of *S. coelicolor* hyphae depends upon a gene product homologous with the motility factor of *B. subtilis*. *Cell* 59, 133-143
- Chater, K. F. (1990). The improving prospects for yield increase by genetic engineering in antibiotic-producing Streptomycetes. *Bio/technology* 8, 115-121
- Collado-vides, J., Magasanik, B., Gralla, J.D. (1991) Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 55, 371-394
- Cramer, R. , Davies, J. E. (1986). Increased production of aminoglycosides associated with amplified antibiotic resistance genes. *J. Antibiot.* 39, 128-135

- Cundliffe, E. (1978). Mechanism of resistance to thiostrepton in producing-organism *Streptomyces azureus*. *Nature* 272, 792-795
- Cundliffe, E. and Thompson, J. (1979). Ribose methylation and resistance to thiostrepton. *Nature*, 278, 859-861
- Cundliffe, E. (1984). Self defence in antibiotic-producing organisms. *Br Med. Bull.* 40, 61-67
- Cundliffe, E. (1989 a). How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 207-233
- Cundliffe, E. (1989 b). Methylation of RNA and resistance to antibiotics. *Handbook of experimental pharmacology*, Vol. 91, 226-248
- Cunningham, P. R., Nurse, K., Weitzmann, C. J., Ofengand, J. (1993) Functional effects of base changes which further define the decoding center of *Escherichia coli* 16S rRNA: Mutation of C1404, G1405, C1496, G1497, and U1498. *Biochemistry* 32, 7172-7180
- Dairi, T., Ohta, T., Hashimoto, E., Hasegawa, M. (1992) Organization and nature of fortimicin A (astromicin) biosynthetic genes studied using a cosmid library of *Micromonospora olivasterospora* DNA. *Mol Gen Genet* 236, 39-48
- Davies, J., Houk, C., Yagisawa, M., White, T. J. (1979) Occurrence and function of aminoglycoside-modifying enzymes. In *Genetics of industrial microorganisms*, ed. Sebek, O. K., Laskin, A. J. pp66-69
- Demain, A. L. (1974). How do antibiotic-producing micro-organisms avoid suicide? *Ann. NY Acad. Sci.* 235, 601-612
- Denoya, C. D., Bechhofer, D. H., Dubnau, D. (1986) Translational autoregulation of *ermC* 23 rRNK methyltransferase expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 168, 1133-1141
- Distler, J., Mansouri, K., Pissowotzki, K., Stockmann, M., Pipersberg, W. (1987) Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of tree genes and analysis of transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.* 15, 8041-8056
- Doyle, D., McDowall, K. J., Butler, M. J., Hunter, I. S. (1991) Characterization of an oxytetracycline-resistance gene, *otrA*, of *Streptomyces rimosus*. *Mol. Microbiol.* 5, 2923-2933
- Epp, J. E. , Burgett, S. G. , Schoner, B. E. (1987). Cloning and nucleotide sequence of a carbomycin-resistance gene from *Streptomyces thermotolerans*. *Gene* 53, 73-83
- Fernandez-Moreno, M. A., Caballero, J. L., Hopwood, D. A., Malpartida, F. (1991) The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell*, 66, 769-780
- Freedman, L. P., Zengel, J. M., Archer, R. H., Lindahl, L. (1987) Autogenous control of the S10 ribosomal protein operon of *Escherichia coli*: genetic dissection of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6516-6520
- van Gemen, B., Twisk, J., van Knippenberg P. H. (1989) Autogenous regulation of the *Escherichia coli* *ksgA* gene at the level of translation. *J. Bacteriol.* 171, 4002-4008
- Goldberg, S. L. , Romero, J. G. , Yashwant, D. M. (1990). Cloning and characterization of sisomycin-resistance gene from *Micromonospora inyoensis* . *J. Antibiot.* 43, 992-999

- Goodrich, J. A., McClure, W. R. (1991) Competing promoters in prokaryotic transcription. *TIBS* 16, 394-397
- Graham, M. Y. and Weisblum, B. (1979). 23S ribosomal ribonucleic acid of macrolide-producing streptomycetes contains methylated adenine. *J. Bacteriol* 137, 1464-1467
- Gralla, J. D. (1989) Bacterial gene regulation from distant DNA sites. *Cell* 57, 193-195
- Grossman, R. G., Erickson, J. W., Gross, C. A. (1984) The *htpR* gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters. *Cell* 38, 383-390
- Grundy, F. J., Henkin, T. M. (1991) The *rpsD* gene, encoding ribosomal protein S4, is autogenously regulated in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 173, 4595-4602
- Grundy, F. J., Henkin, T. M. (1992) Characterization of the *Bacillus subtilis rpsD* regulatory target site. *J. Bacteriol.* 174, 6763-6770
- Hara, O., Beppu, T. (1982) Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus*-the role of A-factor. *J. Antibiot.* 35, 349-358
- Harms, E., Umbarger, H. E. (1987). Role of codon choice in the leader region of the *ilvGMEDA* operon of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 169, 5668-5677
- Hengge-Aronis, R. (1993) Survival of hunger and stress: The role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* 72, 165-168
- Hirschman, J., Wong, P. K., Sei, K., Keener, J., Goldberg, R. B., Hanau, R. (1985) Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription in vitro: evidence that the *ntrA* product is a sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7525-7529.
- Holmes, D. J., Cundliffe, E. (1991). Analysis of ribosomal RNA methylase gene from *Streptomyces tenebrarius* which confers resistance to gentamicin. *Mol. Gen. Genet.* 229, 229-237
- Holmes, D. J. , Drocourt, D. , Tiraby, G. , Cundliffe, E. (1991). Cloning of aminoglycoside-resistance-encoding gene, *kamC*, from *Saccharopolyspora hirsuta* : comparison with *kamB* from *Streptomyces tenebrarius*. *Gene* 102, 19-26
- Hoopes, B. C., McClure, W.R. (1987) Strategies in regulation of transcription initiation. 1231-1240. In Neidhart, F., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umbarger, E.H. (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*-cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington D. C.
- Hopwood, D. A. , Bibb, J. M. , Chater K. F. , Kieser, T. , Bruton, C. J. , Kieser, H. M. , Lydiate, J. D. , Smiith, C.P. , Ward J. M. , Schrempf, H. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual. Norwich, UK, The John Innes Foundation.
- Horii, T., Ogawa, T., Nakatani, T., Hase, T., Matsubara, H., Ogawa, H. (1981) Regulation of SOS functions: purification of *E. coli* *lexA* protein and determination of its specific site cleaved by the *recA* protein. *Cell* 27, 515-522
- Horinouchi, S., Weisblum, B. (1981) The control region for erythromycin resistance: free energy changes related to induction and mutation

- to constitutive expression. *Mol. Gen. Genet.* 182, 341-348
- Hotta, K. , Yamamoto, H. , Okami, Y. , Umezawa, H. (1981). Resistance mechanisms of kanamycin-, neomycin-, and streptomycin-producing streptomycetes to aminoglycoside antibiotics. *J. Antibiot.* 34, 1175-1182
- Houman, F., Dias-Torres, M. R., Wright, A. (1990) Transcriptional antitermination in the *bgl* operon of *E.coli* is modulated by specific RNA binding protein. *Cell* 62, 1153-1163
- Hue, K. K., Bechhofer, D. H. (1992) Regulation of the Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B resistance gene *ermD*. *J. Bacteriol.* 174, 5860-5868
- Janssen, G. R. , Bibb. M. J. (1990). Tandem promoters, *tsrp1* and *tsrp2*, direct transcription of the thiostrepton resistance gene (*tsr*) of *Streptomyces azureus*: Transcriptional initiation from *tsrp2* occurs after deletion of the -35 region. *Mol. Gen. Genet.* 221, 339-346
- Janssen, G. R., Ward, J. M., Bibb. M. J. (1989) Unusual transcriptional and translational features of the aminoglycoside phosphotransferase gene (*aph*) from *Streptomyces fradiae* *Genes Dev* 3, 415-429
- Jenkins, G. , Zalacain, M. , Cundliffe, E. (1989). Inducible ribosomal RNA methylation in *Streptomyces lividans* conferring resistance to lincomycin. *J. Gen. Microbiol.* 135, 3281-3288
- Kamimiya, S. , Weisblum, B. (1988). Translational attenuation control of *ermSF* , and inducible resistance determinant encoding rRNA N-methyltransferase from *Streptomyces fradiae* . *J. Bacteriol.* 170, 1800-1811
- Katz, E. , Thompson, C. J. , Hopwood, D. A. (1983). Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2703-2714
- Kawamoto, I. (1989). Genus *Micromonospora*.. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* vol. 4, 2442-2450. The Williams and Wilkins Co., Baltimor, Hong Kong, London, Sydney
- Keeratipibul. S., Sugiyama, M., Nomi, R. (1983) Mechanism of resistance to streptothricin of a producing microorganism. *Biotechnol. Lett.* 5, 441-446
- Kelemen, H. G. , Cundliffe, E. , Financsek, I. (1991). Cloning and characterization of gentamicin-resistance genes from *Micromonospora purpurea* and *Micromonospora rosea*. *Gene.* 98, 53-60
- Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of cccDNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 12, 19-36.
- Kojic, M. (1991) Kloniranje i karakterizacija gena za rezistenciju na gentamicin bakterije *Micromonospora zionensis*. Magistarski rad. Univerzitet u Beogradu
- Kojic, M. , Topisirovic, L. , Vasiljevic, B. , (1991). Efficient transformation of *Micromonospora melanosporea* protoplasts by *Streptomyces* plasmid. *Curent Microbiol.* 23, 343-345
- Kojic, M. , Topisirovic, L. , Vasiljevic, B. , (1992). Cloning and characterization of an aminoglycoside resistance determinant from *Micromonospora zionensis*. *J. Bacteriol.* 174, 7868-7872

- Konstantinovic, M., Maksimovic, V., Nikcevic, G., Glisin, V. (1991) Hybrid PLtI promoter with dual regulation control. *DNA Cell Biology* 10, 389-395
- Kormanec, J., Farkasovsky, M. (1993) Differential expression of principal sigma factor homologues of *Streptomyces aureofaciens* correlates with the developmental stage. *Nucleic Acids Res.* 21, 3647-3652
- Kustu, S., Santero, E., Keener, J., Popham, D., Weiss, D. (1989) Expression of (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol. Rev.* 53, 367-376
- Kustu, S., North, A. K., Weiss, D. S. (1991) Prokaryotic transcriptional enhancers and enhancer-binding proteins, *TIBS* 16, 397-402
- Kwak, J-H., Choi, E-C., Weisblum, B. (1991) Transcriptional attenuation control of *ermK*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinant from *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 173, 4725-4735
- Lange, R., Hengge-Aronis, R. (1991) Identification of central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5, 49-59
- Lazinski, D., Grzadzielska, E., Das, A. (1989) Sequence-specific recognition of RNA hairpins by bacteriophage antiterminators requires a conserved arginine-rich motif. *Cell* 59, 207-218
- Leboul, J. , Davies, J. (1982). Enzymatic modification of hygromycin B in *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Antibiot.* 35, 527-528
- Leskiw, B. K., Bibb, M. J., Chater, K. F. (1991a) The use of rare codon specifically during development? *Mol. Microbiol.* 5, 2861-2867
- Leskiw, B. K., Lawlor, E. J., Fernandez-Abalos, J. M., Chater, K. F. (1991b) TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental, antibiotic-negative, *Streptomyces* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2461-2465
- Leskiw, B. K., Mah, R., Lawlor, E. J., Chater, K. F. (1993) Accumulation of *bldA*-specified tRNA is temporally regulated in *Streptomyces coelicolor* A3(2) *J Bacteriol.* 175, 1995-2005
- Li, M. , Tzagoloff, A. , Underbrink-Lyon, K. , Martin, N. C. (1982). Identification of the paramomycin-resistance mutation in the 15S rRNA gene of yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257, 5921-5928
- Lin, L-S., Rothestein, D. M. (1992) *Micromonospora* RNA polymerase activity changes during stationary phase. *J Gen Microbiol.* 138, 1881-1885
- Lindahl, L., Archer, R. H., McCormick, J. R., Freedman, L. P., Zengel, J. M. (1989) Translational coupling of the two proximal genes in the S10 ribosomal protein operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, 2639-2645
- Lonetto, M., Gribskov, M., Gross, C. A. (1992) The σ^{70} family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.* 174, 3843-3849
- Lopez-Cabrera, M. ,Perez-Gonzalez, J. A. , Heinzl, P. , Piepersberg, W. , Jimenez, A. (1989). Isolation and nucleotide sequencing of an aminocyclitol acetyltransferase gene from *Streptomyces rimosus* forma *paramomycinus*. *J. Bacteriol.* 171, 321-328
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Neulands, J. B. (1988) pCON4 and pCON5 : improved plasmid vectors to study bacterial promoters. *FEMS Microbiol. Lett.* 50, 17-23

- Lovett, P. S. (1990). Translational attenuation as the regulator of inducible *cat* gene. *J. Bacteriol.* 172, 1-6
- McClure, W. R. (1985) Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 171-204
- Mahadevan, S., Wright, A. (1987) A bacterial gene involved in transcription antitermination: regulation at a rho-independent terminator in the *bgl* operon of *E. coli*. *Cell* 50, 485-494.
- Maloy, S., Stewart, V. (1993) Autogenous regulation of gene expression. *J. Bacteriol.* 175, 307-316
- Matkovic, B. , Piendl, S. , Bock, A. (1984) Ribosomal resistance as widespread self-defence mechanism in aminoglycoside-producing *Micromonospora* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 24, 273-276
- Matkovic, B. , Topisirovic, Lj. (1986). Molekularni mehanizmi rezistencije bakterija na antibiotike. *Genetika*, 18, 75-86
- Matsushashi, Y. , Murakami, T. , Nojiri, C. , Toyama, H. , Anzai, H. , Nagaoka, K. (1985). Mechanisms of aminoglycoside-resistance of *Streptomyces* harbouring resistant genes obtained from antibiotic-producers. *J. Antibiot.* 38, 279-282
- Martin, J. F., Demain A. L. (1980) Control of antibiotic synthesis. *Microbiol Rev.* 44, 230-252
- Mayford, M., Weisblum, B. (1989) Conformational alternations in the *ermC* transcript *in vivo* during induction. *EMBO J.* 9, 4307-4313
- Miller, J. (1972) Experiments in molecular genetics (Cold Spring Harbor Laboratory) Cold Spring Harbour, NY. p 433
- Miyake, K., Horinouchi, S., Yoshida, M., Chiba, N., Mori, K., Nogawa, N., Morikawa, N., Beppu, T. (1989) Detection and properties of A-factor-binding protein from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 171, 4298-4302
- Miyake, K., Kuzuyama, T., Horinouchi, S., Beppu, T., (1990) The A-faktor-binding protein of *Streptomyces griseus* negatively controls streptomycin production and sporulation. *J. Bacteriol.* 172, 3003-3008
- Moazed, D., Noller, H. F. (1987) Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature*, 327, 389-394
- Mosher, R. H. , Ranade, N. P. , Schrempf, H. , Vining, L. C. (1990). Chloramphenicol resistance in *Streptomyces* : cloning and characterization of a chloramphenicol hydrolase gene from *Streptomyces venezuelae*. *J. Gen. Microbiol.* 136, 293-301
- Mulvey, M. R., Loewen, P. C., (1989) Nucleotide sequence of *katF* of *Escherichia coli* suggests *KatF* protein is a novel transkription faktor. *Nucl. Acids Res.* 17, 9979-9991
- Nakano, M. M. , Mashiko, H. , Ogawara, H. (1984) Cloning of kanamycin resistance gene from a kanamycin-producing *Streptomyces* species. *J. Bacteriol.* 157,79-83
- Navre, M., Schachman, H. K. (1983) Synthesis of aspartate transcarbamylase in *Escherichia coli*: transcriptional regulation of the *pyrB-pyrI* operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1207-1211
- Neal, R. J., Chater, K. F. 1987. Nucleotide sequence analysis reveals similarities between proteins determining methylenomycin A resistance in *Streptomyces* and tetracycline resistance in

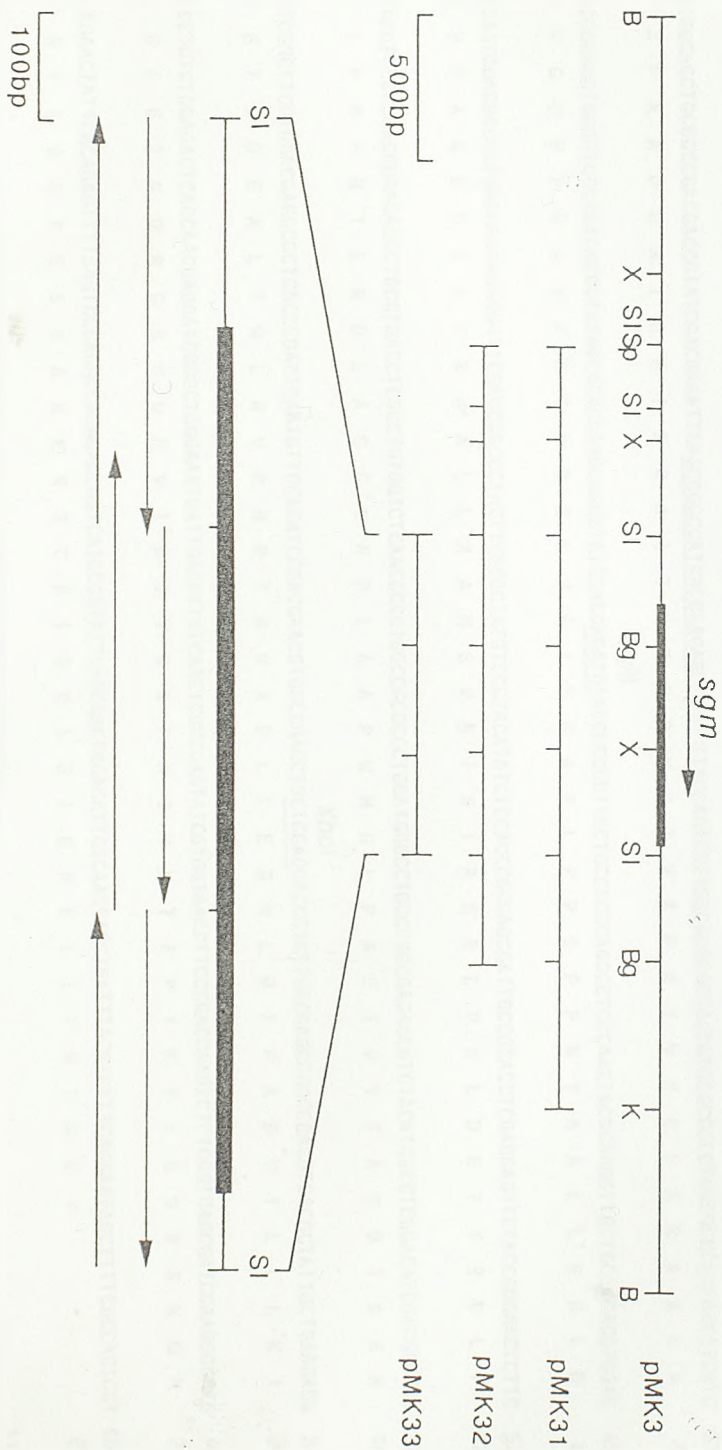
- eubacteria. Gene 58, 229-241
- Neal, R. J. , Chater, K. F. (1991). Bidirectional promoter and terminator regions bracket *mmr*, a resistance gene embedded in the *Streptomyces coelicolor* A3(2) gene cluster encoding methylenomycin production. Gene 100, 75-83
- Nomura, M., Yates, J., Dean, D., Post, L. (1980) Feedback regulation of ribosomal protein gene expression in *Escherichia coli*: structural homology of ribosomal RNA and ribosomal protein mRNA. Proc. Nat. Acad. Sci. 77, 7084-7088
- O'Halloran, T. V., Frantz, B., Shin, M. K., Ralston, D. M., Wright, J. G. (1989) The MerR heavy metal receptor mediates positive activation in a topologically novel transcription complex. Cell 56, 119-129
- Ohnuki, T. , Imanaka, T. , Aiba, S. (1985a). Self cloning in *Streptomyces griseus* of an *str* gene cluster for streptomycin biosynthesis and streptomycin resistance. J. Bacteriol. 164, 85-94
- Ohnuki, T., Katoh, T., Imanka, T., Aiba, S. (1985b) Molecular cloning of tetracycline resistance genes from *Streptomyces rimosus* in *Streptomyces lividans* and characterization of cloned genes. J. Bacteriol. 161, 1010-1016
- Ohta, T., Dairi, T., Hasegawa, M. 1993. Characterization of two different types of resistance genes among producers of fortimicin-group antibiotics. J Gen. Microbiol. 139, 591-599
- Ohta, T., Hasegawa, M. 1993. Analysis of the self-defense gene (*fmrO*) of fortimicin A (astromicin) producer *Micromonospora olivasterospora*: comparison with other aminoglycoside-resistance-encoding genes. Gene 127, 63-69
- Pardo, J. M. , Malpartida, F. , Rico, M. , Jimenez, A. (1985) Biochemical basis of resistance to hygromycin B in *Streptomyces hygroscopicus*-the producing organism. J. Gen. Microbiol. 131, 1289-1298
- Passador, L., Linn, T. (1989) Autogenous regulation of the RNA polymerase β subunit of *Escherichia coli* occurs at the translational level *in vivo*. J. Bacteriol. 171, 6234-6242
- Pedersen, S. (1984) *Escherichia coli* ribosomes translate *in vivo* with variable rate. EMBO J. 3, 2895-2898
- Perez-Gonzalez, J. A. , Lopez-Cabrera, M. , Pardo, J. M. , Jimenez, A. (1989) Biochemical characterization of two cloned resistance determinants encoding a paramomycin acetyltransferase and a paramomycin phosphotransferase from *Streptomyces rimosus* forma *paramomycinus*. J. Bacteriol. 171, 329-334
- Piendl, S. , Bock, A. (1982) Ribosomal resistance in the gentamicin producer organism *Micromonospora purpurea* . Antimicrob. Agents Chemother. 22, 231-236
- Piendl, S. , Bock, A. , Cundliffe, E. (1984) Involvement of 16S ribosomal RNA in resistance of the aminoglycoside-producers *Streptomyces tenjimariensis*, *Streptomyces tenebrarius* and *Micromonospora purpurea* . Mol. Gen. Genet. 197, 24-29
- Piwowski, J. M. , Shaw, P. D. (1979). Streptomycin resistance in a streptomycin-producing microorganism. Antimicrob. Agents Chemother. 16, 179-182

- Raibaud, O., Schwartz, M. (1984) Positive control of transcription initiation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.* 18,173-206
- Reynes, J. P. , Calmels, T. , Drocourt, D. , Tiraby, G. (1988). Cloning, exspression in *Escherichia coli* and nucleotide sequence of a tetracycline-resistance gene from *Streptomyces rimosus*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 585-598
- Roberts, J. W. (1988) Phage lambda and the regulation of transcription termination. *Cell* 52, 5-6
- Roberts, J. W., Hoopes, B. C., McClure, W. R., Kleckner, N. (1985) IS10 transposition is regulated by DNA adenine methylation. *Cell.* 43, 917-920.
- Roland, K. L., Powel, F. E. Turnbough, C. L. Jr. (1985) Role of translation and attenuation in the control of *pyrBI* operon expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 163, 991-999
- Roland, K. L., Chongguang, L., Turnbough, C.L., Jr. (1988) Role of the ribosome suppressing transcriptional termination at the *pyrBI* attenuator of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7149-7153
- Rosteck, P. R., Reynolds, P. A., Hershberger, C. L. (1991) Homology between proteins controlling *Streptomyces fradiae* tylosin resistance and ATP-binding transport. *Gene* 102, 27-32
- Salauze, D. , Perez-Gonzalez, J. A. , Piepersberg, W. , Davies, J. (1991). Characterisation of aminoglycoside acetyltransferase-encoding genes of neomycin-producing *Micromonospora chalcea* and *Streptomyces fradiae*. *Gene* 101, 143-148
- Sanger, F. , Nicklen, S. , Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467
- Sasse-Dwight, S., Gralla, J. D. (1990) Role of eukaryotic-type functional domains found in the prokaryotic enhancer receptor factor σ^{54} . *Cell* 62, 945-954
- Sauer, R. T., Krovatin, J., DeAnda, P., Youderian, P., Susskind, M. M. (1983). Primary structure of the *imm1* immunity region of bacteriophage P22. *J. Mol. Biol.* 168, 699-713
- Schnetz, K., Toloczyki, C., Rak, B. (1987) β -glucoside (*bgl*) operon of *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence, genetic organization, and possible evolutionary relationship to regulatory components of two *Bacillus subtilis* genes. *J. Bacteriol.* 169, 2579-2590
- Schnetz, K., Rak, B. (1988) Regulation of the *bgl* operon of *Escherichia coli* by transcriptional antitermination. *EMBO J.* 7, 3271-3277
- Shapira, S. K., Chou, J., Richaud, F. V., Casadaban, M. J. (1983) New versatile plasmid vectors for expression of hybrid proteins coded by a cloned gene fused to *lacZ* gene sequence encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of β -galactosidase *Gene* 25, 71-82
- Shaw, W. V. , Hopwood, D. A. (1976). Chloramphenicol acetylation in *Streptomyces*. *J. Gen. Microbiol.* 94, 159-166
- Shen, P., Zengel, J. M., Lindahl, L. (1988) Secondary structure of the leader transcript from the *Escherichia coli* S10 ribosomal protein operon. *Nucleic Acids Res.* 16, 8905-8924
- Shiina T., Tanaka, K., Takahashi, H. (1992) Sequence of *hrdB*, an essential gene encoding sigma-like transcription factor of *Streptomyces*

- coelicolor* A3(2): homology to principle sigma factors. Gene 107, 145-148
- Silhavy, T. J., Beckwith, J. R. (1985) Uses of *lac* fusions for the study of biological problems. Microbiol Rev 49, 398-418
- Skeggs, P. A. , Thompson, J. , Cundliffe, E. (1985). Methylation of 16S RNA and resistance to aminoglycoside antibiotics in clones of *Streptomyces lividans* carrying DNA from *Streptomyces tenjimariensis* . Mol. Gen. Genet. 200, 415-421
- Skeggs, P. A. , Holmes, D. J. , Cundliffe, E. (1987). Cloning of aminoglycoside-resistance determinants from *Streptomyces tenebrarius* and comparison with related genes from other actinomycetes. J. Gen. Microbiol. 133, 915-923
- Skinner, H. R. and Cundliffe, E. (1980). Resistance to the antibiotics viomycin and capreomycin in the *Streptomyces* species which produce them. J. Gen. Microbiol. 120, 95-104
- Skinner, H. R. and Cundliffe, E. (1982). Dimethylation of adenine and the resistance *Streptomyces erythraeus* to erythromycin. J. Gen. Microbiol. 128, 2411-2416
- Skinner, R., Cundliffe, E., Schmidt J. F. (1983). Site of action of ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics. J. Biol. Chem. 258, 12702-12706
- Spangler, E. A. , Blackburn, E. H. (1985). The nucleotide sequence of the 17S ribosomal RNA gene of *Tetrahymena thermophila* and the identification of point mutations resulting in resistance to the antibiotics paromomycin and hygromycin. J. Biol. Chem. 260, 6334-6340
- Springer, M., Graffe, M., Butler, J., Grundberg-Manago, M. (1986) Genetic definition of the translational operator of the treonyl-tRNA synthetase gene in *E. coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4384-4388
- Springer, M., Graffe, M., Dondon, J., Grundberg-Manago, M. (1989) tRNK-like structures and gene regulation at the translational level: a case of molecular mimicry in *Escherichia coli*. EMBO J. 8, 2417-2424
- Stock, J. B., Ninfa, A.J., Stock, A.M. (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiol. Rev. 53,450-490
- Sugiyama, M., Paik, S. Y., Nomi, R. (1985) Mechanism of self-protection in a puromycin-producing microorganism. J. Gen. Microbiol. 131, 1999-2005
- Sugiyama, M., Takeda, A., Paik, S. Y., Nimi, O., Nomi, R. (1986) Acetylation of blasticidin S by its producing actinomycetes. J. Antibiot. 39, 827-832
- Tan, H., Chater, K. F. (1993) Two developmentally controlled promoters of *Streptomyces coelicolor* A3(2) that resemble the major class of motility-related promoters in other bacteria. J. Bacteriol. 175, 933-940
- Tanaka, K., Shiina T., Takahashi, H. (1988) Multiple principle sigma factor homologous in eubacteria: identification of the "*rpoD* box" Science 242, 1040-1042
- Tanaka, K., Shiina T., Takahashi, H. (1991) Nucleotide sequence of genes

- hrdA*, *hrdC* and *hrdD* from *Streptomyces coelicolor* A3(2) having similarity to *ropD* genes. Mol. Gen. Genet. 229: 334-340
- Thiara, S. A. , Cundliffe, E. (1988). Cloning and characterization of a DNA gyrase B gene from *Streptomyces spheroides* that confers resistance to novobiocin. EMBO J. 7, 2255-2259
- Thiara, S. A. , Cundliffe, E. (1989). Interplay of novobiocin-resistant and -sensitive DNA gyrase activities in self-protection of the novobiocin producer, *Streptomyces spheroides* . Gene 81, 65-72
- Thompson, J. C., Ward, M. J., Hopwood A.D. (1980). DNA cloning in *Streptomyces* : resistance genes from antibiotic- producing species. Nature, 286, 525-527
- Thompson, J. C., Skinner, H. R., Thompson, J., Ward, M. J., Hopwood A.D, Cundliffe, E. (1982). Biochemical characterization of resistance determinants cloned from antibiotic- producing streptomycetes. J. Bacteriol. 151, 678-685
- Thompson, J. C., Ward, M. J., Hopwood A.D. (1982 b). Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in streptomycetes. J. Bacteriol. 151, 668-677
- Thompson, J. , Schmidt F. J. , Cundliffe, E. (1982). Site of action of a ribosomal RNA methylase conferring to thiostrepton. J. Biol. Chem. 257, 7915-7917
- Uchiyama, H. , Weisblum, B. (1985). N-Methyl transferase of *Streptomyces erythreus* that confers resistance to the macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics: amino acid sequence and its homology to cognate R-factor enzymes from pathogenic bacilli and cocci. Gene 38, 103-110
- Vara, J. , Malpartida, F. , Hopwood, D. A. , Jimenez, A. (1985 a) Cloning and expression of a puromycin N-acetyl transferase gene from *Streptomyces alboniger* in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. Gene 33,197-206
- Vara, J. , Perez-Gonzalez, J. A. , Jimenez, A. (1985 b). Biosynthesis of puromycin by *Streptomyces alboniger* : characterization of puromycin N-acetyltransferase. Biochemistry 24, 8074-8081
- Vara, J. A. , Pulido, D. , Lacalle, R. A. , Jimenez, A. (1988). Two genes in *Streptomyces alboniger* puromycin biosynthesis pathway are closely linked. Gene 69, 135-140
- Varenne, S., Buc, J., Loubes, R., Lazdunski, C. (1984) Translation is a non-uniform process. Effect of RNA availability on the rate of elongation of nascent polypeptide chains. J. Mol. Biol. 180, 549-576
- Vasiljevic, B. , Cundliffe, E. (1990). Cloning of *grm*, a gentamicin resistance gene from *Micromonospora purpurea*. J. Cell. Biochem. 14A, 12
- Vilches, C., Hernandez, C., Mendez, C., Salas, J. A. (1992) Role of glycosylation and deglycosylation in biosynthesis of and resistance to oleandomycin in producer organism, *Streptomyces antibioticus*. J. Bacteriol. 174, 161-165
- Vujaklija, D., Horinouchi, S., Beppu, T. (1993) Detection of an A-factor-responsive protein that binds to the upstream activation sequence of *strR*, a regulatory gene for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. J. Bacteriol. 175, 2652-2661

- Vujaklija, D., Ueda, K., Hong, S.-K., Beppu, T., Horinouchi, S., (1991) Identification of an A-factor-dependent promoter in the streptomycin biosynthesis gene cluster of *Streptomyces griseus*. *Mol. Gen. Genet.* 229, 119-128
- Wagman, G. H., Weinstein, M. J. (1980). Antibiotics from *Micromonospora*. *Ann. Rev. Microbiol.* 34, 537-557
- Ward, M. J., Janssen, G. R., Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Bibb, M. J. (1986) Construction and characterisation of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator. *Mol Gen Genet.* 203, 468-478
- Wikstrom, P. M., Bjork, G. R. (1988) Noncoordinate translational-level regulation of ribosomal and nonribosomal protein genes in the *Escherichia coli trmD* operon. *J. Bacteriol.* 170, 3025-3031
- Yamamoto, H. , Hotta, K. , Okami, Y. , Umezawa, H. (1982) Mechanism of resistance to aminoglycoside antibiotics in nebramicin-producing *Streptomyces tenebrarius*, *J. Antibiot.* 35, 1020-1025
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1984). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33, 103-119
- Yanofsky, C., Kolter, R., (1982) Attenuation in amino acid biosynthetic operons. *Ann. Rev. Genetics* 16, 113-134
- Zalacain, M. , Gonzales, A. , Guerrero, M. C. , Mattaliano, R. J. , Malpartida, F. F., Jimenez, A. (1986). Nucleotide sequence of the hygromycin B phosphotransferase gene from *Streptomyces hygrosopicus*. *Nucleic Acids Res.* 14, 1565-1581
- Zalacain, M. and Cundliffe, E. (1989). Methylation of 23S rRNA caused by *tlrA* (*ermSF*), a tylosin resistance determinant from *Streptomyces fradiae* . *J Bacteriol.* 171, 4254-4260
- Zalacain, M. and Cundliffe, E. (1990). Methylation of 23S rRNA due to *carB*, an antibiotic-resistance determinant from the carbomycin producer, *Streptomyces thermotolerans*. *Eur. J. Biochem.* 189, 67-72
- Zalacain, M. and Cundliffe, E. (1991) Cloning of *tlrD*, a forth resistance gene, from the tylosin producer, *Streptomyces fradiae* . *Gene* 97, 137-142
- Zengel, J. M., Lindahl, L., (1990) Ribosomal protein L4 stimulates *in vitro* termination of transcription at a NusA-dependent terminator in the S10 operon leader. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2675-2679
- Zengel, J. M., Lindahl, L. (1992) Ribosomal protein L4 and transcription factor NusA have separable roles in mediating termination of transcription within the leader of the S10 operon of *Escherichia coli*. *Genes and Dev.* 6, 2655-2662
- Zuber, P., Healy, Losick, R. (1987) Effects of plasmid propagation of a sporulation promoter on promoter utilization and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 169, 461-469



Slika 12. Restrikciona mapa i strategija subkloniranja i sekvenciranja *sgm* gena. Crni pravougaonici predstavljaju kodirajući region *sgm* gena, a strelica na vrhu slike označava smer transkripcije. B, BamHI; Bg, BglII; K, KpnI; S1, SalI; Sp, SphI; X, XhoI.

TCGACGTGCMAAAGCGCCCAAGACGGGCTTGCAGACAGGCCGACCAATATGGACGTGACTGTGTTGGTGTGGGGCCGCCCTGGCCCGC
 94
 RBS
 TCGTAATACCCCTGTAACTCTTGGTAGACGMAAGCAGCACTTTGGTGTGGATCGGTTGGCCGGCGAAGCGAATTACCCGGTTGCGCCGCCATTGATGACCTTTGGAGGACCGC
 214
 *
 ATGACGGCACCITGGGGCCGACGACCGGTATCGACGACATTGAGCGGGCCATCACCMAAGAGGCGGTTTACCAGAGCGTGGGGCCGCCACCCTGGCCGCCCTGCTCTGTC
 334
 M T A P A A D D R I D E I E R A I T K S R R Y Q T V A P A T V R R L A R A A L V 40
 BgIII
 GCGCGGGGGGTGAGTGGCCGACGGGTGAAGCGCACCAGCGGGGTCTGCACGAGATCTACCGGGCCCTCTCTGGCCGCCAGCCCTCCAACTACGCAAGCTTGGTGGCCACTGGAC
 454
 A A R G D V P D A V K R T K R G L H E I Y G A F L P P S P P N Y A A L L R H L D 80
 TCGGCAGTGAAGCGCGGTGACGACGAGCGGTTGAGCGGGCCCTACTTGGCGTATGTCGTACATATCTCCACCCGCGAGCGAATGCGCACTCGAGAGTTCTACCGGGAACCTTTC
 574
 S A V D A G D D E A V R A A L L R A M S V H I S T R E R L P H L D E F Y R E L F 120
 CGGCACCTCCCGCCGACCGAACCCTGGCTGACCTCGCCCTGTGGTCTCAACCCCTGGCCGCCCTGGATGGGCTGGCCCGCGAGACCGTCTACATCGCCCTCGGACATGACCGCCGC
 694
 R H L P R P N T L R D L A C G L N P L A A P W M G L P A E T V Y I A S D I D A R 160
 XhoI
 CTGCTCGGCTTGTGGACGAGGCCCTGACCCGACTCAATGTTCCACATCGGACGAGCCTGGCCGACTGCTCGAGGACCGCTTGGACGAGCGGGCCGACGCTCAGGCTATTGGCTGAAGACG
 814
 L V G F V D E A L T R L N V P H R T N V A D L L E D R L D E P A D V T L L L K T 200
 CTGCCCTGTCTGGAGACTCAGCAACGAGGATGGGGCTGGGAAGTGAATTGACATTTGCACTCGCCGAATATCGTGAACCTTCCGACCAAGTCTCTGGGTCAAGGATCGAAGGGGATG
 934
 L P C L E T Q Q R G S G W E V I D I V N S P N I V V T F P T K S L G Q R S K G M 240
 TTTGAGAACTATTACAGAGTTTTGAGTCCCAAGGCCAAGAGAGCGGTCATGCCGATTCAGCGACTGGAGATTGGCAACGAGCTGATTAAGTCAATTCAGAAATAGCTTTTCGCCACTCT
 1054
 F Q N Y S Q S F E S Q A R E R S C R I Q R L E I G N E L I Y V I Q K < 274
 CGGGAGAAATCGAGCGAGTGTGCGGTCTTCCGCTAACCCCTTTTTCACCAACGACTACGTGAC
 1122

Slika 13. Nukleotidna sekvenca *SaII*. *SaII* restrikcionog fragmenta i dedukovana amino kiselineška sekvenca Sgm proteina. Mesto otpocinjanja transkripcije sa P1 promotora je oznaceno zvezdicom. Mesto vezivanja ribozoma (RBS) je oznaceno, a region komplementaran oligonukleotidu (24-mer) koji je koriscen za odredjivanje starta transkripcije *sgm* gena je podvucen.



